



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/82

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 326 307 1
(31) 165,667
305,566

(22) 06.03.89
(32) 08.03.88
03.02.89

(44) 17.10.90
(33) US

(71) siehe (73)

(72) Ryals, John, US; Montoya, Alice, verstorben; Harms, Christian, DE; Duesing, John, US; Sperisen, Christoph, CH; Meins, Fred, US; Payne, George, US

(73) Ciba-Geigy AG, Basel, CH

(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material

(55) Regulierung; Transkription; Gen chemisch regulierbar; Material pflanzlich; DNA-Sequenz, chemisch regulierbar; chimär; Transformation; Selektion; Regulator chemisch; Pflanzen applizieren

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) innerhalb eines natürlich vorkommenden Systems eine im wesentlichen reine, nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenz, die in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA-Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren, wobei besagte Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist, aus einem chemisch regulierbaren Gen, das innerhalb dieses natürlichen Systems vorliegt, isoliert,
- b) eine chimäre chemisch regulierbare DNA-Sequenz herstellt,
- c) pflanzliche Protoplasten, Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen mit der chimären DNA-Sequenz transformiert,
- d) transformierte Zellen oder Gewebe selektiert; und
- e) einen chemischen Regulator auf pflanzliche Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen und/oder deren Samen, welche die chimäre DNA-Sequenz enthalten, appliziert.

Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material.

Anwendungsgebiete sind die Gentechnik, die Landwirtschaft und die Biotechnologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Fortschritte in der Rekombinant-DNA-Technik, verbunden mit Fortschritten in der Pflanzentransformations- und -regenerationstechnik, haben es möglich gemacht, neues genetisches Material in Pflanzenzellen, Pflanzen oder Pflanzengewebe einzuführen, und damit neue Merkmale, z. B. Phänotypen, einzuführen, wodurch sich der Wert von Pflanzen oder Pflanzengewebe erhöht. Jüngste Demonstrationen von durch Gentechnik geschaffenen Pflanzen, die resistent gegen Pathogene (EP-A 240 332 und EP-A 223 452) oder Insekten (Vaeck, M. u. a., Nature 328, 33 (1987)) sind, und die Erzeugung von herbizid-toleranten Pflanzen (DeBlock, M. u. a., EMBO J. 6, 2513 (1987)) unterstreichen die Möglichkeiten für die Ernteertragssteigerung. Die Zielkulturen können von Bäumen und Büschen bis zu Zierblumen und Feldfrüchten reichen. Tatsächlich ist klar, daß die "Frucht" die Kultur eines Pflanzengewebes sein kann, die in einem Bioreaktor als Quelle für ein Naturprodukt gezogen wurde.

A. Allgemeiner Überblick über die Technik der Pflanzentransformation

In Fachkreisen sind verschiedene Methoden bekannt, um die genetische Transformation von Pflanzen und Pflanzengewebe vorzunehmen (d. h., die stabile Einführung von Fremd-DNA in Pflanzen). Dazu gehören die Transformation durch die Spezies Agrobacterium und die Transformation durch direkten Gen-Transfer.

1. Agrobacterium-vermittelte Transformationen

A. tumefaciens ist das ätiologische Agens von Kronenkahlheit, eine Krankheit mit starker Verbreitung bei Dikotylen und Nacktsamern, die zur Bildung von Tumoren oder Wucherungen an der Infektionsstelle im Pflanzengewebe führt. Agrobacterium, das die Pflanzen normalerweise an wunden Stellen infiziert, enthält ein großes extrachromosomales Element, das als Ti-Plasmid (tumurinduzierendes Plasmid) bezeichnet wird.

Ti-Plasmide enthalten zwei für die Tumorigenizität erforderliche Regionen. Eine Region ist die T-DNA (transferierte DNA), welches die DNA-Folge ist, die letztlich als stabil auf die genomische Pflanzen-DNA übertragen festgestellt wird. Die andere für die Tumorigenizität erforderliche Region ist die vir-Region (Virulenz), die in den Transfer-Mechanismus impliziert wurde. Obwohl die vir-Region für eine stabile Transformation absolut erforderlich ist, wird die vir-DNA nicht tatsächlich auf die infizierte Pflanze übertragen. Es gibt bereits Dokumentationen über die Transformation von Pflanzenzellen, die durch Infektion mit Agrobacterium tumefaciens und die anschließende Übertragung allein der T-DNA vermittelt wurde. Siehe beispielsweise Bevan, M. W. und Chilton, M-D., Int. Rev. Genet. 16, 357 (1982).

Nach mehreren Jahren intensiver Forschung in zahlreichen Labors wurde das Agrobacterium-System so ausgebaut, daß es die routinemäßige Transformation einer Reihe von Pflanzengewebe ermöglicht. Zu den repräsentativen, auf diese Weise transformierten Geweben gehören Tabak, Tomaten, Sonnenblume, Baumwolle, Rübsamen, Kartoffel, Sojabohne und Pappel. Es ist zwar bekannt, daß der Wirtsbereich für die Ti-Plas-

mid-Transformation unter Verwendung von A. tumefaciens als infizierendem Agens sehr groß ist, wegen der Einfachheit der Manipulation wurde jedoch Tabak als Wirt gewählt.

Auch Agrobacterium rhizogenes wurde als Vektor für die Pflanzentransformation verwendet. Dieses Bakterium, das die Haarwurzelbildung bei vielen zweikeimblättrigen Pflanzenspezies anregt, weist ein großes extrachromosomales Element auf, das als Ri-Plasmid (root-inducing - wurzelinduzierend) bezeichnet wird und analog zum Ti-Plasmid von A. tumefaciens funktioniert. Die Transformation unter Verwendung von A. rhizogenes wurde analog zu der mit A. tumefaciens entwickelt und wurde erfolgreich angewendet, um beispielsweise Luzerne, Solanum nigrum L. und Pappel zu transformieren.

2. Direkter Gen-Transfer

Es wurden mehrere sogenannte direkte Gen-Transfer-Verfahren entwickelt, um Pflanzen und Pflanzengewebe ohne die Verwendung des Agrobacterium-Vermittlers zu transformieren. Bei der direkten Transformation von Protoplasten kann die Aufnahme des exogenen genetischen Materials in ein Protoplast durch die Anwendung eines chemischen Agens oder eine elektrischen Feldes verstärkt werden. Das exogene Material kann dann in das Kerngenom integriert werden. Die ersten Arbeiten wurden an der Dikotyle Tabak vorgenommen, wobei gezeigt wurde, daß die Fremd-DNA in Nachkommenpflanzen einbezogen und übertragen wurde, siehe z. B. Paszkowski, J. u. a., EMBO J. 3, 2717 (1984), und Potrykus, I. u. a., Mol. Gen. Genet. 199, 169 (1985).

Nach diesem Verfahren wurde auch monokotyle Protoplaste übertragen, beispielsweise bei Triticum monococcum, Lolium Multiflorum (italienisches Reihergras), Mais und schwarzem mexikanischen Zuckermais.

Als Alternative dazu kann exogene DNA durch Mikroinjektion in Zellen oder Protoplasten eingeführt werden. Eine Lösung von Plasmid-DNA wird mit einer fein gezogenen Glasnadel direkt in die Zelle injiziert. Auf diese Weise wurden Luzerne-Protoplasten durch eine Reihe von Plasmiden transformiert, siehe z. B. Reich, T. J. u. a., Bio/Technology 4, 1001 (1986).

Ein erst in jüngster Zeit entwickeltes Verfahren für den direkten Gen-Transfer sieht das Bombardement von Zellen durch Mikroprojekteile, welche die DNA tragen, vor, siehe Klein, T. M. u. a., Nature 327, 70 (1987). Bei diesem Verfahren werden Wolframteilchen, die mit der exogenen DNA überzogen sind, zu den Zielzellen hin beschleunigt, was zumindest zur transienten Expression bei dem angegebenen Beispiel (Zwiebel) führt.

B. Regeneration von transformiertem Pflanzengewebe

Ebenso wie es eine Vielzahl von Methoden für die Transformation von Pflanzengewebe gibt, gibt es auch eine Vielzahl von Methoden für die Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe. Die jeweilige Regenerationsmethode ist vom Ausgangspflanzengewebe und der zu regenerierenden jeweiligen Pflanzenspezies abhängig. In den letzten Jahren ist es möglich geworden, zahlreiche Pflanzenspezies aus Callusgewebe, das von Pflanzenexplantaten abgeleitet wurde, zu regenerieren. Zu den Pflanzen, die aus Callus regeneriert werden können, gehören Monokotyle, wie Mais, Reis, Gerste, Weizen und Roggen, und Dikotyle, wie Sonnenblumen, Sojabohnen, Baumwolle, Rübsaat und Tabak.

Die Regeneration von Pflanzen aus Gewebe, das mit A. tumefaciens transformiert war, wurde bei mehreren Pflanzenspezies demonstriert.

Dazu gehören Sonnenblume, Tomate, Weißklee, Rübsamen, Baumwolle, Tabak und Pappel. Die Regeneration von Luzerne aus Gewebe, das mit A. rhizogenes transformiert worden war, wurde auch demonstriert. Die Pflanzenregeneration aus Protoplasten ist eine besonders brauchbare Methode, siehe Evans, D. A. u. a. in "Handbook of Plant Cell Culture" (Handbuch der Pflanzenzellkultur), Bd. 1, MacMillan Publ. Co., 1983, S. 124. Wenn eine Pflanzenspezies aus Protoplasten regeneriert werden kann, können Methoden des direkten Gen-Transfers angewendet werden, und die Transformation ist nicht von der Verwendung von A. tumefaciens abhängig. Die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten wurde für Reis, Tabak, Rübsamen, Kartoffel, Aubergine, Gurke, Pappel und Mais demonstriert.

Die technischen Fortschritte in der Pflanzentransformations- und -regenerationstechnik unterstreichen die Möglichkeiten der Kulturverbesserung durch Gentechnik. Es gibt Berichte über genetisch manipulierte Tabak- und Tomatenpflanzen, die resistent gegen Infektionen von beispielsweise dem Tabakmosaikvirus (TMV) und resistent gegen verschiedene Klassen von Herbiziden sind. Durch gentechnische Maßnahmen wurde bei Tabak- und Tomatenpflanzen Insektenresistenz entwickelt.

C. Zellkulturen

Das Potential der genetischen Technik ist nicht auf Feldfrüchte beschränkt, sondern schließt Verbesserungen an Zierpflanzen, Futterfrüchten und Bäumen ein. Ein weniger augenfälliges Ziel der Pflanzen-Biotechnik, die sowohl Anwendungen der Gentechnik als auch von Gewebekulturen einschließt, ist die verstärkte Produktion einer enormen Vielfalt von chemischen Verbindungen, die

von Pflanzen abgeleitet werden, einschließlich Geschmacksstoffe, Aromastoffe, Pigmente, natürliche Süßungsmittel, industrielle Ausgangsstoffe, Antimikrobiotika und Pharmazeutika. In den meisten Fällen gehören diese Verbindungen zu einer ziemlich breiten Stoffwechselgruppe, die zusammen als Sekundärprodukte bezeichnet werden. Pflanzen können solche Sekundärprodukte erzeugen, um potentielle Räuber abzuwehren, Bestäuber anzulocken oder infektiöse Krankheiten zu bekämpfen.

Pflanzenzellkulturen können von einer beeindruckenden Vielfalt von Pflanzenspezies gewonnen und in einem Bioreaktor vermehrt werden. Zu den typischen Pflanzenspezies gehören die meisten der Pflanzen, die Sekundärprodukte von kommerziellem Interesse erzeugen. Bei einer Reihe von landwirtschaftlich wichtigen Kulturpflanzen wurde eindeutig nachgewiesen, daß stabile genetische Varianten, die aus der Gewebekultur von somatischen Pflanzenzellen (somaklonale Variation) hervorgegangen sind, induziert und selektiert werden können. Aus der Pflanzengewebekulturproduktion von Sekundärverbindungen ergeben sich zahlreiche Vorteile. Dazu gehören (1) die Möglichkeit einer verbesserten Reinheit des resultierenden Produkts, (2) die Umwandlung von billigen Vorläufern in teure Endprodukte durch Biotransformation und (3) die Möglichkeit der Zuführung von Substratanalogen in die Kultur, um neuartige Verbindungen zu schaffen.

D. Vorteile der gesteuerten Gen-Expression

Ob es das Ziel der Gentechnik bei einer Pflanze ist, eine Feldfrucht, einen Zierstrauch, eine Blume, einen Baum oder eine Gewebekultur zum Einsatz in einem Bioreaktor zu manipulieren, immer wird man als einen Hauptvorteil die Steue-

rung der Expression des schimärischen Gens erkennen, so daß dieses nur zum entsprechenden Zeitpunkt und im entsprechenden Umfang und, in einigen Situationen, nur in bestimmten Teilen der Pflanze expressiert wird. Beispielsweise kann es, um einen wünschenswerten Phänotyp zu erhalten, erforderlich sein, das schimärische Gen mit Werten von 1 % des Gesamtproteins oder mehr zu expressieren. Das kann durchaus der Fall sein bei Pilzresistenz durch schimärische Chitinase-Expression oder bei Insektenresistenz durch erhöhte Proteinase-Inhibitor-Expression. In diesen Fällen kann die Energie, die zur Erzeugung hoher Werte des Fremdproteins verbraucht wird, zu einer Schädigung der Pflanze führen, während die Energieableitung und damit die Ertragsminderung verringert werden könnten, wenn das Gen nur dann expressiert wird, wenn das wünschenswert ist, beispielsweise bei einem imminanten Pilz- oder Insektenbefall.

Andererseits könnte der durch das schimärische Gen exprimierte Phänotyp zu schädlichen Auswirkungen auf die Pflanze führen, wenn die Expression zu einem ungeeigneten Zeitpunkt in der Entwicklung erfolgt. Wenn das schimärische Gen-Produkt beispielsweise ein Pflanzenhormon wäre, das die Ablösung der Schale induziert, könnte eine frühzeitige Expression die Ablösung der Frucht von der Pflanze bewirken, bevor der Samen ausgereift ist, was zu einem verminderten Ertrag führen würde. In diesem Fall wäre es viel vorteilhafter, die Expression dieses Typs von Gen zu einem Zeitpunkt zu induzieren, an dem die Schalenablösung vorteilhaft oder wenigstens unschädlich für die Pflanze ist.

Bei Gewebe in Kultur oder in einem Bioreaktor könnte die unzeitgemäße Produktion eines Sekundärproduktes zu einer

Verringerung der Wachstumsrate der Kultur führen, was in einer Verringerung im Ertrag des Produkts resultieren würde. Es wäre daher vorteilhaft, die Kultur ohne Expression des Sekundärproduktes wachsen zu lassen und dann das chimäre Gen zu einem geeigneten Zeitpunkt zu induzieren, um eine optimierte Expression des gewünschten Produktes zu ermöglichen.

Angesichts solcher wie auch anderer Erwägungen, ist es offensichtlich, daß die Steuerung des Zeitpunkts, des Umfangs und/oder der Stelle der Expression des chimären Gens in Pflanzen oder Pflanzengewebe äußerst wünschenswert wäre. Eine Steuerung, die leicht auf dem Feld, im Gewächshaus oder im Bioreaktor erfolgen könnte, wäre von besonderem kommerziellen Wert.

E. Bekannte regulierbare Gen-Expressionssysteme bei Pflanzen

Es ist bekannt, daß verschiedene Pflanzengene durch verschiedene innere und äußere Faktoren, einschließlich Pflanzenhormone, Wärmeschock, Chemikalien, Pathogenen Mangel an Sauerstoff und Licht, induziert werden. Es wurden einige dieser Systeme detailliert beschrieben, bei den am besten charakterisierten führt eine erhöhte Akkumulation von mRNA zu einem erhöhten Wert des spezifischen Proteinprodukts.

Als Beispiel für die Gen-Regulierung durch ein Pflanzenhormon wurde gezeigt, daß Abszissinsäure (ABA) die späten, überschießenden Embryogenesis-mRNA von Baumwolle induziert, siehe Galau, G. A. u. a., Plant Mol. Biol. 7, 155 (1986). Bei einem anderen Beispiel induziert Gibberellinsäure (GA3) Malatsynthasetranskripte in Rhizinusbohnsensamen und Alpha-Amylaseisozyme in Gerste-Aleuronschichten, siehe Rodriguez,

D. u. a., Plant Mol. Biol. 9, 227 (1987); Nolan, R. C. u. a., Plant Mol. Biol. 8, 13 (1987).

Die Regulierung von Wärmeschock-Protein-Genen von Sojabohnen wurde ausführlich untersucht. Die Behandlung der Pflanzen über mehrere Stunden bei 40° C führt zur de novo-Synthese von mehreren sogenannten Wärmeschock-Proteinen (Key, J. u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3526 (1981)). Mehrere dieser Gene wurden isoliert und ihre Regulierung im Detail untersucht. Die Expression dieser Gene wird vorwiegend auf Transkriptionsebene gesteuert. Der Promoter des hsp70-Gens wird mit dem Neomycinphosphotransferase-II-Gen (NptII-Gen) verschmolzen, und es wurde nachgewiesen, daß das chimäre Gen durch Wärmeschock induziert wird (Spena A. u. a., EMBO J. 4, 2736 (1985)), wenn auch mit einem geringeren Pegel als die endogenen Wärmeschock-Gene.

Zu einer anderen Klasse von induzierbaren Genen in Pflanzen gehören die lichtregulierten Gene, vor allem das nuklear-codierte Gen für die kleine Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatkarboxylase (RUBISCO). Morelli, G. u. a. (Nature 315, 200 (1985)) und Herrera-Estrella, L. u. a. (Nature 310, 115 (1984)) haben gezeigt, daß die 5'-Flankierungssequenzen eines Erbsen-RUBISCO-Gens Lichtinduzierbarkeit auf ein Reporter-Gen übertragen können, wenn die Zuordnung in chimärer Weise erfolgt. Diese Feststellung wurde auf andere lichtinduzierbare Gene ausgedehnt, beispielsweise das Chlorophyll-a/b-Bindungsprotein.

Die Alkoholdehydrogenasegene (adh-Gene) von Mais wurden umfassend untersucht. Das adh1-s-Gen von Mais wurde isoliert, und es wurde gezeigt, daß ein Abschnitt der 5'-Flankierungs-DNA in der Lage ist, die Expression eines chimären Re-

porter-Gens (z. B. Chloramphenikolazetyltransferase, CAT) zu induzieren, wenn das transient transformierte Gewebe anaeroben Bedingungen ausgesetzt wurde (Howard, E. u. a., *Planta* 170, 535 (1987)).

Es wurde eine Gruppe von Chemikalien entwickelt, die als Safener (Zusatzstoff, der Reaktionen zwischen Bestandteilen von Wirkstoffgemischen verhindert) bekannt sind, um Kulturen vor potentiell schädlichen Anwendungen von Herbiziden zu schützen oder "sicher zu machen". Zwar wurde noch kein allgemeiner Mechanismus für die Wirkung dieser Verbindungen entwickelt, aber die Regulierung von natürlich regulierbaren Genen durch solche Verbindungen ist ein möglicher Mechanismus. Kürzlich wurde berichtet, daß höhere Werte von Glutathion-S-Transferase (GSZ) in Mais induziert werden, der mit dem Safener 2-Chloro-4-(trifluoromethyl)-5-methylthiazolkarboxylsäurebenzylester behandelt wurde, siehe Wiegand, R. C. u. a., *Plant Mol. Biol* 7, 235 (1986). Zwar ist der Pegel der GST-mRNA nach der Behandlung mit dem Safener erhöht, über den dahin führenden Mechanismus wird jedoch nichts angegeben.

Viele Pflanzen werden, wenn sie hypersensitiv auf verschiedene Pathogene reagieren, zur Produktion einer Gruppe von säureextrahierbaren, pathogenesebezogenen (PR) Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht angeregt (Van Loon, L. C., *Plant Mol. Biol* 4, 111 (1985)). Von besonderem Interesse aber ist die Beobachtung, daß sich eben diese PR-Proteine zu hohen Werten in Pflanzen akkumulieren, die mit solchen Chemikalien wie Polyakrylsäure und Azetylsalizylsäure behandelt wurden (Gianinazzi, S. u. a., *J. Gen. Virol.* 23, 1 (1974); White, R. F., *Virology* 99, 410 (1979)). Das Vorhandensein von PR-

Proteinen wurde mit der Induzierung einer lokalen wie auch einer systemischen Resistenz gegen einen breiten Bereich von Pathogenen in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, daß ein interspezifischer Tabakhybrid, der gegen den Tabakmosaikvirus (TMV) resistent ist, die PR-Proteine grundsätzlich exprimiert (Ahl, P. u. a., Plant Sci. Lett. 26, 173 (1982)). Außerdem zeigte die Immunoausfällung von in vitro-Translationsprodukten unter Verwendung von mRNA von TMV-infiziertem oder chemisch behandeltem Tabak (Cornelissen, B. J. C. u. a., EMBO J. 5, 37 (1986); Carr, J. P. u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7999 (1985)), daß der erhöhte Pegel von PR-Protein ein Ergebnis von RNA-Akkumulation war. Daher stellt die Induzierung von PR-Protein-Genen durch Chemikalien oder Pathogene eine Methode dar, das Problem der chemisch regulierten Genexpression in Pflanzen und Pflanzengewebe in Angriff zu nehmen.

In einigen Fällen ist es wünschenswert, die Zeit und/oder das Ausmaß der Expression des eingeführten genetischen Materials in Pflanzen, Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu steuern. Eine Idealsituation wäre die Regulierung der Expression eines auf diese Weise eingeführten Merkmals, die bewußt und nach Willen über eine regulierende Zwischenstufe erfolgt, die leicht bei Feldfrüchten, Zierbüschen, Bioreaktoren usw. angewendet werden kann.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material bereitgestellt, das es ermöglicht, die Zeit und/oder das Ausmaß der Expression des eingeführten genetischen Materials in Pflanzen, Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu steuern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) innerhalb eines natürlich vorkommenden Systems eine im wesentlichen reine, nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz, die in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren, wobei besagte Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist, aus einem chemisch regulierbaren Gen, das innerhalb dieses natürlichen Systems vorliegt, isoliert, indem man
 - (i) innerhalb dieses natürlichen Systems die Expression von RNA eines chemisch regulierbaren Gens aktiviert;
 - (II) besagte RNA isoliert;
 - (iv) ein differentielles "Screening" einer genomischen Genbibliothek durchführt, die sowohl aus RNA erzeugt wurde, welche zuvor aus diesem besagten aktivierten System isoliert wurde als auch aus RNA, welche zuvor aus einem nicht aktivierten Kontrollsystem isoliert wurde;
 - (iV) einen genomischen Klon isoliert;
 - (v) ausgehend von diesem genomischen Klon das chemisch regulierbare Gen subkloniert; und
 - (vi) die gewünschte chemisch regulierbare DNA Sequenz isoliert;

- (b) eine chimäre chemisch regulierbare DNA Sequenz herstellt, die aus einer ersten, gemäß Abschnitt (a) isolierten, nichtkodierenden, chemisch regulierbaren DNA Sequenzkomponente zusammengesetzt ist, die in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren, wobei besagte Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist sowie aus einer zweiten DNA-Sequenzkomponente, die innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes transkribierbar ist, indem man die erste, nichtkodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenzkomponente mit der zweiten Sequenzkomponente verknüpft;
- (c) pflanzliche Protoplasten, Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen mit der chimären DNA-Sequenz, gemäß Abschnitt (b) transformiert, unter Verwendung eines Transformationsverfahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Agrobacterium-vermittelter Transformation, direktem Gentransfer, Mikroinjektion oder Mikroprojektil-Beschuß;
- (d) transformierte Zellen oder Gewebe selektiert; und
- (e) einen chemischen Regulator auf pflanzliche Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen und/oder deren Samen, welche die chimäre DNA-Sequenz gemäß Abschnitt (b) enthalten, appliziert.

Die Erfindung beinhaltet demzufolge (a) chemisch regulierbare DNA-Folgen, vorzugsweise in im wesentlichen reiner Form;

(b) eine oder mehrere chemisch-regulierbare DNA-Folgen in Kombination mit einem oder mehreren Teilen, nicht aber allen einer der codierenden DNA-Folgen, denen die regulierbaren Folgen in natürlich vorkommenden Genen zugeordnet sind; (c) chimäre Gene, die ein

oder mehrere chemisch regulierbare DNA-Folgen enthalten;
(d) Vektoren, die Folgen oder Gene von (a), (b) oder/und (c) enthalten; (e) Pflanzen, Samen und Pflanzengewebe, welche die chemisch regulierbaren chimären Gene enthalten, und (f) die chemische Regulierung von chemisch regulierbaren chimär-schen Genen in Pflanzengewebe. Die Erfindung betrifft außerdem

ein Signalpeptid, eine DNA-Folge, welche das Signalpeptid codiert, und die im wesentlichen reinen Formen von verschiedenen natürlich vorkommenden, chemisch induzierbaren Genen.

Vorliegende Erfindung schließt außerdem verschiedene Anwendungen von chemisch regulierbaren DNA-Folgen ein: (a) Regulierung von schimärischen Genen in Zellen, die in einem Bioreaktor vermehrt werden; (b) eine Untersuchung auf chemische Regulatoren; (c) die Entwicklungsregulierung der Pflanze; (d) die Regulierung der Pflanzensterilität und (e) die Regulierung der schimärischen und/oder heterologen Genexpression in einer transformierten Pflanze. Andere Anwendungen und Vorteile werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen ersichtlich, in denen

Abb. 1 eine partielle Restriktionsendonukleasekartierung von Lambda-tobchrPR1013 ist. Das rekombinante 49 kb-Phagen-genom wird so dargestellt, daß die rechten und linken Arme von Lambda bezeichnet sind. Das 19 kb-Tabak-Insert ist unter der Lambda-Kartierung vergrößert. Bezeichnet sind die Lage des PR-1a-Gens (schraffierte Box) und die Transkriptionsrichtung (Pfeil). P = Pst, H = HindIII, C = ClaI, R = EcoRI.

Abb. 2 die Konstruktion von pBS-PR1013C1a aus Lambda tobchrPR1013 zeigt. Das 19 kb-DNA-Fragment zwischen den beiden ClaI-Sequenzen wurde in das Bluescript-Plasmid subkloniert. C = ClaI, LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 3 die Konstruktion von pBS-PR1013Eco aus Lambda-tobchrPR1013 darstellt. Das 3,6 kb-EcoRI-Fragment, welches

das PR-1A-Gen von Lambda tobchrPR1013 enthält, wird in Bluescript subcloniert. R = EcoRI, LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 4 die Konstruktion von pBS-PR1013Eco aus pBS-PR1013C1a zeigt. Das 3,6 kb-EcoRI-Fragment, welches das PR-1a-Gen enthält, wird in die EcoRI-Sequenz des Bluescript-Plasmids subkloniert. C = ClaI, R = EcoRI, LGT = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 5 die Konstruktion von pBS-PR1013Eco Δ Pst aus pBS-PR1013Eco zeigt. Das 600 bp-PstI-Fragment wird aus pBS-PR1013Eco deletiert. P = PstI, R = EcoRI, X = XhoI, S = SalI, LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 6 die Konstruktion von pBS-PR1013Eco Δ PstXho aus pBS-PR1013Eco Δ Pst zeigt. Das 2 kb-XhoI-Fragment wird aus dem Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst deletiert. R = EcoRI, P = PstI, X = XhoI, S = SalI, LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 7 die Konstruktion von pCIB270 aus pBI101.3 und pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho zeigt. Das PstI-XhoI-Fragment, das einen Teil des PR-1a-Genes und die 5'-Flankierungssequenz enthält, wird in SalI-BamHI-verdautes pBH101.3 subkloniert. Die XhoI- und SalI-Sequenzen sind kompatibel und zerstören, wenn sie ligiert werden, beide Restriktionsstellen. Die PstI-Stelle ist einer BamHI-Stelle unter Verwendung eines Molekularadapters angepaßt. X = XhoI, P = PstI, (X/S) = Stelle der XhoI- und SalI-Fusion. Keines der Enzyme wird nun an dieser (X/S)-Stelle geschnitten. LB = T-DNA linker

Rand, RB = T-DNA rechter Rand. Die Transkriptionsrichtung aus der PR-1a-induzierbaren Region wird durch den Pfeil an pCIB270 veranschaulicht. Der schraffierte Bereich an pCIB270 stellt die 3'-Prozessierungsstelle des NOS-Gens dar. Der einfach schraffierte Bereich von pCIB270 stellt das Beta-Glukuronidase-Gen dar. Der punktierte Bereich von pCIB270 stellt das Neomyzinphosphotransferase-II-Gen dar. Der gestreifte Bereich von pCIB270 stellt den NOS-Promoter dar.

Abb. 8 die Konstruktion von M13mp18-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho und M13mp19-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho zeigt. Das PstI-Asp718-Fragment, das einen Teil der PR-1a-Codierungssequenz und die 5'-Flankierungssequenz enthält, wird aus pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho in Asp718-PstI-verdautes M13mp18 oder 19 subkloniert. R = EcoRI, H = HindIII, P = PstI, K = KpnI (Asp718 ist ein Iso-schizomer von KpnI), LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 9 ein Ablaufschema der Umwandlung des ATG-Codons von PR-1a in eine NcoI-Sequenz zeigt. Die einzelsträngige DNA von M13mp18-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho wird durch eine durchgezogene Linie gezeigt. Die Sequenz TCATGG wird durch sequenzgerichtete Mutagenese in CCATGG umgewandelt. K = KpnI, X = XhoI, B = BstEII, P = PstI.

Abb. 10 die Konstruktion von pCIB268 zeigt. Das BstEII-PstI-Fragment, das von der replikativen Form von M13mp18-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho.Nco abgeleitet wurde, wird in BstEII-PstI-verdautes pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho subkloniert, um pCIB268 zu bilden. X = XhoI, B = BstEII, N = NcoI, P = PstI.

Abb. 11 die Konstruktion von pCIB269 aus pBS-GUS1.2 und

pCIB268 zeigt. X = XhoI, N = NcoI, P = PstI. Die kreuz-schraffierte Box von pCIB269 stellt die GUS-Gensequenzen dar, und die einfach schraffierte Box zeigt die Sequenzen, die vom PR-1a-Gen abgeleitet wurden.

Abb. 12 die Konstruktion von pBS-GUS1.2 zeigt. pBS-GUS1.2 wird über eine Dreiweg-Ligation aus Fragmenten hergestellt, die von pRAJ265, pBI221.1 und pBlueskript abgeleitet wurden. S = SalI, R = EcoRI, N = NcoI.

Abb. 13 die Konstruktion von pCIB271 aus pCIB269 und pCIB200 zeigt. X = XhoI, N = NcoI, R = EcoRI, S = SalI, (S/X) = Fusion der SalI- und XhoI-Sequenzen, LGT-Agarose = Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur.

Abb. 14 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB219 zeigt. Dieses Plasmid wird durch Hinzufügen eines EcoRI/XhoI-Adapters zum pCIB269-XhoI/EcoRI-Fragment, welches das PR-1- und das GUS-Gen enthält, und dessen Ligation in SalI-restriktiertes pCIB712 konstruiert.

Abb. 15 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB272 zeigt. Dieses Plasmid wird durch Ligation eines Asp718I/BamHI-Fragmentes von pCIB 282, das ein PR-1/GUS-Gen (-833 bis +1 von PR-1a) enthält, in Asp718I/BamHI-restriktiertes pCIB200 hergestellt.

Abb. 16 die Restriktionsendonukleasenkartierung von pCIB273 zeigt. Dieses Plasmid wird durch Ligation eines Asp718I/BamHI-Fragmentes von pCIB283, das ein PT-1/GUS-Gen (-603 bis +1 von PR-1a) enthält, in Asp718/BamHI-restriktiertes pCIB200 konstruiert.

Abb. 17 die Restriktionsendonukleasenkartierung von pCIB1004 zeigt. Dieses Plasmid wird durch Ligation eines XhoI/NcoI-Fragmentes von pCIB269 (das den PR-1a-Promoter enthält) mit dem BT-Gen, das aus pCIB10/35Bt(607) als NcoI/BamHI-Fragment herausgeschnitten wurde, und SalI/BamHI-verdauten pCIB710 konstruiert.

Abb. 18 die Restriktionsendonukleasenkartierung von pCIB200/PR1-BT zeigt. Dieses Plasmid wird aus pCIB1004 und pCIB200 konstruiert.

Abb. 19 die Restriktionsendonukleasenkartierung von pCIB1207 zeigt. Ein 5,8 kb-XbaI-Fragment des lambda-genomischen Klons, der das Arabidopsis-AHAS-Gen enthält, wird in das XbaI-restrierte Blueskript kloniert.

Abb. 20 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB1216 zeigt. Ein 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1207 wird in pCIB269 kloniert, das mit NcoI und XbaI restriktiert worden ist, um das GUS-Gen zu entfernen.

Abb. 21 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB1233 zeigt. Ein 4,2 kb-KpnI/XbaI-Fragment wird aus pCIB1216 isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 22 die Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc-39.1/GUS zeigt. Ein 1462 bp-Fragment von pBSGluc39.1 wird in pBS-GUS1.2 kloniert, das mit NcoI und KpnI restriktiert worden ist.

Abb. 23 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.1-GUS zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, welches

den β -Glukanasepromoter und das GUS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.1/GUS isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 24 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.1-BT zeigt. Ein KpnI/NcoI-Fragment von pCIB1004, welches das BT-Gen enthält, ein KpnI/NcoI-Fragment von pBSGluc39.1/GUS und pCIB200, das mit KpnI restriktiert und mit einer alkalischen Kalbsthymusphosphatase behandelt worden ist, werden ligiert.

Abb. 25 die Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc39.1/AHAS zeigt, das aus einem NcoI/XbaI-Fragment von pBSGluc39.1/GUS und einem 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1207, welches das AHAS-Gen enthält, konstruiert worden ist.

Abb. 26 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.1-AHAS zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, welches den β -Glukanasepromoter und das AHAS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.1/AHAS isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 27 die Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc39.3/GUS zeigt. Ein 1677 bp-Fragment von pBSGluc39.3 wird in pBS-GUS1.2 kloniert, das mit NcoI und KpnI kloniert worden ist.

Abb. 28 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.3-GUS zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, welches den β -Glukanasepromoter und das GUS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.3/GUS isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 29 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.3-BT zeigt. Ein KpnI/NcoI-Fragment von pCIB1004, welches das BT-Gen enthält, ein KpnI/NcoI-Fragment von pBSGluc39.3/GUS und pCIB200, das mit KpnI restriktiert und mit alkalischer Kalbsthymusphosphatase behandelt worden ist, werden ligiert.

Abb. 30 die Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc39.3/AHAS zeigt, das aus einem NcoI/XbaI-Fragment von pBSGluc39.3/GUS und einem 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1207, welches das AHAS-Gen enthält, konstruiert worden ist.

Abb. 31 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.3-AHAS zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, das den β -Glukanasepromoter und das AHAS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.3/AHAS isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 32 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB1208 zeigt. Ein 5,8 kb-XbaI-Fragment des genomischen Lambda-Klons, welches ein mutiertes Arabidopsis-AHAS-Gen enthält, wird in das XbaI-restriktierte Blueskript kloniert.

Abb. 33 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB1230 zeigt. Ein 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1208 wird in pCIB269 kloniert, das mit NcoI und XbaI restriktiert worden ist, um das GUS-Gen zu entfernen.

Abb. 34 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB1232 zeigt. Ein 4,2 kb-KpnI/XbaI-Fragment wird aus pCIB1230 isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI ligiert worden ist.

Abb. 35 eine Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc39.1/AHAS-SuR zeigt, das aus einem NcoI-XbaI-Fragment von pBSGluc39.1/GUS und einem 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1208, welches das AHAS-Gen enthält, konstruiert worden ist.

Abb. 36 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, das den β -Glukanasepromoter und das AHAS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.1/AHAS-SuR isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Abb. 37 die Restriktionsendonukleasekartierung von pBSGluc39.3/AHAS-SuR zeigt, das aus einem NcoI/XbaI-Fragment von pBSGluc39.3/GUS und einem 3,3 kb-NcoI/XbaI-Fragment von pCIB1208, welches das AHAS-Gen enthält, konstruiert worden ist.

Abb. 38 die Restriktionsendonukleasekartierung von pCIB200/Gluc39.3-AHAS-SuR zeigt. Ein KpnI/XbaI-Fragment, das den β -Glukanasepromoter und das AHAS-Gen enthält, wird aus pBSGluc39.3/AHAS-SuR isoliert und in pCIB200 ligiert, das mit KpnI und XbaI restriktiert worden ist.

Kurze Beschreibung der Sequenzen

Sequenz 1 legt die genomische DNA-Folge des 2 kbp-Fragmentes zwischen den XhoI- und BglII-Stellen des Tabak-PR-1a-Gens offen. Der Pfeil etwa bei Nukleotid 903 kennzeichnet die Transkriptionsstartstelle, und die mit 207 und 313 gekennzeichneten senkrechten Pfeile identifizieren die Enden der beiden unabhängigen cDNA-Klone. Offengelegt wird auch die Polypeptidsequenz, die durch den Codierungsabschnitt des Gens codiert wird.

Sequenz 2 legt die genomische DNA-Sequenz des Tabak-PR-1'-Gens und die Aminosäurefolge des Polypeptids offen, das durch den Codierungsbereich des Gens codiert wird.

Sequenz 3 legt die cDNA-Folge von Gurken-PR-Chitinase und die Aminosäurefolge des Polypeptids offen, das durch den Codierungsbereich des Gens codiert wird.

Sequenz 4 legt die cDNA-Folge der Hauptform des Tabak-PR-R-Gens offen, und (4a) legt sowohl die Folge (%) als auch die Aminosäurefolge des Polypeptids offen, das durch den Codierungsbereich des Gens codiert wird.

Sequenz 5 legt die genomische DNA-Folge des basischen Tabak- β -1,3-Glukanase-Gens offen, das im Klon pBSGluc 39.1 enthalten ist.

Sequenz 6 legt die genomische DNA-Folge des basischen Tabak- β -1,3-Glukanase-Gens offen, das im Klon pBSGluc39.3 enthalten ist.

Sequenz 7 legt die cDNA-Folge des Tabak-PR-Q offen, das im Plasmid pBScht15 enthalten ist.

Sequenz 8 legt die DNA-Folge einer isolierten cDNA offen, die im Plasmid pBSGL6e enthalten ist. Die cDNA codiert die saure Form von β -1,3-Glukanase.

Vorliegende Erfindung beschreibt die Isolierung, Klonierung und Identifizierung von DNA-Folgen, welche die Transkription einer zugeordneten DNA-Folge in Pflanzengewebe regulieren

können, wobei die Regulierung von einem chemischen Regulator abhängig ist. Diese DNA-Folgen können dazu genutzt werden, schimärische Gene zu konstruieren, in denen die Expression des Gens durch solche Regulatoren oder Regler reguliert werden kann. Die Fähigkeit, die Expression eines schimärischen Gens in einer transgenen Pflanze durch eine chemische Methode zu regulieren, ist nützlich bei der Erlangung einer geeigneten Expression des phänotypischen Merkmals bei minimalen schädlichen Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze. Diese Regulierung ist wichtig bei der Produktion von Sekundärprodukten oder anderen klonierten Produkten in Pflanzengewebe in der Kultur oder in Bioreaktoren. Die Regulierung der klonierten Sequenz ist auch bei der Regulierung anderer Gen-Produkte durch einen "anti-sense"-Mechanismus.

Die Expression einer gegebenen Codierungssequenz zu einem bestimmten Zeitpunkt kann unter Verwendung eines chemischen Reglers reguliert werden, der im typischen Fall auf Pflanzengewebe aufgebracht wird. Gene, die bei der Steuerung distinktiver Entwicklungsübergangsstufen eine Rolle spielen, können ebenfalls durch Zuordnung einer chemisch regulierbaren DNA-Folge zu einer geeigneten codierenden DNA-Folge reguliert werden. Auf diese Weise kann die Entwicklung einer Pflanze in einer bestimmten Stufe angehalten werden, bis der Pegel eines chemischen Reglers erhöht, oder bei einer spezifischen Rate beschleunigt werden, wenn der Pegel eines chemischen Reglers gesenkt wird.

Die chemisch regulierbaren DNA-Folgen können dazu genutzt werden, die Expression von Fremdgenen anzutreiben, die beispielsweise Herbizidresistenz oder -toleranz übertragen (z. B. Atrazintoleranz bei Sojabohnen), Insektenresistenz

übertragen (z. B. Bacillus thuringiensis-Kristallprotein bei Baumwolle) oder selektive Expression verlangen (wie männliche oder weibliche Sterilität). Die chemisch regulierbaren DNA-Folgen können auch genutzt werden, um die Transkription einer DNA-Folge anzutreiben, welche die Expression einer zweiten Codierungssequenz durch einen "anti-sense"-Mechanismus steuert.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet demzufolge:

- a. ein schimärisches Gen, dessen Expression in Pflanzengewebe durch einen chemischen Regler reguliert wird.
- b. Im wesentlichen reine, chemisch regulierbare DNA-Folgen, welche die genetische Aktivität von anderen DNA-Folgen in Pflanzengewebe in Reaktion auf einen chemischen Regler steuern können.
- c. Chemisch regulierbare DNA-Folgen in Kombination mit einem Teil, nicht aber der Gesamtheit einer codierenden DNA-Folge, mit der sie in natürlich vorkommenden Genen assoziiert sind.
- d. Vektoren, welche die chemisch regulierbaren DNA-Folgen mit den oder ohne die anderen Teile von natürlichen vorkommenden Genen, in denen sie vorkommen können, enthalten.
- e. Vektoren, welche die schimärischen Gene enthalten,
- f. Pflanzengewebe, Pflanzen und Samen, die von Zellen abgeleitet wurden, die durch diese Vektoren transformiert wurden.
- g. Verfahren der chemischen Regulierung der Expression von DNA-Codierungsfolgen, die den chemisch regulierbaren DNA-Folgen zugeordnet sind, um beispielsweise ein phänotypisches Merkmal zu regulieren.

h. Verfahren zur Identifizierung neuer chemischer Regler unter Anwendung der schimmärischen Gene dieser Erfindung und von Pflanzengewebe, in welchem diese enthalten sind.

i. Signalpeptidfolgen in Proteinen, die durch chemisch regulierte Gene codiert sind.

j. Im wesentlichen reine, pathogenese-bezogene Protein-Gene.

Definitionen

Um ein klares und folgerichtiges Verständnis der Patentbeschreibung und der Patentansprüche, einschließlich des darin gegebenen Rahmens, zu ermöglichen, werden die folgenden Definitionen gegeben:

"Anti-sense"-Mechanismus: Ein Mechanismus zur Gen-Regulierung auf der Grundlage der Steuerung der Translationsrate der mRNA auf das Protein auf Grund des Vorhandenseins eines RNA-Moleküls in einer Zelle, welches komplementär zu wenigstens einem Abschnitt der translaterierten mRNA ist.

Assoziierte oder zugeordnete DNA-Folge: Eine DNA-Folge, deren Zellaktivität entweder (1) die Aktivität einer anderen DNA-Folge reguliert oder (2) durch eine andere DNA-Folge re-

guliert wird. Diese Definition umschließt insbesondere, ist aber nicht beschränkt auf Folgen, die in einem kontinuierlichen DNA-Strang räumlich nebeneinander liegen oder die räumlich getrennt sind. Die räumliche Trennung schließt beispielsweise eine Trennung innerhalb desselben DNA-Stranges, die Lage in unterschiedlichen DNA-Strängen oder unterbrochene, eingestreute Folgen (z. B. regulierbare und codierende Folgen im Wechsel) in einem Strang ein.

Chemisch regulierbare DNA-Folge: Eine DNA-Folge, welche die Transkription einer assoziierten DNA-Folge regulieren kann, wobei die Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist. Die Folgen können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein.

Chemisch regulierbares Gen: Ein Gen, das wenigstens eine nicht-codierende, chemisch regulierbare DNA-Folge und wenigstens eine assoziierte, codierende DNA-Folge enthält. Die Gene können natürlichen, synthetischen oder teils natürlichen/teils synthetischen Ursprungs sein.

Chemischer Regler (für eine chemisch regulierbare DNA-Folge): Eine elementare oder molekulare Spezies, welche durch direkte oder indirekte Wirkung die Aktivität einer chemisch regulierbaren DNA-Folge in einem System steuert (z. B. einleitet, beendet, verstärkt oder verringert), in welchem der chemische Regler normalerweise nicht in ausreichender Menge in einer aktiven Form vorhanden ist, um die Regulierung der Transkription einer transkribierbaren DNA-Folge, die der chemisch regulierbaren DNA-Folge zugeordnet ist, im gewünschten Maße und zum gewünschten Zeitpunkt zu bewirken.

Wenn also das System, welches die chemisch regulierbare DNA-Folge enthält, eine Pflanze ist, beispielsweise eine transgene Pflanze, dann ist ein chemischer Regler eine Spezies, die natürlicherweise in der Pflanze nicht in einer ausreichenden Menge vorhanden ist, um die chemische Regulierung und damit die Transkription eines assoziierten Gens im gewünschten Maße zum gewünschten Zeitpunkt zu bewirken.

Unter "direkter Wirkung" versteht man, daß die chemische Reglerwirkung aus der direkten Wechselwirkung zwischen dem chemischen Regler und der DNA-Folge resultiert. Unter "indirekter Wirkung" versteht man, daß die Reglerwirkung aus der direkten Wechselwirkung zwischen dem chemischen Regler und einer anderen endogenen oder exogenen Komponente im System resultiert, wobei das Endergebnis dieser direkten Wechselwirkung die Aktivierung oder Unterdrückung der Aktivität der DNA-Folge ist. Unter "aktiver Form" versteht man, daß der chemische Regler die zur Bewirkung der Steuerung erforderliche Form hat.

Schimärische Folge oder Gen: Eine DNA-Folge, die wenigstens zwei heterologe Teile enthält, z. B. Teile, die von natürlich vorkommenden DNA-Folgen abgeleitet wurden, die in ihren natürlich vorkommenden Zuständen nicht assoziiert sind, oder die wenigstens einen Teil enthält, der synthetischen Ursprungs ist und in der Natur nicht vorkommt.

Codierende DNA-Folge: Eine DNA-Folge, die zur Bildung eines zellularen Polypeptids führt, wenn sie transkribiert oder translaterieirt wird.

Gen: Ein diskreter Chromosomenbereich, der für ein diskretes Zellularprodukt verantwortlich ist.

Nicht-codierende DNA-Folge: Eine DNA-Folge, die nicht transkribiert und translateriert wird und zur Bildung eines Zellulärpopeptids führt, wenn sie mit einer besonderen, codierenden DNA-Folge assoziiert wird. So kann beispielsweise eine Folge, die bei der Zuordnung zu einer Codierungsfolge nicht-codierend ist, tatsächlich codierend sein, wenn sie einer anderen codierenden oder nicht-codierenden Folge zugeordnet wird.

Phänotypisches Merkmal: Eine feststellbare Eigenschaft, die aus der Expression eines Gens resultiert.

Pflanzengewebe: Jedes Gewebe einer Pflanze in planta oder in Kultur. Dieser Begriff schließt ein, ist aber nicht beschränkt auf, Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenorgane, Pflanzensamen, Protoplaste, Kallus, Zellkulturen und alle Gruppen von Pflanzenzellen, die zu strukturellen und/oder funktionellen Einheiten organisiert sind. Die Verwendung dieses Begriffs in Verbindung mit oder ohne einen speziellen Typ von Pflanzengewebe, wie er oben aufgeführt wurde oder anderweitig durch diese Definition eingeschlossen wird, darf nicht als Ausschluß anderer Typen von Pflanzengewebe betrachtet werden.

PR oder pathogenese-bezogene Proteine: Proteine, die in Pflanzen exprimiert werden, die hypersensitiv auf Pathogene reagieren. Dieser Begriff schließt ein, ist aber nicht beschränkt auf, die sauren und basischen Formen von Tabak-PR-1a-, -PR-1b-, -PR-1c-, -PR-1'-, -PR-2-, -PR-N-, -PR-O-, -PR-P-, -PR-Q-, -PR-S-, -PR-R-Proteine, die Chitinase, die das basische Gegenstück zur PR-P oder PR-Q ist, und die Beta-1,3-Glukanase (Glucan-endo-1,3- β -Glukosidase, EC 3.2.1.39), die das basische Gegenstück zu PR-2, PR-N oder PR-O ist,

und die pathogeninduzierbare Chitinase von Gurke. Eine hypersensitive Reaktion ist gekennzeichnet durch eine lokale Nekrose der Gewebe, welche die Infektionsstelle des Pathogens unmittelbar umgeben, und eine anschließende Lokalisation des Pathogens, was zur sensitiven Reaktion im Gegensatz steht, bei der sich das Pathogen über die Pflanze ausbreitet. Pathogene sind beispielsweise Viren oder Viroide, z. B. der Tabak- oder Gurkenmosaikvirus, der Ringpunktvirus oder der Nekrosevirus, der Pelargonienblattkräuselvirus, der Rotkleefleckenvirus, der Tomatenstrauchkrüppelvirus und ähnliche Viren, Pilze, z. B. Phytophthora parasitica oder Peronospora tabacina, Bakterien, z. B. Pseudomonas syringae oder Pseudomonas tabaci, oder Blattläuse, z. B. Myzus persicae. Diese Liste ist in keiner Weise einschränkend.

Regulierung: Die Steigerung (Induzierung) oder Verringerung (Unterdrückung) des Pegels der Expression eines Gens oder des Pegels der Transkription einer DNA-Folge. Die Definition soll keinen bestimmten Mechanismus zum Ausdruck bringen.

Im wesentlichen reine DNA-Folge: Eine DNA-Folge, die in im wesentlichen reiner Form aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen Quelle isoliert wurde. Eine solche Folge kann in einem natürlichen System vorkommen, beispielsweise in Bakterien, Viren oder in Pflanzen- oder Tierzellen, oder sie kann beispielsweise durch synthetische Mittel oder als eine cDNA-Folge geschaffen werden. Im wesentlichen reine DNA-Folgen werden in der Regel in Form eines Vektors isoliert, der die vorgesehene DNA umfaßt. Im wesentlichen rein heißt, daß andere DNA-Folgen als die vorgesehenen nur in Grenzmenngen, beispielsweise von weniger als 5 %, weniger als 1 %

oder vorzugsweise von weniger als 0,1 %. Im wesentlichen reine DNA-Folgen oder Vektoren, welche diese enthalten, können in Lösung vorhanden sein und sind es im typischen Fall auch, beispielsweise in wässriger Lösung, die Puffer enthält, oder in den üblichen Kulturmedien.

Wesentliche Sequenzhomologie: Unter einer wesentlichen Sequenzhomologie versteht man ein enges strukturelles Verhältnis zwischen Sequenzen von Nukleotiden oder Aminosäuren. Beispielsweise können im wesentlichen homologe DNA-Folgen zu 80 % homolog sein, vorzugsweise zu 90 % oder 95 % homolog, und im wesentlichen homologe Aminosäurefolgen können im typischen Fall zu 50 % homolog oder mehr sein. Homologie schließt auch ein Verhältnis ein, bei dem eine oder mehrere Subsequenzen von Nukleotiden oder Aminosäuren fehlen oder Subsequenzen, bei denen zusätzliche Nukleotide oder Aminosäuren eingestreut sind.

A. Chemisch regulierbare DNA-Folgen

Vorliegende Erfindung betrifft nicht-codierende DNA-Folgen, die unter dem Einfluß eines chemischen Reglers die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren können. Insbesondere betrifft die Erfindung nicht-codierende DNA-Folgen, welche die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren können, wobei diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist. Vorzugsweise ist die DNA-Folge in im wesentlichen reiner Form im Verhältnis zum Gen und Genom, in welchem sie vorkommen, vorhanden, wenn sie von einer natürlichen Quelle abgeleitet wurde, oder im Verhältnis zu einem DNA-Gemisch, wenn sie in einem synthetischen Gemisch vorhanden sind.

Vorzugsweise sind die nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Folgen dieser Erfindung solche, die bei der Zuordnung zu einer codierenden DNA-Folge die Expression der Codierungsfolge in Pflanzengewebe regulieren, wobei das Ausmaß der Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist. Solchen Folgen können de novo synthetisiert oder aus einem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen abgeleitet (z. B. isoliert oder kloniert) werden. Das Vorkommen von chemisch regulierbaren DNA-Folgen ist nach der Erfindung nicht auf Pflanzengewebe begrenzt, d. h., die chemisch regulierbaren DNA-Folgen können von einer Vielzahl natürlicher Quellen abgeleitet werden, z. B. bakteriellen, viruellen oder tierischen Quellen. Sie können beispielsweise isoliert werden aus dem 5'-Flankierungsbereich oder aus dem 3'-Flankierungsbereich eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens. Als Alternative dazu können die nicht-codierenden DNA-Folgen chemisch synthetisiert oder enzymatisch synthetisiert werden als cDNA, die mit der isolierten Folge identisch ist oder eine wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat. Durch Klonierung der chemisch regulierbaren, nicht-codierenden DNA-Folge kann die Folge von anderen Folgen getrennt werden, die im natürlich vorkommenden Gen an diese angrenzen. Auf diese Weise kann man eine im wesentlichen reine DNA-Folge erhalten.

Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung schließt Regulierung chemische Regler ein, die entweder induzierende oder unterdrückende Regler sind. Zu den Beispielen für chemisch unterdrückbare Gene, d. h., Gene, die durch eine unterdrückende Chemikalie unterdrückt werden, gehören u. a. Gene wie TrpR oder AroH, wobei der Zusatz des Tryptophan-

Repressionsmittels oder von Tryptophan selbst die Expression aus diesen Genen unterdrückt. Es gibt viele andere Gene, die durch diesen Typ von Endproduktrepression reguliert werden, und in jedem Fall wirkt das Endprodukt als chemischer Regler, der zur Unterdrückung der Expression des Gens eingesetzt werden kann. Die vorliegende Erfindung schließt die regulierbaren Sektionen dieser Gene an sich oder als Teil von schimärischen Konstruktionen ein, die zur Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe chemisch reguliert werden können.

Beispiele für chemisch induzierbare Gene, d. h., Gene, die durch einen induzierenden chemischen Regler induziert werden, sind PR-Protein-Gene, vor allem die Tabak-PR-Protein-Gene, beispielsweise die PR-1a-, PR-1b-, PR-1c-, PR-1'-, PR-Q-, PR-R- und PR-S-Gene, das Gurken-Chitinase-Gen und die basischen und sauren Tabak- β -1,3-Glukanase-Gene. Nach einem besonderen Gesichtspunkt schließt die vorliegende Erfindung eine im wesentlichen reine DNA-Folge ein, die eine nicht-codierende, chemisch regulierbare DNA-Folge ist oder eine wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat, welche Teil eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist, beispielsweise eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe von einer einkeimblättrigen, zweikeimblättrigen oder nacktsamigen Pflanze. Vorzugsweise ist eine solche DNA-Folge in der Lage, die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe zu regulieren, wobei diese assoziierte DNA-Folge eine Codierungsfolge ist. Die Transkription dieser DNA-Folge kann durch einen unterdrückenden chemischen Regler oder durch einen induzierenden

chemischen Regler reguliert werden. Besonders in Betracht gezogen werden die DNA-Folgen, bei denen das chemisch regulierbare Gen ein PR-Protein-Gen ist, beispielsweise von einer zweikeimblättrigen Pflanze, z. B. Tabak oder Gurke. Bevorzugt werden vor allem DNA-Folgen, bei denen das chemisch regulierbare Gen ein Tabak-PR-1a-, -PR-1b-, -PR-1c-, -PR-1'-, -PR-Q- oder -PR-R-Gen, ein Gurken-Chitinase-Gen oder ein basisches oder saures β -1,3-Glukanase-Gen, besonders das Tabak-PR-1a- und -PR-1'-Gen ist, aber auch das Gurken-Chitinase-Gen und die basischen und sauren Tabak- β -1,3-Glukanase-Gene. In erster Linie werden DNA-Folgen in Betracht gezogen, bei denen das chemisch regulierbare Gen ein Tabak-PR-1a- oder ein basischen β -1,3-Glukanase-Gen ist.

Die chemisch induzierbaren DNA-Folgen der bevorzugten PR- und verwandten Gene der Erfindung kommen offensichtlich in den nicht-codierenden Folgendes anliegenden 5'-Flankierungsbereichs zu den codierenden Folgen vor. Als repräsentatives Beispiel sei angeführt, daß in einer Folge, die aus einem etwa 6500 Basenpaaren großen Fragment des Tabak-PR-1a-Gens isoliert wurde, welche einen Teil des codierenden Bereichs enthält, der Bereich mit etwa 900 bis etwa 1200 Basenpaaren, der natürlich an die Transkriptionsstartstelle anschließt, als chemisch induzierbar ermittelt wurde. Die Induzierbarkeit wird in einem Fragment davon erhalten, das etwa 500 bis etwa 700 Basenpaare enthält und sich natürlich an die Transkriptionsstartstelle anschließt. Am meisten bevorzugt werden daher die DNA-Folgen, die sich im 5'-Flankierungsbereich dieser PR- und verwandten Gene befinden, beispielsweise in dem 1200 Basenpaar, das sich an die Transkriptionsstartstelle anschließt.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren für die Herstellung einer nicht-codierenden DNA-Folge, welche die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren kann, wobei diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, und von DNA-Folgen mit einer wesentlichen Homologie zu diesen nicht-codierenden Folgen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die DNA aus einem natürlich vorkommenden Gen in im wesentlichen reiner Form isoliert oder chemisch oder enzymatisch synthetisiert wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren für die Herstellung einer im wesentlichen reinen, chemisch regulierbaren DNA-Folge aus einem chemisch regulierbaren Gen in einem natürlich vorkommenden System, welches das Gen enthält, wobei dieses Verfahren die nachfolgenden Schritte einschließt:

(a) Aktivierung der Expression der RNA aus dem chemisch regulierbaren Gen in diesem System;

(b) Isolierung dieser RNA;

(c) differenziertes Testen ("Screening") einer Genombibliothek nach RNA, die aus RNA erzeugt wurde, welche aus diesem aktivierten System isoliert wurde, sowie nach RNA, die aus RNA erzeugt wurde, die von einem Kontrollsystem, das nicht aktiviert wurde, isoliert worden ist;

(d) Isolierung eines genomischen Klons;

(e) Subklonieren des chemisch regulierbaren Gens aus diesem genomischen Klon und

(f) Isolierung der gewünschten, chemisch regulierbaren DNA-Folge.

Außerdem betrifft die Erfindung ein solches Verfahren, bei dem dieses System eine Pflanze ist, und es schließt folgende Schritte ein:

(a) Aktivierung der Expression einer PolyA+-RNA aus dem chemisch regulierbaren Gen in dieser Pflanze;

(b) Isolierung dieser PolyA+-RNA;

(c) Konstruktion einer cDNA-Bibliothek aus dieser PolyA+-RNA;

(d) differenziertes "Screening" dieser cDNA-Bibliothek mit der aus RNA erzeugten cDNA in einer Kontrollpflanze, die nicht aktiviert ist;

(e) Isolierung von cDNA-Klonen, die chemisch regulierbar sind;

(f) Isolierung eines genomischen Klon aus einer genomischen Bibliothek dieser Pflanze unter Verwendung des cDNA-Klons aus Schritt (e) als Sonde;

(g) Subklonieren des chemisch regulierbaren Gens aus diesem genomischen Klon und

(h) Isolierung der gewünschten, chemisch regulierbaren DNA-Folge.

Bevorzugt wird ein Verfahren, bei welchem das chemisch regulierbare Gen ein chemisch induzierbares Gen ist, bei-

spielsweise ein PR-Protein-Gen, z. B. ein Tabak-PR-1a-, -PR-1b-, -PR-1c-, PR-1'-, PR-Q- oder PR-R-Gen, ein Gurken-Chitinase-Gen oder ein basisches oder saures β -1,3-Glucanase-Gen des Tabaks. Außerdem wird ein Verfahren bevorzugt, bei welchem das PR-Protein-Gen im Schritt (a) durch ein chemisches Induziermittel oder ein Pathogen aktiviert wird.

Die Erfindung schließt außerdem im wesentlichen reine DNA ein, die nach den genannten Verfahren hergestellt wurde.

B. Chemisch regulierbare DNA-Folgen mit Teilen von natürlich vorkommenden Codierungsfolgen

Neben den vollständig nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Folgen, die oben im Verfahren A beschrieben wurden, sieht die Erfindung auf die nicht-codierende DNA-Folge einer natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren DNA-Folge in Kombination mit einem Teil, nicht aber einer vollständigen Codierungsfolge vor, mit welcher die regulierbare Folge in einem natürlich vorkommenden Gen assoziiert ist. Insbesondere schließt die vorliegende Erfindung, vorzugsweise in einer im wesentlichen reinen Form, eine DNA-Folge ein, welche besteht aus einer ersten DNA-Komponentenfolge, die eine nichtcodierende, chemisch regulierbare DNA-Folge eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist oder eine wesentliche Sequenzhomologie dazu aufweist, wobei diese erste Komponentenfolge die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren kann, wobei diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, und einer zweiten DNA-Komponentenfolge, die Teil einer, aber keine vollständige transkribierbare DNA-Folge ist oder eine wesentliche Sequenzho-

mologie dazu hat, welche mit der ersten Komponente in dem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen assoziiert ist. Das natürlich vorkommende, chemisch regulierbare Gen kann pflanzlichen Ursprungs sein, beispielsweise in einer einkeimblättrigen oder zweikeimblättrigen Pflanze vorkommen, und es kann durch einen unterdrückenden oder einen induzierenden chemischen Regler reguliert werden. Die zweite DNA-Komponentenfolge ist im typischen Fall eine codierende Folge. Eine bevorzugte zweite DNA-Folge für die vorliegende Erfindung ist eine Folge, welche das Signalpeptid eines Proteins codiert, das durch das natürlich vorkommende, chemisch regulierbare Gen exprimiert wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine DNA-Folge, die besteht aus einer ersten nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Folge und einer zweiten codierenden DNA-Folge von einem PR-Protein-Gen, beispielsweise einem PR-Protein-Gen von einer zweikeimblättrigen Pflanze, vorzugsweise von Tabak oder Gurke, wie ein PR-1a-, PR-1b-, PR-1c-, PR-1'-, PR-Q- oder PR-R-Gen, ein Chitinase-Gen oder ein basisches oder saures β -1,3-Glukanase-Gen. Bevorzugt wird eine DNA-Folge von einem PR-Protein-Gen, bei welchem die Transkription durch einen induzierenden chemischen Regler reguliert wird. Insbesondere betrifft die Erfindung eine DNA-Folge, bei welcher sich die erste nicht-codierende DNA-Folge im 5'-Flankierungsbereich eines der genannten PR-Protein-Gene befindet, sich beispielsweise in den annähernd 2000 Basenpaaren neben der Transkriptionsstartstelle dieses PR-Protein-Gens befindet. Am günstigsten ist eine DNA-Folge, die aus einer bevorzugten ersten nicht-codierenden Folge, wie sie oben genannt wurde, und einer zweiten codierenden DNA-Folge, die für ein Signalpeptid codiert, wie oben erwähnt wurde, besteht.

Bevorzugt werden vor allem im wesentlichen reine DNA-Folgen, wie sie in "Sequenz 1", "Sequenz 2", "Sequenz 5" und "Sequenz 6" gezeigt werden, und im wesentlichen reine DNA-Folgen mit wesentlicher Sequenzhomologie mit diesen "Sequenzen" 1, 2, 5 und 6. Diese "Sequenzen" sind Beispiele für chemisch regulierbare DNA-Folgen, die aus einer ersten nicht-codierenden und einer zweiten codierenden DNA-Folge bestehen und von den PR-Protein-Genen des Tabaks PR-1a, PR-1' und von zwei Formen der basischen Tabak- β -1,3-Glucanase abgeleitet wurden. "Sequenz 1" zeigt die Folge des repräsentativen PR-1a-Gens von Tabak. Die Nukleotide 1 bis etwa 1150 sind die nicht-codierende, 5'-flankierende, chemisch induzierbare DNA-Folge und ein Teil der PR-1a-Codierungsfolge, die natürlich in der Tabakpflanze vorkommen. In diesem Fall liegt die chemisch induzierbare Komponentenfolge im Anschluß an die Codierungsfolge. Die Nukleotide, welche die Codierung für die ersten dreißig Aminosäuren haben, bilden die Codierungsfolge für das Signalpeptid des PR-1a-Proteins. Die Codierungsfolge kann von der nicht-codierenden Folge entfernt werden, um die nicht-codierende, chemisch induzierbare DNA-Folge, frei von jeder Codierungsfolge, zu schaffen, wie sie oben im Teil A beschrieben wurde. Diese Entfernung kann durch herkömmliche Techniken, beispielsweise Restriktionsenzymverdauung, vorgenommen werden.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Methode zur Herstellung einer DNA-Folge, die besteht aus einer ersten DNA-Komponentenfolge, die eine nicht-codierende, chemisch regulierbare DNA-Folge eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist oder wesentliche Sequenzhomologie dazu hat, wobei diese erste Komponentensequenz die Transkrip-

tion einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren kann, wobei diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, und einer zweiten DNA-Komponentenfolge, die Teil einer transkribierbaren DNA-Folge, diese aber nicht vollständig ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat, mit welcher die erste Komponente in dem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen assoziiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA aus einem natürlich vorkommenden Gen in im wesentlichen reiner Form isoliert oder chemisch oder enzymatisch synthetisiert wird. Bevorzugt werden die oben im Teil A genannten besonderen Verfahren und die dadurch gewonnenen, im wesentlichen reinen DNA-Folgen.

C. Schimärische Gene, die chemisch regulierbare DNA-Folgen enthalten

Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung ist eine schimärische DNA-Folge (ein schimärisches Gen), die wenigstens eine chemisch regulierbare DNA-Folge enthält. Zwei Typen dieser schimärischen Folgen werden als Beispiel gegeben. Die einfachere oder aus zwei Teilen bestehende schimärische DNA-Folge besteht aus einer chemisch regulierbaren DNA-Folge und einer transkribierbaren DNA-Folge, so daß das schimärische Gen in Pflanzengewebe unter geeigneten Bedingungen der chemischen Regulierung exprimiert werden kann. Genauer formuliert, die Erfindung schließt eine chemisch regulierbare, schimärische DNA-Folge ein, die aus einer ersten nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Komponentenfolge, welche die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren kann, wobei diese Regulierung von einem chemischen

Regler abhängig ist, und einer zweiten DNA-Komponentenfolge besteht, welche in eine Pflanze oder in Pflanzengewebe transkribiert werden kann. Die DNA-Komponentenfolgen können von natürlichen Quellen abgeleitet oder synthetisch hergestellt werden.

Die zweite DNA-Folge kann als eine RNA transkribiert werden, welche die Expression eines phänotypischen Merkmals durch einen "Anti-sense"-Mechanismus regulieren kann. Als Alternative dazu kann die zweite DNA-Folge in der schimärischen DNA-Folge in das Pflanzengewebe transkribiert und translatiert, d. h., codiert, werden, um ein Polypeptid zu erzeugen, das in einem phänotypischen Merkmal resultiert. Das schimärische Gen wird so konstruiert, daß die zweite DNA-Folge in geeigneter Weise mit der chemisch regulierbaren DNA-Folge assoziiert wird, im typischen Fall in einer angrenzenden Orientierung zu dieser, um die Transkription zu gewährleisten. Die Assoziation erfolgt mit herkömmlichen Methoden.

Bevorzugt wird eine schimärische DNA-Folge, die aus einer ersten nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Komponente und einer zweiten, transkribierbaren DNA-Komponente besteht, wobei die erste nicht-codierende DNA-Folge eine der oben im Teil A genannten bevorzugten DNA-Folgen ist. Die erste DNA-Komponentenfolge kann durch Unterdrücken oder Induzieren mittels eines chemischen Reglers reguliert werden. Eine besondere Folge der Erfindung ist eine schimärische DNA-Folge, bei welcher die erste DNA-Komponentenfolge wesentliche Sequenzhomologie mit einer chemisch regulierbaren DNA-Folge in einem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen von einer Pflanze hat.

Bevorzugt wird eine schimärische DNA-Folge, bei welcher die erste DNA-Komponentenfolge eine chemisch regulierbare DNA-Folge in einem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen von einer Pflanze ist oder wesentliche Sequenzhomologie mit dieser hat, und die zweite DNA-Komponentenfolge eine codierende Folge ist, welche transkribiert und translatiert werden kann, um ein Polypeptid zu produzieren, das in einem phänotypischen Merkmal resultiert. Vorzugsweise grenzt diese zweite DNA-Komponentenfolge an die erste codierende DNA-Folge an. Besonders bevorzugt wird eine solche schimärische DNA-Folge, bei welcher die erste DNA-Komponentenfolge die chemisch induzierbare DNA-Folge in einem PR-Protein-Gen, beispielsweise einem PR-Protein von einer zweikeimblättrigen Pflanze, wie Tabak oder Gurke, ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat. Beispiele dafür werden oben in Teil A gegeben.

Ein zweiter, als Beispiel gegebener Typ einer schimärischen DNA-Folge enthält drei DNA-Komponentenfolgen, die ihren Ursprung in zwei oder mehr Quellen haben. Beim einfachsten Ausführungsbeispiel besteht diese schimärische DNA-Folge aus der zweiteiligen DNA-Folge, wie sie oben im Teil B beschrieben wurde, und einer dritten DNA-Folge, die von wenigstens einer unterschiedlichen Quelle stammt. Genauer formuliert, dieser Typ der schimärischen DNA-Folge, die aus einer ersten DNA-Komponentenfolge besteht, welche eine nicht-codierende, chemisch regulierbare DNA-Folge eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat, wobei diese erste DNA-Komponentenfolge die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regu-

lieren kann und diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, und aus einer zweiten DNA-Komponentenfolge, die Teil einer, aber keine vollständige transkribierbare DNA-Folge ist oder eine wesentliche Sequenzhomologie zu dieser Art, mit welcher die erste Komponente in dem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen assoziiert ist, hat eine dritte DNA-Komponentenfolge, die in eine Pflanze oder in Pflanzengewebe transkribiert werden kann. Vorzugsweise ist das natürlich vorkommende, chemisch regulierbare Gen ein Pflanzengen.

Die zweite und die dritte DNA-Komponentenfolge sind im typischen Fall codierende Folgen. Die dritte DNA-Komponente kann von mehr als einer natürlichen oder synthetischen Quelle abgeleitet werden. Die beiden ersten DNA-Komponenten haben im typischen Fall natürlichen Ursprung. Wenn der Ursprung eine Pflanze ist, kann es eine einkeimblättrige, zweikeimblättrige oder nacktsamige Pflanze sein. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel beinhaltet die zweite DNA-Folge die Nukleotidfolge, welche das Signalpeptid des chemisch regulierbaren Gens codiert, in welchem die beiden ersten DNA-Folgen vorkommen. Wenn die chemisch regulierbare DNA-Folge einem Teil der Codierungsfolge des Gens zugeordnet ist, von der es abgeleitet wurde, muß die dritte DNA-Folge nicht nur die richtige Orientierung haben, sondern muß sich auch im richtigen Leseraster mit der zweiten DNA-Folge befinden. Diese Orientierung kann durch Techniken erreicht werden, die allgemein in Fachkreisen bekannt sind.

Bevorzugt werden schimärische DNA-Folgen, bei denen die erste und die zweite DNA-Folgenkomponente den oben im Teil B genannten entsprechen. Beispielsweise ist eine bevorzugte

schimärische DNA-Folge die, bei welcher die erste DNA-Komponentenfolge die chemisch induzierbare DNA-Folge in einem PR-Protein-Gen von einer zweikeimblättrigen Pflanze, beispielsweise Tabak oder Gurke, ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat. Beispiele für PR-Protein-Gene werden oben genannt.

Die oben beschriebenen schimärischen Gene schließen eine Vielfalt möglicher Konstruktionen ein. Eine chemisch regulierbare, nicht-codierende Folge kann einem Gen zugeordnet werden, welches die Blütenbildung oder Fruchtreifung steuert; einem Gen, das die Toleranz oder Resistenz gegenüber Herbiziden oder vielen Typen von Schädlingen, beispielsweise Pilzen, Viren, Bakterien, Insekten, Nematoden oder Spinnentieren, bewirkt; einem Gen, das die Produktion von Enzymen oder sekundären Stoffwechselprodukten steuert; die männliche oder weibliche Sterilität; den Zwergwuchs; den Geschmack; Nährwerteigenschaften und ähnliche. Unter Anwendung der vorliegenden Erfindung können solche Merkmale durch den Bauer oder Gärtner verstärkt werden, der damit nicht mehr ausschließlich von natürlichen Faktoren abhängig ist. Ein für die Steuerung besonders interessantes Merkmal phänotypischer Art ist die Produktion von Stoffwechselprodukten in Gewebekulturen oder im Bioreaktor.

Eine bevorzugte schimärische DNA-Folge ist eine Zwei- oder Dreikomponentenfolge, in welcher die codierende DNA-Komponentenfolge für ein phänotypisches Merkmal codiert, beispielsweise ein aus der folgenden Gruppe ausgewähltes Merkmal, wie Toleranz oder Resistenz gegenüber einem Herbizid, Pilz, Virus, Bakterium, Insekt, einer Nematode oder einem

Spinnentier; Produktion von sekundären Stoffwechselprodukten; männliche oder weibliche Sterilität und Produktion eines Enzyms oder einer anderen Verbindung. Bevorzugt wird vor allem eine aus zwei oder drei Komponenten bestehende, schimärische DNA-Folge, bei welcher die codierende Komponentenfolge für Toleranz oder Resistenz gegenüber Herbiziden codiert, beispielsweise den Wildtyp von oder herbizidresistente Azetohydroxysäuresynthase (AHAS) codiert, oder bei welcher die codierende Komponentenfolge für Resistenz gegenüber Insekten codiert, beispielsweise für Bacillus thuringiensis-Endotoxin (BT) codiert.

Wenn die schimärische Folge als Untersuchungsmittel für chemische Regler verwendet werden soll, ist das phänotypische Merkmal vorzugsweise ein analysierbarer Marker. Zu den geeigneten Markern gehören Luziferase (LUX), Chlorampheniklazetyltransferase (CAT), Neomycinphosphotransferase (NPT), Nopalinsynthase (NOS), Oktopinsynthase (OCS), Beta-1,3-Glukuronidase (GUS), Azetohydroxysäuresynthase (AHAS) und Bacillus thuringiensis-Endotoxin (BT), wobei diese Aufstellung keine Einschränkung darstellt. Bevorzugte Marker sind Beta-1,3-Glukuronidase (GUS), Azetohydroxysäuresynthase (AHAS) und Bacillus thuringiensis-Endotoxin (BT).

Ein repräsentatives Beispiel für eine solche schimärische DNA-Folge, die in den Beispielen ausführlich beschrieben wird, ist eine zweiteilige schimärische DNA-Folge, welche die nicht-codierende 5'-Flankierungsfolge des PR-1a-Gens enthält. Zwar wird als eines der Beispiele für den Marker die Codierungsfolge für das GUS-Gen gegeben, es könnte aber auch jeder andere der oben gegebenen Marker eingesetzt werden. Die analoge dreiteilige schimärische Folge enthält

einen Teil der Codierungsfolge des PR-1a-Gens. Diese Konstruktionen sind besonders nützlich, da die Wirkung der chemischen Induzierung, d. h., die Beta-Glukuronidase-Enzymaktivität, in Pflanzenzellen oder deren Extrakten leicht feststellbar ist. Andere besondere Ausführungsbeispiele, beispielsweise die, welche die nicht-codierende Folge eines der Tabak- β -1,3-Glukanase-Gene enthalten, und die, welche die Codierungsfolge für den Wildtyp von oder herbizidresistente Azetohydroxysäuresynthase oder für das Bacillus thuringiensis-Endotoxin enthalten, werden im Teil L, Beispiele, beschrieben.

Bevorzugte schimärische DNA-Folgen sind aus zwei oder drei Komponenten bestehende, schimärische DNA-Folgen, bei denen die erste DNA-Komponentenfolge der 5'-Flankierungsbereich des Tabak-PR-1a-Gens ist und mehr als etwa 300, beispielsweise zwischen 300 und 2000, vorzugsweise zwischen 600 und 1000, Basenpaare neben der Transkriptionsstartstelle enthält.

Bevorzugt wird außerdem eine schimärische DNA-Folge, die aus drei Komponenten besteht, wobei die zweite DNA-Komponentenfolge für ein Signalpeptid codiert, worin beispielsweise die zweite DNA-Komponentenfolge für ein Peptid codiert, das ein Signalpeptid von einem PR-Protein-Gen, vorzugsweise dem PR-1a-Gen, ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu diesem hat.

Die Erfindung beinhaltet außerdem eine Methode zur Herstellung einer chemisch regulierbaren, schimärischen DNA-Folge, die besteht aus einer ersten nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Komponentenfolge, welche die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflan-

zengewebe regulieren kann, wobei diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, und einer zweiten DNA-Komponentenfolge, die in eine Pflanze oder in Pflanzengewebe transkribiert werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Komponentenfolgen ligiert werden. Ebenso beinhaltet die Erfindung eine Methode für die Herstellung einer schimärischen DNA-Folge, die besteht aus einer ersten DNA-Komponentenfolge, welche eine nicht-codierende, chemisch regulierbare DNA-Folge eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist oder wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat, wobei die erste DNA-Komponentenfolge die Transkription einer assoziierten DNA-Folge in einer Pflanze oder in Pflanzengewebe regulieren kann und diese Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist, einer zweiten DNA-Komponentenfolge, die Teil einer, aber keine vollständige transkribierbare DNA-Folge ist oder wesentliche Sequenzhomologie dazu hat, mit welcher die erste Komponente in dem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen assoziiert ist, und einer dritten DNA-Komponentenfolge, die in eine Pflanze oder in Pflanzengewebe transkribiert werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Komponentenfolgen gleichzeitig oder nacheinander ligiert werden.

D. Vektoren

Vektoren, die nach Standardtechniken hergestellt wurden und entweder die chemisch regulierbaren DNA-Folgen, die im Teil A oder B beschrieben wurden, oder die schimärischen DNA-Folgen enthalten, die im Teil C beschrieben wurden, stellen ein weiteres Merkmal der vorliegenden Erfindung dar. Vektoren sind rekombinante DNA-Folgen, die für Isolierungs- und

Vervielfältigungszwecke der genannten DNA-Folgen und für die Transformation von geeigneten Wirten mit diesen Folgen verwendet werden können. Bevorzugte Vektoren für Isolierung und Vervielfältigung sind Plasmide, die in einem geeigneten Wirtsmikroorganismus, beispielsweise in E. coli, vermehrt werden können. Bevorzugte Vektoren für die Transformation sind die, welche für die Transformation von Pflanzenzellen oder von Agrobacteria geeignet sind. Genauer formuliert, wenn andere Pflanzenzellen als Protoplaste transformiert werden, ist der bevorzugte Vektor ein Ti-Plasmid-abgeleiteter Vektor. Für den direkten DNA-Transfer in Protoplaste kann jeder der genannten Vektoren verwendet werden. Geeignete Vektoren, die als Ausgangsmaterial verwendet werden können, sind in Fachkreisen bekannt. Geeignete Vektoren zur Transformation von Pflanzengewebe und Protoplasten wurden von deFramond, A. u. a., Bio/Technology 1, 263 (1983); An, G. u. a., EMBO J. 4, 277 (1985); Potrykus, I. u. a., oben; Rothstein, S. J. u. a., Gene 53, 153 (1987) beschrieben. Neben diesen wurden in der Fachliteratur viele andere Vektoren beschrieben, die als Ausgangsmaterial in der vorliegenden Erfindung geeignet sind.

Die Vektoren, die nur die chemisch regulierbare DNA-Folge enthalten, wie das oben in den Teilen A oder B beschrieben wurde, können als Zwischenprodukte für die Herstellung eines Vektors verwendet werden, der die schimärische DNA-Folge enthält, wie sie im Teil C beschrieben wurde. Die Einfügung einer geeigneten Folge, die zur Transkription fähig ist, in einen solchen Zwischenvektor ergibt einen Vektor, der eine schimärische DNA-Folge nach der Erfindung enthält, die zur Transformation des gewünschten Pflanzengewebes, Protoplasten oder anderen Wirts verwendet werden kann. Als Alterna-

tive dazu kann eine schimärische DNA-Folge hergestellt und in einen geeigneten Vektor eingefügt werden, der dann zur Transforantion des gewünschten Pflanzengewebes oder anderen Wirts verwendet wird.

Die Konstruktion und Vervielfachung der Vektoren kann in einem geeigneten Wirt erfolgen, beispielsweise in E. coli. Zu den geeigneten E. coli-Stämmen gehören HB101, JM83, DH1, DH5~~α~~, L392 und ähnliche. Die Vektoren der Erfindung können als solche in einer direkten Gen-Transfer- oder einer Mikroinjektionsmethode eingesetzt werden. Unter bestimmten Umständen kann es vorteilhaft sein, den Vektor vor der Anwendung zu linearisieren. Als Alternative dazu können die Vektoren auf einen Agrobacterium-Wirt transferiert werden. Dieser Transfer erfolgt nach herkömmlichen Techniken, einschließlich der biparenteralen Anpassung (mating) (Simon, R. u. a., Bio/Technology 1, 74 (1983)), der triparenteralen Anpassung (Ditta, G. u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347 (1980)) oder der Transformation (Holsters, M. u. a., Mol. Gen. Genet. 163, 181 (1978)). Zu den geeigneten Stämmen von Agrobacterium gehören die Stämme A. tumefaciens LBA4404, CIB542 und CB8Z707, sie sind aber nicht auf diese beschränkt.

Bevorzugt werden die Vektoren, welche die bevorzugten DNA-Folgen enthalten, die oben in den Teilen A, B oder C genannt wurden. Außerdem ist ein bevorzugter Vektor einer, der in Pflanzenzellen oder in Agrobacterium funktional ist. Besonders bevorzugt werden die Vektoren, die im Teil L, Beispiele, beschrieben werden.

E. Pflanzengewebe, Pflanzen und Samen

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung sind Pflanzengewebe, Pflanzen oder Samen, welche die schimärischen DNA-Folgen enthalten, die oben beschrieben wurden. Bevorzugt werden die Pflanzengewebe, Pflanzen und Samen, welche die schimärischen DNA-Folgen enthalten, die als bevorzugt genannt werden.

Die Zellen von Pflanzengewebe werden mit den oben beschriebenen Vektoren nach jeder in Fachkreisen bekannten Methode transformiert, einschließlich der Methoden, die in den oben genannten Literaturangaben aufgeführt werden, und der Methoden, die in den nachfolgenden Beispielen detailliert beschrieben werden. Zu diesen Methoden gehören die direkte Infektion oder die Kokultivierung von Pflanzen oder Pflanzengewebe mit Agrobacterium. Ein sehr geeignetes Verfahren ist die Blattscheibentransformation, die von Horsch, R. B. u. a., Science 225, 1229 (1985), beschrieben wird. Als Alternative dazu kann der Vektor direkt transferiert werden, beispielsweise durch Elektroporation, durch Mikroinjektion oder durch Transformation von Protoplasten bei Vorhandensein von Polyethylenglykol (PEG), Kalziumchlorid oder in einem elektrischen Feld, wie das oben ausführlicher beschrieben worden ist.

Die transformierten Zellen können ihren Ursprung in einkeimblättrigen oder zweikeimblättrigen Pflanzen haben und können ein oder mehrere der chemisch regulierbaren, schimärischen Gene dieser Erfindung enthalten. So werden beispielsweise Gene in das Pflanzengewebe eingeführt, die auf Resistenz oder Toleranz gegenüber Herbiziden und einer

Vielzahl von insektiziden, viruellen, bakteriellen, Pilz- oder anderen Schädlingen, auf Sterilität, auf Größe, auf Blütenbildung und Fruchtreifung codieren, und diese Zellen oder Protoplaste werden schließlich wieder in Pflanzen regeneriert, in denen diese Merkmale durch Manipulation mit einem chemischen Regler gesteuert werden können. Als Alternative dazu können Zellen in Gewebekultur oder in einem Bioreaktor vermehrt werden, um Enzyme oder sekundäre Stoffwechselprodukte zu erzeugen. Wenn eine Enzymanalyse ausgeführt werden soll, weist der Codierungsschnitt des schimärischen Gens beispielsweise ein LUX-, CAT-, NPT-, NOS-, OCS-, GUS-, AHAS- oder BT-Gen auf, wie sie oben identifiziert wurden. Derartige schimärische Gene, die eine chemisch induzierbare Folge von einem PR-Gen enthalten, sind auf Grund ihrer leichten Anwendbarkeit und des einfachen Nachweises des Enzymproduktes ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel der Erfindung.

Nach der Transformation wird das transformierte Zell- oder Pflanzengewebe nach herkömmlichen Techniken selektiert oder gesichtet. Das transformierte Zell- oder Pflanzengewebe enthält die oben genannte schimärische DNA-Folge und kann auf Wunsch nach den bekannten Techniken regeneriert werden, zu denen die in den oben genannten Literaturangaben aufgeführten und in den folgenden Beispielen genannten Techniken für ein- und zweikeimblättrige Pflanzen gehören. Zu den Spezies, die nach diesen Methoden regeneriert werden können, gehören Mais, Sonnenblume, Rübsamen, Klee, Tabak, Karotte, Baumwolle, Luzerne, Reis, Kartoffel, Aubergine und Gurke, sie sind aber nicht auf diese Spezies beschränkt. Die regenerierten Pflanzen werden nach Standardverfahren zur Transformation gesichtet. Die Nachkommenschaft der regenerierten

Pflanzen wird ständig auf das fortbestehende Vorhandensein der integrierten DNA-Folge gesichtet und selektiert, um verbesserte Pflanzen- und Samenstämme zu entwickeln. Die DNA-Folge kann durch eine Vielzahl von Techniken, einschließlich der klassischen Züchtung, der Protoplastfusion, der Kernübertragung und des Chromosomentransfers, in andere genetische Linien eingebracht werden.

F. Vorteile und Anwendungen

Vorliegende Erfindung bietet eine Reihe von Vorteilen und nutzt die Abstammung von leicht steuerbaren, regulierbaren Expressionen in Pflanzen oder Pflanzengewebe für die schimärischen Gene, die chemisch regulierbare DNA-Folgen enthalten. Die Regulierung von Genen, die nach einem "Anti-sense"-Mechanismus wirken, oder von Genen, deren Expression zur Produktion eines phänotypischen Merkmals führt, ist möglich. Besonders wichtig ist die Fähigkeit, Zeit und Rate der Gen-Expression zu steuern, ebenso wie die Leichtigkeit, diese Steuerung, gleichmäßig in der gesamten Pflanze oder in lokalisierten Teilen der Pflanze, vorzunehmen.

Die Steuerung kann einfach durch Anwendung des chemischen Reglers bei Pflanzengewebe oder bei der Pflanze oder bei einem Teil der Pflanze in einer Art und Weise und in einer Menge erfolgen, daß das (die) schimärische(n) Gen(e) reguliert wird (werden), dessen (deren) Expression in Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzen gewünscht wird. Wenn das zu expressierende Merkmal beispielsweise vorzugsweise nur in den Blättern expressiert werden soll, dann kann dieses Ziel leicht und wirksam durch Besprühen oder Bestäuben der Blätter zu einem Zeitpunkt, zu welchem diese Expression

optimiert wird und bevor eine Wanderung auf andere Teile der Pflanze eintritt, erreicht werden. Als Alternative dazu kann die gleichmäßige Expression in dem Teil der Pflanze, der sich über der Erde befindet, dadurch erreicht werden, daß die Anwendung auf die vollständige Pflanze (d. h., den Stengel und beide Blattseiten) erfolgt. Wird eine Expression in den Wurzeln gewünscht, ist die Aufbringung auf den Samen oder den Boden um den Samen oder die Wurzeln eine mögliche Regulierungsmethode. Die Expression in einem Bioreaktor ist leicht ausführbar, beispielsweise durch Aufbringung des chemischen Reglers auf das die Zellen berührende Medium.

Die Fähigkeit, Zeitpunkt, Rate und/oder Gen-Expression von neuartigen phänotypischen Merkmalen in transgenen Pflanzen steuern zu können, bietet eine Reihe brauchbarer Vorteile. Wenn beispielsweise durch einen Enttoxifikationsmechanismus Toleranz gegenüber einem Herbizid oder anderen Pestizid in eine Pflanze eingeführt wird, kann dieses Merkmal durch die entsprechende Zeitwahl bei der Aufbringung des chemischen Reglers optimiert werden. So kann der Regler in Abhängigkeit von der Methode, die eine optimale Toleranz erbringt, vor, mit oder nach der Aufbringung eines Herbizids oder anderen Pestizids aufgebracht werden.

Außerdem ist es jetzt möglich, die Produktion von Verbindungen zu regulieren, deren Biosynthese durch endogene oder fremde Gene gesteuert wird. Nach der chemischen Induzierung kann die Produktion dieser Produkte zum gewünschten Zeitpunkt beginnen. Der induzierte Prozeß könnte eine mehrstufige Biosynthese oder eine einstufige Umwandlung eines Stoffwechselprodukts sein.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ergibt sich aus der Fähigkeit, Entwicklungsprozesse in Pflanzen zum gewünschten Zeitpunkt durch die Aufbringung einer regulierenden Chemikalie zu regulieren. Beispielsweise kann die Synchronisation der Pflanzenentwicklung (Keimung, Treiben von Schößlingen, Treiben von Knospen, Blütenbildung, Blütezeit, Fruchtreifung, Abtrocknen, Abszission usw.) erreicht werden. Außerdem kann die normale Pflanzenentwicklung verhindert werden. Dazu kann beispielsweise ein Toxin-Gen eingeführt werden, welches die gewünschte Entwicklungsstufe beeinträchtigen könnte, eine DNA-Folge, welche die Entwicklungsstufe durch einen "Anti-sense"-Mechanismus blockieren würde, oder ein Gen, dessen Expression den Übergang zu einer neuen Entwicklungsstufe blockiert und das chemisch unterdrückt werden kann, damit die Entwicklung weitergehen kann. Eine mögliche Anwendung ist die Induzierung der männlichen oder weiblichen Sterilität, um die Früchte gesteuert hybridisieren zu können.

Weitere Vorteile der vorliegenden Erfindung sind neuartige Untersuchungsverfahren, vorzugsweise Enzymanalyseverfahren. Beispielsweise ist die Identifizierung neuer chemischer Regler jetzt ziemlich leicht möglich. Diese Analysemethoden beinhalten die Verwendung von transformierten Pflanzen oder Pflanzenzellen, die eine schimärische DNA-Folge dieser Erfindung enthalten. Auf den transformierten Wirt wird eine Chemikalie aufgebracht, und die Transkription der transkribierbaren DNA-Folge wird anhand einer Kontrolle gemessen; in der Regel wird die Transkription in Form eines Translationsproduktes oder als Wirkung eines solchen Produktes festgestellt. Die Analyse kann auf unterschiedliche Weise ausgeführt werden, im typischen Fall aber wird sie mit ganzen, re-

generierten Pflanzen (durch Aufbringung der Chemikalie auf die Pflanze) oder mit kultivierten Zellen oder Gewebe (durch Aufbringung der Chemikalie auf die Zellen oder das Gewebe) und anschließende Verwendung eines Substrats für die Enzymaktivität durchgeführt. Das Produkt der Enzymaktivität wird dann nach Standardmethoden, z. B. spektrofotometrische Messungen, festgestellt.

Insbesondere schließt die Erfindung ein Verfahren ein für Identifizierung eines chemischen Reglers, welches besteht aus der Transformation eines Wirts mit einer schimärischen DNA-Folge, wie sie oben im Teil C beschrieben wurde, oder mit einem Vektor, der diese schimärische DNA-Folge enthält, der Aufbringung eines mutmaßlichen chemischen Reglers auf den transformierten Wirt und der Messung der Expression des phänotypischen Merkmals. Ein bevorzugtes Verfahren ist ein Verfahren, bei welchem der transformierte Wirt Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen ist. Bevorzugt wird außerdem ein Verfahren, bei welchem die schimärische DNA-Folge eine oben als bevorzugt genannte Folge ist, beispielsweise eine solche, bei der die erste DNA-Komponentenfolge dieser schimärischen DNA eine chemisch induzierbare Folge ist, die eine chemisch induzierbare Folge eines PR-Protein-Gens ist oder eine wesentliche Sequenzhomologie zu dieser hat, und bei welcher das phänotypische Merkmal, das durch die schimärische DNA codiert wird, ein analysierbarer Enzym-Marker ist.

Ein weiteres Merkmal der Erfindung ist die Entwicklung von neuartigen Methoden zur Identifizierung anderer chemisch regulierbarer DNA-Folgen. Es wird ein Vektor, der eine mutmaßliche chemisch regulierbare DNA-Folge enthält, hergestellt, beispielsweise aus einem wirt-selektierbaren Marker und einem selektierbaren oder analysierbaren Marker. Zu den ge-

eigneten selektierbaren Markern gehören Antibiotika-Resistenz-Gene und Herbizid-Resistenz-Gene. Repräsentative Antibiotika-Resistenz-Gene sind die für Hygromyzin, Kanamycin, Chloramphenikol, Bleomycin, Puromycin, Lincomycin, G418 und Methotrexat. Ein besonders geeignetes Gen zur Resistenz gegenüber Hygromyzin ist Aminoglykosidphosphotransferase IV. Geeignete Vektoren für die Transformation von Pflanzen, die das Hygromyzin-Resistenz-Gen enthalten, wurden von Rothstein, S. J. u. a., Gene 53, 153 (1987), beschrieben. Beispiele für Herbizidresistenz-Gene codieren beispielsweise auf Sulfonylharnstoffe, Glyphosat, Phosphinotrizin und Atrazin.

Zu den geeigneten analysierbaren Markern gehören Enzym-Gene, Gene für Antigene, Immunoglobuline und ähnliche sowie Antibiotikaresistenz-Gene. Zu den geeigneten Enzym-Markern gehören LUX, CAT, NPT, NOS, OCS, GUS, AHAS und BT. Ein besonders geeignetes Enzym ist Beta-1,3-Glukuronidase (GUS), weil es eine besonders einfache Enzymanalyse ermöglicht. Die DNA-Folgecodierung für die analysierbaren Marker kann unter Anwendung herkömmlicher Techniken in den Vektor eingefügt werden.

Die mutmaßliche regulierbare DNA-Folge wird im typischen Fall neben dem analysierbaren Marker-Gen eingefügt, so daß die Expression des analysierbaren Markers unter der Steuerung durch die mutmaßliche DNA-Folge geschieht. Dann wird der Vektor zur Transformation von Pflanzengewebe oder eines anderen geeigneten Wirts verwendet. Das transformierte Pflanzengewebe oder der Wirt werden auf der Grundlage des pflanzenselektierbaren Markers, im typischen Fall der antibiotischen Resistenz ausgewählt. Dann wird auf das Pflanz-

zengewebe oder den anderen Wirt ein chemischer Regler aufgebracht, gefolgt von der Selektion oder der Regeneration des transformierten Gewebes. Die Induzierung oder Unterdrückung des analysierbaren Markers nach der Aufbringung des chemischen Reglers identifiziert die mutmaßliche DNA-Folge als eine, welche die Transkription einer benachbarten DNA-Folge regulieren kann, wobei die Regulierung von einem chemischen Regler abhängig ist. Die Analyse kann an ganzen, regenerierten oder transformierten Pflanzen, beispielsweise durch Aufbringung des chemischen Reglers auf die Blätter oder anderes Pflanzengewebe und Messung der Expression des analysierbaren Markers, durchgeführt werden. Als Alternative dazu kann die Analyse an transformiertem Callusgewebe oder einem anderen Wirt in Zellkultur durchgeführt werden, wozu die mutmaßliche chemische Reglersubstanz auf die Callus- oder andere Kultur aufgebracht und die Expression des analysierbaren Markers gemessen wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren für die Identifizierung einer chemisch regulierbaren DNA-Folge, das besteht aus den Schritten:

(a) Transformation eines Wirts mit einer mutmaßlichen chemisch regulierbaren DNA-Folge oder einem Vektor, der diese Folge enthält, einer zweiten DNA-Folge, die ein wirtselektiver Gen-Marker ist, und einer dritten DNA-Folge, welche für ein phänotypisches Merkmal codiert;

(b) Aufbringung eines chemischen Reglers auf diesen transformierten Wirt und

(c) Messung der Expression oder Selektion zur Änderung der Expression des phänotypischen Merkmals, das durch die drit-

te DNA-Folge codiert wird.

Bevorzugt wird dabei ein Verfahren, bei welchem diese dritte DNA-Folge ein wirtselektierbarer oder ein analysierbarer Gen-Marker ist, und ein Verfahren, bei welchem die zweite oder dritte DNA-Folge ein Gen-Marker für Herbizidresistenz oder Antibiotikaresistenz ist, der beispielsweise ausgewählt wurde aus der Gruppe Hygromyzin, Kanamyzin, Chloramphenikol, Bleomyzin, Puromyzin, Linkomyzin und Methotrexat-Resistenz-Genen, z. B. einem Aminoglykosidphosphotransferase-IV-Hygromyzinresistenz-Gen.

Bevorzugt wird auch ein Verfahren, bei welchem die mutmaßliche chemisch regulierbare DNA-Folge der dritten DNA-Folge zugeordnet ist und vorzugsweise neben dieser liegt. Weiterhin bevorzugt wird ein Verfahren, bei welchem der transformierte Wirt Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen ist.

Außerdem wird ein Verfahren bevorzugt, bei welchem die dritte DNA-Folge auf einen analysierbaren Enzym-Marker codiert, der aus folgender Gruppe ausgewählt wurde: Luziferase (LUX), Chloramphenikolazetyltransferase (CAT), Neomyzinphosphotransferase (NPT), Nopalinsynthase (NOS), Oktopinsynthase (OCS), Beta-1,3-glukuronidase (GUS), Azetohydroxysäuresynthase (AHAS) und Bacillus thuringiensis-Endotoxin (BT).

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung sind im wesentlichen reine, chemisch regulierbare DNA-Folgen, die durch die genannten Verfahren identifiziert werden.

Die vorliegende Erfindung sieht auch eine Methode für die Auswahl von transformiertem Pflanzenmaterial vor. Pflanzen-

material wird einer exogenen DNA-Folge ausgesetzt, die eine chemisch regulierbare DNA-Folge enthält, für welche ein chemischer Regler bekannt ist, und eine zweite DNA-Folge für ein phänotypisches Merkmal wird mit dem Regler behandelt und die Expression des phänotypischen Merkmals angestrebt. Die Beobachtung des Merkmals bestätigt, daß die Transformation der mutmaßlichen Transformanten tatsächlich erfolgt ist. Zu den typischen phänotypischen Merkmalen für die Zwecke dieser Methode gehören die oben beschriebenen wirtselektiven Marker und die analysierbaren Marker.

Insbesondere schließt die Erfindung eine Methode ein zur Auswahl von transformierten Pflanzenzellen oder -gewebe, die einer transformierenden DNA-Behandlung unterzogen wurden, die aus einer ersten DNA-Komponentenfolge besteht, welche durch einen bekannten chemischen Regler chemisch regulierbar ist, und einer zugeordneten zweiten DNA-Folge, welche für ein phänotypisches Merkmal codiert, wobei diese Methode aus den folgenden Schritten besteht: (a) Behandlung von mutmaßlichen Transformanten mit dem bekannten chemischen Regler und (b) Auswahl von Transformanten nach der Expression des phänotypischen Merkmals, das durch die zweite DNA-Folge codiert wurde. Eine bevorzugte Methode ist eine solche Methode, bei der dieses phänotypische Merkmal antibiotische Resistenz ist, beispielsweise Resistenz gegen Hygromyzin, Kanomycin, Chloramphenikol, Belomycin, Puromycin, Linkomycin, G418 und Methotrexat, oder ein analysierbarer Enzym-Marker, der beispielsweise aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus Luziferase (LUX), Chloramphenikolazetyltransferase (CAT), Neomycinphosphotransferase (NPT), Nopalinsynthase (NOS), Oktopinsynthase (OCS), Beta-1,3-Glukuronidase (GUS), Azetohydroxysäuresynthase (AHAS)

und Bacillus thuringiensis-Endotoxin (BT) besteht.

G. Signalpeptide

Ein Signalpeptid oder eine Signalfolge ist eine spezielle N-terminale Aminosäurefolge in einem Protein, die in das endoplasmische Netzwerk eintritt. Eine solche Folge enthält in eukaryotischen Zellen im typischen Fall etwa 15 bis 40 Aminosäurereste, von denen viele hydrophob sind. Die Folge wird schließlich vom reifen Protein geschnitten.

Im Kontext der vorliegenden Erfindung ist das Signalpeptid eines chemisch regulierbaren Gens bei der Konstruktion der oben beschriebenen dreiteiligen schimärischen Konstruktionen von Nutzen. Diese schimärischen Konstruktionen enthalten eine erste, chemisch regulierbare Folge, eine zweite DNA-Folge, die für ein Signalpeptid in Proteinen codiert, und eine dritte Folge, die für ein phänotypisches Merkmal codiert. Das phänotypische Merkmal ist vorzugsweise ein leicht feststellbares, beispielsweise in einem Analyse- oder Probeverfahren. Die Einbeziehung einer für ein Signalpeptid codierenden DNA-Folge in die schimärische Konstruktion ermöglicht es, daß das durch die dritte DNA-Folge exprimierte Produkt vom endoplasmischen Netzwerk der Wirtszelle zur endgültigen Zielstelle hin weg gerichtet ist.

Ein zusätzliches Merkmal der Erfindung ist daher ein Signalpeptid vom Tabak-PR-1a-Protein und ein Protein mit einer Aminosäurefolge, das eine wesentliche Sequenzhomologie zu diesem Peptid hat. Die Aminosäurefolge für dieses Peptid lautet:

MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuProSerPheLeuLeuVal-
SerThrLeuLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAla.

Vorliegende Erfindung beinhaltet auch die DNA-Folge, die für dieses Peptid (Siehe Folge 1) codiert, und DNA-Folgen, die wesentliche Sequenzhomologie zu dieser Folge haben. Wie bereits ausgeführt, beinhaltet die Erfindung auch (1) DNA-Folgen, welche die chemisch regulierbare Folge in Kombination mit der für das Signalpeptid codierenden Folge enthalten, und (2) dreiteilige schimärische DNA-Folgen, welche die chemisch regulierbare Komponente, die Codierungssektion für ein Signalpeptid und eine DNA-Folge, die transkribiert wird, vorzugsweise mit Translation, enthalten.

H. Neuartige PR-Gene

Vorliegende Erfindung betrifft auch neu isolierte und identifizierte PR-genomische DNA- und cDNA-Folgen von Genen, die hier als PR-1a, PR-1' und PR-R von Tabak, die pathogen-induzierbare Chitinase von Gurke, PR-Q von Tabak, die basische β -1,3-Glukanase 39.1 und 39.3 von Tabak, saure β -1,3-Glukanase von Tabak bezeichnet werden, und DNA-Folgen mit wesentlicher Sequenzhomologie zu diesen Genen. Die DNA-Folgen dieser Gene werden in den Folgen 1 bis einschließlich 8 dargestellt. Die neuartigen Gene der Folgen 1, 2, 5 und 6 (PR-1a, PR-1' und β -1,3-Glukanase 39.1 bzw. 39.3) stellen auch Ausführungsbeispiele der nicht-codierenden, chemisch regulierbaren DNA-Folgen nach der Erfindung, wie sie oben erwähnt wurden, dar. Die neuartigen Sequenzen 3, 4, 7 und 8 codieren für die PR-Proteine Gurkenchitinase, Tabak-PR-R, Tabak-PR-Q und die saure Form von Tabak- β -1,3-Glukanase. Einzelheiten zur Isolierung und Charakterisierung der Gene werden in den Beispielen gegeben.

I. Chemische Regler

Ein chemischer Regler ist als eine Substanz definiert, welche die Expression eines Gens durch eine chemisch regulierbare DNA-Folge unter bestimmten Bedingungen reguliert, wie das in der Definition des Begriffs angegeben wird. Die Substanz, in ionischer oder neutraler Form, mit oder ohne löslichmachende oder andere komplexbildende Moleküle(n) oder Anionen), ist in der Regel im Verhältnis zu dem System, das das chemisch regulierbare Gen zum gewünschten Regulierungszeitpunkt enthält, exogen. Die Verwendung von exogenen chemischen Reglern wird auf Grund der Einfachheit und Leichtigkeit der Steuerung der Menge des Reglers im System bevorzugt. Die Erfindung schließt jedoch auch die Verwendung von endogenen Reglern ein, z. B. Chemikalien, deren Aktivität oder Pegel im System künstlich durch andere Komponenten im System oder auf das System wirkend gesteuert wird.

Zu den chemischen Reglern gehören Chemikalien, von denen bekannt ist, daß sie PR-Proteine in Pflanzen induzieren, oder deren enge Derivate. Dazu zählen Benoesäure, Salizylsäure, Polyakrylsäure und deren substituierte Derivate; geeignete Substituenten sind u. a. niedere Alkyl-, niedere Alkoxy-, niedere Alkylthio- und Halogengruppen. Bei der Aufbringung auf Pflanzengewebe, vorzugsweise auf die Blätter der ganzen Pflanze, entwickeln sich im Pflanzengewebe erhöhte Pegel an mRNA und PR-Proteinen.

Eine weitere Gruppe von Reglern für die chemisch regulierbaren DNA-Folgen und die schimärischen Gene dieser Erfindung basiert auf der Benzo-1,2,3-thiadiazolstruktur und schließt die folgenden Typen von Verbindungen ein, ohne auf diese beschränkt zu sein: Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäu-

re, Benzo-1,2,3-thiadiazolethiokarbonsäure, Zyanobenzo-1,2,3-thiazol, Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäureamid, Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäurehydrazid und deren Derivate.

Eine bevorzugte Gruppe von Reglern schließt Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-thiokarbonsäure, 7-Zyanobenzo-1,2,3-thiazol, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäureamid, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäurehydrazid und deren Derivate ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

Zu den geeigneten Derivaten gehören, ohne auf die genannten beschränkt zu sein, Vertreter der genannten Typen von Verbindungen, bei denen die Benzo-1,2,3-Thiadiazolkomponente unsubstituiert oder substituiert ist durch kleine Substituenten, wie sie normalerweise in aromatischen Ringsystemen von Agrochemikalien eingesetzt werden, wie niederes Alkyl, niedere Alkoxygruppe, niederes Haloalkyl, niedere Haloalkoxy-, niedere Alkylthio-, Zyano-, Nitrogruppe und Halogen. Zu den geeigneten Derivaten gehören außerdem, ohne auf die genannten beschränkt zu sein, Vertreter der genannten Benzo-1,2,3-thiadiazolverbindungen, bei denen entweder die karbonsäure-, die thiokarbonsäure-, die karbonsäureamid- oder die karbonsäurehydrazidfunktionelle Gruppe unsubstituiert oder substituiert sind durch aliphatische, araliphatische oder aromatische Reste. Zu den geeigneten Resten gehören, ohne auf diese beschränkt zu sein, Alkyl (vor allem niederes Alkyl), Alkoxygruppe (vor allem niedere Alkoxygruppe), niederes Alkoxyalkyl, Alkoxyalkoxyalkyl, Zykloalkyl, Zykloalkylalkyl, Phenylalkyl (vor allem Benzyl), Naphthylalkyl, Phenoxyalkyl, Alkenyl und Alkynyl, worin der Alkylteil des Substituenten unsubstituiert oder substituiert

ist durch eine Hydroxy-, Halogen-, Zyano- oder Nitrogruppe und der aromatische Teil des Substituenten unsubstituiert oder substituiert ist durch kleine Substituenten, wie sie normalerweise in aromatischen Ringsystemen in Agrochemikalien eingesetzt werden, wie niederes Alkyl, niedere Alkoxygruppe, niederes Haloalkyl, niedere Haloalkoxygruppe, niedere Alkylthiogruppe, Zyanogruppe, Nitrogruppe und Halogen.

Regler, die auf der Benzo-1,2,3-thiadiazolstruktur basieren, schließen alle Molekularsysteme ein, die das tatsächlich als Regler wirkende Molekül freisetzen können.

Eine bevorzugte Gruppe von Reglern auf der Grundlage der Benzo-1,2,3-thiadiazolstruktur schließt Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäure, Alkylbenzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylat ein, bei denen die Alkylgruppe ein bis sechs Kohlenstoffatome hat, und die substituierten Derivate dieser Verbindungen. Zu den geeigneten Substituenten gehören niederes Alkyl, niedere Alkoxy-, niedere Alkylthiogruppe und Halogen. Insbesondere sind Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure und deren Alkylester, z. B. Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, bevorzugte Induktoren für die schimärischen DNA-Folgen, die chemisch regulierbare DNA-Folgen enthalten, welche von PR-Protein-Genen isoliert wurden. Die Synthese der genannten chemischen Regler und ihre Anwendung als Biozide kann der Br-PS 1 176 799 und Kirby, P. u. a., J. Chem. Soc. C 2250 (1970), entnommen werden.

Derivate von Benzo-1,2,3-Thiadiazol, die außerdem als Regler nach der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, werden in der US-Patentanmeldung, Serien-Nr 234 241 vom 18. August 1988 beschrieben, die hier als Verweis einbezogen wird.

Von den bevorzugten Spezies auf der Grundlage der Benzo-1,2,3-thiadiazolstruktur können beispielsweise Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäuresecbutylhydrazid und ähnliche genannt werden.

Eine weitere Gruppe von Reglern für die chemisch regulierbaren DNA-Folgen dieser Erfindung basiert auf der Pyridin-karbonsäurestruktur, beispielsweise der Isonikotinsäurestruktur und vorzugsweise der Haloisonikotinsäurestruktur. Bevorzugt werden Dichloroisonikotinsäuren und deren Derivate, beispielsweise die niederen Alkylester. Geeignete Regler dieser Klasse von Verbindungen sind beispielsweise 2,6-Dichloroisonikotinsäure und deren niedere Alkylester, vor allem der Methylester.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung ist folglich ein Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens, wobei dieses Verfahren darin besteht, auf Pflanzengewebe, eine Pflanze oder Samen einen solchen Regler aufzubringen, wenn in den genannten Pflanzenteilen eine chemisch regulierbare DNA-Folge enthalten ist, wie sie oben in den Teilen A, B oder C beschrieben wurde. Bevorzugt wird ein solches Verfahren, bei dem das Pflanzengewebe, die Pflanze oder der Samen eine chemisch regulierbare DNA-Folge enthält, die oben als bevorzugt genannt wurde.

Die chemischen Regler können in reiner Form, in Lösung oder Suspension, als Pulver oder Staube oder in anderen herkömmlichen Rezepturen, wie sie landwirtschaftlich oder in Bioreaktorverfahren eingesetzt werden, angewandt werden. Zu

diesen Zusammensetzungen können flüssige oder feste Trägermittel gehören, d. h., Stoffe, mit denen der Regler kombiniert wird, um die Aufbringung auf die Pflanze, das Pflanzengewebe, die Zell- oder Gewebekultur oder ähnliches zu erleichtern oder um die Langerungs-, Handhabungs- oder Transporteigenschaften zu verbessern. Zu den Beispielen für geeignete Trägermittel gehören Silikate, Tone, Kohlenstoff, Schwefel, Harze, Alkohole, Ketone, aromatische Kohlenwasserstoffe und ähnliches. Wenn die Reglerzusammensetzung als herkömmliches benetzbares Pulver oder wässrige Emulsion hergestellt wird, kann sie eines oder mehrere der herkömmlichen Benetzungsmittel, ionische oder nichtionische, enthalten, beispielsweise Befeuchtungs-, Emulgier- oder Dispergiermittel.

Die Regler können auf Pflanzen auch in Verbindung mit einem anderen Mittel aufgebracht werden, das wünschenswert ist, um Vorteile für die Pflanze zu bringen, wobei dieser Vorteil mit dem durch das schimärische Gen, das durch den Regler reguliert wird, gesteuerte Merkmal im Zusammenhang stehen kann aber nicht muß. Beispielsweise kann ein Regler mit einem Düngemittel gemischt werden und unmittelbar vor der Expression eines transgenen Merkmals aufgebracht werden, das nicht mit der gewünschten Düngung im Zusammenhang steht. Oder er kann mit einem Herbizid gemischt und so aufgebracht werden, daß die Wirkung des Herbizids zu einem Zeitpunkt abgeschwächt wird, zu dem diese Wirkung sonst ein Maximum erreichen würde.

Als flüssige Zusammensetzung kann der Regler als Sprühmittel auf die Pflanzenblätter, -stengel oder -zweige, auf Samen vor der Aussaat oder auf den Boden oder ein anderes

Wachstumsmittel, das die Pflanze hält, aufgebracht werden. Regler können auch in Bioreaktorsystemen eingesetzt werden, wobei die Regulierung durch einen einzigen Zusatz der Reglerzusammensetzung zum Reaktionsmedium oder durch den allmählichen Zusatz über eine festgelegte Zeitspanne erfolgt.

Der Regler wird in einer Menge und über eine Zeitspanne eingesetzt, die ausreichend sind, um die gewünschte Regulierung zu erreichen. Ein bevorzugter Regler weist keine oder nur minimale phytotoxische oder andere schädliche Wirkungen auf die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen auf, auf welche er in der eingesetzten Menge aufgebracht wird.

Bevorzugte DNA-Folgen unter den oben im Teil A oder B beschriebenen und bevorzugte schimärische DNA-Folgen unter den oben im Teil C beschriebenen sind vor allem die, bei denen die Transkription durch einen chemischen Regler, wie er oben erwähnt wurde, reguliert wird, der beispielsweise ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus Benzoesäure, Salizylsäure, Azetylsalizylsäure, Polyakrylsäure und deren substituierten Derivaten besteht, oder ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäure, Benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarbonsäure, Zyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäureamid, Benzo-1,2,3-thiadiazolkarbonsäurehydrazid und deren Derivaten besteht, oder Dichloroisoinikotinsäure oder einem seiner Derivate. Besonders bevorzugt werden die DNA-Folgen, bei denen die Transkription durch die genannten bevorzugten chemischen Regler reguliert wird, beispielsweise durch Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat,

Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäuresecbutylhydrazid, 2,6-Dichloroisotikotinsäure oder Methyl-2,6-dichloroisotikotinat, insbesondere Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat.

J. Deponierungen beim ATCC

Die folgenden Bakterien, Plasmide und Suspensionskultur wurden beim American Type Culture Collection hinterlegt:

E. coli HB101/pTJS75-Km, ATCC-Nº 67628, hinterlegt am 11. Februar 1988;

Plasmid pBS-PR1013Cla, ATCC-Nº 40426, hinterlegt am 11. Februar 1988;

Plasmid pBS-PR1019, ATCC-Nº 40427, hinterlegt am 11. Februar 1988;

Zea mays-Suspensionskultur 6-2717-GC, ATCC-Nº 40326, hinterlegt am 20. Mai 1987;

Plasmid pBS-Gluc39.1, ATCC-Nº 40526, hinterlegt am 29. Dezember 1988;

Plasmid pBS-Gluc39.3, ATCC-Nº 40527, hinterlegt am 29. Dezember 1988;

Plasmid pBSucchi/Chitinase, ATCC-Nº 40528, hinterlegt am 29. Dezember 1988;

Plasmid pBSGL6e, ATCC-Nº 40535, hinterlegt am 18. Januar 1989.

K. Zusammenfassung der experimentellen Protokolle

Die schimärischen Gene der vorliegenden Erfindung enthalten chemisch regulierbare DNA-Folgen von einer beliebigen Quelle, natürlich oder synthetisch, in Verbindung mit einer oder mehreren transkribierbaren DNA-Folgen; in der Regel wird wenigstens ein Teil der transkribierbaren Folge in ein phänotypisches Merkmal translateriert, obwohl die Erfindung auch schimärische Gene einschließt, die durch einen "Anti-sense"-Mechanismus wirken. Die folgende Beschreibung und viele der Beispiele beschäftigen sich zwar mit chemisch regulierbaren DNA-Folgen, die natürlich in einem Pflanzen-Genom vorkommen, die Erfindung betrifft aber gleichermaßen solche Folgen, die in anderen natürlichen Systemen vorkommen, beispielsweise bakteriellen, viruellen und tierischen Systemen, da Techniken zur Isolierung solcher Folgen aus ihren natürlichen Systemen allgemein bekannt sind. Außerdem sind Folgen, die von synthetischen oder anderen nicht-natürlichen Systemen abgeleitet wurden, ebenso eingeschlossen.

Eine chemisch regulierbare DNA-Folge wird aus der Quelle isoliert, in welcher sie natürlich oder synthetisch vorhanden ist, und, soweit erforderlich, nach herkömmlichen Methoden charakterisiert. Wenn die DNA-Folge aus einem natürlich vorkommenden Gen isoliert wird, wird dieses Gen durch einen geeigneten Regler, entweder durch einen chemischen oder einen anderen bekannten Regler für das Gen, aktiviert. Die aus dieser Aktivierung resultierende RNA wird isoliert und zur Konstruktion einer cDNA-Bibliothek verwendet. Diese Bibliothek wird zur differentiellen "screening" unter Verwendung von radiomarkierter cDNA verwendet, die

erzeugt wird sowohl aus (1) RNA, die vom aktivierten System isoliert wurde, als auch von (2) RNA, die von einem zweiten, nicht durch den Regler aktivierten System isoliert wurde. Dieses differentielle "screening" ist, wie bereits oben erwähnt wurde, ein besonderer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung. Die Klone, welche die chemisch regulierte cDNA enthalten, werden dann isoliert und vorzugsweise an diesem Punkt sequenziert. Anschließend werden die cDNA-Klone zur Identifizierung und Isolierung eines genomischen Klon aus einer genomischen Bibliothek verwendet, wobei dieser genomische Klon die chemisch regulierbare DNA-Folge enthält. Dieses Gen wird vorzugsweise sequenziert, und die chemisch regulierbare DNA-Folge wird funktionell kartiert durch Subklonierung von Fragmenten dieses Gens, ihre Ligation an ein Reporter-Gen und die Bewertung ihrer Aktivität in transgenem Pflanzenmaterial oder in einem transienten Pflanzenexpressionssystem.

Für die PR-Protein-Gene von Tabak wird unter Anwendung von Standardtechniken eine λ -genomische Bibliothek konstruiert, und die Klone, welche die chemisch regulierbaren DNA-Folgen aufweisen, werden identifiziert und gereinigt. Einer dieser Klone wird charakterisiert. Es werden Restriktionsfragmente, welche die chemisch regulierbare DNA-Folge tragen, identifiziert; beim PR-1a-Gen schließen diese Gen-Fragmente ein ClaI-Fragment von etwa 20 000 Basenpaaren, ein HindIII-Fragment von 6500 Basenpaaren und ein EcoRI-Fragment von 3600 Basenpaaren ein. Das HindIII-Fragment enthält etwa 500 codierende Basenpaare und etwa 6000 nicht-codierende Basenpaare im 5'-Flankierungsbereich im Anschluß an die Transitionsstartstelle. Einige dieser Fragmente werden in Plasmide

subkloniert, um als DNA-Quellen für das weitere Subklonieren und die volle Charakterisierung verwendet zu werden, d. h., die Restriktionskartierung, die DNA-Sequenzierung und Identifizierung der Transkriptionsstartstelle des Gens. Beim PR-1a-Gen ist das 3600 Basenpaare umfassende EcoRI-Fragment direkt von einem λ -genomischen Klon subkloniert und anschließend in einen Endklon von etwa 1200 Basenpaaren subkloniert, der von den XhoI- und PstI-Stellen flankiert wird. Dieser Klon enthält eine chemisch induzierbare DNA-Folge vom PR-1a-Gen und einen Abschnitt des anschließenden Codierungsbereiches für dieses Gen; dieser Abschnitt schließt die Codierungssequenz für das Signalpeptid des PR-1a-Proteingens ein.

Ebenso werden genomische Klone isoliert, die für die basische Form von Beta-1,3-Glukanase codieren. Es werden zwei als 39.1 und 39.3 bezeichnete Klone charakterisiert und Restriktionsfragmente, welche chemisch regulierbare DNA-Folgen aufweisen, identifiziert.

Unter Anwendung der Vektoren dieser Erfindung können diese Klone dann für die Herstellung von chimärischen Genen, welche die drei oben behandelten Teile enthalten, verwendet werden. Diese chimärischen DNA-Folgen enthalten die chemisch regulierbare Folge, einen Teil der transkribierbaren DNA und eine dritte DNA-Folge von einer Fremdquelle. Als Alternative dazu können die Klone weiter manipuliert werden, z. B. durch gerichtete Mutagenese, um vollständig oder zum größten Teil ein mögliches Codierungsfragment vom Stammgen zu entfernen, bevor ein Codierungsfragment von einer Fremdquelle angefügt wird, um ein zweiteiliges chimärisches Gen herzustellen, wie das oben beschrieben wurde.

Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel stellt der Teil des schimärischen Gens, der die chemisch regulierbare Folge nicht ist, ein Reporter-Gen für ein leicht zu beobachtendes oder nachweisbares phänotypisches Merkmal dar. Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Gene für Beta-1,3-Glukuronidase, den Wildtyp von und herbizidresistente Azetohydroxysäuresynthase und Bacillus thuringiensis-Endotoxin, es ist aber eine Vielzahl anderer Reporter-Gene vorstellbar, wie das oben ausgeführt wurde. Bei einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel codiert die codierende Komponente der DNA-Folge des schimärischen Gens für Toleranz oder Resistenz gegenüber Herbiziden oder für Insektenresistenz. Dieses Ausführungsbeispiel wird veranschaulicht durch die genannten Gene für Azetohydroxysäuresynthase und für Bacillus thuringiensis-Endotoxin.

Die schimärischen Gene und Vektoren, welche diese Gene enthalten, können in Pflanzenzellen durch eine Vielzahl von Techniken eingeführt werden, durch welche transformierte Zellen, Gewebe und Pflanzen entstehen, oder in Zellkulturen, wie sie in Bioreaktoren eingesetzt werden. Verschiedene Techniken werden in den anschließenden Beispielen detailliert beschrieben, sie beziehen sich auf einkeimblättrige wie auf zweikeimblättrige Pflanzen. Einige dieser Methoden, die hier zu Ausführungszwecken einbezogen werden, sind Gegenstand anderer Patentanmeldungen, insbesondere der US-Patentanmeldung, Reihen-~~1~~ 056 506 vom 29. Mai 1987, und der US-Patentanmeldung, Reihen-~~1~~ 165 665 vom 8. März 1988.

Anschließend kann das transformierte Pflanzenmaterial mit einem chemischen Regler behandelt und die Expression des phänotypischen Reporter-Gens beobachtet und/oder gemessen

werden. Diese Art von System stellt ein einfaches "screenings"-Instrument zur Identifizierung der regulatorischen Aktivität von bestimmten Chemikalien dar. Die Erfindung betrifft auch eine verbesserte Untersuchung der beta-1,3-glukuronidase-(GUS)-enzymatischen Aktivität, welche das "screening" einer großen Anzahl von Proben mit hoher Präzision und in kurzer Zeit ermöglicht. Insbesondere besteht diese Untersuchung in der Reaktion von Pflanzengewebeextrakten in Proben von weniger als 0,5 ml, die 1,5 bis 3 mM 4-Methylumbelliferylglukuronid enthalten, bei etwa 37° C für die Dauer von 1 bis 5 Stunden und in der Bestimmung der Konzentration des freigesetzten fluoreszenten Indikators.

Die quantitative Bestimmung der stationären Werte von RNA ist ein wesentlicher Schritt bei der Analyse der Gen-Expression. Zu diesem Zweck wurde eine Starter-Extensionsuntersuchung entwickelt. Diese Methode der Erfindung beinhaltet die Markierung eines genspezifischen Oligonukleotids auf eine hohe spezifische Radioaktivität, die Hybridisierung des Oligonukleotids auf eine RNA-Probe und die Weiterführung des Hybrids mit Umkehrtranskriptase. Die Extensionsprodukte werden auf denaturierenden Akrylamidgelen getrennt und durch Autoradiografie sichtbar gemacht. Zu den Vorteilen dieser Methode gehören im Vergleich zu früheren Untersuchungen Leichtigkeit der Sondenherstellung, Einfachheit des Untersuchungsprotokolls und die zur Ausführung der Untersuchung benötigte Zeit. Dieser Starter-Extensionsuntersuchung ist ebenso sensitiv und quantitativ wie die S1-Kartierung.

Die Starter-Extensionsuntersuchung, wie sie unter den unten in den Beispielen beschriebenen besonderen Reaktionsbedin-

gungen angewendet wird, ist für die Bestimmung des Pegels der PR-1-mRNA in der Gesamt-RNA optimiert, welche aus TMV-infizierten Tabakblättern extrahiert wird. Die PR-1-mRNA wird auf der Grundlage der quantitativen Analyse der Starter-Extensionsdaten und der Häufigkeit der cDNA-Klone in einer von dieser RNA abgeleiteten cDNA-Bibliothek als 1 % der mRNA in diesen Blättern ausgedrückt. Zu den Verbesserungen der Methode der Erfindung gegenüber den vorher beschriebenen gehören die Markierung des Oligonukleotiden auf eine hohe spezifische Aktivität, die geringe Molarmenge der bei der Untersuchung verwendeten Sonde (im typischen Fall etwa 0,01 bis 0,05 pMol), die optimierte Hybridisierung und Zeitverlängerung und die optimierten Nukleotidtriphosphatkonzentrationen.

Die Erfindung schließt daher eine Methode zur Bestimmung der Menge einer spezifischen RNA in einer RNA-Lösung ein, die besteht aus

(a) der Markierung eines RNA-spezifischen Starter-Oligonukleotiden mit einer Länge von 12 bis 18 Nukleotiden auf eine hohe spezifische Radioaktivität;

(b) der Hybridisierung der RNA mit dem markierten Oligonukleotiden bei einer Konzentration zwischen 0,1 und 20 nM für die Dauer zwischen 2 Minuten und 24 Stunden bei einer Temperatur von etwa 37° C;

(c) der Verlängerung des Starter-Oligonukleotiden mit Umkehrtranskriptase bei Vorhandensein von Nukleotidtriphosphaten bei einer Konzentration zwischen 0,003 und 1 mM für die Dauer von 1 bis 120 Minuten und

(d) der Trennung und Sichtbarmachung der Verlängerungsprodukte durch Autoradiografie.

Ausführungsbeispiele

Mit den folgenden Beispielen wird die vorliegende Erfindung weiter veranschaulicht. Sie sind in keiner Weise als Einschränkung des Rahmens und der Bedeutung der Patentansprüche zu betrachten.

Enzymreaktionen werden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren ausgeführt, wenn nichts Gegenteiliges angegeben wird. Die schimärischen Gene und Vektoren der vorliegenden Erfindung werden unter Anwendung von Techniken konstruiert, wie sie in Fachkreisen bekannt sind. Geeignete Techniken wurden beschrieben von Maniatis, T. u. a., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1982); Methods of Enzymology, Bd. 68, 100, 101 und 118 (1979, 1983, 1983 und 1986), und DNA-Cloning, Glover, D. M., Hsg. IRL Press, Oxford (1985). Die Mediumzusammensetzungen wurden beschrieben bei Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972) sowie in den oben genannten Literaturangaben.

Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CETAB	Hexadezyltrimethylammoniumbromid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
dTT	Dithiothreitol
Dicamba	3,6-Dichloro-2-methoxybenzoesäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

kb	Kilobasenpaar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MU	4-Methylumbelliferylglukuronid
PEG	Polyethylenglykol
Picloram	4-Amino-3,5,6-trichloropikolinsäure
SDS	Natriumdodekylsulfat
TFA	Trifluoroessigsäure
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)methylaminhydrochlorid

Medien :

SH-O-Medium: Medium von Schenk, R. U. u. a., Can. J. Bot., 50 (1972) 199 - 204; ohne Hormone. SH-Medium kann flüssig oder mit 0,8 % Agar oder mit 0,5 % GelRite^R verfestigt sein. Das Medium wird normalerweise durch Wärme bei 230° - 250° F (ca. 110° - 121° C) für die Dauer von 15 bis 20 min sterilisiert.

SH-30-Medium: SH-O-Medium, das 30 µm Dicamba enthält.

SH-45-Medium: SH-O-Medium, das 45 µm Dicamba enthält.

RY-2-Medium: Medium von Yamada, Y. u. a., Plant Cell Reports, 5, 85 - 88 (1986).

OMS-Medium: Medium von Murashige, T. und Skoog. F., Physiologia Plantarum 9, 473 (1968). Das Medium kann mit 0,8 % Agar oder Agarose oder mit 0,5 % GelRite^R verfestigt sein.

Tabelle I - Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medien: KM-8p^{b,c,d} N6

Makroelemente^a, Mikroelemente^a und Fe-EDTA entsprechen den Angaben in der Literatur, KM-Medium nach Kao, K. N. u. a., Planta 126, 105 - 110 (1965); N6-Medium nach Chu u. a., Scientia Sinica 18, 659 (1975)

Organische Stoffe und Vitamine^e (mg/l):

Biotin	0,01	
Pyridoxin-HCl	1,00	0,5
Thiamin-HCl	10,00	0,1
Nikotinamid	1,00	
Nikotinsäure	0,10	0,5
Folsäure	0,40	
D-Ca-Pantothenat	1,00	
p-Aminobenzoessäure	0,02	
Cholinchlorid	1,00	
Riboflavin	0,20	
Vitamin B12	0,02	
Glyzin	0,10	2,0

Zucker und Zuckeralkohole (g/l):

Sukrose	0,25	30,0
Glukose	68,40	
Mannitol	0,25	
Sorbitol	0,25	
Zellobiose	0,25	
Fruktose	0,25	
Mannose	0,25	
Rhamnose	0,25	

Ribose	0,25	
Xylose	0,25	
Myo-inositol	0,10	
Abschließender pH-Wert	5,8	5,6
Sterilisation	Filter	Autoklav

Fußnoten:

^a Makroelemente werden in der Regel als 10fach konzentrierte Lösung bereitgestellt, bei Mikroelementen hat die Vorratslösung eine 1000fache Konzentration.

^b Zitronen-, Fumar- und Malinsäure (jeweils mit einer Endkonzentration von 40 mg/l) und Natriumpyruvat (Endkonzentration 20 mg/l) werden als 100fach konzentrierte Vorratslösung, abgestimmt auf einen pH-Wert von 6,5 mit NH_4OH , hergestellt und diesem Medium zugesetzt.

^c Adenin (Endkonzentration 0,1 mg/l) und Guanin, Thymidin, Urazil, Hypoxanthin und Zystosin (jeweils mit einer Endkonzentration von 0,03 mg/l) werden als 1000fach konzentrierte Vorratslösung hergestellt, abgestimmt mit NH_4OH auf einen pH-Wert von 6,5, und diesem Medium zugesetzt.

^d Die folgenden Aminosäuren werden diesem Medium unter Verwendung einer 10fachen Vorratslösung, 6,5 pH-Wert, NH_4OH , zugesetzt, um die folgenden Endkonzentrationen zu erreichen: Glutamin (5,6 mg/l), Alanin, Glutaminsäure (je 0,6 mg/l), Zystein (0,2 mg/l), Asparagin, Asparginsäure, Zystin, Histidin, Isoleuzin, Leuzin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin (jeweils 0,1 mg/l).

^eVitaminvorratslösung wird normalerweise in 100facher Konzentration hergestellt.

Materialien:

Agarose: Herstellung und Reinigung von Agarose werden von Guiseley und Renn, "The Agarose Monograph" (Agarose-Monografie), Marine Colloids Division FMC Corp., 1975, beschrieben. Agarose ist einer der Bestandteile von Agar. Kommerziell erhältliches Agar besteht normalerweise aus einer Mischung von neutraler Agarose und ionischen Agaropektin mit einer großen Zahl von Nebengruppen. In der Regel bleibt eine gewisse Zahl von Nebengruppen intakt und bestimmt die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Agarose, wie Gelbildung und Schmelztemperatur. Niedrigschmelzende Agarose, insbesondere SeaPlaque^R-Agarose, wird als Verfestigungsmittel bevorzugt.

Kaseinhydrolysat: Kaseinhydrolysat - enzymatisches Hydrolysat von Rindermilch, Typ 1, Sigma Co., PO Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA.

Zellulose-RS: Zellulose-RS, Yakult Honsha Co., Ltd. 1.1.19 Higashi-Shinbashi, Minato-ku, Tokio, 105 Japan.

GelRite^R: GelRite-Gellan-Gummi, Scott Laboratories Inc., Fiskerville, R. I., 02823, USA.

GeneScreen Plus^R: Kat.-M NMF 976, NMF Research Products, 549 Albany St., Boston, MA 02118, USA.

IBI Random primer kit: Zufallsstartergruppe "Prime Time", International Biotechnologies Inc., PO Box 1565, New Hyven, CT 07606, USA.

Nalgene^R-Filter: Nalge Co., Division of Sybron Corp., Rochester, N. Y. 14602, USA.

Pectolyase Y-23^R: Seishin Pharmaceutical Co. Ltd., 4-13 Koa-mi-cho, Nihonbashi, Tokio, Japan.

Parafilm^R: Parafilm^R-Laborfilm, American Can Co. Greenwich, CT 06830, USA.

SSC: 1,54 mM NaCl, 0,154 mM Natriumzitat.

Spin-Kolonne: Sephadex^R-G25 vorgepackte Kolonne, Kat.-N^o 100402, Boehringer Mannheim Biochemicals, Piscataway, NJ, USA.

TAE-Puffer und TBE-Puffer: Tris-Azetatpuffer und Tris-Borat-Puffer - gebräuchliche Puffer für Elektrophorese, siehe Mania-tis u. a., oben.

1. Allgemeine Techniken

In dieser Gruppe von Beispielen werden allgemeine Manipulationen beschrieben, die zur Ausführung der folgenden detaillierten Beispiele angewendet werden.

Beispiel 1 - Ligation in Agarose

Nach der Restriktionverdauung von Plasmid-DNA und der elektrophoretischen Trennung der Fragmente auf einem niedrig-schmelzenden TAE-Gel werden die Bänder, welche die entsprechenden Fragmente enthalten, präzise herausgeschnitten und auf 65° C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen. Zu 15 µl Wasser werden 2 bis 5 µl zugesetzt, und man hält die Lösung 10

Minuten lang bei 65° C. Diese Lösung wird auf 37° C abgekühlt und fünf Minuten lang stehengelassen, um die Temperatur zu äquilibrieren. Zusammen mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) werden 2 µl 10facher Ligasepuffer (200 mM Tris, pH-Wert 8,0, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) zugesetzt, und diese Lösung läßt man festwerden und bei 15° C über Nacht inkubieren.

Beispiel 2 - Transformation aus Agarose

Die Agarose, welche die entsprechende DNA enthält, wird durch zehnminütiges Inkubieren bei 65° C geschmolzen. Zu 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH-Wert 7,5, 1 mM EDTA) werden 10 µl dieser Lösung gegeben, gemischt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Gefrorene kompetente Zellen (E. coli-Stamm DH5α) werden auf nasses Eis zum Tauen gegeben. Die verdünnte DNA-Lösung wird 200 µl Zellen zugesetzt und 20 Minuten lang auf Eis stehengelassen. Die Zellen, welche die DNA enthalten, werden dann einer Wärmeschockbehandlung bei 41° C für die Dauer von 90 s unterzogen. Dann läßt man die Zellen bei Zimmertemperatur 10 min stehen. Es werden 0,8 ml SOC-Medium (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557 - 580 (1983)), und die Kultur wird bei 37° C eine Stunde lang inkubiert. Einhundert Mikroliter der Kultur werden auf LB-Platten (Miller, siehe oben) aufgebracht, die 100 µg/ml Ampizillin (L-amp) enthalten, und die Platten werden über Nacht bei 37° C inkubiert. Es werden positive Kolonien herausgegriffen und wieder auf eine zweite L-amp-Platte aufgestrichen, und die Platten werden über Nacht bei 37° C inkubiert.

Beispiel 3 - Southern-Transfer

Mit verschiedenen Restriktionsenzymen werden unter den vom

Lieferer angegebenen Bedingungen 3 µg von Tabak-DNA verdaut. Die DNA wird mit Phenol extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und dann in Gelbelastungspuffer (15 % Ficoll, 0,025 % Bromophenol Blau, 10 mM EDTA, pH-Wert 8) wieder zur Suspension gebracht. Proben werden belastet und mit 5 V/cm auf einem 0,5 %igen Agarosegel elektrophoretisiert, bis der Bromophenol-Blau-Farbstoff das Ende des Gels erreicht. Die DNA wird auf Gene-Screen Plus (DuPont) unter Anwendung des alkalischen Transfervorgangs, das vom Lieferer beschrieben wird, übertragen. Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschen erfolgen nach den Empfehlungen des Herstellers. Hybridisierung wird durch Autoradiografie festgestellt.

Beispiel 4 - Molekularadapter

Ein typischer Molekularadapter ist die Folge

5'-GGGATCCCTGCA-3'

für die Umwandlung einer PstI-Stelle in eine BamHI-Stelle. Dieses Molekül wird auf einem Applied Biosystems Synthesizer unter Anwendung der B-Zyanoethylphosphoramiditchemie synthetisiert und durch Umkehrphasen-HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatografie) gereinigt. Etwa 2 µg dieses Oligonukleotids werden nach Maniatis u. a., siehe oben, S. 125, kinatisiert. Die Oligonukleotidlösung wird im Wasserbad auf 65° C erhitzt und über 30 min auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Ein etwa zehnfacher Molüberschuß dieses hybridisierten Adapters wird zusammen mit zehnfachem Ligasepuffer, T4-DNA-Ligase und einer entsprechenden Wassermenge verdauter DNA zugesetzt. Eine typische Reaktion ist:

Zu adaptierende DNA:	1 - 2 μ l ($\sim$ 1 pMol)
Adapter:	1 μ l ($\sim$ 10 pMol)
10 X Ligasepuffer:	1 μ l
T4-DNA-Ligase:	1 μ l
Wasser:	5 - 6 μ l

Diese Lösung wird 30 min bei 12° - 15° C inkubiert und für 30 min auf 65° C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren. Salzkonzentration und Volumen werden auf die entsprechende Restriktionsverdauung abgestimmt, und die adaptierte DNA wird verdaut, um das adaptierte "kohäsive Ende" zu exponieren. Nicht-einbezogene Adapter werden entweder durch Elektrophorese auf Agarosegel oder durch sequentielle Isopropanolausfällungen entfernt.

Beispiel 5 - Starterextensionskartierung

A. Synthese und 5'-Endmarkierung von Startern zur Starter-Extension

Die folgenden Starter-Oligomere werden unter Anwendung eines Applied Biosystems-Synthesizer und der β -Zyanoethylphosphoramiditchemie synthetisiert:

PR-1:	5'-ATAGTCTTGTTGAGAGTT-3'
GUS:	5'-TCACGGGTTGGGGTTTCTAC-3'
AHAS:	5'-AGGAGATGGTTTGGTGGA-3'
BT:	5'-ATACGTTCTACTATCATAGT-3'

Die Oligonukleotide werden durch Umkehrphasenhochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) gereinigt. Fünf Pikomol jedes Oligonukleotiden werden kinatisiert (Maniatis, T. u. a., siehe oben, S. 125), wobei 200 μ C ^{32} P-ATP (6000 Ci/mMol,

10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) verwendet werden. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37° C wurde die Reaktion mit 100 μl verdünnt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und dann dreimal mit 50 μg Träger-RNA ausgefällt. Die abschließende Ausfällung wird in 1 X Umkehrtranskriptasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 40 mM KCl, 3 mM MgCl_2) bei einer Konzentration von 2 nM erneut zur Suspension gebracht. Die spezifische Aktivität des markierten Oligonukleotids wird mit etwa 3×10^6 Cvpmp/pMol ermittelt.

B. Herstellung von Total-RNA

Total-RNA wird im wesentlichen so hergestellt, wie das von Lagrimini, L. M. u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7542 (1987) beschrieben wurde. Gewebe wird unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen. Das gemahlene Gewebe wird einem Schleifpuffer (Lagrimini u. a., siehe oben) unter Einsatz von 2,5 ml je Gramm Gewebe zugesetzt. Dann wird eine gleiche Menge Phenol zugesetzt, und die Emulsion wird in einem Brinkman-Polytron homogenisiert. Eine halbe Volumenmenge Chloroform wird zugesetzt, und die Emulsion wird 15 min lang vorsichtig gemischt. Die Phasen werden durch Zentrifugieren getrennt, und die wässrige Phase wird entfernt. RNA wird durch den Zusatz von Natriumazetat zu 0,3 M und 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren aufgefangen und in 2 ml sterilem Wasser wieder zur Suspension gebracht. Lithiumchlorid wird bis zu einer Endkonzentration von 3 M zugesetzt und bei 4° C über Nacht stehengelassen. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren aufgefangen und das Pellet mit eiskaltem, 80 %igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird getrocknet und in 500 μl sterilem Wasser wieder zur Suspension gebracht. Die Konzentration dieses Total-RNA-Präparats wird spektrofoto-

metrisch bestimmt. Als Alternative dazu wird RNA in der beschriebenen Weise aus Kallus extrahiert, mit der Ausnahme, daß das Kallusgewebe in Würfel von etwa 3 mm Größe geschnitten und zum Zermahlen in einen vorgekühlten Mörser gegeben und in flüssigem Stickstoff mit dem Pistill zerrieben wird, bevor die Behandlung im Polytron erfolgt.

C. Starterextension

In einem 500 µl-Eppendorf-Rohr werden 50 µg Gesamt-RNA lyophilisiert. Die RNA wird in 30 µl radiomarkierter Sondenlösung wieder zur Suspension gebracht und 10 Minuten lang bei 70° C erhitzt. Das Rohr wird langsam auf 37° C abgekühlt und kann über Nacht inkubieren. Ohne das Rohr aus dem 37° C-Wasserbad zu nehmen, werden 2 µl 10 X Umkehrtranskriptasepuffer (500 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 400 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 1 µl 5 mg/ml Rinderserumalbumin, 5 µl 100 mM Dithiothreitol, 5 µl 10 X dNTPs (10 mM jedes dNTP in H₂O), 3 µl H₂O, 2 µl RNasin (80 Einheiten) und 2 µl Umkehrtranskriptase (400 Einheiten) zugesetzt, und die Reaktion wird bei 37° C 30 min lang inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, werden 5 µl 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5, und 150 µl absolutes Ethanol zugesetzt. Man läßt das Rohr 30 Minuten lang bei -20° C, der Niederschlag wird durch Zentrifugieren aufgefangen, mit 80 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft trockengelassen. Der Niederschlag wird in 10 - 20 µl Belastungsfarbstoff (90 % Formamid, 0,05 % Bromophenol Blau, 0,05 % Xylenzyanol, 1 mM EDTA) wieder zur Suspension gebracht, und die Extensionsprodukte werden auf einem 6 %igen Sequenzierungsgel abgetrennt (Maniatis, T. u. a., siehe oben). Die Extensionsprodukte werden durch Autoradiografie sichtbar gemacht.

Beispiel 6 - S1-Nukleasekartierung

Das Plasmid pBS-PR1013Cla wird mit SfaNI verdaut, mit Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert und mit ^{32}P -ATP kinatisiert. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolausfällung wird die DNA mit BstEII verdaut, und das 300 bp-Fragment von 750 bis 1035 in der Abb. 1 wird nach der Elektrophorese auf einem Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur isoliert. Die Sonde wird in Formamidhybridisationspuffer (Berk, A. J. u. a., Cell 12, 721 (1977)) in einer Konzentration von etwa 2 nM wieder zur Suspension gebracht. Die spezifische Aktivität der Sonde beträgt etwa 5×10^6 CvpM/pMol.

Die lyophilisierte Total-RNA (50 µg) wird in 30 µl der Sondenlösung aufgelöst, und die Röhrchen werden 10 min lang auf 65° C erhitzt, anschließend werden sie über Nacht bei 48° C hybridisiert. Die S1-Nukleasebehandlung und die Gelelektrophorese erfolgen im wesentlichen wie beschrieben, wobei mit einer S1-Konzentration von 400 Einheiten/ml und einer Inkubationstemperatur von 30° C gearbeitet wurde. Die entsprechende S1-Nukleasekonzentration wird in Pilotexperimenten bestimmt.

Beispiel 7 - Kartierung der Transkriptionsstartstelle

Die Transkriptionsstartstelle für das PR-1a-Gen wird durch eine Kombination von S1-Nukleasekartierung und Starterextensionsanalyse bestimmt. Untersucht wird ein Autoradiogramm eines Starterextensionsexperimentes unter Verwendung von entweder RNA, die aus TMV-infizierten Blättern isoliert wurde, oder eines mp19-Subklons des ShoI-PstI-Fragmentes als Matrize und eines 17-Basenoligonukleotiden, der kom-

plementär zu den Positionen 1025 bis 1042 der PR-1a-Folge ist, als spezifischem Starter. Der Starter selbst ist am 5'-Phosphat markiert, daher ist die Größe des Extensionsproduktes identisch mit der Größe des entsprechenden Bandes in den Sequenzierungsbahnen. Das Auftreten von zwei starken Bändern, die den Positionen 902 und 903 entsprechen, und eines schwachen Bandes in der Position 901 des genomischen Klons läßt darauf schließen, daß die Transkription an einer dieser Positionen beginnt. Es kann aber nicht allein mit der Starterextensionsanalyse gearbeitet werden, um das 5'-Ende einer mRNA zu bestimmen. Beispielsweise kann die mRNA ein 5'-Ende enthalten, das von einer Flußaufwärtslokation gespleißt wurde.

Um das 5'-Ende schlüssig bestimmen zu können, wird in Verbindung mit der Starterextension eine S1-Nukleasekartierung mit hoher Auflösung angewendet. Am 5'-Ende wird ein SfaNI-Fragment markiert und mit BstEII verdaut, um eine strangspezifische Sonde zu ergeben, die von Position 759 bis 1040 reicht. Diese Sonde wird dazu verwendet, das 5'-Ende von PR-1a-Transkripten in RNA zu kartieren, die von TMV-infizierten Tabakblättern isoliert wurde. Es wird ein Hauptband von 137 ± 2 Basen gefunden, das den Positionen 901 bis 905 des genomischen Klons entspricht. Bei S1-Experimenten mit hoher Auflösung, bei denen die Verdauungsprodukte zusammen mit einem Größenstandard von Sequenzierungsreaktionen an der Sonde elektrophoretisiert werden, werden drei Bänder sichtbar, die den Positionen 901, 902 und 903 entsprechen. Diese Ergebnisse bestätigen die Starterextensionsanalyse und bringen das 5'-Ende der PR-1-mRNA an eine der Positionen 901, 902 oder 903. Was die Transkriptionseinleitung betrifft, so lautet eine mögliche Interpretation dieser

Ergebnisse, daß RNA-Polymerase mit mehr oder weniger gleicher Wahrscheinlichkeit die Transkription bei Base 901, 902 oder 903 beginnt. Daß die eukaryotische Transkription aber die Einleitung oder Initiierung an einem A begünstigt, ist eine wahrscheinlichere Erklärung für die scheinbar vielfachen 5'-Enden, daß die PR-1a-mRNA an Position 903 (einem A) beginnt und die PR-1b- und -1c-mRNA jeweils an einer der anderen Positionen bei den entsprechenden Genen beginnen.

2. Proteinidentifikation und -charakterisierung

Die für diese Beispiele relevanten PR-Proteine werden in einigen Fällen zum ersten Mal isoliert, gereinigt und sequenziert, während das in anderen Fällen nach den in der Literatur gegebenen Verfahren erfolgt, dabei ist es das Ziel, die Identitäten der chemisch induzierbaren Gene abschließend zu bestimmen.

Beispiel 8 - Reinigung von PR-1a- und PR-1b-Protein

Pflanzen von Nicotiana tabaccum cv. Xanthi werden in einem Gewächshaus gezogen und im Alter von acht Wochen durch vorsichtiges Reiben der Blätter mit einer Suspension eines gebräuchlichen Stammes (UI) von TMV (Tabakmosaikvirus) (0,5 Mikrogramm/Milliliter) infiziert. Sieben Tage nach der Infektion werden die Blätter geerntet, und die intrazelluläre Flüssigkeit (ICF) wird aus den Blättern ausgewaschen und nach Parent, J. G. u. a., Can. J. Bot. 62, 564 (1984) aufgefangen. 250 ml von ICF werden durch Lyophilisieren auf 50 ml konzentriert und in eine Ultragel-Kolonnen ACA54 eingeführt, die mit Tris-HCl, pH-Wert 8,0, und 1 mM EDTA äquilibriert worden war. Eluate werden durch Elektrophorese auf

10 %igem Polyakrylamidgel analysiert. Fraktionen, welche das PR-1-Protein enthalten, werden zusammengefaßt, lyophilisiert, in 3 ml Wasser wieder zur Suspension gebracht und dann über Nacht anhand von Wasser dialysiert. Dieses Präparat wird durch HPLC-Anionenaustauschchromatografie auf einer TSK-DEAE-5PN-Kolonne weiter gereinigt; die Kolonne wird mit einem NaCl-Gradienten von 0 - 0,6 M in 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 1 mM EDTA eluiert. Fraktionen werden durch Polyakrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Zuerst eluiert PR-1b bei 0,18 M NaCl aus der Kolonne, während PR-1a bei 0,28 M NaCl eluiert. Die Fraktionen, welche das jeweilige Protein enthalten, werden zusammengefaßt, anhand von Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die Reinheit des PR-1a- und PR-1b-Proteinpräparats wird durch Umkehrphasenhochdruckflüssigkeitschromatografie unter Verwendung einer Aquapore-Phenylkolonne (2,1 x 100 mm, Brownlee) und Eluierung mit einem linearen Azetonitril/Isopropanolgradienten (1 : 1, 5 bis 80 %) in 0,1 % TFA bestätigt.

Beispiel 9 - Proteinsequenzbestimmung

Gereinigtes, lyophilisierte PR-1a-Protein wird in 6 M Guanidin-HCl, die 1 M Tris-HCl, pH-Wert 8,6, 10 mM EDTA enthält, aufgelöst. Auf 20 mM wird Dithiothreitol zugesetzt, und bis zu einer Endkonzentration von 50 mM wird 4-Vinylpyridin zugeben. Dann wird die Probe 1,5 Stunden unter Stickstoff inkubiert. Das pyridylethylierte Material wird durch Hochdruckflüssigkeitskolonnenchromatografie unter Verwendung einer Aquapore-Phenylkolonne (2,1 x 10 cm, Brownlee) entsalzt. Die Kolonne wird mit einem linearen Gradienten von 5 bis 80 % von Azetonitril/Isopropanol (1 : 1) in 0,1 % Trifluoroessigsäure (TFA) eluiert.

Mit einem Gasphasensequenzierungsgerät 470A von Applied Biosystems wird ein automatischer Edman-Abbau vorgenommen. Mit einem PTH-Analysegerät 120A von Applied Biosystems werden Phenylthiohydantoinaminosäuren (PTH-Aminosäuren) identifiziert.

Das Zyanogenbromidschneiden wird in situ nach Simpson, R. J. u. a., Biochem. Intl. 8, 787 (1984) durchgeführt. Die Verdauung von PR-1 mit Pyroglutamaminopeptidase (Boehringer Mannheim) erfolgt nach Allen, G., Plant Sci. Lett. 26, 173 (1982).

PR-1a wird mit Endoproteinase Lys-C (Boehringer Mannheim) im 0,1 M Tris-HCl, pH-Wert 8,5, 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur unter Anwendung eines Enzym-Substrat-Verhältnisses von 1 : 10 verdaut. Peptide werden durch HPLC unter Anwendung einer Aquapore-C-8-Kolonne (1 x 22 cm, Brownlee) durch einen linearen Azetonitril/Isopropanolgradienten (1 zu 1) (0 bis 60 %) in 0,1 % TFA isoliert.

Die Verdauung des N-Terminal-Lys-C-Peptids mit Trypsin (Cooper) erfolgt in 0,1 M Ammoniumbikarbonat, pH-Wert 8,2, das 0,1 M Kalziumchlorid enthält, über fünf Stunden bei 37° C und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1 : 100. Die beiden erzeugten Peptide werden auf HPLC unter Anwendung der gleichen Bedingungen wie bei den Lys-C-Peptiden getrennt.

Beispiel 10 - Proteinsequenz von PR-1a-Peptiden

Eine Korrelation der DNA-Folge von drei cDNA-Klonen mit den PR-1a-, PR-1b- und PR-1c-Proteinen wurde ursprünglich von Cornelissen, B. J. u. a., oben, auf der Grundlage eines Vergleichs der veröffentlichten Proteinsequenzdaten von drei

Peptiden, die von PR-1a abgeleitet wurden (Lucas, J. u. a., EMBO J. 4, 2745 (1985)), und der Primärstruktur des Proteins, das von den cDNA-Klonen abgeleitet wurde, vorgenommen. Der als PR-1a bezeichnete cDNA-Klon ist jedoch am 5'-Ende verkürzt und kann nur mit zwei der drei Peptide bei einer Fehlanpassung von einem Rest verglichen werden. Die codierte Aminosäurefolge, die von cDNA abgeleitet wurde, wie es oben hergestellt und analysiert worden ist, und die PR-1a-cDNA-Folge von Pfitzner, U. M. u. a., siehe oben, weisen nicht nur eine Fehlanpassung zu der veröffentlichten Proteinfolge am Tryptophanrest auf, wie das angegeben wurde, sondern auch an drei anderen Positionen der Aminoterminalproteinfolge. Diese Anomalie stellt die Identifizierung dieses Klons als PR-1a in Frage. Daher wird die Identität des Klons tobchrPR1013 als PR-1a-Gen durch Bestimmung eines großen Abschnitts der Primärstruktur des gereinigten PR-1a-Proteins durch Aminosäuresequenzierung verifiziert.

Die Aminosäurefolgedaten für das PR-1a-Protein werden mit den Aminosäurefolgen verglichen, die von cDNA-Klonen für PR-1a, -1b und -1c abgeleitet wurden. Die bei der Analyse verwendeten cDNA-Sequenzdaten stammen von den cDNA-Klonen, die oben isoliert wurden, und Sequenzen von Pfitzner, U. M. u. a., siehe oben, die an allen Positionen übereinstimmen. Mehr als 80 % der reifen PR-1a-Proteinfolgen werden bestimmt, diese Sequenz stimmt mit der deduzierten Proteinsequenz für tobchrPR1013 überein. Beim Vergleich mit der deduzierten Amino-folge, die für mutmaßliche PR-1b- und PR-1c-cDNA-Klone abgeleitet wurde (Cornelissen, B. J. C. u. a., siehe oben), werden sieben bzw. sechs Fehlanpassungen festgestellt. Die Beweise zeigen somit eindeutig, daß tobchrPR1013 tatsächlich ein Klon des PR-1a-Gens ist.

3. Herstellung von Klonen

In dieser Gruppe von Beispielen werden Klone beschrieben, die im Ergebnis der Gen-Isolierung und -Identifizierung der chemisch regulierbaren Sequenzen und der schmärischen Gene, welche diese Sequenzen enthalten, hergestellt wurden.

Beispiel 11 - Herstellung von tobchrPR1013

Aus den Blättern von Nicotiana tabaccum werden durch Gefrieren von 35 g des Gewebes in flüssigem Stickstoff und anschließendes Zerreiben mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver Nuklei isoliert. Das Pulver wird 250 ml Schleifpuffer (0,3 M Sukrose, 50 mM Tris, pH-Wert 8,0, 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Natriumbisulfit, 0,5 % NP40) zugesetzt und auf Eis 10 min lang gerührt. Dieses Gemisch wird durch sechs Schichten Filtertuch gefiltert, und die Flüssigkeit wird in Zentrifugenflaschen gefüllt und bei 700 x g 10 min lang zentrifugiert. Die Pellets werden erneut in Schleifpuffer zur Suspension gebracht und erneut zentrifugiert. Diese Pellets werden wieder in Schleifpuffer zur Suspension gebracht, und diese Suspension wird auf eine kalte Sukrosekissenschicht von 20 ml gebracht, die 10 mM Tris, pH-Wert 8, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 140 mM Natriumchlorid, 24 % Sukrose, 1 % NP40 enthält. Diese Röhren werden bei 17 000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Pellets in dieser Phase enthalten vor allem Nuklei und Stärkekörnchen. Aus den Nuklei wird DNA mit hohem Molekulargewicht im wesentlichen nach Maniatis, T. u. a., siehe oben, isoliert. Die DNA wird partiell mit MboI verdaut und in die BamHI-Stelle des EMBL3-Klonierungsvektors ligiert. Etwa 300 000 "Plaques" werden mit einer markierten PR-1b-cDNA-Sonde einem "Screening" un-

terzogen. Fünfzig positive Klone werden isoliert und charakterisiert. Positive "Plaques" werden gereinigt und durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Diese Klone werden nach acht unterschiedlichen Gruppen durch Restriktionskartierung klassiert. Einer der Klone wird als tobchrPR1013 identifiziert. Eine partielle Restriktionskarte von tobchrPR1013 wird in der Abb. 1 gezeigt. Die Isolierung der DNA und DNA-Manipulationen werden im wesentlichen so ausgeführt, wie das von Maniatis, T. u. a., siehe oben, beschrieben wurde.

Beispiel 12 - Herstellung von pBS-PR1013Cla

Ein ClaI-Fragment des Klons tobchrPR1013 wird in das Bluescript-Plasmid (Stratagen-Klonierungssysteme) subkloniert, was pBS-PR1013Cla ergibt (siehe Abb. 2). Das 2 kb-XhoI-BglIII-Fragment von pBS-PR1013Cla wird sequenziert, und es wird festgestellt; daß die Positionen 913 bis 1711 (Sequenz 1) perfekt mit der Sequenz eines cDNA-Klons für PR-1a übereinstimmen, der von Pfitzner, U. M. u. a., siehe oben, isoliert wurde. Mögliche Umstellungen der Tabak-DNA während des Klonierungsverfahrens werden durch Analyse der vorhergesagten Restriktionsfragmente von genomischer DNA ausgeschlossen. Auf der Grundlage der Sequenzinformation und einer Restriktionskarte von pBS-PR1013Cla sollte die Verdauung von genomischer Tabak-DNA mit Eco RI, HindIII, XhoI+BglIII oder HindIII+PstI Fragmente von 3,2 kb, 6,7 kb, 2,0 kb bzw. 6,4 kb erbringen, die das PR-1a-Gen enthalten. Um diese Vorhersage zu testen, werden 3 µg von Tabakchromosomal-DNA mit den entsprechenden Enzymen verdaut und auf einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisiert. Die DNA wird auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem markierten XhoI-BstEII-Restriktionsfragment vom PR-1a-Gen geprüft. Als Kontrolle wird pBS-

PR1013Cla-DNA verdaut und auf dem gleichen Gel elektrophoretisiert. Wie vorhergesagt, erzeugen die EcoRI-, HindIII-, XhoI+BglII- und HindIII+PstI-Verdauung Bänder mit dem erwarteten Molekulargewicht, die zusammen mit den Kontrollbändern wandern. Die im tobchrPR1013-Klon enthaltene DNA stellt folglich ein benachbartes Stück der DNA im Tabakgenom dar.

Beispiel 13 - Herstellung von pBS-PR1013Eco

A. Das Plasmid pBS-PR1013Eco wird durch Subklonierung des 3,6 kb-EcoRI-Fragmentes, das das PR-1a-Gen von tobchrPR1013 enthält (Beispiel 9), in die einzigartige EcoRI-Stelle des Bluescript-Plasmids konstruiert. Bluescript-Plasmid (Katalog-Nr 21203) wird bei Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Kalifornien, bezogen. Die Struktur von pBS-PR1013Eco wird sowohl durch Restriktionskartierung als auch durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Diese Konstruktion des Plasmids wird in der Abb. 3 gezeigt.

B. Als Alternative dazu wird das Plasmid pBS-PR1013Cla mit EcoRI verdaut, und es wird das 3,6 kb-Fragment isoliert, welches das PR-1a-Gen enthält. Das pBluescript wird mit EcoRI verdaut, mit dem vorher isolierten 3,6 EcoRI-Fragment gemischt und mit diesem ligiert. Diese Konstruktion des Plasmids wird in der Abb. 4 gezeigt.

Beispiel 14 - Herstellung von pBS-PR1013Eco_Pst

Das Plasmid pBS-PR1013Eco wird mit PstI verdaut, und die DNA-Fragmente werden auf einem 2,5 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur getrennt. Das große Fragment, welches den Bluescript-Vektor und ein 3,0 kb-Fragment der Tabak-

DNA enthält, wird präzise herausgeschnitten und auf 65° C erhitzt, um die Agarose zu schmelzen. Zu 15 µl Wasser werden 2 µl zugesetzt, und die DNA wird wie im Beispiel 1 beschrieben in Agarose ligiert. Nach der Inkubation über Nacht wird die Agarose, welche die DNA enthält, durch Inkubieren bei 65° C für die Dauer von 10 min geschmolzen und anschließend im wesentlichen nach der Beschreibung im Beispiel 2 aus der Agarose transformiert. Ein Abschnitt der Bakterienkultur von jeder von sechs mutmaßlichen positiven Konstruktionen wird in 5 ml LB-Medium (Miller, siehe oben), das 100 µg/ml Ampizillin enthält, inokuliert, und diese Kultur wird bei 37° C über Nacht inkubiert. Zellen werden durch Zentrifugieren in einer klinischen Zentrifuge bei voller Geschwindigkeit für die Dauer von 10 min geerntet. Die obenaufschwimmende Schicht wird entfernt, und die Zellen werden wieder in 100 µl von 50 mM Glukose, 25 mM Tris, pH-Wert 7,5, 10 mM EDTA zur Suspension gebracht, und die Suspension wird in eine 1,5 ml-Eppendorf-Zentrifugalröhre übertragen. Es werden 25 µl einer frisch hergestellten 10 mg/ml-LysozymbLösung zugesetzt, und man läßt die Suspension 10 min auf Eis stehen. Dann werden 200 µl von 0,2 N Natriumhydroxid, 1 % Natriumdodezylsulfat zugesetzt, und die Suspension wird gemischt und zwei Minuten auf Eis stehengelassen. Es werden 200 µl 2 M Natriumazetat (pH-Wert 4,8) zugesetzt, und man läßt die Lösung 15 Minuten auf Eis stehen. Die resultierende Lösung wird bei voller Geschwindigkeit 10 min lang in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die obenaufschwimmende Schicht wird in eine neue Zentrifugenröhre gegeben und mit 400 µl Phenol/Chloroform (1 : 1) extrahiert. Die wässrige Phase wird in ein frisches Rohr gegeben und mit 400 µl Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase von dieser Extraktion wird in ein fri-

sches Rohr gegeben, und die DNA wird durch den Zusatz von zwei Volumen Ethanol und die Lagerung bei -20°C für die Dauer von 30 min ausgefällt. Die ausgefällte DNA wird durch Zentrifugieren in einer Eppendorf-Mikrofuge für die Dauer von 15 min bei voller Drehzahl aufgefangen. Das Ethanol wird entfernt, und die Pellets werden mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wird wieder entfernt, und man läßt die Pellets an der Luft trocknen. Die DNA wird in 100 μl TE-Puffer wieder zur Suspension gebracht. Die Konstruktionen werden durch Verdauung mit PstI verifiziert. Das Ausgangs-plasmid pBS-PR1013Eco ergibt ein 6 kb- und ein ~ 650 bp-Band, das kleinere davon fällt in den neuen Konstruktionen. Eines dieser Plasmide wird als Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst ausgewählt. Die Struktur dieses Subklons wird durch Sequenzanalyse verifiziert. Die Konstruktion dieses Plasmids wird in der Abb. 5 gezeigt.

Beispiel 15 - Herstellung von pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ XhoI

Es wird eine vorläufige Restriktionskarte von pBS-PR1013Eco erstellt. Eine XhoI-Restriktionsstelle wird ~ 1200 bp fluß-aufwärts der PstI-Stelle loziert. Das Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst wird mit XhoI verdaut, und die Fragmente werden auf 0,9 %igem Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur getrennt. Es werden zwei Fragmente mit einer Größe von 3,9 kb und 1,7 kb sichtbar. Das Band, welches das 3,9 kb-Fragment enthält, wird sorgfältig aus dem Gel ausgeschnitten und im wesentlichen nach der obigen Beschreibung in Agarose ligiert. Die Agarose wird geschmolzen und die DNA wie oben beschrieben in den kompetenten E. coli-Stamm HB101 transformiert. Zellen werden auf LB-amp-Platten wie oben plattiert und inkubiert. Eine mutmaßliche positive Kolonie

wird in LB-amp-Medien inokuliert, und die DNA wird im wesentlichen entsprechend der Beschreibung isoliert. Die Struktur dieses neuen Subklons pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho wird durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert. Abb. 6 zeigt die Konstruktion dieses Plasmids.

Beispiel 16 - Herstellung von pCIB270

Plasmid pBI101.3 (Katalog-nr 6024.1) wird von den Clontech Labs, Palo Alto, Kalifornien, bezogen. Dieses Plasmid wird zuerst mit BamHI und dann mit SalI verdaut. Das Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho wird mit PstI verdaut. Das Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho wird mit PstI verdaut. Wie im Beispiel 4 wird ein PstI/BamHI-Adapter mit der Folge

5'-GGGATCCCTGCA-3'

hergestellt und mit dem PstI-verdauten pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho ligiert. Das resultierende Material wird zuerst mit BamHI und dann mit XhoI verdaut. Das BamHI/XhoI-Fragment wird isoliert, mit dem verdauten pBI101.3 gemischt und ligiert und transformiert. Ein mutmaßlicher positiver Klon von pCIB270 wird isoliert und durch Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse verifiziert. Die Herstellung dieses Plasmids wird in der Abb. 7 gezeigt.

Beispiel 17 - Herstellung von M13mp18- oder mp19-PR1013-Eco Δ Pst Δ Xho

Das Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho wird mit PstI und Asp718 verdaut. Nach der Elektrophorese auf einem 1 %igen, niedriggelierenden TAE-Agarosegel wird das 1,1 kb-Asp718/PstI-

Fragment isoliert. Die replikative Form (RF) von coli-Phag M13mp18 oder M13mp19 wird nach Messing, J., Meth. Enzymol. 101, 20 (1983) hergestellt. Als Alternative dazu können diese Vektoren bei Bethesda Research Labs., Gaithersburg, Maryland, bezogen werden. Jeder der Vektoren wird zuerst mit Asp718 und dann mit PstI verdaut. Nach Entfernung des Polylinkerstücks durch Elektrophorese auf 0,7 %iger, niedriggelierender Agarose wird die resultierende Vektor-RF gemischt und in Agarase mit dem oben hergestellten 1,1 kb-Fragment ligiert. Die DNA wird transformiert, mutmaßliche positive "Plaques" werden isoliert, und ihre Struktur wird durch Analyse der RF-DNA verifiziert. Die Konstruktionen von M13mp18- und M13mp19-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho werden in der Abb. 8 gezeigt.

Beispiel 18. Herstellung von M13mp18- oder M13mp19-
PR1013Eco Δ Pst Δ Xho.Nco und pCIB 268

Einzelsträngige M13mp18-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho-Phag-DNA wird nach Messing, siehe oben, isoliert. Wie oben beschrieben, wird ein 18 bp-Oligonukleotidstarter mit der Folge

5'-AATCCCATGGCTATAGGA-3'

synthetisiert. Der Starter wird mit T4-Polynukleotidkinase (Maniatis, T. u. a., siehe oben, S. 125) unter Verwendung von nichtmarkierter ATP phosphoryliert. Nach einer sechzigminütigen Inkubation bei 37° C wird die Reaktion für 15 min auf 68° C erhitzt und dann auf Eis gegeben. Dieser Starter und der M13 -40-Vorwärtssequenzierungsstarter (New England Biolabs № 1212) werden nach dem Mischen in einem Verhältnis von 1 : 1 : 1 (Molverhältnis) auf einzelsträngige M13mp18-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho-DNA durch langsames Abkühlen nach einer

zehnminütigen Erhitzung auf 68° C hybridisiert. Das hybridisierte Gemisch wird auf Eis gebracht und ein Zehntel Volumen von 10fachem Verlängerungspuffer (20 mM Tris-Puffer, pH-Wert 7,5, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP und 1 mM dTTP) wird zugesetzt. Es werden 10 Einheiten des großen DNA-Polymerase-I-Fragmentes (Klenow-Fragment, New England Biolabs № 210) und 0,1 Einheiten von T4-DNA-Ligase (NEB № 202) zugesetzt, und man läßt die Reaktion bei 15° C 14 Stunden andauern. Zu diesem Zeitpunkt wird ein weiteres Aliquot jedes Enzyms zugesetzt, und die Reaktion wird bei 25° C weitere 2 Stunden fortgesetzt, bevor das Gemisch zur Transformation von kompetenten E. coli JM101 verwendet wird. Ein allgemeines Ablaufschema dieses Verfahrens wird in der Abb. 9 dargestellt.

Um das mutierte Phag zu identifizieren, werden die "Plaques" auf Gene Screen Plus (Dupont) gegeben und nach den Empfehlungen des Herstellers bearbeitet. Die Filter werden vier Stunden vorhybridisiert und über Nacht bei 42° C in der Hybridisierungslösung des Herstellers, die 0,9 M NaCl enthält, hybridisiert. Dann werden die Filter nacheinander mit einer NaCl-Konzentration von 0,9 M gewaschen und durch Autoradiografie überwacht, wobei die Waschtemperatur bei jedem Schritt um 5° C erhöht wurde. Die Phage, die durch Hybridisierung als mutiert identifiziert wurden, werden zur Bestätigung der Basenänderung sequenziert.

Die replikative Form eines dieser Kandidaten (M13mp18-PR1013EcoAPstAXho.Nco) wird isoliert und mit PstI und BstEII verdaut, um ein 394 bp-Fragment zu schaffen, das dazu verwendet wird, das nichtmutierte 394 bp-Fragment in pBS-PR1013EcoAPstAXho zu ersetzen, wie das in der Abb. 10

gezeigt wird. Das führt zur Herstellung von pCIB268, das eine NcoI-Stelle in der Position 930 hat, gefolgt von 217 Basenpaaren der Kodierungssequenz für das PR-1a-Gen. Die Struktur dieses Plasmids wird durch Sequenzanalyse bestätigt.

Beispiel 19 - Herstellung von schimärischen Genen, die GUS und unterschiedliche Längen der PR-Promotersequenz enthalten

A. Konstruktion von pCIB269

Ein Fragment von 930 bp wird nach der Elektrophorese von XhoI- und NcoI-verdaulichem pCIB268 auf einem 1,0 %igen Agarose-TAE-Gel mit niedriger Gelierungstemperatur isoliert. Dieses Fragment wird dann in pBS-GUS1.2 ligiert (siehe Beispiel 19 B), das mit XhoI und NcoI verdaut worden ist. Es werden Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung analysiert. Ein positiver Klon wird ausgewählt und als pCIB269 bezeichnet. Die Konstruktion dieses Plasmids wird in der Abb. 11 gezeigt.

B. Konstruktion von pBS-GUS1.2

pBS-GUS1.2 wird durch dreiteilige Ligation eines 391 bp-umfassenden SalI/SnaBI-Fragments von pRAJ265 (Jefferson, R. A. u. a., EMBO J. 6, 3091 - 3907 (1987) und GUS User Manual, Clonetechn. Labs., Palo Alto, Kalifornien) mit einem 1707 bp-umfassenden SnaBI/EcoRI-Fragment von pBI221 (Jefferson, R. A. u. a., EMBO J., siehe oben) und pBS, das mit SalI und EcoRI verdaut wurde, geschaffen, siehe Abb. 12. Transformanten werden isoliert und durch Restriktionsverdauung und

DNA-Sequenzierung analysiert. Ein verifizierter Klon wird als pBS-GUS1.2 bezeichnet.

C. Konstruktion von pCIB200

Zuerst wird TJS75Kan durch Verdauung von pTJS75 (Schmidhauser und Helinski, J. Bacteriol. 164, 446 - 455 (1985)) mit NarI geschaffen, um das Tetrazyklin-Gen auszuschneiden, gefolgt von der Einfügung eines AccI-Fragmentes von pUC4K (Messing, J. und Vierra, J., Gene 19, 259 - 268 (1982)), das ein NptII-Gen trägt. Dann wird pCIB200 durch Ligation von XhoI-Linkern an das EcoRV-Fragment von pCIB7 (das den linken und rechten T-DNA-Rand, ein pflanzenselektierbares nos/nptII-schimärisches Gen und den pUC-Polylinker enthält, Rothstein, S. J. u. a., Gene 53, 153 - 161 (1987)) und Klonierung des XhoI-digerten Fragmentes in das SalI-verdaute TJS75-Kan hergestellt.

D. Konstruktion von pCIB271

Das Plasmid pCIB269 (Beispiel 19 A) wird mit XhoI und EcoRI verdaut, und das 3023 bp-Fragment, welches den PR-1a-Promoter trägt, der mit einem nos-3'-Ende an das GUS-Gen gebunden ist, wird isoliert, worauf sich die Elektrophorese auf einem 1,0 %igen, niedriggelierenden Agarose-TAE-Gel anschließt. Dieses Fragment wird dann in einen Vektor pCIB200 mit breitem Wirtsbereich ligiert, der mit SalI und EcoRI verdaut worden ist. Es werden Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein verifizierter Klon wird als pCIB271 bezeichnet. Die Konstruktion dieses Klons wird in der Abb. 13 gezeigt.

E. Konstruktion von pCIB272

pCIB268 (Beispiel 18) wird mit AluI plus NcoI verdaut, und nach der Elektrophorese auf einem 1 X-TAE-Agarosegel von 0,7 % wird ein 833 bp-Fragment isoliert. Dieses Fragment wird mit dem β -Glukuronidase-Gen mit dem nos-3'-Ende in pBS-GUS1.2 (Beispiel 19 B) ligiert. Der Promoter und GUS werden dann aus diesem Plasmid mit der Bezeichnung pCIB282 als Asp718I/BamHI-Fragment herausgeschnitten und in pCIB200 ligiert, das mit Asp718I und BamHI verdaut wurde, bevor die Transformation in den E. coli-Stamm DH5 α erfolgt. Es werden Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein verifizierter Klon wird als pCIB272 bezeichnet.

F. Konstruktion von pCIB273

pCIB268 wird mit HaeIII plus NcoI verdaut, und nach der Elektrophorese auf einem 0,7 %igen 1 X-TAE-Agarosegel wird ein 603 bp-Fragment isoliert. Dieses Fragment wird vor das β -Glukuronidase-Gen mit dem nos-3'-Ende in pBS-GUS1.2 gebracht. Der Promoter und GUS werden dann aus diesem Plasmid mit der Bezeichnung pCIB283 als ein Asp718I/BamHI-Fragment herausgeschnitten und in pCIB200 ligiert, das mit Asp718I und BamHI verdaut wurde, bevor die Transformation in den E. coli-Stamm DH5 α erfolgt. Transformanten werden isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein verifizierter Klon wird als pCIB273 bezeichnet.

Beispiel 20 - Herstellung eines schimärischen Gens in einem Hygromycinvektor

pCIB269 wird mit XhoI und EcoRI verdaut, und nach der Elektrophorese auf einem 1,0 %igen niedriggelierenden Agarose-

TAE-Gel wird das 3023 bp-umfassende Fragment isoliert, das den PR-1a-Promoter trägt, der mit dem nos-3'-Ende an das GUS-Gen gebunden ist. Dieses Fragment wird dann durch Ligation mit einem EcoRI/SalI-Adapter mit der Folge

5'-AATTCGTCGACG-3'

in ein XhoI/SalI-Fragment umgewandelt. Das XhoI/SalI-Fragment wird in SalI-verdautes pCIB712 (Rothstein, S. J. u. a., siehe oben), ligiert, um pCIB219 zu schaffen, siehe Abb. 14.

Beispiel 21 - Herstellung von pCIB200/PR1-BT

A. Ligation mit pCIB200

Das Plasmid pCIB1004 (siehe unten) wird mit SphI verdaut, mit Phenol extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und wieder zur Suspension gebracht. Es wird ein Oligonukleotid mit der Folge

5'-CCGGTACCGGCATG-3'

synthetisiert, gereinigt, kinatisiert und an das SphI-verdaute Plasmid pCIB1004 ligiert. Nach der Ligation wird die Ligase inaktiviert und die DNA mit KpnI verdaut. Diese DNA wird auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB200 (Beispiel 19 C) wird mit KpnI verdaut und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt und auf ein 0,8 %iges Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur gebracht. Das Band, welches den pCIB200-Vektor enthält, und das Band, welches die PR-1-5'-Flankierungssequenz/BT-Fusion enthält, werden gemischt und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB200/PR1-BT zu bilden.

B. Herstellung von pCIB1004

Das Plasmid pCIB10/35Bt(607) wird mit NcoI und BamHI verdaut und auf 0,8 %iges Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur gebracht. Das Plasmid pCIB269 (Beispiel 19 a) wird mit NcoI und XhoI verdaut und auf ein 0,8 %iges Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur gebracht. Das Plasmid pCIB710 (Rothstein, S. J. u. a., siehe oben) wird mit SalI und BamHI verdaut und auf ein 0,8 %iges Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur gebracht. Das Band mit dem SalI- und BamHI-verdauten Vektor, der ein in pUC19 kloniertes CaMV-35S-Promoter-3'-Ende enthält, das Band, welches das BT-Gen enthält, und das Band, das den PR-1-5'-Flankierungsbereich enthält, werden ausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB1004 zu bilden.

C. Herstellung von pCIB10/35Bt(607)

pCIB10/35Bt(607), ein deletiertes Protoxin-Gen, welches eine Sequenzkodierung für annähernd 607 Aminosäuren enthält, wird aus Plasmid pCIB10/35Sbt hergestellt, einem Plasmid, das das Protoxin-Gen vom Bacillus thuringiensis-Endotoxin enthält. E. coli MC1061, der pCIB10/35Sbt enthält, wurde bei der American Type Culture Collection, ATCC-№ 67329, am 27. Februar 1987 deponiert. Ein deletiertes Protoxin-Gen wird durch Einführung einer BamHI-Schneidestelle (GGATCC) nach dem Nukleotid 1976 in die GT-Gen-Sequenz hergestellt. Das geschieht durch Klonierung des BamHI-Fragmentes, welches die Protoxinsequenz von pCIB10/35Sbt enthält, in mp18 und Anwendung von Oligonukleotidmutagenese-Standardverfahren. Nach der Mutagenese wird die doppelsträngige replikative Form von DNA aus dem M13-Klon hergestellt, die dann mit BamHI verdaut wird.

Das etwa 1,9 kb-große Fragment, welches das deletierte Pro-toxin-Gen enthält, wird in das BamHI-geschnittene pCIB10/710 eingefügt. Das resultierende Plasmid wird nach Kanamycin selektiert. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung wird in US-Patentanmeldung, Reihen-Nr 122 109 vom 18. November 1987 gegeben, die hier als Verweis einbezogen wird.

Beispiel 22 - Herstellung von pCIB1233 (pCIB200/PR1-AHAS)

A. Ligation mit pCIB200

Das Plasmid wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt (pCIB200). Das Plasmid pCIB1216 wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das etwa 4,3 kb-umfassende Band, welche die mit der AHAS-Codierungssequenz verschmolzene PR-1-5'-Flankierungsfolge enthält, und das Band, welches den pCIB200-Vektor enthält, werden ausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um pCIB1233 zu bilden.

B. Herstellung von pCIB1216

Das Plasmid pCIB269 (Beispiel 19 A) wird mit XbaI und NcoI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB1207 (siehe unten) wird mit XbaI und NcoI verdaut und auf einem Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band, welches den Bleuscript-Vektor mit der PR-1-5'-Flankierungssequenz enthält, und das 3,3 kb-umfassende Band, welche die AHAS-Codierungssequenz enthält, werden ausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB1216 zu bilden.

C. Herstellung des Plasmids pCIB1207, welches das Arabidopsis-AHAS-Gen enthält

Die Gesamtpflanzen-DNA wird aus Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia, entfernt und isoliert. 250 µg dieser DNA werden mit 4000 Einheiten des Restriktionsenzym XbaI vier Stunden lang verdaut. Das Resultat wird durch Elektrophorese auf einem 0,8 %igen Agarosegel fraktioniert. Die DNA-Fragmente zwischen 6,5 kb und 4,36 kb (auf der Grundlage von HindIII-verdauten Lambda-DNA-Größenmarkern) werden unter Verwendung von NA-45-DEAE-Membran (Schleicher und Schuell, Keene, NH, USA) nach den vom Hersteller empfohlenen Verfahren aus dem Gel isoliert. XbaI-verdautes und phosphatasebehandeltes Lambda-longC (longC)-Armpräparat wird von Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA, USA) bezogen. Es werden 0,1 µg der Arabidopsis-XbaI-Insert-DNA an 1,0 µg der longC-Arme nach den von Stratagene empfohlenen Verfahren ligiert. 2,5 µl der Ligationsreaktion werden in Lambda-Phagköpfen unter Verwendung des Gigapack-Plus-Satzes (Stratagene Cloning Systems) nach den vom Hersteller empfohlenen Verfahren gepackt. Die Aktivität der Bibliothek wird auf E. coli VCS257 (Stratagene Cloning Systems) titriert.

Es werden 50 µg von pE16/8-c4-Plasmid-DNA (J. Polaina, Carlsberg Res. Comm. 49, 577 - 584) mit EcoRI verdaut, und die Verdauungsprodukte werden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgelöst. Das 2 kb-EcoRI-Fragment, welches die Codierungssequenz für das Hefe-AHAS-Gen enthält, wird aus dem Gel unter Einsatz von NA45-DEAE-Membran nach den vom Hersteller empfohlenen Verfahren isoliert. Radiomarkierte Sonden zum 2 kb-Fragment werden am Tag der Hybridisierungsreaktion nach der Zufallsstartreaktion unter Verwendung des

Prime Time-Satzes (International Biotechnologies Inc., New Haven, CT, USA) entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren isoliert.

Es werden 250 000 rekombinante Phage auf VCS257 plattiert. Duplikatmembranelemente der Phagplaques werden unter Verwendung von Colony/Plaque Screen-Membranen (NEN Research Products, Du Pont, Boston, MA, USA) nach den vom Hersteller empfohlenen Verfahren ausgeführt. Die Membranen werden in LS-Hybridisationspuffer vorhybridisiert, dann auf 150 ml frischen LS-Hybridisationspuffer transferiert, der 0,25 µg der ³²P-markieren Hefe.AHAS-Gen-Sonde enthält, die oben hergestellt wurde. Die Membranen werden bei 42° C 16 Stunden lang unter sanftem Schütteln inkubiert, zweimal bei Zimmertemperatur mit 2XSSC für jeweils 15 min gewaschen, dreimal bei 42° C in LS-Waschpuffer (25 % Formamid, 5XSSC, 1 % SDS) für jeweils 2 Stunden gewaschen und zweimal mit einem Spülpuffer (0,1XSSC, 0,1 % SDS) für jeweils 30 min gewaschen. Die Membranen werden eingerichtet und mit Cronex Lightening Plus Screens (DuPont, Wilmington, DE, USA) und XAR-5-Film (Kodak) fluorografiert. Die "Plaques" von Bereichen der Platten, die positive Filmsignale auf beiden Membranelementen ergeben, werden herausgegriffen und mit einer geringen Dichte von 300 "Plaques" je 150 mm-Platte erneut plattiert, anschließend wird der "Screening"-Vorgang wiederholt, bis einzelne hybridisierende "Plaques" isoliert werden.

Eine Minipräparation der Phag-DNA vom plaque-gereinigten Phag wird nach den Verfahren ausgeführt, die im LambdaSorb Phage Adsorbent-Satz (Promega, Madison, WI, USA) beschrieben werden. Die Phag-DNA wird mit Restriktionsenzym *Xba*I geschnitten, und das 5,8 kb-Insertionsfragment wird in die

XbaI-Stelle des pBS(-)-Plasmids (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Die Identität des klonierten Fragmentes mit dem XbaI-Fragment, welches das Arabidopsis-AHAS-Gen enthält, wird durch Vergleich seiner Restriktionskarte und seiner DNA-Folge mit denen verifiziert, die für das Gen von Haughn u. a., Mol. Gen. Gente. 211, 266 (1988), und Mazur u. a., Plant Physiol. 85, 1110 (1987) veröffentlicht wurden. Dieses Plasmid wird als pCIB1207 bezeichnet.

Beispiel 23 - Herstellung von pCIB1232 (pCIB200/PR1-AHAS-SuR)

A. Ligation mit pCIB200

Das Plasmid pCIB200 (Beispiel 19 C) wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB1230 wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das etwa 4,3 kb-umfassende Band, welche die mit der AHAS-SuR-Codierungssequenz verschmolzene PR-1-5'-Flankierungssequenz enthält, und das Band, welches den pCIB200-Vektor enthält, werden ausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um pCIB1232 zu bilden.

B. Herstellung von pCIB1230

Plasmid pCIB1208 (siehe unten) wird mit XbaI und NcoI verdaut, und die Fragmente werden durch Elektrophorese auf einem 0,8 %igen 1 X TAE-Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur getrennt. Das Plasmid pCIB269 (Beispiel 19 A) wird mit NcoI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen 1 X TAE-Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das

pCIB269-Fragment, welches den Bluescript-Vektor und den PR-1-Promoter enthält, und das 3,3 kb-Fragment, welches das mutierte AHAS-Gen enthält (identifiziert durch Querhomologie und durch Restriktionsfragmentanalyse mit dem von Mazur u. a., Plant Physiol. 85, 1110 - 1117 (1987) beschriebenen Gen) werden ausgeschnitten, geschmolzen und miteinander ligiert, um einen als pCIB1230 bezeichneten Klon zu schaffen.

C. Herstellung von pCIB1208

Wie im Beispiel 22 C beschrieben, wird eine genomische DNA-Bibliothek hergestellt unter Verwendung von DNA, die aus Arabidopsis-Pflanzen isoliert wurde, welche auf Resistenz gegenüber Sulfonylharnstoffherbizid selektiert worden waren, wie das von Haughn und Somerville, Mol. Gen. Genet. 204, 430 - 434 (1986), beschrieben wurde. "Plaques", die Gene mit der Codierung für Azetohydroxysäuresynthase (AHAS) enthalten, werden durch Querhybridisierung mit einer Hefe-Azetohydroxysäuresynthase-Gen-Sonde (siehe Beispiel 22 C) identifiziert. Die rekombinante DNA wird in Bluescript (Stratagene) subkloniert, wodurch ein als pCIB1208 bezeichneter Klon geschaffen wird. Dieses Plasmid enthält ein Gen, das eine mutierte Azetohydroxysäuresynthase codiert, die resistent gegen Hemmung durch Sulfonylharnstoffherbizide ist.

Beispiel 24 - Isolierung eines genomischen Klons, der die basische Form von β -1,3-Glukanase (Glukan-Endo-1,3- β -glukosidase) von Nicotina Tabacum codiert

DNA mit einem hohen Molekulargewicht wird aus den Blättern von Nicotiana tabacum cv. Havana 425 nach dem CETAB-Verfahren (Murray und Thompson, Nucleic Acid. Res. 8, 4321 (1980))

hergestellt. Es werden 100 µg der DNA mit SacI vollständig verdaut. Diese DNA wird durch Elektrophorese auf einem 0,8-%igen Agarosegel abgetrennt. Der Bereich des Gels, der einem Molekulargewichtsbereich von 3 bis 7 kb entspricht, wird in 6 Streifen gleicher Größe geschnitten, und die DNA wird aus diesen Streifen elektroeluiert und in Form getrennter Fraktionen ausgefällt. Die DNA wird wieder zur Suspension gebracht, und ein Aliquot jeder Fraktion wird auf einem Agarosegel behandelt und durch Southern-Transfer analysiert. Die Fraktion, welche DNA enthält, die an eine β -1,3-Glukanas-cDNA-Sonde hybridisiert (Shinshi, H. u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5541 - 5545 (1988)), wird zusammengefaßt und zur Konstruktion von Bibliotheken verwendet.

Der Clonierungsvektor LambdaOngC, der von der Stratagene Corp. bezogen wurde, wird mit SacI verdaut. Es werden 1 µg dieser DNA mit 0,1 µg der SacI-verdauten Tabak-DNA gemischt, und die DNA wird mit T4-DNA-Ligase nach den Empfehlungen des Herstellers ligiert. Die ligierte DNA wird dann unter Anwendung eines in vitro-Verpackungsverfahrens nach Stratagene in Phagteilkörpern verpackt. Die Phage werden mit Bakterien, wie sie in der Lambda-Vorschrift vorgeschlagen werden, plattiert. Es werden etwa 75 000 "Plaques" unter Anwendung einer ^{32}P -markierten β -1,3-Glukanase-cDNA-Sonde "gescreent". Elf positive "Plaques" werden identifiziert. Diese "Plaques" werden durch aufeinanderfolgende Runden von Plattierung und "Screening" gereinigt.

DNA wird aus den gereinigten Klonen isoliert, und die Klone werden durch Restriktionsverdauung unter Verwendung von HindIII, EcoRI und SacI analysiert. Es handelt sich um Klone zweiter Typen, der eine wird durch den Klon 39.1, der

andere durch den Klon 39.3 repräsentiert. Die 4,5- und 4,7-kb-Inserte in Klon 39.1 bzw. 39.3 werden in das Bluescript-Plasmid, das mit SacI verdaut wurde, subkloniert, und es werden die Subklone pBSGluc39.1 (SacI-Fragment von Lambda-Klon 39.1 abgeleitet) und pBSGluc39.3 (SacI-Fragment von Lambda-Klon 39.3 abgeleitet) isoliert. Die Sequenz der DNA in den SacI-Fragmenten, die in den Subklonen pBSGluc39.1 und pBSGluc39.3 enthalten ist, wird durch DNA-Sequenzierung bestimmt und in den Sequenzen 5 bzw. 6 gezeigt. Es wird die Codierungssequenz ermittelt und eine große intervenierende Sequenz in der Nähe des 5'-Endes der Codierungssequenz lokalisiert.

Beispiel 25 - Identifizierung der Transkriptionsstartstelle für das β -1,3-Glukanase-Gen

A. Starterextensionskartierung

Es wird ein synthetischer DNA-Starter synthetisiert, der komplementär zu den Basen 2399 bis 2416 ist und in Starterextensionsexperimenten eingesetzt wird, wie sie im Beispiel 5 beschrieben werden. Die RNA für diese Experimente wurde aus Tabak isoliert, der mit Phytophthora parasitica var. nicotiana infiziert war. Die Starterextensionsprodukte werden gegen einen Molekulargewichtsstandard behandelt, bei dem der markierte Starter in Dideoxy-DNA-Sequenzierungsreaktionen mit dem Subklon pBSGluc39.1 als Matrice verwendet wird. Nach der Gelelektrophorese und der Autoradiografie, wie sie im Beispiel 5 beschrieben wurden, werden Extensionsprodukte identifiziert, die den Positionen 1432, 1446 und 1447 der β -1,3-Glukanase-39.1-Sequenz, Sequenz 5, entsprechen. Da zwischen den Positionen 1554 und 2345 der pBSGluc39.1-Se-

quenz ein großes Intron vorhanden ist, kann es sein, daß die Molekulargewichtsskala nicht das korrekte Molekulargewicht der Extensionsprodukte widerspiegelt. Es wird daher ein zweites Starterextensionskartierungsexperiment mit einem Starter durchgeführt, der komplementär zu den Positionen 1530 bis 1547 ist. Bei Anwendung dieses Starters werden drei 5'-Enden der Glukanase-mRNA als A-Reste in den Positionen 1434, 1448 und 1449 kartiert.

B. S1-Nukleasekartierung

Es wird ein synthetisches Oligonukleotid synthetisiert, das komplementär zu den Positionen 1415 bis 1504 ist und als Sonde in der S1-Nukleasekartierung eingesetzt wird. Das Oligonukleotid wird am 5'-Ende unter Verwendung von ^{32}P -ATP und T4-Polynukleotidkinase nach den Empfehlungen des Herstellers kinatisiert. Nach der Phenolextraktion und der Ethanol-
ausfällung wird das markierte Oligonukleotid in Formamidhybridisationspuffer (siehe Beispiel 6) mit einer Konzentration von etwa 2 mM wieder zur Suspension gebracht. Die bei diesen Experimenten eingesetzte RNA wird wie im vorstehenden Beispiel aus Tabak isoliert, der mit Phytophthora parasitica infiziert war. Die S1-Kartierung wird auf dieser RNA unter Verwendung des markierten Oligonukleotiden so vorgenommen, wie das im Beispiel 6 beschrieben wurde. Nach der Gelelektrophorese werden drei Bänder festgestellt, die den Positionen 1434, 1448 und 1449 in der pBSGluc39.1-DNA-Folge entsprechen.

C. Bestimmung der Transkriptionsstartstelle

Sowohl beim Starterextensions- als auch bei S1-Nukleasekar-

tierungsverfahren werden die 5'-Enden der mRNA in den Positionen 1434, 1448 und 1449 loziert. Folglich entsprechen diese Stellen, die alle Adeninreste sind, der Transkriptionsstartstelle des β -1,3-Glukanase-Gens.

Beispiel 26 - Herstellung von pBSGluc39.1./GUS

Oligonukleotide mit den Sequenzen

- A) 5'-GTTTATGTGAGGTAGCCATGGTGGGAAGACTTGTGGG-3'
- B) 5'-GATCGCGGTACCGAGCTCCTCTAGGGGGCCAAGG-3'

werden synthetisiert, gereinigt und in einer polymerasekatalysierten Reaktion (PCR) nach den Anweisungen des Herstellers (Perkin Elmer Cetus, DNA-Wärmezyklerelement, und Perkin Elmer Cetus, GeneAmp-Reagenziensatz) eingesetzt, um ein 1494-bp-Fragment der DNA von pBSGluc39.1 zu amplifizieren. Die Oligonukleotide werden bezeichnet, um eine KpnI-Stelle unmittelbar an die SacI-Stelle am Basenpaar 1 der 39.1-Glukanasesequenz hinzuzufügen und eine neue NcoI-Stelle am Basenpaar 1462 zu schaffen. Die aus dem PCR-Amplifikationsverfahren abgeleitete DNA wird mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNA wird wieder zur Suspension gebracht und mit NcoI und KpnI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das 1462bp-Band wird ausgeschnitten und in der folgenden Ligation eingesetzt. Das Plasmid pBS-GUS1.2 (Beispiel 19 B) wird mit NcoI und KpnI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel behandelt, und das den Vektor enthaltende Band wird ausgeschnitten. Das Band, das den pBS-GUS1.2-Vektor enthält, und das 1462 bp-Band aus

der PCR-Reaktion werden ligiert und zur Transformation von E. coli verwendet. Positive Klone werden herausgegriffen und nach denen gesichtet, welche das 1462 bp-Insert enthalten. Die Plasmide, welche Inserte enthalten, sind mutmaßliche Klone von pBSGluc39.1/GUS, da jedoch die Mutationsrate bei diesem Verfahren verhältnismäßig hoch ist ($\sim 1/1000$ Basen), müssen mehrere Klone bis zu 1462 bp-Fragment sequenziert werden. Es wird ein Klon mit der erwarteten Sequenz ausgewählt und als Klon pBSGluc39.1/GUS bezeichnet.

Beispiel 27 - Herstellung von pBSGluc39.3/GUS

Oligonukleotide mit den Sequenzen

- A) 5'-GTTTATCTGAGGTAGCCATGGTGAGAAGACTTGTTCGA-3'
- B) 5'-GATCGCGGTACCGAGCTCCCTTGGGGGGCAAG-3'

werden synthetisiert, gereinigt und in einer PCR-Reaktion eingesetzt, um ein 1677 bp-Fragment von pBCGluc39.3 zu amplifizieren. Die Oligonukleotide werden so aufgebaut, daß eine neue KpnI-Stelle unmittelbar im Anschluß an die SacI-Stelle in Position 1 der Glukanase-39.3-Sequenz und eine neue NcoI-Stelle in der Position 1646 eingeführt werden. Die DNA aus der PCR-Amplifikation wird mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit Ethanol ausgefällt, wieder zur Suspension gebracht, mit NcoI und KpnI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band bei 1646 bp wird ausgeschnitten und in der folgenden Ligation eingesetzt. pBS-GUS1.2 wird mit NcoI und KpnI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das den Vektor enthaltende

Band wird herausgeschnitten, mit dem 1646 bp-Band aus der PCR-Reaktion gemischt und ligiert, um das Plasmid pBSGluc39.3/GUS zu bilden. Wie oben werden verschiedene mutmaßliche Plasmide isoliert und sequenziert, und eines mit der erwarteten Sequenz wird als Plasmid pBSGluc39.3/GUS herausgegriffen.

Beispiel 28 - Herstellung von pCIB200/Gluc39.1-GUS und
pCIB200/Gluc39.3-GUS

A. pCIB200 (Beispiel 19 c) wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pBSGluc39.1/GUS (Beispiel 26) wird mit KpnI und XbaI verdaut, und die Fragmente werden auf einem 0,8 %igen Gel mit niedriger Gelierungstemperatur getrennt. Die Bänder, die den pCIB200-Vektor enthalten, und das KpnI-XbaI-Band, welche die 5'-Flankierungssequenz des Glukanase-39.1-Gens enthält, die mit dem GUS-Gen verschmolzen ist, werden herausgeschnitten und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.1-GUS zu bilden.

B. Ebenso wird Plasmid pBSGluc39.3/GUS (Beispiel 27) verdaut und mit dem verdauten pCIB200 ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.3-GUS zu bilden.

Beispiel 29 - Herstellung von pCIB200/Gluc39.1BT und
pCIB200/Gluc39.3-BT

A. pCIB200/Gluc39.1-BT

Das Plasmid pBSGluc39.1/GUS wird mit KpnI und EcoI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB1004 (Beispiel 21 c)

wird mit KpnI und NcoI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB200 (Beispiel 19 C) wird mit KpnI verdaut, unter Einsatz von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band, das den pCIB200-Vektor enthält, das Band, das den Glukanase-5'-Flankierungsbereich enthält, und das Band, welches das BT-Gen enthält, werden herausgeschnitten, miteinander vermischt und ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.1-BT zu bilden.

B. pCIB200/Gluc39.3-BT

Ebenso wird Plasmid pBSGluc39.3/GUS verdaut und mit verdautem pCIB1004 und verdaulichem pCIB200 ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.3-BT zu bilden.

Beispiel 30 - Herstellung von pCIB200/Gluc39.1-AHAS und pCIB200/Gluc39.3-AHAS

A. Ligation mit pCIB200

Das Plasmid pBSGluc39.1/AHAS wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB200 (Beispiel 19 C) wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band, welches die Glukanase/AHAS-Fusion enthält, und das Band, das den pCIB200-Expressionsvektor enthält, werden herausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.1-AHAS zu bilden.

Ebenso wird das Plasmid pBSGluc39.3/AHAS verdaut und mit verdaulichem pCIB200 ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.3-AHAS zu bilden.

B. Herstellung der Plasmide pBSGluc39.1/AHAS und pBSGluc39.3/AHAS

Das Plasmid pBSGluc39.1/GUS (Beispiel 26) wird mit NcoI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB1207 (Beispiel 22 C) wird mit NcoI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band, das die Glukanase-5'-Flankierungssequenz und den Vektor enthält, und das Band, das die AHAS-Codierungssequenz enthält, werden herausgeschnitten, gemischt und die DNA ligiert, um das Plasmid pBSGluc39.1/AHAS zu bilden.

Ebenso wird Plasmid pBSGluc39.3/GUS (Beispiel 27) verdaut und mit dem verdaulichem pCIB1207 ligiert, um das Plasmid pBSGluc39.3/AHAS zu bilden.

Beispiel 31 - Herstellung von pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR und pCIB200/Gluc39.3-AHAS-SuR

A. Ligation mit pCIB200

Das Plasmid pBSGluc39.1/AHAS-SuR wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Plasmid pCIB200 (Beispiel 19 C) wird mit KpnI und XbaI verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur behandelt. Das Band, das die Glukanase/AHAS-SuR-Fusion enthält, und das Band,

das den pCIB200-Expressionsvektor enthält, werden herausgeschnitten und die DNA ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR zu bilden.

Ebenso wird das Plasmid pBSGluc39.3/AHAS-SuR verdaut und mit verdaulichem pCIB200 ligiert, um das Plasmid pCIB200/Gluc39.3-AHAS-SuR zu bilden.

B. Herstellung der Plasmide pBSGluc39.1/AHAS-SuR und pBSGluc39.3/AHAS-SuR

Die Plasmide pBSGluc39.1/GUS (Beispiel 26) und pBSGluc39.3/GUS (Beispiel 27) werden mit NcoI und XbaI verdaut, und die Restriktionsfragmente werden auf einem 0,8 %igen 1 X TAE-Agarosegel mit niedriger Gelierungstemperatur getrennt. pCIB1208 (Beispiel 23 C) wird mit XbaI und NcoI verdaut, und das 3,3 kb-Fragment, welches das mutierte AHAS-Gen (Sulfonylharnstoffherbizidresistent, SuR) enthält, wird durch Agarosegelelektrophorese isoliert. Die Fragmente die den Glukuronidasepromoter und den pBS-Vektor enthalten, werden herausgeschnitten, geschmolzen und mit dem AHAS-Fragment ligiert, um Klone zu schaffen, die als pBSGluc39.1.AHAS-SuR bzw. pBSGluc39.3/AHAS-SuR bezeichnet werden.

4. Identifizierung der neuartigen Gene

In den folgenden Beispielen wird die Isolierung und die Charakterisierung der restlichen neuartigen PR-Protein-Gene der vorliegenden Erfindung offengelegt.

Beispiel 32 - Isolierung von anderen genomischen und cDNA- Klonen

A. Isolierung eines PR-1'-codierenden genomischen Klons

Es wird eine genomische Bibliothek konstruiert und mit einer PR-1-cDNA-Sonde einem "Screening" unterzogen, wie das im Beispiel 11 beschrieben wurde. Ein Klon wird isoliert und als lambdabchroPR1019 bezeichnet. Es wird eine vorläufige Restriktionskarte aufgestellt. In das Bluescript wird ein ClaI-Fragment subkloniert, und dann wird eine Restriktionskarte des Plasmids, pBS-PR1019Cla, aufgestellt. Ein großes XhoI-Fragment wird aus pBS-PR1019Cla deletiert, was das Plasmid pBS-PR1019Cla Xho ergibt. Dieses Plasmid enthält etwa 2,7 kb der Tabak-DNA mit dem PR1019-Gen. In diesem Plasmid werden Deletionen vorgenommen, und der Satz der Deletionen wird für die DNA-Sequenzierung verwendet.

Die DNA-Folge für etwa 2100 bp dieses Gens wird in der Sequenz 2 gezeigt. Das in PR1910 codierte Protein ist zu etwa 65 % homolog zu PR-1a, PR-1b oder PR-1c, daher wird dieses neue Gen als PR-1' bezeichnet.

B. Isolierung eines Gurkenchitinase codierenden cDNA-Klons

Ein pathogeninduzierbares Chitinaseprotein wird aus infizierten Gurkenblättern isoliert, wie das von Metraux, J. P. u. a., *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33, 1 bis 9 (1988) beschrieben wurde. Aus diesem homogenen Proteinpräparat werden Peptide hergestellt, wie das im wesentlichen in der Fachliteratur und in den Beispielen 9 und 10 beschrieben wird. Es werden zwei Bereiche des Proteins ausgewählt, und es werden zwei Oligonukleotidsonden synthetisiert, die zu allen möglichen Kombinationen der Boten-RNA

komplimentär ist, die Peptide codieren können. Diese Sonden haben folgende Sequenzen:

G T A

Sonde 1: 5'-CCATTCTGNCCCCAGTA-3'

G G G G C

Sonde 2: 5'-GGATTATTATAAAAATTGNACCCA-3'

Gukenblätter werden mit dem Tabaknekrosevirus (TNV) infiziert, und 5 Tage nach der Infektion wird RNA isoliert, wie das im Beispiel 5 beschrieben wurde. Nach Standardverfahren wird Poly-A⁺-RNA isoliert, und im λ Zap-Klonierungsvektor (Stratagene) wird eine cDNA-Bibliothek konstruiert, wie das im wesentlichen von Gubler, U. und Hoffman, B. J., Gene 25, 203 (1983) beschrieben wurde. Es werden 300 000 "Plaques" plattiert und Duplikatplaque-Elemente mit dem mit ³²P markierten Oligonukleotidgemisch 1 (Sonde 1) oder Gemisch 2 (Sonde 2) sondiert. Es werden die "Plaques" isoliert, die beim "Screening" mit einer der Sonden positive Ergebnisse zeigen. Die Isolierung des Phagen und das automatische Herausschneiden erfolgen nach den Anweisungen im Stratagene Lambda Zap-Laborhandbuch.

Wenn die Chitinase-cDNA-Klone im Bluescript-Plasmid isoliert sind, werden sie durch Dideoxysequenzierung sequenziert. Die Sequenz des Chitinase-Gens wird in der Sequenz 3 dargestellt.

C. Isolierung des cDNA-Klons zur Codierung der Hauptform von PR-R

Blätter von Nicotinia tabaccum cv. Kanthi-ne werden mit dem

Tabakmosaikvirus infiziert und fünf Tage nach der Infektion geerntet. Die Gesamt-RNA wird wie im Beispiel 5 hergestellt, und Poly-A+-RNA wird nach Standardverfahren isoliert. Unter Verwendung dieser Poly-A+-RNA im Lambda-ongC-Klonierungsvektor (Stratagene) wird eine cDNA-Bibliothek konstruiert. Mit einer Oligonukleotidsonde mit der Sequenz

5'-GAACTTCCTAAAAGCTTCCCCTTTATGCC-3'

werden etwa 300 000 "Plaques" einem "Screening" unterzogen. Positive "Plaques" werden nach Standardverfahren gereinigt, und aus dem Phag wird DNA hergestellt. Ein Fragment des rekombinanten Phags, das die cDNA enthält, wird in das Bluescript-Plasmid subkloniert. Die DNA-Folge der cDNA wird durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Die Sequenz eines Klons, der die Hauptform von PR-R codiert (Pierpoint, W. S. u. a., Physiol. Plant Pathol. 31, 291 (1987)) wird in Sequenz 4 dargestellt. Dieses codierte Protein hat eine sehr starke Homologie zu einem bekannten Trypsin/Alpha-Amylase-Inhibitor, der aus Mais isoliert wird (Richardson, M. u. a., Nature 327, 432 (1987)). Die klonierte PR-R kann ein Inhibitor von Proteasen oder Alpha-Amylasen sein und überträgt als dieser insektizide, virizide oder fungizide Aktivität auf Pflanzen, wenn die Transgenexpression erfolgt.

D. Isolierung der PR-Q-codierenden cDNA

Blätter von Nicotinia tabaccum cv. Xanthi-nc werden mit dem Tabakmosaikvirus infiziert und fünf Tage nach der Infektion geerntet. Die Gesamt-RNA wie im Beispiel 5 wird hergestellt, und unter Standardverfahren wird Poly-A+-RNA isoliert. Unter Verwendung dieser Poly-A+-RNA im Lambda OngC-Klonierungsvektor (Stratagene) wird eine cDNA-Bibliothek konstruiert.

iert. Etwa 300 000 "Plaques" werden einem "Screening" unter Verwendung einer markierten cDNA-Sonde mit Codierung für das basische Tabakchitinase-Gen (Shinshi u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 89 - 93 (1987)) und Waschfiltern bei 50° C in 0,125 mM NaCl, 1 % SDS, 40 mM Natriumphosphat (pH-Wert 7,2), 1 mM EDTA, unterzogen. Es werden 24 positive "Plaques" gereinigt, und die DNA-Folge eines als pBScht15 bezeichneten Klons wird bestimmt. Diese Folge wird in Sequenz 7 dargestellt.

Das PR-Q-Protein wird teilweise von intrazellulärer Flüssigkeit der TMV-infizierten Tabakblätter gereinigt, wie das im Beispiel 8 beschrieben wurde. Fraktionen von der Ultragel-ACA54-Chromatografie, die PR-O, PR-P, PR-Q und PR-R enthalten, werden zusammengefaßt und durch Lyophilieren konzentriert. Die Proteine werden weiter durch Polyakrylamidgелеlektrophorese gereinigt. Das Proteinband, das PR-Q enthält, wird herausgeschnitten und nach dem Applied Biosystems User Bulletin # 36 vom 21. März 1988 proteineluiert. Das Protein wird mit Pyroglutamaminopeptidase behandelt und durch automatisierten Edman-Abbau sequenziert, wie das im Beispiel 9 beschrieben wurde. Die Sequenz des Aminoterminus des PR-Q-Proteins wird bestimmt mit (Xxx = unklar):

GlnGlyIleGlySerIleValThrXxxAspLeuPheAsnGluMetLeu

Das im Klon in Sequenz 7 codierte Protein wird als das pathogenesebezogene Protein Q bestimmt auf der Grundlage von 1) begrenzter struktureller Homologie mit der basischen Tabakchitinase und 1) Identität mit der Aminoterminalproteinfolge von PR-Q, bestimmt durch Proteinsequenzierung.

E. Isolierung der cDNA zur Codierung der sauren Form von β -1,3-Glukanase

Etwa 300 000 "Plaques" der in Beispiel 32 D (oben) beschriebenen cDNA-Bibliothek werden unter Einsatz einer markierten cDNA-Sonde zur Codierung der basischen Form von β -1,3-Glukanase (Shinshi, H, u. a., siehe oben) und Waschen der Filter bei 50° C in 0,125 M NaCl, 1 % SDS, 40 mM Natriumphosphat (pH-Wert 7,2), 1 mM EDTA "screeniert". Es werden 15 positive "Plaques" isoliert und das Insert in das Bluescript-Plasmid subkloniert. Die partielle DNA-Sequenzierung zeigt, daß Klon 5 und 6 identische cDNA codieren, die eine Homologie von etwa 55 % zur bekannten DNA-Folge der basischen Form von β -1,3-Glukanase haben. Die Folge der cDNA in Klon 5 und 6 wird bestimmt und in Sequenz 8 gezeigt. Es wird gefolgert, daß diese cDNA die saure Form von β -a,3-Glukanase codiert, Grundlage für diese Schlußfolgerung bilden die begrenzte Aminosäurefolgenhomologie und der stärker saure isoelektrische Punkt des codierten Proteins.

F. Isolierung eines genomischen Klons mit der Codierung des Gurkenchitinase-Gens

Von Cucumis sativus cv. Long Marketer werden Nuklei isoliert, und wie im Beispiel 11 wird die DNA isoliert. Es werden 3 µg dieser DNA mit EcoRV, EcoRI, BamHI oder HindIII verdaut, und die Fragmente werden auf einem 0,5 %igen Agarosegel getrennt. Eine Southern-Transfer-Analyse unter Verwendung einer markierten Sonde der Gurkenchitinase-cDNA (Sequenz 3) zeigt, daß im EcoRI-Verdauungsprodukt ein einzelnes Band bei etwa 12 kb vorhanden ist. Es wird daher entschieden, das Gurkenchitinase-Gen unter Verwendung des gesamten EcoRI-Verdauungsproduktes zu isolieren und in einen Lambda-Klonierungsvektor des Austauschtyps zu ligieren.

Es werden 10 µg der oben isolierten DNA vollständig verdaut, wozu EcoRI eingesetzt wird. Diese DNA wird dann mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt und in die EcoRI-Stelle von EMBL 4 ligiert. Mit der markierten cDNA-Sonde von Gurkenchitinase, Sequenz 3, werden etwa 100 000 "Plaques" screeniert. Zehn positive "Plaques" werden herausgegriffen und gereinigt, und das DNA-Insert wird durch vorläufige Restriktionsverdauungskartierung analysiert. Alle Klone bringen das gleiche Ergebnis, für die weitere Analyse wird einer herausgegriffen. Das 12 kb-Insert in diesem Klon wird dann in das Bluescript-Plasmid subkloniert und ergibt Plasmid pBScucchi/Chitinase. Für diese klonierte DNA wird eine Restriktionskarte erstellt, die Fragmente werden subkloniert und die DNA-Folge bestimmt.

G. Isolierung eines genomischen Klons mit der Codierung von saurer β -1,3-Glukanase

Wie im Beispiel 11 beschrieben, wird eine genomische Bibliothek konstruiert und mit einem cDNA-Klon auf die saure β -1,3-Glukanase, Beispiel 32 E, "screeniert". Es wird ein Lambda-Klon isoliert, und ein 1 kb-umfassendes EcoRI-Fragment dieses Lambda-Klons wird in das Bluescript-Plasmid subkloniert, wie das im Beispiel 32 A beschrieben wurde. Der Bluescript-Klon hat die Bezeichnung pBSGL6e.

5. Stabile Transformation und Regeneration von Pflanzen

Pflanzengewebe wird mit den oben beschriebenen Vektoren nach einer aus dem Fachgebiet bekannten Technik transformiert. Zu diesen Methoden für die Übertragung von DNA in Pflanzenzellen gehören beispielsweise die direkte Infektion oder Kokultivierung von Pflanzen, Pflanzengewebe oder

Zellen mit A. tumefaciens (Horsch, R. B. u. a., Science 225, 1229 (1985); Marton, L., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (Zellkultur und somatische Zellgenetik von Pflanzen), Bd. 1, 514 - 521 (1984)), die Behandlung von Protoplasten mit exogener DNA nach Methoden, wie sie in den folgenden Publikationen beschrieben wurden: Paszkowski, J. u. a., EMBO J. 3, 2717 (1984); EP-A 0 164 575; Shillito, R. D. u. a., Bio/Technology 3, 1099 (1985); Potrykus, I. u. a., siehe oben; Loerz, H. u. a., Mol. Gen. Genet. 199, 178 (1985); Fromm, M. u. a., siehe oben; GB-PS 2 140 822 und Negrutiu, I. u. a., Plant Mol. Biol. 8, 363 (1987); die Inkubation mit Polyethylenglykol (PEG) (Negrutiu, I. u. a., siehe oben); die Mikroinjektion (Reich, T. J. u. a., Bio/Technology 4, 1001 - 1004 (1986); Reich, T. J. u. a., Can. J. Bot. 64, 1259 - 1267 (1986)), Mikroprojektilbombardement (Klein, T. M. u. a., Nature 327, 70 (1987)).

Beispiel 33 - Transformation von Agrobacterium

pCIB270- (Beispiel 16), pCIB271-, pCIB272- und pCIB273-Plasmid-DNA (Beispiele 19 D, E und F) wird auf Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt und zur Transformation des A. tumefaciens-Stammes A136 verwendet, der das Helferplasmid pCIB542 enthält, dazu wird das Verfahren von Holsters, M. u. a., Mol. Gen. Genet. 163, 181 - 187 (1978) angewendet. Dabei erhält man die Stämme CIB270, CIB271, CIB272 und CIB273.

Unter Anwendung desselben Verfahrens werden die Plasmide pCIB271, pCIB272 und pCIB273 in die virulenten Stämme von A. tumefaciens 15955, A208, A281 und den A. rhizogenes-Stamm A4 transformiert, wobei die als pCIB271 X 15955,

pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB273 X A281 und pCIB273 X A4 geschaffen werden.

Der Agrobacterium-Stamm CIB542 ist Stamm EHA101 (Hood, u. a., J. Bacteriol. 168, 1291 - 1301 (1986)), in welchem der Kanamycin-Marker des Plasmids durch den Spektinomycin/Streptomycin-Abschnitt von Tn7 ersetzt wurde.

Beispiel 34 - Blattscheibentransformation von Tabak

Die Agrobacterium-Stämme CIB270, CIB271, CIB272 und CIB273 werden 18 bis 24 Stunden lang in Medien von Glutamatsalzen, die auf einen pH-Wert von 5,6 abgestimmt und mit 0,15 % Mannitol, 50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Spektinomycin und 1 mg/ml Streptomycin ergänzt wurden, gezogen, bevor sie auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,2 in den gleichen Medien ohne die Antibiotika verdünnt werden. Die Bakterien werden dann drei bis fünf Stunden gezogen, bevor sie auf einen OD-Wert von 0,2 - 0,4 verdünnt werden, zur Inokulation von Scheiben von 5 bis 7 mm, die aus Blättern von Nicotinia tabaccum cv. Xanthi gestanzt wurden, die aseptisch in GA7-Containern gezogen worden sind, worauf sich eine Methode von Horsch, R. u. a., Science 227, 1229 - 1232 (1985) bezieht.

Die Blattscheiben werden auf einem 0,7-%igen Agar gehalten, das Haupt- und Nebensalze von Murashige und Skoogs (MS), 1 mg/l Benzyladenin und 1 mg/ml *o*-Naphthalenessigsäure enthält, bevor nach zwei Tagen die Übertragung auf das gleiche Medium erfolgt, das 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Karbenizillin und 100 µg/ml Mefoxin enthält. Triebe, die sich auf den Scheiben bilden, werden herausgeschnitten und vermehrt,

bis man durch Subkultivierung der Triebspitzen in GA7-Behältern auf MS-Medium (das 50 µg/ml Kanamycin enthält) sechs Pflänzchen erhält.

Die Pflänzchen werden auf einem Medium bewurzelt, das keine Hormone und 50 µg/ml Kanamycin enthält, in den Boden gebracht und in einem Phytotron abgehärtet, bevor die Übertragung ins Gewächshaus zur Induktionsbehandlung mit chemischen Reglern erfolgt. Zur Blütezeit werden die Blüten zur Selbstbestäubung gebracht. Nach dem Reifen wird der Samen geerntet.

Die Induzierungsexperimente und deren Ergebnisse werden in den Beispielen 63, 66 und in Tabelle II beschrieben.

Beispiel 35 - Produktion von transgenen Tabakkallus und -pflanzen

Der Agrobacterium-Stamm pCIB270 oder pCIB271 ist zur Transformation von Kallus eingesetzt worden, der sich aus den Blattscheiben entwickelt (Beispiel 34). Kallus, der sich auf kanamyzinhaltigem MSNB-Selektionsmedium bildet, wird auf einem Kalluswachstumsmedium gehalten, das aus MS-Haupt- und Nebensalzen und Fe-EDTA (Gibco № 500-1117; 4,3 g/l), MS-Vitaminen, 100 mg/ml Myoinositol, 20 g/l Sukrose, 2 mg/l Naphthalenessigsäure und 0,3 mg/l Kinetin besteht.

Der Kallus kann zur Regeneration von transgenen Pflanzen durch Übertragung von Kallusstückchen auf MSBN-Medium und Anwendung der im Beispiel 34 beschriebenen Methoden verwendet werden. Der Kallus wird auch zum Messen der Gen-Induzierung nach dem Einsatz von induzierenden Chemikalien und zum "Screening" nach gen-induzierenden Chemikalien eingesetzt..

Beispiel 36 - Transformation von Möhren

Die Agrobacterium-Stämme CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB273 x 15955, pCIB272 X A208, pCIB273 X A281 und pCIB273 X A4 werden wie im Beispiel 34 gezogen. Die Bakterien, verdünnt auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,2 bis 0,4, werden dann zur Inokulation von Scheiben verwendet, die aus oberflächensterilisierten Möhren geschnitten wurden.

Um die Möhren oberflächenzusterilisieren, wurden sie geschält und dann 20 min in einer 10 %igen Chlorox-Lösung getränkt. Dann werden die Möhren mit sterilem Wasser gespült, in 5 mm-Stücke geschnitten und mit der Basalseite nach unten auf Wasser-Agar gebracht. Anschließend werden auf die Oberflächen der Scheiben 20 - 50 µl Bakterien aufgebracht. Nach 7 Tagen werden die Scheiben auf 0,7 %iges Agar gebracht, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 0,1 mg/l 2,4-D, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Karbenizillin und 100 µg/ml Mefoxin enthält. Der Kallus, der sich um den Kambialring bildet, wird herausgeschnitten und auf 0,7 %iges Agar gebracht, das durch 3 % Sukrose, 0,1 mg/l 2,4-D, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Karbenizillin und 100 µg/ml Mefoxin ergänzt wurde. Nachdem der Kallus gewachsen ist, wird er in kleine Stücke geschnitten und willkürlich auf vier Platten des gleichen Mediums gebracht. Wenn dieser Kallus die Platte gefüllt hat, werden drei der Platten mit Wasser, 50 mM Natriumsalzyilat, pH-Wert 5,6, oder 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat besprüht, um die Expression des schimärischen PR-1a/GUS-Gens zu induzieren.

Die Induzierungsexperimente und deren Ergebnisse werden in den Beispielen 63 und 66 beschrieben.

Beispiel 37 - Transformation von Sonnenblumen

Die Agrobacterium-Stämme CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB272 x 15955, pCIB273 X A 208, pCIB273 X A281 und pCIB273 X A4 werden wie im Beispiel 34 gezogen. Dann werden die Bakterien, verdünnt auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,2 - 0,4, für die Inokulation der Stengel von Sonnenblumenpflanzen verwendet, die folgendermaßen präpariert wurden:

Sonnenblumensamen wird 10 min in 10 %igem Kaptan getränkt, gefolgt von 10 min in 10 %igem Chlorox und Spülen mit sterilem Wasser. Die Samenhüllen werden entfernt, und der Samen wird auf 0,7 %igem Wasser-Agar im Dunkeln drei Tage lang gekeimt, anschließend wird er in einen Laborinkubator gebracht, der auf 23° C und einen 12-Stundenwechsel von Tag und Nacht eingestellt ist. Die Sämlinge werden eine Woche gezogen, bevor sie gekappt und Bakterien auf die geschnittene Stengeloberfläche gebracht werden.

Nach einer Woche werden die mit CIB270, CIB271, CIB272 oder CIB273 inokulierten Stengel geschnitten und auf 0,7 %iges Agar gebracht, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 2 mg/ml α -Naphthalennessigsäure, 1 mg/ml 6-Benzylaminopurin, 100 μ g/ml Karbenizillin, 100 μ g/ml Mefoxin und 50 μ g/ml Kanamycin enthält. Die mit pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208,

pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB273 X 15955, pCIB273 X A208, pCIB273 X 281 und pCIB273 X A4 inokulierten Stengel werden geschnitten und auf 0,7 %iges Agar gebracht, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 100 µg/ml Karbenizillin und 100 µg/ml Mefoxin enthält. Der Kallus wird alle zwei Wochen auf frisches Medium übertragen, bis man eine ausreichende Menge für 4 Platten erhält. Die Hälfte des Kallus, der von den virulenten Agrobacterium-Stämmen wächst, wird auf Medien ohne Hormone, die 50 µg/ml Kanamycin enthalten, übertragen. Nachdem man eine ausreichende Menge von Kallus, der ohne oder mit Kanamycin gezogen wurde, erhalten hat, wird er wie oben bei der Transformation von Möhren-Kallus zur Induzierung behandelt.

Beispiel 38 - Transformation von Tomaten

Die Agrobacterium-Stämme CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB273 X 15955, pCIB273 X A208, pCIB273 X A281 und pCIB273 X A4 werden wie im Beispiel 34 gezogen. Dann werden die Bakterien, Verdünnung auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,2 - 0,4, für die Inokulierung von Stengeln von Tomatensämlingen verwendet, die folgendermaßen präpariert wurden:

Tomatensamen werden 20 min in 10 %igem Chlorox getränkt und mit sterilem Wasser gespült. Die Samen werden auf 0,7-%igem Wasser-Agar im Dunkeln drei Tage lang gekeimt, anschließend werden sie in einen Laborinkubator gebracht, der auf 23° C und einen 12-stündigen Tag- und Nachtwechsel eingestellt ist. Die Sämlinge werden eine Woche gezogen, bevor sie gekappt und Bakterien auf die geschnittene Stengelfläche inokuliert werden.

Nach einer Woche werden die mit CIB270, CIB271, CIB272 oder CIB273 inokulierten Stengel geschnitten und auf ein 0,7 %iges Agar gebracht, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 2 mg/ml α -Naphthalennessigsäure, 1 mg/ml 6-Benzylaminopurin, 100 μ g/ml Karbinizillin, 100 μ g/ml Mefoxim und 50 μ g/ml Kanamycin enthält. Die mit pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X A4, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB273 X 15955, pCIB273 X A208, pCIB273 X A281 und pCIB273 XA4 inokulierten Stengel werden geschnitten und auf 0,7 %iges Agar gebracht, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 100 μ g/ml Karbenizillin und 100 μ g/ml Mefoxim enthält. Der Kallus wird alle zwei Wochen auf frisches Medium übertragen, bis man eine für 4 Platten ausreichende Menge erhält. Die Hälfte des Kallus, der von den virulenten Agrobacterium-Stämmen wächst, wird auf Medien ohne Hormone übertragen, die 50 μ g/ml Kanamycin enthalten. Nachdem man genügend Kallus erhalten hat, das bei Vorhandensein oder Fehlen von Kanamycin gezogen wurde, wird die Behandlung zur Induzierung vorgenommen, wie sie oben für transformierten Möhrenkallus beschrieben wurde.

Beispiel 39 - Transformation von Baumwolle

Die Agrobacterium-Stämme pCIB271 X 15955, pCIB271 X A208, pCIB271 X A281, pCIB271 X 4A, pCIB272 X 15955, pCIB272 X A208, pCIB272 X A281, pCIB272 X A4, pCIB273 X 15955, pCIB273 X A208, pCIB273 X A281 und pCIB273 X A4 werden wie im Beispiel 34 gezogen. Dann werden die Bakterien, verdünnt auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,2 - 0,4 für die Inokulation von Baumwollkeimblättern verwendet, welche folgendermaßen präpariert wurden:

Die Baumwollsaamen wurden 20 min in 10 % Chlorox getränkt und mit sterilem Wasser gespült. Die Samen wurden im Dunkeln auf 0,7 %igem Wasser-Agar gekeimt. Die Sämlinge werden eine Woche gezogen, bevor die Bakterien auf die Keimblattoberfläche inokuliert werden.

Man läßt die inokulierten Keimblätter Kallus bilden, bevor sie geschnitten und auf 0,7 %iges Agar gebracht werden, das MS-Salze, 3 % Sukrose, 100 µg/ml Karbenizillin und 100 µg/ml Mefoxim enthält. Der Kallus wird alle drei Wochen auf frisches Medium gebracht, bis eine für vier Platten ausreichende Menge vorhanden ist. Die Hälfte des von den virulenten Agrobacterium-Stämmen wachsenden Kallus wird auf Medien ohne Hormone übertragen, die 50 µg/ml Kanamycin enthalten. Nachdem man genügend Kallus, der bei Vorhandensein oder Fehlen von Kanamycin gezogen wurde, gewachsen ist, wird er zur Induzierung behandelt, wie das oben für transformierten Möhrenkallus beschrieben wurde.

Beispiel 40 - Herstellung eines Kallusspezialtyps von Zea Mays, Inzucht-Elite-Stamm Funk 2717

Zea Mays-Pflanzen der Inzuchtlinie Funk 2717 werden bis zur Blüte im Gewächshaus gezogen und eigenbestäubt. Unreife Ähren, die Fruchtkeime von etwa 2 - 2,5 mm Länge enthalten, werden von den Pflanzen entfernt und in 10 %iger Chlorox-Lösung 20 min sterilisiert. Die Fruchtkeime werden aseptisch von den Körnern entfernt und mit der Fruchtkeimachse nach unten auf OMS-Medium plattiert, das 0,1 mg/l 2,4-D, 6 % Sukrose und 25 mM L-Prolin, das mit 0,24 % Gelrite^R (Initiierungsmedium) verfestigt wurde, enthält. Nach einer zweiwöchigen Kultur bei 27° C in Dunkelheit wird der Kallus,

der sich am Skutellum (Schildchen) entwickelt, vom Fruchtkeim entfernt und auf B5-Medium plattiert (Gamborg, O. L. u. a., Experimental Cell Research 50, 151 - 158 (1968)), welches 0,5 mg/l 2,4-D enthält und mit 0,24 % Gelrite^R verfestigt wurde. Der Kallus wird alle zwei Wochen auf frisches Medium übertragen. Insgesamt acht Wochen, nachdem die Fruchtkeime auf das Initiierungsmedium übertragen worden sind, wird der Kallusspezialtyp anhand seiner charakteristischen Morphologie identifiziert. Dieser Kallus wird auf demselben Medium weiter subkultiviert. Nach einer weiteren Zeitspanne von 2 Monaten wird der Kallus auf N6-Medium, das 2 mg/l 2,4-D enthält und mit Gelrite^R verfestigt wurde, übertragen und serienmäßig subkultiviert.

Beispiel 41 - Herstellung einer Suspensionskultur von Zea mays, Inzucht-Elite-Stamm Funk 2717

Der im Beispiel 40 beschriebene Kallus wird insgesamt mindestens sechs Monate subkultiviert. Der für die Subkultur gewählte Kallus ist verhältnismäßig nicht-schleimig, körnig und sehr krümelig, so daß er bei der Einbringung in ein flüssiges Medium in kleine, einzelne Zellzusammenballungen getrennt wird. Kulturen, die Zusammenballungen mit großen, gestreckten Zellen enthalten, werden nicht beibehalten. Etwa 500 mg-Aliquote des Spezialkallus von Zea mays, Inzucht-Elite-Stamm Funk 2717, werden in 30 ml N6-Medium gebracht, das 2 mg/l 2,4-D enthält und sich in 125 ml-De-long-Kolben befindet. Nach einer Woche Kultur bei 26° C im Dunkeln auf einer Kreiselerschüttelmaschine (130 U/min, 2,5 cm Ausschlag) wird das Medium durch frisches Medium ersetzt. Nach einer weiteren Woche werden die Suspensionen erneut auf diese Weise subkultiviert. Gleichzeitig werden

die Kulturen inspiziert, und es werden die zurückbehalten, welche keine große Anzahl von gestreckten Zellen aufweisen. Suspensionskulturen mit Zusammenballungen von großen, gestreckten Zellen werden beseitigt. Das bevorzugte Gewebe besteht aus leicht zytoplasmischen, sich teilenden Zellzusammenballungen, die eine charakteristisch glattere Oberfläche als der übliche Typ von Zellzusammenballungen hatten. Die zurückbehaltenen Kulturen wiesen wenigstens 50 % der Zellen auf, die in diesen kleinen Zusammenballungen dargestellt waren. Das ist die gewünschte Morphologie. Diese Suspensionen hatten auch eine schnelle Wachstumsrate mit einer Verdopplungszeit von weniger als einer Woche. Die Suspensionskulturen werden wöchentlich durch Übertragung von 0,5 ml PCV (gepacktes Zellvolumen : abgesetztes Zellvolumen in einer Pipette) in 25 ml frisches Medium subkultiviert. Nach vier bis sechs Wochen Subkultur auf diese Weise vergrößerten sich die Kulturen je wöchentlicher Subkultur auf das Zwei- bis Dreifache. Kulturen, bei denen mehr als 75 % der Zellen die gewünschte Morphologie aufweisen, werden für die weitere Subkultur zurückbehalten. Die Stämme werden dadurch erhalten, daß für die Subkultur jeweils der Kolben gewählt wird, dessen Inhalt die beste Morphologie aufweist. In einigen Fällen erfolgt alle zwei Wochen ein periodisches Filtern durch Siebe aus rostfreiem Stahl mit einer Porengröße von 630 μm , um die Dispersion der Kulturen zu vergrößern, das ist aber nicht notwendig.

Beispiel 42 - Herstellung von Protoplasten aus Suspensionskulturen von Zea Mays

Es werden 1 - 1,5 ml PCV der Suspensionskulturzellen, wie sie im Beispiel 41 hergestellt wurden, in 10 - 15 ml eines

filtersterilisierten Gemischs inkubiert, das aus 4 % Zellulase-RS mit 1 % Rhozyme in KMC-Salzlösung (8,65 g/l KCl, 16,47 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 12,5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l MES, pH-Wert 5,6) besteht. Die Verdauung erfolgt bei 30° C auf einem langsam schaukelnden Tisch über eine Zeitspanne von drei bis vier Stunden. Die Herstellung wird unter einem gestürzten Mikroskop auf die Freisetzung von Protoplasten überwacht. Die freigesetzten Protoplasten werden folgendermaßen aufgefangen: Das Präparat wird durch ein 100 µm-Maschensieb gefiltert, an das sich ein 50 µm-Maschensieb anschließt. Die Protoplasten werden mit einer Menge an KMC-Salzlösung durch die Siebe gewaschen, die gleich dem ursprünglichen Volumen der Enzymlösung ist. In jedes von mehreren Wegwerfzentrifugenröhrchen aus Plaste werden 10 ml des Protoplastpräparats gegeben und 1,5 - 2 ml einer 0,6 M-Sukroslösung (auf einen pH-Wert von 5,6 mit 0,1 % Morpholinoethansulfonsäure (MES und KOH) gepuffert) unterlegt. Das Röhrchen wird bei 60 - 100 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, und die Protoplasten, die an der Grenzfläche ein Band bilden, werden mit einer Pipette aufgenommen und in ein frisches Röhrchen gegeben. Das Protoplastpräparat wird wieder in 10 ml frischer KMC-Salzlösung zur Suspension gebracht und 5 min bei 60 - 100 x g zentrifugiert. Die obenaufschwimmende Schicht wird entfernt und weggeworfen, und die Protoplasten vorsichtig in dem verbleibenden Tropfen wieder zur Suspension gebracht, worauf allmählich 10 ml einer KMC-Lösung mit 13/14 Stärke zugesetzt wird. Nach einem erneuten Zentrifugieren über fünf Minuten wird die obenaufschwimmende Schicht wieder entfernt, und die Protoplasten werden wieder in einer KMC-Lösung mit Stärke 6/7 zur Suspension gebracht. Zum Zählen wird ein Aliquot ent-

nommen, die Protoplasten werden wieder durch Zentrifugieren abgesetzt. Die Protoplasten werden wieder zur Suspension gebracht mit einer Konzentration von 10^7 (zehn Mill.) je Milliliter in KM-8p-Medium (Tabelle I) oder in 0,5 M Mannitol, das 6 mM $MgCl_2$ enthält, oder einem anderen Mittel, das für den Einsatz bei der Transformation geeignet ist und in den folgenden Beispielen beschrieben wird. Diese Protoplastsuspension wird für die Transformation eingesetzt und wird so gezüchtet, wie das in den Beispielen 43 und 44 beschrieben wird.

Beispiel 43 - Transformation von Zea Mays-Protoplasten durch Elektroporieren

A. Alle Schritte mit Ausnahme des Wärmeschocks werden bei Zimmertemperatur ($22^\circ - 28^\circ$ C) ausgeführt. Die Protoplasten werden im letzten Schritt von Beispiel 42 in 0,5 M Mannitol zur Suspension gebracht, das 0,1 % MES und 6 mM $MgCl_2$ enthält. Die Resistenz dieser Suspension wird in der Kammer eines Dialog Electroporators (DIA-LOG GmbH, D-4000 Düsseldorf 13, Bundesrepublik Deutschland) gemessen und auf 1 - 1,2 kOhm unter Einsatz einer 300 mM $MgCl_2$ -Lösung abgestimmt. Die Protoplasten werden durch Eintauchen des Röhrchens, welches die Probe enthält, in ein Wasserbad von 45° C für die Dauer von fünf Minuten wärmegeshockt, anschließend erfolgt die Abkühlung auf Zimmertemperatur auf Eis. Aliquoten von 0,25 ml dieser Suspension werden 4 µg linearisiertes Plasmid, das ein pflanzenselektierbares Hygromycinresistenz-Gen, wie es von Rothstein, S. J. u. a., siehe oben, beschrieben wurde, oder schimärische Gen-Konstruktionen nach den Beispielen 19 bis 31 und 20 µg Kälberthymus-Träger-DNA zugesetzt. Den Protoplasten werden 0,125 ml einer

24 %igen Polyethylenglykollösung (PEG-Lösung, Molekulargewicht 8000) in 0,5 M Mannitol, das 30 mM MgCl_2 enthält, zugesetzt. Das Gemisch wird gut, aber vorsichtig gemischt und 10 min lang inkubiert. Die Probe wird in die Kammer eines Elektroporiergerätes übertragen und die Proben werden in Intervallen von 10 s drei Impulsen bei Anfangsspannungen von 1500, 1800, 2300 oder 2800 Vcm^{-1} und einer exponentiellen Abfallzeit von 10 μs ausgesetzt.

Die Protoplasten werden folgendermaßen kultiviert. Die Proben werden in 6 cm-Petrischalen bei Zimmertemperatur plattiert. Nach 5 bis 15 min werden 3 ml KM-8p-Medium (Tabelle I, oben), das 1,2 % SeaPlaque-Agarose und 1 mg/l 2,4-D enthält, zugesetzt. Die Agarose und die Protoplasten werden gut gemischt und man läßt das Medium gelieren.

B. Beispiel 43 A wird mit einer oder mehreren der folgenden Modifikationen wiederholt:

- (1) Der Widerstand des Protoplastenpräparats wird auf 0,5 bis 0,7 k Ω m abgestimmt.
- (2) Die verwendete PEG-Lösung ist eine PEG-Lösung mit einem Molekulargewicht von 4000.
- (3) Es wird kein PEG oder ein halbes Volumen einer 12 %igen PEG-Lösung zugesetzt.
- (4) Die Impulse werden in Intervallen von 3 s ausgeführt.
- (5) Die Protoplasten werden nach dem Elektroporieren in Schalen, die auf eine auf 16° C gekühlte Platte gebracht wurden, plattiert.

(6) die Protoplasten werden nach dem Elektroporierungsschritt in Rohre gegeben, mit 10 ml KMC-Lösung mit der Stärke 6/7 oder mit W5-Lösung (die aus 380 mg/l KCl, 18,375 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 g/l NaCl; 9 g/l Glukose, pH-Wert 6,0 besteht) gewaschen, anschließend durch Zentrifugieren bei 60 g für die Dauer von 10 min aufgefangen, in 0,3 ml KM-Medium wieder zur Suspension gebracht und wie in A plattiert.

(7) die Kälberthymus-Träger-DNA wird nicht zugesetzt.

Beispiel 44 - Transformation von Zea Mays-Protoplasten
durch Behandlung mit Polyethylenglykol (PEG)

A. Die Protoplasten werden im letzten Schritt von Beispiel 42 in einer 0,5 M Mannitol-Lösung wieder zur Suspension gebracht, die 12 - 30 mM MgCl_2 enthält. Es wird wie im Beispiel 43 beschrieben ein Wärmeschock von 45°C für die Dauer von 5 min gegeben. Die Protoplasten werden in Aliquoten zur Transformation in Zentrifugenröhrchen verteilt, 0,3 ml suspergierte Protoplaste je Röhrchen. In den nächsten 10 Minuten wird folgendes zugesetzt: DNA (wie im Beispiel 43) und Polyethylenglykollösung (PEG-Lösung, Molekulargewicht 6000, die 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und 0,4 M Mannitol enthält; pH-Wert 8 - 9 mit KOH), um eine Endkonzentration von 20 % PEG zu erreichen. Die Aliquote werden 30 min unter gelegentlichem sanften Schütteln inkubiert, anschließend werden die Protoplaste in Petrischalen (0,3 ml Originalprotoplastsuspension je Schale mit 6 cm Durchmesser) gegeben und so gezüchtet, wie das im Beispiel 43 beschrieben wurde.

B. Beispiel 44 A wird wiederholt, und die Protoplaste werden nach 30 min Inkubationszeit in der PEG-Lösung aus Bei-

spiel 44 A gewaschen, wozu in Intervallen von zwei bis drei Minuten fünfmal 0,3 ml W5-Lösung zugesetzt werden. Die Protoplastsuspension wird zentrifugiert, die obenaufschwimmende Schicht wird entfernt, und die Protoplaste werden wie im Beispiel 43 A gezüchtet.

C. Die Beispiele 44A und 44 B werden mit der Modifikation wiederholt, daß die Endkonzentration von PEG zwischen 13 % und 25 % liegt.

Beispiel 45 - Regeneration von Kallus aus Protoplasten

Die Platten mit den Protoplasten in Agarose werden ins Dunkle bei 26° C gehalten. Nach 14 Tagen haben sich aus den Protoplasten Kolonien gebildet; die Agarose, welche die Kolonien enthält, wird auf die Oberfläche einer Petrischale mit einem Durchmesser von 9 cm gebracht, in der sich 30 ml N6-Medium (Tabelle I, oben) befinden, die 2 mg/l 2,4-D, verfestigt mit 0,24 % Gelrite^R, enthalten. Dieses Medium wird als 2N6 bezeichnet. Der Kallus wird im Dunkeln weiter bei 26° C gezüchtet, und alle zwei Wochen werden Kallusstücke auf frisches, festes 2N6-Medium subkultiviert.

Beispiel 46 - Auswahl von transformiertem Kallus von Zea Mays

Beispiel 45 wird mit der Modifikation wiederholt, daß 100 mg je Liter oder 200 mg/l Hygromycin B dem 2N6-Medium zugesetzt werden, um nach den transformierten Zellen zu selektieren.

Beispiel 47 - Regeneration von Getreidepflanzen

A. Kallus wird zur Erhaltung auf 2N6-Medium gebracht und zur

Einleitung der Regeneration auf ON6- (bestehend aus N6-Medium ohne 2,4-D) und N61-Medium (bestehend aus N6-Medium mit 0,25 mg/l 2,4-D und 10 mg/l Kinetin). Kallus, der auf ON6- und N61-Medium wächst, wird im Licht gezogen (16 Stunden/Tag Licht von 10 - 100 μ Einstein/m²s von weißen Leuchtstofflampen). Auf N61-Medium wachsender Kallus wird nach zwei Wochen auf ON6-Medium übertragen, da eine längere Zeit auf N61-Medium schädlich ist. Der Kallus wird alle zwei Wochen subkultiviert, selbst wenn der Kallus auf dieselbe Mediumrezeptur gebracht werden muß. Nach etwa vier bis acht Wochen erscheinen Pflänzchen. Sobald die Pflänzchen mindestens 2 cm hoch sind, werden sie auf ON6-Medium in GA7-Behältern gebracht. In zwei bis vier Wochen bilden sich Wurzeln, und wenn die Wurzeln gut ausgebildet erscheinen, um das Wachstum zu fördern, werden die Pflänzchen in Boden in Torftöpfen mit Lichtschattierung während der ersten vier bis sieben Tage gebracht. Oft ist es nützlich, für zwei bis drei Tage durchsichtige Plastekappen über die Transplantate zu stülpen, um deren Abhärtung zu unterstützen. Sobald sich die Pflanzen stabilisiert haben, werden sie wie normale Getreidepflanzen behandelt und bis zur Reife im Gewächshaus gezogen. Um Nachkommenschaft zu erreichen, werden die Pflanzen eigenbestäubt oder mit dem Wildtyp gekreuzt.

B. Beispiel 47A wird mit der Modifikation wiederholt, daß 100 mg/l oder 200 mg/l Hygromycin B dem Medium zugesetzt werden, das für die Erhaltung des Kallus verwendet wird.

Beispiel 48 - Herstellung von embryogenen Suspensionen von
Gewebe von Dactylis Glomerata L. (Orchardgras)

A. Embryogener Kallus wird aus Basalschnitten der jüngsten Blätter von im Gewächshaus gezogenen Orchardgraspflanzen

(Dactylis glomerata L.) initiiert, wie das von Hanning, G. E. u. a., Theor. Appl. Genet. 63, 155 - 159 (1982), beschrieben wurde. Die Blätter wurden durch Eintauchen in eine 1 : 10-Verdünnung einer Clorox-Lösung (5,25 % Natriumhypochlorit; The Clorox Company, Oakland, Ca.) für die Dauer von etwa 10 min oberflächensterilisiert und dann aseptisch in kleine Segmente von 1 bis 5 mm Länge oder Durchmesser geschnitten. Diese Segmente werden auf steriles SH-30-Medium plattiert, das 0,8 % Agarose als Gelierungsmittel enthält. Innerhalb von 2 bis 6 Wochen nach dem Plattieren bei einer Kultur bei etwa 25° C erscheinen Kallus und/oder embryogene Strukturen. Der embryogene Kallus wird durch Subkultivieren auf frisches SH-30-Medium im Abstand von 2 bis 4 Wochen und Kultivieren im Dunkeln bei 25° C erhalten.

B. Embryogene Suspensionskulturen werden dadurch eingeleitet, daß etwa 0,5 g Frischgewicht an embryogenem Kallus in 50 ml flüssiges Medium gegeben werden, wie es von Gray, D. J. u. a., Plant Cell Tissue Organ Cult. 4, 123 - 133 (1985), beschrieben wurde und das 45 µM Dicamba und 4 g/l Kaseinhydrolysat enthält. Die Suspensionskulturen werden bei 27° C bei einem Photorhythmus von 16 Stunden Licht (40 µE/m²s), 8 Stunden Dunkelheit auf einem Kreiselrüttler bei etwa 130 U/min in 125 ml-Delong-Kolben, die mit einer Metallkappe und Parafilm^R versiegelt sind, gezogen. Nach etwa vier Wochen können sich die großen Klumpen für die Dauer von etwa 30 s absetzen, und es werden 10 ml-Aliquote des oben aufschwimmenden Mediums, das kleine Zelltrauben enthält, entnommen und auf 50 ml frisches Medium übertragen. Dieses Verfahren wird alle drei bis vier Wochen wiederholt, wobei die erfolgreichsten Kulturen verwendet werden, die anhand der kleineren Klumpengröße und der besseren Qualität auf der

Grundlage des Vorhandenseins kleiner, zytoplasmischer Zellen beurteilt werden. Nach 5 bis 8 Übertragungen sind die Suspensionen im wesentlichen von nichtembryogenen Zellen frei und die Mehrzahl der embryogenen Zelltrauben ziemlich klein (150 bis 2000 μm).

Beispiel 49 - Isolierung und Reinigung von Dactylis Glomerata L.-Protoplasten

Protoplaste werden aus den embryogenen Suspensionskulturen des Beispiels 48 hergestellt durch aseptisches Filtern der Zellen auf einer Nalgene^R-Filterereinheit von 0,2 μm und anschließende Zugabe von 0,5 g Frischgewicht an Zellen zu jeweils 12,5 ml des Protoplastenenzymgemischs in einer Petrischale. Das Enzymgemisch besteht aus 2 % Cellulase RS, 7 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,7 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3 mM MES (pH-Wert 5,6), Glukose (550 mOs/kg H_2O mit pH-Wert 5,6) und ist filtersterilisiert. Das Gemisch wird auf einem Orbitalrüttler mit etwa 50 U/min in Dämmerlicht ($< 5 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) für die Dauer von 4 bis 5 Stunden verwirbelt. Dann wird das Verdauungsprodukt durch ein Sieb aus rostfreiem Stahl (Maschengröße 100 μm) gesiebt und in 12 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt, die etwa 5 min lang bei etwa 60 bis 100 g zentrifugiert werden. Das protoplasthaltige Sediment wird dann dreimal mit Protoplastkulturmedium KM-8p gewaschen, das auf 550 mOs/kg H_2O mit Glukose abgestimmt worden war. An dieser Stelle kann zur weiteren Reinigung der Protoplasten ein Flotationsschritt eingefügt werden. In diesem Fall lagern sich die gewaschenen Protoplaste oben auf 10 ml KM-8p-Kulturmedium ab, das mit Sukrose auf 700 mOs/kg H_2O abgestimmt worden war. Nach etwa zehnminütigem Zentrifugieren bei 60 - 100 x g werden die Protoplaste, die an der Grenz-

fläche Bänder bilden, mit einer feinen Pipette aufgefangen. Abschließend werden die Protoplaste wieder in 1 bis 2 ml KM-8p-Kulturmedium zur Suspension gebracht und durch ein rostfreies Stahlsieb (Maschengröße 20 μ m) gesiebt. Die freigesetzten Protoplaste werden aufgefangen und gewaschen und erneut in KM-8p-Medium zur Kultur oder in einem osmotisch abgestimmten Medium, das für die Transformation nach den Beispielen 51 bis 53 geeignet ist, zur Suspension gebracht.

Beispiel 50 - Dactylis Glomerata L.-Protoplastkultur und Wachstum von Kallus

A. Die gereinigten Protoplaste werden mit einer Dichte von etwa 5×10^5 Protoplaste je Milliliter in KM-8p-Kulturmedium plattiert, das 1,3 % SeaPlaque^R-Agarose (FMC Corp., Marine Colloids Division, Rockland, Maine, USA) und 30 bis 40 % konditioniertes Medium enthält (hergestellt aus 3 bis 4 Wochen alten embryogenen Dactylis glomerata L.-Suspensionskulturen durch Filtern des Mediums durch einen sterilen Nalgene^R-Filter von 0,2 μ m, wobei das Medium durch den Zusatz von Glukose auf 550 mOs/kg H₂O gebracht wird, und erneutes Filtersterilisieren). Die Platten werden dann im Dunkeln bei einer konstanten Temperatur von 28° C aufbewahrt. Nach 10 bis 14 Tagen wird die Agarose in Keile geschnitten und diese in eine "Tröpfchenkultur" gebracht, wie sie von Shillito, R. D. u. a., Plant Cell Reports 2, 244 bis 247 (1983) beschrieben wurde, wozu 20 ml SH-45-Suspensionskulturmedium mit 3 % Sukrose je 3 ml ursprünglicher, in Agarose eingebetteter Kultur verwendet werden. Die Platten werden auf einem Rüttler bei etwa 50 U/min in Licht von 8 μ E/m²s gerührt. Neue Suspensionskulturen bilden sich, wenn die Kolonien aus der Agarose herauswachsen und Zellen

in das flüssige Medium freigesetzt werden. Die resultierenden suspensionskultivierten Zellen werden auf agar-verfestigtes SH-30-Medium plattiert und bei 25° C im Dunkeln aufbewahrt, bis sich Kallus bildet.

B. Protoplaste werden wie im Beispiel 50 A gezogen, wobei aber das Kulturmedium kein konditioniertes Medium enthält.

Beispiel 51 - Transformation von Dactylis Glomerata L.-Protoplasten durch Elektroporieren

A. Sofort nach dem Reinigen der Protoplaste wird die Elektroporierung nach Shillito, R. D. u. a., Bio/Technology 3, 1099 - 1103 (1985), unter Verwendung des linearisierten Plasmids durchgeführt, wie das im Beispiel 20 beschrieben wurde. Nach dem letzten Waschen werden die Protoplaste mit einer Dichte von etwa 7×10^6 Protoplaste je Milliliter im Elektroporierungspuffer (0,4 M Mannitol, 6 mM $MgCl_2$) wieder zur Suspension gebracht. Die Protoplaste werden in Aliquoten von 0,7 ml in 10 ml-Plastezentrifugenröhrchen gegeben. Plasmid-DNA aus Beispiel 20 und schallbehandelte Kälberthymus-DNA (Sigma) werden den Röhrchen zugesetzt, um eine Endkonzentration von 10 µg/ml bzw. 50 µg/ml zu erreichen. Dann werden 0,38 ml Polyethylenglykollösung (PEG-Lösung) (24 % PEG, Molekulargewicht 6000, in 0,4 M Mannitol, 30 mM $MgCl_2$, 0,1 % MES, pH-Wert 5,6) zugesetzt, und die Lösung wird vorsichtig gemischt. Die Protoplastsuspension wird in die Kammer eines Dialog^R-Elektroporiergeräts gegeben, und in Intervallen von 30 s werden 10 Impulse mit einer Anfangsspannung von 3250 V/cm und einer exponentiellen Abfallkonstante von 10 µs angelegt. Die Probe wird der Kammer entnommen und in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser gegeben.

Es werden 10 ml KM-8p-Medium zugesetzt, das 1,2 % SeaPlaque^R-Agarose enthält, die Protoplaste werden gleichmäßig im Medium verteilt, und man läßt die Agarose gelieren.

B. Beispiel 51 A wird mit der Ausnahme wiederholt, daß die angelegte Anfangsspannung 3500 V/cm, 4000 V/cm, 5000 V/cm, 3000 V/cm oder 2500 V/cm beträgt.

C. Die Beispiele 51 A und B werden mit der Ausnahme wiederholt, daß PEG mit einem Molekulargewicht von 4000 bzw. von 8000 verwendet wird.

D. Die Beispiele 51 A bis C werden mit der Ausnahme wiederholt, daß die PEG-Endkonzentration zwischen 10 % und 30 % liegt.

Beispiel 52 - Transformation von Dactylis Glomerata L.-Protoplasten durch Behandlung mit Polyethylenglykol (PEG)

A. Der PEG-vermittelte direkte Gen-Transfert wird nach McGrath u. a., siehe oben, durchgeführt. Als DNA wird der im Beispiel 20 beschriebene linearisierte Plasmid verwendet.

Die Protoplaste werden nach dem letzten Waschen mit einer Dichte von etwa 2×10^6 je Milliliter in 0,5 M Mannitol, das 15 mM MgCl₂ enthält, zur Suspension gebracht. Die Protoplastsuspension wird in Form von 1 ml-Aliquoten in 10 ml-Plastezentrifugallröhrchen verteilt. Die DNA wird wie oben im Beispiel 51 zugesetzt, anschließend wird die PEG-Lösung in einer Menge von 0,5 ml (40 % PEG, Molekulargewicht 4000, in 0,4 M Mannitol, 0,1 M Ca(NO₃)₂, pH-Wert 7,0) zugesetzt.

Die Lösungen werden vorsichtig gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur (etwa 24° C) unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Dann werden 1,4 ml der Waschlösung zugesetzt, und der Inhalt des Rohres wird vorsichtig gemischt. Die Waschlösung besteht aus 87 mM Mannitol, 115 mM CaCl₂, 27 mM MgCl₂, 39 mM KCl, 7 mM Tris-HCl und 1,7 g/l Myoinositol, pH-Wert 9,0. In Intervallen von 4 Minuten werden weitere vier Aliquote zu 1,4 ml der Waschlösung zugesetzt, wobei nach jeder Zugabe gemischt wird. Dann wird das Rohr bei etwa 60 x g zehn Minuten zentrifugiert, und die obenaufschwimmende Schicht wird weggeworfen. Die sedimentierten Protoplaste werden in 1 ml KM-8p-Medium gegeben und in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser gebracht. Es werden 10 ml von KM-8p-Medium, das 1,2 % SeaPlaque^R-Agarose enthält, zugesetzt. Die Protoplaste werden gleichmäßig im Medium verteilt, und man läßt die Agarose gelieren.

B. Beispiel 52 A wird mit einer oder mehreren der folgenden Modifikationen wiederholt:

- (1) Der pH-Wert der Waschlösung wird auf 5,6 oder 7,0 abgestimmt.
- (2) Verwendet wird PEG mit einem Molekulargewicht von 6000, 2000 oder 8000.
- (3) Das Waschmedium besteht aus 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glukose, pH-Wert mit KOH auf 6,0 abgestimmt, aus 0,2 M CaCl₂, 0,1 % MES, pH-Wert mit KOH auf 6,0 abgestimmt, oder aus 0,2 M CaCl₂, 7 mM Tris/HCl, pH-Wert mit KOH auf 9,0 abgestimmt.

Beispiel 53 - Transformation von Dactylis Glomerata L.-Protoplasten durch Elektroporieren oder PEG-Behandlung

Die Transformation wird wie im Beispiel 51 oder 52 ausgeführt, wobei aber die Protoplasten vor der Verteilung der Aliquote in Röhrchen zur Transformation oder nach der Verteilung der Aliquote und vor dem Zusatz von PEG etwa fünf Minuten lang bei 45° C behandelt werden.

Beispiel 54 - Selektion von transformierten Kolonien

A. Die Kulturplatten (Petrischalen) mit den Protoplasten aus den Beispielen 51 bis 53 werden 10 Tage lang im Dunkeln bei etwa 25° C inkubiert und dann in 5 gleiche Scheiben zur "Tröpfchenkultur" (Shillito, R. D. u. a., Plant Cell Reports 2, 244 - 247 (1983)) geschnitten. Vier der Scheiben werden jeweils in 20 ml SH-45-Kulturmedium mit 4 g/l Kaseinhydrolysat und 20 µg/ml Hygromycin B gegeben. Die fünfte Scheibe wird in 20 ml des gleichen Mediums, aber ohne Zusatz von Hygromycin B, als nichtselektierte Kontrolle gegeben. Nach 4 bis 5 Wochen werden die mutmaßlichen transformierten, protoplastabgeleiteten Zellkolonien, die om Hygromycin B wachsen, aus der Agarose herausgeschnitten und in eine Petrischale von 19 mm Durchmesser mit 2 ml flüssigem SH-45-Medium gegeben, das 20 µg/ml Hygromycin B enthält, und auf einem Orbitalrüttler bei etwa 50 U/min gerührt. Nach weiteren vier bis fünf Wochen werden alle Kolonien, die bis zur Bildung neuer Suspensionen gewachsen sind, in 125 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und auf gleiche Weise wie die Suspensionsgrundkultur gezogen, mit der Ausnahme, daß in das Medium 20 µg/ml Hygromycin B einbezogen werden.

Die neuen Suspensionen werden alle ein bis drei Wochen unter Einsatz von SH-45-Medium subkultiviert, das 4 g/l Kaseinhydrolysat und 20 µg/ml Hygromycin B enthält. Zellen von diesen Suspensionen werden auch auf verfestigtes SH-30-Medium plattiert, das 20 µg/ml Hygromycin B enthält, und bei etwa 25° C im Dunkeln inkubiert. Das aus den plattierten Zellen gewachsene Kallus wird alle zwei Wochen auf frisches Medium plattiert. Die Zellen, die bei Vorhandensein von Hygromycin B wachsen, sind vermutlich Transformanten.

B. Die Selektion erfolgt wie im Beispiel 54 A, mit der Ausnahme, daß die protoplastabgeleiteten Zellkolonien, die in hygromycin-B-haltigem Medium wachsen, auf Agar-Platten des SH-30-Mediums gebracht werden, das 20 µg/ml Hygromycin B enthält, und bei 25° C im Dunkeln inkubiert werden.

Beispiel 55 - Regeneration von transformierten Dactylis
Glomerata L.-Pflanzen

A. Dactylis glomerata L.-Kallus (der wie im Beispiel 54 gewonnen wurde), abgeleitet von Protoplasten, wird auf verfestigtem SH-30-Medium gezogen und alle zwei Wochen subkultiviert. Alle sich bildenden Fruchtkeime werden entfernt und auf Keimungsmedium (SH-0) plattiert und ans Licht (45 bis 55 µE/m²s) gebracht. Die Keimung dieser Fruchtkeime erfolgt in 1 bis 4 Wochen, und die resultierenden Pflänzchen werden auf SH-0-Medium im Licht gegeben, um Wurzelsysteme auszubilden. Im Stadium von sechs bis zwölf Blättern werden sie ins Gewächshaus gebracht und allmählich abgehärtet.

B. Kallus (der wie im Beispiel 54 gewonnen wurde), abgeleitet von Protoplasten, wird auf SH-0-Medium gezogen, das mit

0,24 % Gelrite^R verfestigt wurde, die Lichtmenge beträgt 45 bis 55 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, und alle zwei Wochen subkultiviert. Die resultierenden Pflänzchen werden auf einem 1 : 1-Gemisch von SH-O- und OMS-Medium, verfestigt mit einer Kombination von 0,12 % Gelrite^R und 0,4 % Agar, in Licht gezogen, um Wurzelsysteme zu entwickeln. Im Stadium von sechs bis zwölf Blättern werden sie ins Gewächshaus gebracht und allmählich abgehärtet.

C. Man erhält kleine Pflänzchen, wie das oben in 44 A und 44 B beschrieben wurde, und diese werden auf OMS-Medium, das mit 0,8 % Agar verfestigt wurde, in Licht gegeben, um Wurzelsysteme zu bilden. Im Stadium von sechs bis zwölf Blättern werden sie ins Gewächshaus gebracht und allmählich abgehärtet.

D. Man erhält kleine Pflänzchen, wie das oben in 44 A beschrieben wurde, und diese werden auf eine 1 : 1-Mischung von SH-O- und OMS-Medium, die mit einer Kombination von 0,12 % Gelrite^R und 0,4 % Agar verfestigt wurde, in Licht gegeben, um Wurzelsysteme zu bilden. Im Stadium von sechs bis zwölf Blättern werden sie ins Gewächshaus gebracht und allmählich abgehärtet.

6. Transiente Gen-Expression

In den folgenden Beispielen wird beschrieben, wie die schimmarischen Gene eingeführt und genutzt werden können, ohne daß das Gen notwendigerweise stabil in den Genom der Pflanze einbezogen wird.

Beispiel 56 - Einführung von DNA in Protoplasten von N. tabacum durch Behandlung mit PEG

A. Die Herstellung von Protoplasten von N. tabacum kann nach den Methoden erfolgen, die in den nachstehenden Publikationen genannt werden: Paszkowski, J. u. a., EMBO J. 3, 2717 (1984); GB-PS 2 159 173; Europäische Patentanmeldung EP 0 129 668; Shillito, R. D. und Potrykus, I. in "Methods in Enzymology" (Methoden in der Enzymologie), Hsg. Wu, R. und Grossman, L., Academic Press, Orlando, Florida, Bd. 153, 313 bis 306 (1987), oder nach anderen, in Fachkreisen bekannten Methoden. Die genannten Publikationen werden als Verweis einbezogen.

B. DNA wird in Protoplasten durch eine Modifikation der Methode von Negrutiu, I. u. a., Plant Mol. Biol. 8, 363 (1987), eingeführt. Die Protoplaste, die nach Beispiel 56 A hergestellt wurden, werden nach dem letzten Waschvorgang in einer Lösung wieder zur Suspension gebracht, die aus 0,4 M Mannitol, 15 - 30 mM CaCl_2 , 0,1 % MES besteht, die Dichte beträgt $1,6 - 2 \times 10^6$ je Milliliter. Die Protoplastsuspension wird in Form von 0,5 ml-Aliquoten auf 10 ml-Plastezentrifugenröhrchen verteilt. Die DNA aus den Beispielen 19 bis 31 wird in 10 μl sterilem, destillierten Wasser zugesetzt, nach Paszkowski, J. u. a., EMBO J. 3, 2727 (1984) sterilisiert, und anschließend werden 0,5 ml der PEG-Lösung (40 % PEG, Molekulargewicht 8000 in 0,4 M Mannitol, 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pH-Wert 7,0) zugesetzt. Die Lösungen werden vorsichtig gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur (etwa 24°C) inkubiert, dabei wird gelegentlich geschüttelt. Dann werden 1 ml der Waschlösung zugesetzt und der Inhalt des Rohres sanft gemischt. Die Waschlösung besteht aus 154 mM NaCl, 125 mM

CaCl_2 , 5 mM KCl, 5 mM Glukose, pH-Wert mit KOH auf 6,0 abgestimmt. Nacheinander werden in Intervallen von 5 Minuten weitere Aliquote von 2 ml, 3 ml und 4 ml der Waschlösung zugesetzt und nach jedem Zusatz gemischt. Dann wird das Rohr bei etwa 10 - 100 x g etwa 10 min zentrifugiert, und die obenaufschwimmende Schicht wird weggegossen. Die pelletierten Protoplaste werden in eine ausreichende Menge K3-Kulturmedium mit 0,3 M Glukose als Osmotikum und ohne Sukrose gebracht, um eine abschließende Dichte von 100 000 je Milliliter zu erreichen, und in einer Petrischale von 10 cm kultiviert.

C. Beispiel 56 B wird mit einer oder mehreren der folgenden Modifikationen wiederholt:

- (1) Der pH-Wert der Waschlösung wird auf 5,6 oder 7,0 abgestimmt.
- (2) Verwendet wird eine PEG mit einem Molekulargewicht von 4000.
- (3) Das Waschmedium besteht aus 0,2 M CaCl_2 , 0,1 % MES, mit KOH auf einen pH-Wert von 6,0 abgestimmt, oder aus 0,2 M CaCl_2 , 7 mM Tris/HCl, mit KOH auf einen pH-Wert von 9,0 abgestimmt.
- (4) Zusammen mit der Plasmid-DNA werden 50 µg gescherte Kälberthymus-DNA in 25 µl sterilem Wasser zugesetzt.
- (5) Die Plasmid-DNA wird vor dem Einsatz durch Behandlung mit einem geeigneten Restriktionsenzym (z. B. BamHI) linearisiert.

Beispiel 57 - Einführung von DNA in Protoplaste von N. tabacum durch Elektroporieren

A. Die Einführung von DNA in Protoplaste von N. tabacum erfolgt durch Behandlung der Protoplasten mit einem elektrischen Impuls bei Vorhandensein der geeigneten DNA in einer Modifikation der Methoden von Fromm, M. E., in: Methods in Enzymology (Methoden in der Enzymologie), Hsg. Wu, R. und Grossman, L., Academic Press, Orlando, Florida, Bd. 153, 307 (1987); und Shillito, R. D. und Potrykus, L., ebenda, S. 283 - 306.

Die Protoplaste werden wie im Beispiel 56 A isoliert. Nach dem letzten Waschen werden die Protoplaste in folgender Lösung erneut zur Suspension gebracht: 0,2 M Mannitol, 0,1 % MES, 72 mM NaCl, 70 mM CaCl₂, 2,5 mM KCl, 2,5 mM Glukose, mit KOH auf einen pH-Wert von 5,8 abgestimmt, bei einer Dichte von $1,6 - 2 \times 10^6$ je Milliliter. Die Protoplastsuspension wird in Aliquoten von 1 ml in Wegwerfküvetten aus Plaste gegeben, und es werden 10 µg DNA zugesetzt, wie das in den Beispielen 56 B und C beschrieben wird. Der Widerstand der Lösung beträgt zu diesem Punkt bei der Messung zwischen den Elektroden des 471-Elektrodensatzes des Elektroporationsgerätes, das unten beschrieben wird, etwa 6 Ohm.

Die DNA der Beispiele 19 bis 31 wird in 10 µl sterilem, destillierten Wasser zugesetzt und sterilisiert, wie das von Paszkowski, J. u. a., EMBO J. 3,2717 (1984) beschrieben wurde. Die Lösung wird vorsichtig gemischt und dann bei Zimmertemperatur (24° - 28° C) einem Impuls von 400 V/cm bei einer exponentiellen Abfallkonstante von 10 ms von einem BTX-Transfector 300-Elektroporationsgerät unter Einsatz des 471-Elektrodensatzes ausgesetzt. Man läßt die Protoplaste

5 min ungestört, dann werden sie in eine Petrischale gegeben und K3-Medium wie im Beispiel 56 A zugesetzt, um die Dichte der Protoplaste auf 100 000 je Milliliter zu bringen.

B. Beispiel 57 A wird mit einer oder mehreren der folgenden Modifikationen wiederholt:

- (1) Die verwendete Spannung beträgt 200 V/cm oder liegt zwischen 100 V/cm und 800 V/cm.
- (2) Die exponentielle Abfallkonstante beträgt 5 ms, 15 ms oder 20 ms.
- (3) Zusammen mit der Plasmid-DNA werden 50 µg gescherte Kälberthymus-DNA in 25 µl sterilem Wasser zugesetzt.
- (4) Die Plasmid-DNA wird vor dem Einsatz durch Behandlung mit einem geeigneten Restriktionsenzym (z. B. BamHI) linearisiert.

Beispiel 58 - Einführung von DNA in Protoplaste von Zea
Mays-Stamm 2717

Protoplaste der Mais-Zuchtlinie Funk 2717 werden wie oben in den Beispielen 40 bis 47 hergestellt und in einer der Lösungen zur Suspension gebracht, die oben für das erneute Suspergieren der N. tabacum-Protoplaste in den Beispielen 56 und 57 beschrieben wurden, die Dichte beträgt 10^7 je Milliliter. Die Transformation erfolgt im wesentlichen wie in den Beispielen 56 und 57. Die Protoplaste werden nach der Transformation bei einer Dichte von 2×10^6 je ml in KM-8p-Medium ohne den Zusatz eines Verfestigungsmittels, aber mit 1 mg/l 2,4-D kultiviert.

Beispiel 59 - Einführung von DNA in Protoplasten von Sorghum Bicolor

Protoplaste der Sorghumsuspension FS 562 werden im wesentlichen so hergestellt, wie das oben im Beispiel 40 für Zea mays beschrieben wurde, und in einer der Lösungen erneut zur Suspension gebracht, die für die Resuspension von N. tabacum-Protoplasten in den Beispielen 56 und 57 beschrieben wurden, dabei beträgt die Dichte 10^7 je ml. Die Transformation erfolgt im wesentlichen wie im Beispiel 58. Nach der Transformation werden die Protoplaste mit einer Dichte von 2×10^6 je ml in KM-8p-Medium ohne den Zusatz eines Verfestigungsmittels kultiviert.

Beispiel 60 - Einführung von DNA in Protoplasten von Nicotiana Plumbaginifolia, Petunia Hybrida und Lolium Multiflorum

Protoplaste von N. plumbaginifolia, P. hybrida oder L. multiflorum werden so hergestellt, wie das von Shillito und Potrykus, siehe oben, beschrieben wurde, und wie in den Beispielen 56 und 57 behandelt. Sie werden in dem von Shillito und Potrykus, siehe oben, beschriebenen Medium ohne den Zusatz von Agarose oder einem anderen Gelierungsmittel gezogen.

Beispiel 61 - Einführung von DNA in Protoplasten von Glycine Max.

Protoplaste von Glycine max werden nach den Methoden hergestellt, die von Tricoli, D. M. u. a., Plant Cell Reports, 5, 334 - 337 (1986), oder von Chowchury, V. K. und Widholm, J. M., Plant Cell Reports, 4, 289 - 292 (1985), oder Klein,

A. S. u. a., Planta 152, 105 - 114 (1981) beschrieben wurden. DNA wird in diese Protoplaste im wesentlichen so eingeführt, wie das in den Beispielen 56 und 57 beschrieben wurde. Die Protoplaste werden gezüchtet, wie das von Klein, A. S. u. a., siehe oben, Chowhury, V. K. und Widholm, J. M., siehe oben, oder Tricoli, D. M. u. a., siehe oben, beschrieben wurde, wobei kein Alginat zum Verfestigen des Mediums zugesetzt wurde.

7. Chemische Regulierung von transgenem Pflanzengewebe

In den folgenden Beispielen werden Verfahren für die chemische Regulierung von chemisch regulierbaren Genen in repräsentativen transgenen Pflanzengeweben beschrieben. Die folgenden Beispiele sind zwar auf die Induzierung gerichtet, ähnliche Verfahren wären aber auch bei durch Repression wirksamen Systemen anwendbar.

Für die Behandlung von transgenen Zellen mit einem chemischen Regler steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Beispielsweise können Zellen in einem flüssigen Medium suspendiert werden, das den Regler enthält. Kallus kann auf Medium gezogen oder transferiert werden, das den Regler enthält, oder der Regler kann mit einer sterilen Farbbürste oder einer anderen geeigneten Vorrichtung auf den Kallus aufgebracht werden. Ebenso werden Pflanzen oder Pflanzenteile mit einer Lösung oder Suspension des Reglers mit einer Farbbürste oder einem geeigneten Element behandelt.

Die Expression des phänotypischen Merkmals in transgenen Pflanzen, die ein chemisch regulierbares schimärisches Gen enthalten, ist der Menge des Reglers proportional, die auf die Pflanze oder das Pflanzengewebe aufgebracht wird.

Beispiel 62 - Chemische Induzierung in transgenen Kalluskulturen

A. Kallus, der nach den oben beschriebenen Verfahren gewonnen wurde, wird durch Aufbringung einer filtersterilisierten Lösung von 0,1 bis 50 mM Salizylsäure, die durch den Zusatz von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 gebracht worden war, mit einer sterilen Pflanzenbürste oder Farbbürste auf chemische Induzierung überprüft.

Nach der Induzierung läßt man den Kallus zwei Tage inkubieren, anschließend wird er geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt, bis er zur Gen-Induzierungsuntersuchung verwendet wird, wie das im Beispiel 65 und/oder 66 beschrieben wird.

B. Als Alternative werden für die Induzierung folgende Lösungen verwendet:

(1) 0,1 bis 50 mM Benzoesäure, die durch den Zusatz von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 gebracht wurde.

(2) 0,1 bis 50 mM Polyakrylsäure, die durch den Zusatz von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 gebracht wurde.

(3) Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat. Die Lösung wird durch Resuspension eines benetzbaren Pulvers, welches die Chemikalie enthält, über mehrere Minuten in sterilem Wasser bei einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Durch Filtersterilisieren werden unlösliche Feststoffe aus der Lösung entfernt.

(4) 0,1 bis 50 mM Bezo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, pH-

Wert zwischen 6,0 und 8,0. Die Verbindung wird in einer Minimalmenge Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst, dann bis zur gewünschten Konzentration mit sterilem Wasser verdünnt. Die gewonnene Suspension wird ohne Filtern eingesetzt.

(5) 0,1 bis 50 mM n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, hergestellt wie unter (4).

(6) 0,1 bis 50 mM Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, hergestellt wie unter (4).

(7) 0,1 bis 50 mM Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure-N-secbutylhydrazid, hergestellt wie unter (4).

(8) 0,1 bis 50 mM 2,6-Dichloroisisonikotinsäure, pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0, hergestellt wie unter (4).

(9) 0,1 bis 50 mM Methyl-2,6-dichloroisisonikotinat, hergestellt wie unter (4).

Beispiel 63 - Chemische Induzierung von transgenen Pflanzen

A. Die Genexpression wird in Pflanzen, die nach den oben beschriebenen Verfahren gewonnen wurden, durch Aufbringung eines feinen Sprühnebels einer Lösung von 0,1 bis 50 mM Salizylsäure, die mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 gebracht wurde, auf die Blätter mit einem Pflanzenbestäubungsgerät induziert.

Man läßt die Pflanzen zwei Tage weiterwachsen, dann werden sie geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt, bis sie wie im Beispiel 65 und/oder 66 untersucht und bestimmt werden.

B. Als Alternative werden folgende Fösungen für die Induzierung verwendet:

- (1) 0,1 bis 50 mM Benzoesäure, die durch den Zusatz von NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 bis 8,0 abgestimmt wurde.
- (2) 0,1 bis 50 mM Polyakrylsäure, die durch den Zusatz von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 abgestimmt wurde.
- (3) Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat. Die Lösung wird durch Resuspension eines benetzbaren Pulvers, das die Chemikalie enthält, für mehrere Minuten in sterilem Wasser bei einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Durch Filtersterilisation werden unlösliche Feststoffe aus der Lösung entfernt.
- (4) 0,1 bis 50 mM Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0. Die Verbindung wird in einer Minimalmenge Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und anschließend mit sterilem Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die gewonnene Suspension wird ohne Filtern eingesetzt.
- (5) 0,1 bis 50 mM n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, hergestellt wie unter (4).
- (6) 0,1 bis 50 mM Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, hergestellt wie unter (4).
- (7) 0,1 bis 50 mM Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure-N-secbutylhydrazid, hergestellt wie unter (4).

- (8) 0,1 bis 50 mM 2,6-Dichloroisisonikotinsäure, pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0, hergestellt wie unter (4).
- (9) 0,1 bis 50 mM Methyl-2,6-dichloroisisonikotinat, hergestellt wie unter (4).

Beispiel 64 - Induzierung der Expression der in Protoplaste von N. Tabacum, Zea Mays, N. Plumbaginifolia, P. Hybrida, L. Multiflorum und Sorghum Bicolor eingeführten DNA

Die Protoplaste, die nach den Beispielen 56 bis 61 behandelt wurden, werden bei 26° C im Dunkeln 2 Tage lang kultiviert. Danach wird Salizylsäure bis zu einer Konzentration zwischen 0,1 und 50 mM als neutralisierte Lösung, pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0, zugesetzt. Die Protoplaste werden weitere 2 Tage kultiviert, durch Zentrifugieren geerntet, schnell gefrostet und wie in den folgenden Beispielen beschrieben untersucht.

B. Als Alternative dazu werden den Protoplasten folgende neutralisierte Lösungen oder Suspensionen zugesetzt, um eine Endkonzentration zwischen 0,1 und 50 mM zu erreichen:

- (1) Benzoesäure
- (2) Polyakrylsäure
- (3) Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat
- (4) Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat
- (5) n-Propyl-benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat
- (6) Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat
- (7) Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure-N-secbutylhydrazid
- (8) 2,6-Dichloroisisonikotinsäure
- (9) Methyl-2,6-dichloroisisonikotinat

C. Als Alternative wird die Induzierung so ausgeführt, wie das in den Beispielen 64 A und B beschrieben wurde, mit der Ausnahme, daß die Protoplaste einen Tag, drei oder fünf Tage vor der Induzierung gezogen werden.

D. Die Induzierung wird wie in den Beispielen 64 A, B oder C ausgeführt, mit der Ausnahme, daß die Protoplaste einen Tag, drei oder fünf Tage nach der Induzierung und vor dem Ernten kultiviert werden.

Beispiel 65 - Untersuchung auf eine chemisch induzierbare
DNA-Folge: mRNA-Produktion

Pflanzenmaterial, das wie in den Beispielen 62 bis 64 induziert und geerntet wurde, wird auf Induzierung der mRNA-Spezies durch Isolierung der RNA und Starterextensionsuntersuchung, wie das im Beispiel 5 beschrieben wurde, untersucht.

Kallus oder regeneriertes Pflanzenmaterial, das von transgenen Pflanzen abgeleitet wurde, die chemisch regulierbare schimärische Gene mit der Codierung für GUS, AHAS oder BT enthalten und durch Salizylsäure, Methylbenzo-1,2,3-benzothiadiazol-7-karboxylat, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure, n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbonsäure-N-secbutylhydrazid, 2,6-Dichloroisoinikotinsäure, Methyl-2,6-Dichloroisoinikotinat oder TMV induziert wurden, weisen einen erhöhten Pegel an mRNA bei der Untersuchung mit dem GUS-, AHAS- oder BT-Starter auf, wenn die Starterextensionsuntersuchung durchgeführt wird. Der Pegel an mRNA ist der Menge des zugeführten Reglers proportional.

Beispiel 66 - Untersuchung auf chemisch induzierbare DNA-
Folgen: β -Glukuronidaseenzymatische Aktivität

A. ELISA-Test

Gefrorenes Blattgewebe wird in einem Mörser mit dem Pistill bei Vorhandensein von flüssigem Stickstoff zerstoßen, um ein feines Pulver herzustellen. Es werden Blattextrakte durch Mischen eines gegebenen Gewichts (g) mit einem gleichen Volumen (ml) eines GUS-Extraktionspuffers (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7,0, 0,1 % Triton-X 100, 0,1 % Sarkosyl, 10 mM β -Merkaptoethanol) hergestellt, wobei die von Jefferson, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci USA 83, 8447 bis 8451 (1986), beschriebene Methode angewendet wird.

Diese Reaktionen werden in den Vertiefungen von ELISA-Platten durch Mischen von 5 bis 25 μ l Extrakt mit 120 bis 100 μ l GUS-Analysepuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7,0, 0,1 % Triton X-100, 10 mM β -Merkaptoethanol), der 4-Methylumbelliferylglukuronid (MU) bei einer Endkonzentration von 2 mM in einem Gesamtvolumen von 125 μ l enthält, ausgeführt. Die Platte wird bei 37° C 1 bis 5 Stunden inkubiert, und die Reaktion wird durch den Zusatz von 150 μ l 3 M Na_2CO_3 gestoppt. Die Konzentration des freigesetzten fluoreszierenden Indikators wird durch Ablesen der Platte auf einem ELISA-Platten-Lesegerät Flow Labs Fluoroskan II bestimmt.

B. Ergebnisse

Tabelle II - Spezifische Aktivität, nKat MU/mg Protein

Pfl. ^a	A	B	C	D	E ^b
H 1	5,39 $\pm$ 1,9	13,9 $\pm$ 1,2	13,5 $\pm$ 0,8	20,1 $\pm$ 5,1	33,6 $\pm$ 2,6
H 3	0,21 $\pm$ 0,02	6,92 $\pm$ 0,88	11,95 $\pm$ 0,85	1,66 $\pm$ 0,02	6,54 $\pm$ 1,43
H 4	8,39 $\pm$ 0,04	27,5 $\pm$ 0,7	18,52 $\pm$ 1,07	2,28 $\pm$ 0,78	25,1 $\pm$ 0,9
H 6	0,10 $\pm$ 0,04	4,08 $\pm$ 0,58	2,58 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,06	2,8 $\pm$ 1,2
H 9	0,23	10,8	9,1	0,5	7,5
Alu 1	5,6	20,0	206,9	20,5	70,5
Alu 2	2,0	6,6	83,2	8,9	155,3
Alu 3	0,1 $\pm$ 0,07	2,8 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 3,8
Alu 4	2,1 $\pm$ 1	43,0 $\pm$ 19	7,1 $\pm$ 2,6	6,1 $\pm$ 3,2	7,5 $\pm$ 3,5
Alu 5	0,6 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 2,3	1,2 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 3,7
Alu 6	0,8	28,8	67,0	3,1	36,4
Alu 7	1,7	38,7	29,1	21,7	63,0
Alu 8	0,6	0,4	0,4	0,6	0,2
Alu 9	0,9	0,6	0,4	0,3	nd
Alu 10	4,0	39,2	52,0	8,1	37,9
Alu 11	1,6 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 2,6	2,8 $\pm$ 2,9
Alu 12	0,7 $\pm$ 0,4	57,1 $\pm$ 22	73,4	2,3 $\pm$ 1,2	78,0 $\pm$ 41,4
Alu 13	0,1	19,1	13,2	1,9	10,6
Hae 1	0,6	1,6	2,6	1,7	3,9
Hae 2	2,3	8,8	11,8	0,4	0,8
Hae 3	1,7	11,1	11,2	3,0	1,6
Hae 4	2,0	8,1	10,8	1,7	0,82
Hae 5	18,1	59,4	132,5	36,6	14,0
Hae 8	0,4	30,6	28,9	0,6	29,0
Hae 9	2,6	63,9	129,7	12,5	55,2
Hae 10	1,6	70,5	98,2	13,5	94,5
Hae 11	2,6	81,8	58,5	3,9	46,0

Tabelle II, fortgesetzt

Pfl. ^a	A	B	C	D	E ^b
Hae 12	0,2	2,5	5,8	0,6	14,5
Hae 13	0,01	0,7	0,1	nd	nd
Hae 14	0,1	1,8	8,6	0,1	3,3
Hae 15	0,1	6,4	7,2	3,4	7,4
Hae 16	0,1	2,3	4,3	0,8	2,7

Fußnoten

a - H 1 - 9 Tabakpflanzen, die durch Transformation von Blattscheiben durch Stamm CIB271 gewonnen wurden

Alu 1 - 13 Tabakpflanzen, die durch Transformation von Blattscheiben durch Stamm CIB272 gewonnen wurden

Hae 1- 16 Tabakpflanzen, die durch Transformation von Blattscheiben durch Stamm CIB 273 gewonnen wurden

b - A - Wasser

B - Salizylsäure

C - Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat

D - Puffer

E - TMV

Transformierter Tabakkallus (Beispiel 23): Folgende GUS-Aktivitäten erhält man bei Proben von transformiertem Kallus, der 21 Stunden nach der Behandlung geerntet wurde. Transformiert mit CIB271: H₂O-Besprühung: 1,8 nKat MU/mg Protein; Besprühung mit 50 mM Natriumsalizylat: 3,8 nKat MU/mg Protein; transformiert mit CIB271 (anderes Experiment): H₂O-Besprühung: 2,8 nKat MU/mg Protein; Besprühung mit 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat: 13,7 nKat MU/mg Protein. Transformiert mit CIB273: H₂O-Besprühung: 0,46 nKat MU/mg Protein; 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karb-

oxylat zum Besprühen: 31,2 nKat MU/mg Protein.

Transformierte Möhren (Beispiel 36): Die folgenden GUS-Aktivitäten erhält man von Kallusproben, die durch pCIB271 transformiert wurden, wobei der Kallus 21 Stunden nach der Behandlung geerntet wurde. H₂O-Besprühung: 5,2 pKat MU/mg Protein. Besprühung mit 50 mM Natriumsalizylat: 11,6 pKat MU/mg Protein. Besprühung mit 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat: 22,1 pKat MU/mg Protein.

Transformierte Tomaten (Beispiel 38): die folgenden GUS-Aktivitäten erhält man von Proben von transformiertem Kallus, der 21 Stunden nach der Behandlung geerntet wurde. Transformiert mit CIB271: Besprühung mit H₂O: 17,2 pKat MU/mg Protein; Besprühung mit 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat: 56,1 pKat MU/mg Protein. Transformiert mit CIB273 X A4: Besprühung mit H₂O: 4,6 pKat MU/mg Protein; Besprühung mit 250 µg/l Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat: 22,1 pKat MU/mg Protein.

Transiente Expression in Tabakprotoplasten (Beispiel 56), die mit pCIB269 behandelt wurden: H₂O: 30,6 ± 13 pKat MU/mg Protein; Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat: 66,6 ± 20 pKat MU/mg Protein.

Beispiel 67 - Untersuchung auf chemische Induzierung des endogenen Gens

Im Kontrollverfahren werden Tabakpflanzen, die wie in den Beispielen 62 bis 64 mit Salizylsäure, Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylat und TMV induziert wurden, auf die Transkription der mRNA vom endogenen PR-1a-Gen durch die im Beispiel 5 beschriebenen Methoden untersucht. Ein er-

höherer Pegel an mRNA wird nach der Induzierung mit allen drei Induzierungsmitteln festgestellt.

Beispiel 68 - Untersuchung auf chemisch induzierbare DNA-Folgen: Azetohydroxysäuresynthaseenzymaktivität (AHAS-Enzymaktivität)

A. Probenvorbereitung für die AHAS-Untersuchung

Es wird das Gewicht des Blatt- und/oder Wurzelgewebematerials, das untersucht werden soll, bestimmt, das Gewebe wird in flüssigen Stickstoff gegeben und zu einem feinen Pulver zerkleinert. Es wird ein Volumen (in ml) kalter Homogenisierungspuffer (50 mM NaH_2PO_4 -Puffer, pH-Wert 7,0, 0,5 mM EDTA, pH-Wert 7,0, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM Natriumpyruvat, pH-Wert 7,0, 10 μM Flavinadenindinukleotid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 % Glyzerol), das gleich dem Doppelten des Gewichts (in g) des Gewebes ist, zugesetzt, und das Gemisch wird in eine Französische Druckzelle gebracht. Alle nachfolgenden Schritte werden so durchgeführt, daß das Material kalt (etwa 4° C) gehalten wird. Die Zellen werden bei 16 000 psi (etwa 1125 kg/cm^2) aufgebrochen, das Zellexudat wird auf einem Eisbett in einem Behälter aufgenommen. Als Alternative dazu wird das Gewebe mit Homogenisierungspuffer in einem Mörser mit dem Pistill zerrieben, dadurch entfällt die Behandlung in der Französischen Druckzelle. Das Exudat wird bei 10 000 U/min 5 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Das Volumen der obenaufschwimmenden Schicht wird gemessen, und bis zu einer Sättigung von 25 % wird Ammoniumsulfat von Enzymgüte (144 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$ der obenaufschwimmenden Schicht) zugesetzt. Das Gemisch wird 15 min auf Eis gerührt, dann 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert.

Das Pellet wird weggeworfen, und die obenaufschwimmende Schicht wird bis zu 50 % Sättigung mit Ammoniumsulfat (158 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /ml obenaufschwimmende Schicht) abgestimmt. Nach einem fünfzehnminütigen Rühren auf Eis wird das Pellet durch Zentrifugieren aufgefangen, 5 min bei 10 000 U/min. Das so gewonnene Pellet wird in 1 ml Kolonnenpuffer auf jeweils 2 g Blatt- oder 5 g Wurzelmaterial aufgelöst. Der Extrakt wird durch Aufbringung auf eine Sephadex G50-Kolonne entsalzt, die mit Kolonnenpuffer (50 mM NaH_2PO_4 -Puffer, pH-Wert 7,0, 0,1 mM EDA, 0,5 mM MgCl_2 , 10 μM Flavinadenindinukleotid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 % Glyzerol) äquilibriert wird. Die Probe wird mit Kolonnenpuffer eluiert, und es werden 2 ml der Probe für jeweils einen Milliliter der der Kolonne zugeführten Probe aufgefangen.

B. Röhrchenuntersuchung

5 bis 50 μl eines Extrakts, der nach Beispiel 68 A hergestellt wurde, werden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml des Reaktionsgemischs (20 mM NaH_2PO_4 -Puffer, pH-Wert 7,0, 20 mM Natriumpyruvat, pH-Wert 7,0, 0,5 mM Thiaminpyrophosphat, 5 mM MgCl_2 , 10 μM Flavinadenindinukleotid) aufgelöst. Das Gemisch wird bei 37° C 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch den Zusatz von 50 μl von 6N H_2SO_4 gestoppt. Das Gemisch wird bei 60° C 15 min inkubiert, dann mit 625 μl α -Naphtholreagens (500 μl 5 %iges α -Naphthol in 2,5 M NaOH und 125 μl 25 mg/ml Kreatin) behandelt und weitere 15 min bei 60° C inkubiert. Wenn sich ein Niederschlag gebildet hat, wird dieser ausgesponnen und bei 520 m μ die Absorbanz gemessen. Es wird berechnet, wieviel pMol Azetoin gebildet werden, wozu eine Standardkurve verwendet wird, die unter Einsatz von 0,4 μg bis 10 μg Azetoin erstellt wird. Die spezifische Aktivität wird als pKat/mg Protein ausgedrückt.

C. ELISA-Plattenuntersuchung

Ein bis 20 µl einer Probe werden in die Vertiefung einer ELISA-Platte mit einem Gesamtvolumen von 0,15 ml Reaktionsgemisch gegeben. Das Gemisch wird 30 min bei 37° C reagiert. Die Reaktion wird durch den Zusatz von 50 µl 2,4 M H₂SO₄, das Kreatin enthält, gestoppt. Das Gemisch wird 30 min bei 60° C inkubiert. Jeder vorhandene Niederschlag wird durch Zentrifugieren entfernt. Auf eine neue ELISA-Platte werden 150 µl des Untersuchungsgemischs gegeben, mit 100 µl von 10 %igem α-Naphthol in 5 M NaOH behandelt und weitere 20 min bei 60° C inkubiert. Die Absorbanz wird bei 520 mµ gemessen und die spezifische Aktivität wie im Beispiel 68 B ausgedrückt.

Beispiel 69 - Untersuchung auf chemisch induzierbare DNA-Folgen: Bacillus Thuringiensis-Endotoxin

A. Pflanzenextraktionsverfahren

Etwa 100 mg Pflanzengewebe werden in 0,1 ml Extraktionspuffer (50 mM Na₂CO₃, pH-Wert 9,5, 10 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100, 0,05 % Tween, 100 mM NaCl, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (vor der Verwendung zugesetzt) und 1 mM Leupeptin (unmittelbar vor der Verwendung zugesetzt)) homogenisiert. Nach der Extraktion werden 2 M Tris, pH-Wert 7,0, zugesetzt, um den pH-Wert auf 8,0 - 8,5 abzustimmen. Dann wird der Extrakt 10 min in einer Beckman-Mikrofuge zentrifugiert, und die obenaufschwimmende Schicht wird für die ELISA-Analyse verwendet.

B. ELISA

Eine ELISA-Platte wird mit Ethanol vorbehandelt. Affinitäts-

gereinigtes Kaninchen-anti-Bt-Antiserum (50 µl) mit einer Konzentration von 3 µg/ml in boratgepufferter Salzlösung (100 mM Borsäure, 25 mM Natriumborat, 75 mM NaCl, pH-Wert 8,4 - 8,5) wird der Platte zugesetzt, und diese läßt man über Nacht bei 4° C inkubieren. Antiserum wird durch Immunisierung von Kaninchen mit gradientengereinigtem BT-(Bacillus thuringiensis-Endotoxin)-Kristallen (Ang, B. J. und Nickerson, K. W., Appl. Environ. Microbiol. 36, 625 - 626 (1978)), die mit Natriumdodezylsulfat löslich gemacht wurden, hergestellt. Die Platte wird mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 0,05 % Tween 20, 0,02 % Natriumazid) gewaschen, dann eine Stunde bei Zimmertemperatur mit einem Blockierungspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7,4, 140 mM NaCl, 1 % Rinderserumalbumin, 0,02 % Natriumazid) behandelt und erneut gewaschen. Der Pflanzenextrakt wird in einer Menge zugegeben, die 50 µg Protein ergibt (im typischen Fall etwa 5 µl des Extrakts; das Protein wird nach der Methode von Bradford, M., Anal. Biochem. 72, 248 (1976) unter Anwendung eines kommerziell erhältlichen Satzes von Bio-Rad bestimmt), und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dem Waschen werden 50 µl affinitätsgereinigtes Ziegen-Anti-Bt-Antiserum in einer Konzentration von 3 µl/ml Protein in ELISA-Verdünnungsmittel (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7,4, 140 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 1 % Rinderserumalbumin, 0,02 % Natriumazid) zugesetzt, und man läßt eine Stunde bei 37° C inkubieren. Nach dem Waschen werden 50 µl Kaninchen-Antiziegen-Antikörper, gebunden an alkalische Phosphatase (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., USA), in ELISA-Verdünnungsmittel 1 : 500 verdünnt, zugesetzt und eine Stunde läßt man das Ganze bei 37° C inkubieren. Nach dem Waschen werden 50 µl Substrat (0,6 mg/ml p-

Nitrophenylphosphat, 0,05 mg/ml MgCl_2 , 10 % Diethanolamin, mit HCl auf einen pH-Wert von 9,8 abgestimmt) zugesetzt, und man läßt bei Zimmertemperatur 30 min inkubieren. Die Reaktion wird durch den Zusatz von 50 μl 3 M NaOH beendet. Die Absorbanz wird bei 405 nm in einem modifizierten ELISA-Gerät (Hewlett Packard, Stanford, Ca., USA) abgelesen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Regulierung der Transkription eines chemisch regulierbaren Gens in pflanzlichem Material, dadurch gekennzeichnet, dass man

(a) innerhalb eines natürlich vorkommenden Systems eine im wesentlichen reine, nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz, die in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren, wobei besagte Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist, aus einem chemisch regulierbaren Gen, das innerhalb dieses natürlichen Systems vorliegt, isoliert, indem man

- (i) innerhalb dieses natürlichen Systems die Expression von RNA eines chemisch regulierbaren Gens aktiviert;
- (ii) besagte RNA isoliert;
- (iv) ein differentielles "Screening" einer genomischen Genbibliothek durchführt, die sowohl aus RNA erzeugt wurde, welche zuvor aus diesem besagten aktivierten System isoliert wurde als auch aus RNA, welche zuvor aus einem nicht aktivierten Kontrollsystem isoliert wurde;
- (iv) einen genomischen Klon isoliert;
- (v) ausgehend von diesem genomischen Klon das chemisch regulierbare Gen subkloniert; und
- (vi) die gewünschte chemisch regulierbare DNA Sequenz isoliert;

(b) eine chimäre chemisch regulierbare DNA Sequenz herstellt, die aus einer ersten, gemäss Abschnitt (a) isolierten, nicht-kodierenden, chemisch regulierbaren DNA Sequenzkomponente zusammengesetzt ist, die in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren, wobei besagte Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist, sowie aus einer zweiten DNA-Sequenzkomponente, die innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes transkribierbar ist, indem man die erste, nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenzkomponente mit der zweiten Sequenzkomponente verknüpft;

(c) pflanzliche Protoplasten, Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen mit der chimären

DNA-Sequenz gemäss Abschnitt (b) transformiert, unter Verwendung eines Transformationsverfahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Agrobacterium-vermittelter Transformation, direktem Gentransfer, Mikroinjektion oder Mikroprojektil-Beschuss;

(d) transformierte Zellen oder Gewebe selektiert; und

(e) einen chemischen Regulator auf pflanzliche Zellen, Gewebe oder ganze Pflanzen und/oder deren Samen, welche die chimäre DNA-Sequenz gemäss Abschnitt (b) enthalten, appliziert.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Isolierung einer im wesentlichen reinen, nicht-kodierenden, chemisch regulierbaren DNA Sequenz, die natürlicherweise in einer Pflanze vorliegt, die folgenden Verfahrensschritte anwendet:

- (a) Aktivierung der Expression von PolyA+ RNA in der Pflanze von besagtem chemisch regulierbarem Gen;
- (b) Isolierung dieser PolyA+ RNA;
- (c) Konstruktion einer cDNA Bibliothek ausgehend von dieser PolyA+ RNA
- (d) "Differentielles Screening" dieser cDNA Bibliothek mit cDNA, die sich von RNA aus einer nicht aktivierten Kontrollpflanze ableitet;
- (e) Isolierung von chemisch regulierbaren cDNA Klonen;
- (f) Isolierung eines genomischen Klon aus einer genomischen Bibliothek dieser Pflanze unter Verwendung des cDNA Klon aus Schritt (e) als Sonde;
- (g) Subklonierung des chemisch regulierbaren Gens aus diesem genomischen Klon; und
- (h) Isolierung der gewünschten, chemisch regulierbaren DNA-Sequenz.

3. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Regulation von einem induzierenden chemischen Regulator abhängig ist.

4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das chemisch regulierbare Gen, aus welchem eine im wesentlichen reine, nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz isoliert werden kann, die als erste DNA-Sequenzkomponente in einem chimären Gen gemäss Abschnitt (b) fungieren kann, ein

PR-Proteingen ist.

5. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes PR-Proteingen ein Tabak PR-1a-, PR-1b-, PR-1c-, PR-1'-, PR-Q- oder eine PR-R-Gen, ein Chitinasegen aus der Gurke oder aber ein basisches oder saures β -1,3-Glucanasegen aus Tabak ist.

6. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes PR-Proteingen ein Tabak PR-1a-, PR-1b-, PR-1c-, PR-1'- oder eine PR-R-Gen oder ein Chitinasegen aus der Gurke ist.

7. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes PR-Proteingen ein Tabak PR-1a-Gen ist.

8. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes PR-Proteingen ein Tabak PR-1'-Gen ist.

9. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes PR-Proteingen ein ein basisches Tabak- β -1.3-Glucanasegen ist.

10. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sich besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenz in der 5'-flankierenden Region des besagten PR-Proteingens befindet.

11. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sich besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenz in der 5'-flankierenden Region des PR-1a Gens von Tabak befindet und etwa 300 oder mehr Basenpaare aufweist, die sich an die Transkriptionsstartstelle anschliessen.

12. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sich besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA-Sequenz in der 5'-flankierenden Region des PR-1a Gens von Tabak befindet und etwa zwischen 600 und 1000 Basenpaare aufweist, die sich an die Transkriptionsstartstelle anschliessen.

13. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch einen Regulator, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzoe-

säure, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, Polyacrylsäure und substituierten Derivaten davon, reguliert wird.

14. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch eine Regulator, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-1,2,3-thiadiazolcarbonsäure, Benzo-1,2,3-thiadiazolthiocarbonsäure, Cyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, Benzo-1,2,3-thiadiazolcarbonsäureamid, Benzo-1,2,3-thiadiazolcarbonsäurehydrazid und Derivate davon, reguliert wird.

15. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch eine Regulator, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-carbonsäure, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-thiocarbonsäure, 7-Cyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-carbonsäureamid, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-carbonsäurehydrazid und Derivate davon, reguliert wird.

16. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch eine Regulator, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-1,2,3-thiadiazolcarbonsäure, Alkylbenzo-1,2,3-thiadiazolcarboxylat, worin die Alkylgruppe ein bis sechs Kohlenstoffatome enthält, und den substituierten Derivaten dieser Verbindungen, reguliert wird.

17. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch einen Regulator, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-carbonsäure, Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-carboxylat, n-Propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-carboxylat, Benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-carboxylat, Benzo-1,2,3-thiadiazol-7-carbonsäure-sec.butylhydrazid, 2,6-Dichlorisonicotinsäure und Methyl-2,6-dichlorisonicotinat reguliert wird.

18. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-carboxylat reguliert wird.

19. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription durch Dichloroisotonicotinsäure oder Derivate davon reguliert wird.

20. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) aus

einer ersten DNA-Sequenzkomponente besteht, welche die nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz eines natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gens ist oder aber wesentliche Sequenzhomologien zu dieser aufweist, wobei besagte erste DNA-Sequenzkomponente in der Lage ist, die Transkription einer assoziierten DNA Sequenz innerhalb einer Pflanze oder eines pflanzlichen Gewebes zu regulieren und diese Regulation von der Gegenwart eines chemischen Regulators abhängig ist, sowie einer zweiten DNA-Sequenzkomponente, die einen Teil einer transkribierbaren, aber keine vollständige DNA-Sequenz darstellt, mit der die erste DNA-Sequenzkomponente in dem natürlich vorkommenden, chemisch regulierbaren Gen assoziiert ist oder aber zumindest wesentliche Sequenzhomologien zu dieser Sequenz aufweist.

21. Verfahren gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das natürlich vorkommende, chemisch-regulierbare Gen in einer Pflanze vorkommt und besagte zweite DNA-Sequenzkomponente eine kodierende Sequenz ist.

22. Verfahren gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Gen ein PR-Proteingen ist.

23. Verfahren gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass besagte kodierende Sequenz ein Signalpeptid kodiert.

24. Verfahren gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass besagte kodierende Sequenz ein Signalpeptid kodiert, welches die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuProSerPheLeuLeuVal-

SerThrLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAla

oder aber ein Peptid, das eine wesentliche Sequenzhomologie zu diesem Signalpeptid aufweist.

25. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 1" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

26. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 2" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die

dieser im wesentlichen homolog ist.

27. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 3" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

28. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 4" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

29. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 5" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

30. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 6" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

31. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 7" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

32. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nicht-kodierende, chemisch regulierbare DNA Sequenz gemäss Abschnitt (a) die in "Sequenz 8" wiedergegebene DNA-Sequenz aufweist oder aber eine DNA-Sequenz, die dieser im wesentlichen homolog ist.

33. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite DNA Sequenzkomponente innerhalb der gemäss Abschnitt (b) hergestellten chimären, chemisch regulierbare DNA Sequenz in der Lage ist, die Expression eines phänotypischen Merkmals über einen "anti-sense"- Mechanismus zu regulieren.

34. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite DNA Sequenzkomponente innerhalb der gemäss Abschnitt (b) hergestellten chimären, chemisch regulierbare DNA Sequenz eine kodierende Sequenz ist, welche transkribiert und translatiert werden kann und in der Folge zur Herstellung eines Polypeptides führt, das in einem phänotypischen Merkmal resultiert.

35. Verfahren gemäss Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite DNA-Sequenzkomponente an die erste DNA-Sequenzkomponente angrenzt.

36. Verfahren gemäss Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die erste DNA-Sequenzkomponente durch einen reprimierenden chemischen Regulator reguliert wird.

37. Verfahren gemäss Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die erste DNA-Sequenzkomponente durch einen induzierenden chemischen Regulator reguliert wird.

38. Verfahren gemäss Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem phänotypischen Merkmal um ein Merkmal, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Toleranz oder Resistenz gegenüber einem Herbizid, einem Pilz, einem Virus, einem Bakterium, einem Insekt, einem Nematoden oder einem Arachniden; Herstellung von Sekundärmetaboliten; männliche oder weibliche Sterilität; sowie Herstellung eines Enzyms oder einer anderen Reporterverbindung, handelt.

39. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem phänotypischen Merkmal um Toleranz oder Resistenz gegenüber einem Herbizid oder Resistenz gegenüber Insekten handelt.

40. Verfahren gemäss Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Toleranz oder Resistenz gegenüber Herbiziden durch eine DNA-Sequenz verursacht wird, die für die Wildtyp-Form oder die Herbizid-resistente Form der Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) kodiert.

41. Verfahren gemäss Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die Resistenz gegenüber Insekten durch eine DNA-Sequenz verursacht wird, die für das Bacillus thuringiensis Endotoxin (Bt) kodiert.

42. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes phänotypisches Merkmal eine Reporter Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Luziferase (LUX), Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Neomycinphosphotransferase (NPT), Nopalinsynthase (NOS), Oktopinsynthase (OCS), β -1,3-Glucuronidase (GUS), Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) und Bacillus thuringiensis Endotoxin (Bt).

43. Verfahren gemäss Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes phänotypisches Merkmal eine Reporter Verbindung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus β -1,3-Glucuronidase (GUS), Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) und Bacillus thuringiensis Endotoxin (Bt).

Hierzu 53 Seiten Zeichnungen

```

10          30          50          70          90          110
CTCGAGGATTTCAAACCTTAGCTTCACTAAACCTTGAGCTTTCTTTTCCACTAATGTCGAAAAACGAAATAAACATAAGCTATTTACAAAAATAAAAAATACTCCATTGAACTAAA

130          150          170          190          210          230
GTCAAGTCGTGATTTGGGATAAGAAAAAGAAATTTATTTATACTCCAGATCAAGCCGTGATTGGAATGAGATAATAGAAAAGTAGTAGTACATGAGTAACATCAAGTTGGAAATTAAG

250          270          290          310          330          350
GGAAGGAAATTAGAGAAAGAACTGAAGAATATCCAAATATTCTTTACGTCCAAATTTGATAGTTATTTAACGTCATCGAGATGACGGCCATGTTCAAGTTTCCACAAATATTGAGAAAA

370          390          410          430          450          470
GAAAGAAGAAGACACAACTGTGTTGGTATTATTATAGTTTTTTCTTTAGAGAATTGATTGTACATATAAGAAATATAATATAAGATTTAGAAATAAGATTATTAGAAAAATCAAACA

490          510          530          550          570          590
TCAAAGTATTATTTTAAATTTCTTTTCCAATGGACATTCCTTCGAAAAAAGAGATATAAATATGGAAGTAAAAATTAATCAGATCGTTAAATGTAGAAAAATATTAAATTAACACA

610          630          650          670          690          710
TTAACCATTAACCACTACTTTATTAAACAAAAAGCACATCTGATAGATCAAAAAAGTGTTAACTTCATGCATTGACAAATTTAAATTTATTTTGCAACATCGGGTAAAACTATTTTACA

730          750          770          790          810          830
ACAAATGGTAACGCATATATAAGTTTAAATATGGTAACCTAGAAAAATAGGATAAATTATCTATAACAGGATATATTACATTGATATTACCATGTCAAAAAATTTAGTAAGTACATGAATA

850          870          890          910          930          950
ATCACCGTGAATCTTCAAGATTTCTCCTATAAATACCCCTGGTAGTAAATCTAGTTTTCCATTCAAGATACAACATTTCTCCTATAGTCATGGGATTGTTCTCTTTTCACAATTGCC
MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuPr

970          990          1010          1030          1050          1070
TTCATTTCTCTGTCTCTACCTCTCTTATTCTAGTAATATCCCACTCTTGCCGTGCCAAAAATTCCTCAACAAGACTATTGGATGCCATAACACAGCTCGTGCGATGATAGGTGT
oSerPheLeuLeuValSerThrLeuLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAlaGlnAsnSerGlnGlnAspTyrLeuAspAlaHisAsnThrAlaArgAlaAspValGlyVa

1090          1110          1130          1150          1170          1190
AGAACCTTTGACCTGGGACGACAGCTAGCAGCCTATGCGCAAAATTATGCTTCCCAATTGGCTGCAGATGTAACTCTGACATTCTCATGGTCAATACGGCGAAAACTAGCTGAGGG
lGluProLeuThrTrpAspAspGlnValAlaAlaTyrAlaGlnAsnTyrAlaSerGlnLeuAlaAlaAspCysAsnLeuValHisSerHisGlyGlnTyrGlyGluAsnLeuAlaGluGl

1210          1230          1250          1270          1290          1310
AAGTGGCGATTTCTGACGCTGCTAAGGCTGTTGAGATGTGGTTCGATGAGAAACAGTATTATGACCATGACTCAAACTCTGTGCACAAGGACAGGTGTGTGACACTATACTCAGGT
ySerGlyAspPheMetThrAlaAlaLysAlaValGluMetTrpValAspGluLysGlnTyrTyrAspHisAspSerAsnThrCysAlaGlnGlyGlnValCysGlyHisTyrThrGlnVa

1330          1350          1370          1390          1410          1430
GGTTTGGCGTAACTCGGTTCTGTTGGATGTGCTAGGGTTTCAAGTGAACAATGGAGGATATGTTGTCTCTTGCAACTATGATCCTCCAGGTAATTATAGAGGCGAAAGTCCATACTAATT
lValTrpArgAsnSerValArgValGlyCysAlaArgValGlnCysAsnAsnGlyGlyTyrValValSerCysAsnTyrAspProProGlyAsnTyrArgGlyGluSerProTyrEnd

1450          1470          1490          1510          1530          1550
GAAACGACCTACGTCATTTACGTTAATATGTATGGATTGTTCTGCTTGATATCAAGAACTTAAATAATTGCTCTAAAAAGCAACTTAAAGTCAAGTATATAGTAATAGTACTATATT

1570          1590          1610          1630          1650          1670          207
GTAATCTCTGAAGTGGATCTATAAAAGACCAAGTGGTCATAATTAAAGGGAAAAATATGAGTTGATGATCAGCTTGATGTATGATCTGATATTATTATGAACACTTTTGTACTCATAC
↓
1690          1710          1730          1750          1770          1790
GAATCAATGTTGATGGTCTAGCTACTTGGATATTACGAGCAAAATCTTAACTACATGCCCTTAGGAACAAGCTTACACAGTTCAATATAATCTACTAGAGGGCCAAAAACATGAAAAAT

1810          1830          1850          1870          1890          1910
ACCAATTTAGATGGTAGGAGGATATTGAAAGTGGAGCAGCTAGTTTTAATAACTGACCGTTAGTCTTAAATTGACGGTATAAAAAATATTACATAATCAGGTCAATTTATAAGGTAATTA

1930          1950          1970          1990          2010          2030
TAGGTAATATTATTGACGAATTTCTCAATAGTAATCTGAAAAAAATGTAACTAACCTATTATACTAAACTACTATAATAGGTTAGATTACATTAAATCATGTTCATTAGAAGATCTT

```

```

10      30      50      70      90      110
TTACTGTTAAAGTATTCGTACTCGTAGATATTTCAAAAATTAGATAGCGATTTTATCATCTAATCAACTATAGATCTAAGTCGAAAAATATACCTTGAGTATAGATTTTAA

130      150      170      190      210
CTTACCAGCCTTTCATCTTCTTCCAGAAATAAGAGTGGAAATCAACGGTAGCAGATAACGTTGAGATATGATCTTGTAGTAATTGACACCTAACGGGACTGCTTTCCTTT

230      250      270      290      310      330
AAAATATAGACGATAATATCAGTTATAAGGATGCTTTCACCTTTCTAATTAAAGCATATTCTGATTTCGTTTTATAGAATTGATAGAAGTTAGACAGCATCCCTCCAATT

350      370      390      410      430
GAACAGGTTTCGATTACTCAACTTCCCGTCTACTTAAACAAATTCAACTCTTTTCGCGTACTATATTTATGTTAAAAATACACTGGTAATAATGTATAAACTATATGTATG

450      470      490      510      530      550
TATATAATATAACTTCATGATTTATCAAAGTTGGTCAAATTATGATCATGGCTATAATAGTTGTTTCATCAATAGATAGAATTTTTTAATGGCGGCTTTTGTTTCTTTAAC

570      590      610      630      650
GAATATGATCTAACGTTCTTTGAATTAACGGAGCTATAATTTTATACTATTCTTTCAAATATGGCTAAAGAGTTTGCTAACAAAGTTGCAAACCTTGTAACCTCAGCTATA

670      690      710      730      750      770
TTCTTCCCTATAAAAAATCATCCTTACTATGCTTTGTTCTCACCAAAACACAAAAATGGGATTCTTAACAACAATAGTTGCTTGTTCATTACCTTTGCAATATTAATTC
MetGlyPheLeuThrThrIleValAlaCysPheIleThrPheAlaIleLeuIleH

790      810      830      850      870
ACTCATCAAAGCTCAAACTCCCCCAAGATTATCTTAACCTCACAATGCAGCTCGTAGACAAGTTGGTGTGGCCCCATGACATGGGACAATAGGCTAGCAGCCTAT
isSerSerLysAlaGlnAsnSerProGlnAspTyrLeuAsnProHisAsnAlaAlaArgArgGlnValGlyValGlyProMetThrTrpAspAsnArgLeuAlaAlaTyr

890      910      930      950      970      990
GCCCAAAATTATGCCAATCAAAGAATTGGTGAAGTGGGATGATCCACTCTCATGGCCCTTACGGCGAAAACCTAGCCGCCGCCCTTCCCTCAACTTAACGCTGCTGGTGC
AlaGlnAsnTyrAlaAsnGlnArgIleGlyAspCysGlyMetIleHisSerHisGlyProTyrGlyGluAsnLeuAlaAlaAlaPheProGlnLeuAsnAlaAlaGlyAl

1010      1030      1050      1070      1090
TGTA AAAATGTGGTCGATGAGAAGCGTTTCTATGATTACAATTCAAATTCCTGTGTAGGAGGAGTATGTGGCACTATACTCAGGTGGTGTGGCGTAACTCAGTACGTC
aValLysMetTrpValAspGluLysArgPheTyrAspTyrAsnSerAsnSerCysValGlyGlyValCysGlyHisTyrThrGlnValValTrpArgAsnSerValArgL

1110      1130      1150      1170      1190      1210
TCGGTTGTGCTAGGGTTCGAAGCAACAATGGTTGGTTTTTCATAACTTGCAATTATGATCCACCAGGTAATTTTATAGGACAACGTCCCTTTGGCGATCTTGAGGAGCAA
euGlyCysAlaArgValArgSerAsnAsnGlyTrpPhePheIleThrCysAsnTyrAspProProGlyAsnPheIleGlyGlnArgProPheGlyAspLeuGluGluGln

1230      1250      1270      1290      1310
CCCTTTGATTCCAAATGGAACTTCCAACCTGATGCTAATGAGTGACGTACATGAACAAATTCATGAATAAAGGAAAAATAAAATGCAGTGCTATGCTATGTGATTTT
ProPheAspSerLysLeuGluLeuProThrAspValEnd

```

```

1330      1350      1370      1390      1410      1430
AGCTTCCAGTTGGATAATAATCTGATGGTGTAGTAAGTGGCCGAGTGTGACCCCTACCTTGCATGTTGGTAGATGGAATCAGTTTATATATGAGTTTTCTGTTGGCT
1450      1470      1490      1510      1530
TATGTTATTTTATTAAATCTTATTCTAGTTTACAGTTTTTATTGCACTATATGTGTATGGGTCCAAATTGATCGACCACGACCTATGACGAGTACAACAAACGA
1550      1570      1590      1610      1630      1650
CCGGGTACCTTCGAATCGGCGTCCCAAGGGAACGACCCTAGGGCGAAAGAAGAGACTGTATGACTCTTGTAGTAGTGAAGCCCATAGGGAACATTAGAATAITCCG
1670      1690      1710      1730      1750
CCGAATACTAATTGTATTTTGTCTTACAATTCGGAAGGGTTTCTCTAGTATATAAAGGGGACAAAAACCTTGTAAGTGGCGGTGGATACTCTGAGAAGCTTACTA
1770      1790      1810      1830      1850      1870
ATCTTGATGAAAAGAAAACTCTCTCTCTTATCTATTATTATCTAGAGATTATTATCTTCAGCTACGATTACCCCTTCATCTTTGATTGATTGTTCAAAAAGGT
1890      1910      1930      1950      1970
TTTAACATCTTTTGAGTCAACAAATTTGGCNCCTCTATGGGGATTCTATAGCTGAAATCATAGTTCTCATCTAGATTCTGAAGTGATAATTACTTTCTTCAAACCT
1990      2010      2030      2050      2070      2090
CATAAAATCAACAATGGCAGGAAGGTGAAGCTAAAGGCGTASAGATCGTCTGAATAACTCCTGAACTCCCTCAACGAAGACGGCAGAGAAGACAATGAGAATA

```

```

      10              30              50              70              90
AAAGAAAGCTCTTTAAGCAATGGCTGCCACAAAATAACTACAACCCCTTTCATCTTCTCTCTTTCTCTATTTTCCGCTCTTCCGACGCGGCTGGA
      M A A H K I T T T L S I F F L L S S I F R S S D A A G

     110             130             150             170             190
ATCGCCATCTATTGGGGTCAAAACGGCAACGAGGGCTCTCTTGCACTCCACCTGCGCAACTGGAACTACGAGTTCGTCAACATAGCATTTCTCTCATCCT
I A I Y W G Q N G N E G S L A S T C A T G N Y E F V N I A F L S S F

     210             230             250             270             290
TTGGCAGCGGTCAAGCTCCAGTTCTCAACCTTGCTGGTCACTGCAACCTTGACAACAACGGTTGCGCTTTTGTAGCGACGAAATAAACTCTTGCAAAAG
G S G Q A P V L N L A G H C N P D N N G C A F L S D E I N S C K S

     310             330             350             370             390
TCAAAATGTCAAGGTCCTCTCTATCGGTGGTGGCGGGGAGTTATTCACTCTCCTCCGCCGACGATGCGAAACAAGTCGCAAACTTCATTGGAAC
Q N V K V L L S I G G G A G S Y S L S S A D D A K Q V A N F I W N

     410             430             450             470             490
AGCTACCTTGGCGGGCAGTCCGATTCAGGCCACTTGGCGCTGCGGTTTTGGATGGCGTTGATTTTCGATATCGAGTCTGGCTCGGGCCAGTTCTGGGACG
S Y L G G Q S D S R P L G A A V L D G V D F D I E S G S G Q F W D V

     510             530             550             570             590
TACTAGCTCAGGAGCTAAAGAATTTTGACAAGTCATTTTATCTGCCGCGCGCGAGTGTCCAATACCAGACGCTCACCTAGACGCCGCGATCAAACTGG
L A Q E L K N F G Q V I L S A A P Q C P I P D A H L D A A I K T G

     610             630             650             670             690
ACTGTTTCGATTCCGTTTGGGTTCAATTCTACAACAACCCGCCATGCATGTTTGAGATAACGCGGACAATCTCCTGAGTTTCATGGAATCAGTGGACGGCG
L F D S V W V Q F Y N N P P C M F A D N A D N L L S S W N Q W T A

     710             730             750             770             790
TTTCCGACATCGAAGCTTTACATGGGATGCGCAGCGGCACGGGAGGCAGCGCGGAGCGGGGATTTATCCGGCGGATGTGCTTATTTCTCAAGTTCCTC
F P T S K L Y M G L P A A R E A A P S G G F I P A D V L I S Q V L P

     810             830             850             870             890
CAACCAATAAAGCTTCTTCCAATATGGAGGAGTGATGTTATGGAGTAAGGCGTTTGACAATGGCTACAGCGATTCCATTAAAGGCAGCATCGGCTGAAG
T I K A S S N Y G G V M L W S K A F D N G Y S D S I K G S I G *

     910             930             950             970             990
GAAGCTCCTAAGTTTAATTTTAATAAAGCTATGAATAAACTCCAAAGTATATAATAATTAAAAAGTGAGACTTCATCTTCTCCATTAGTCTCATATT

    1010            1030            1050            1070            1090
AAATTAGTGTGATGCAATAAATAATATCCTTTTTTTCATTACTATACTACCAATGTTTTAGAAATTGAAAAGTTGATGTCAATAAAAAACATTCCAAGTTTA

```

TTT .

SEQUENCE 3

```
1  AAAAAGAAAA AAAAAATGAA CTTCTCTCAA AGCTTCCCCT TTTTTCCTT
51  CCTTTATTTT GGCCAATACT TTGTAGCTGT TACTCATGCT GCCACTTTTG
101 ACATTGTCAA CAAATGCACC TACACAGTCT GGGCCGCGGC CTCTCCAGGT
151 GGAGGCAGGC GGCTCGACTC AGGCCAATCT TGGAGCATTA ATGTGAACCC
201 AGGAACAGTC CAGGCTCGCA TTTGGGGTCG AACCAATTGC AACTTCGATG
251 GCAGTGGCCG AGGTAATTGT GAGACTGGAG ACTGTAACGG GATGTTAGAG
301 TGTCAAGGCT ATGGAAAAGC ACCTAACACT TTAGCTGAAT TTGCACTTAA
351 TCAACCCAAT CAGGACTTTG TCGACATCTC TCTTGTGAT GGATTTAACA
401 TCCCCATGGA ATTCAGCCCG ACCAATGGAG GATGTCGTAA TCTCAGATGC
451 ACAGCACCTA TTAACGAACA ATGCCCAGCA CAGTTGAAAA CACAAGGTGG
501 ATGTAACAAC CCATGTACTG TGATAAAAAC CAATGAATAT TGTTGTACAA
551 ATGGGCCTGG ATCATGTGGG CCTACTGATT TGTCGAGATT TTTTAAGGAA
601 AGATGCCCTG ATGCTTATAG TTATCCACAG GATGATCCAA CCAGTTTGTT
651 TACGTGTCCT TCTGGTACTA ATTACAGGGT TGTCTTCTGC CCTTGAAATT
701 GAAGCCTGCA AAATTATGAC TATGTAATTT GTAGTTTCAA ATATATAAGC
751 TACACAAGTA GTACTAAGCA CTATTAAATA AAAAAGAGAG TGACAAAGAG
801 GAGAGGCTGT GGGTCAGATT CTCTTGTTCTG CTGTTGTCGT TGTTGTAGCA
851 TTCTGGTTTT AAGAAATAAA GAAGATATAT ATCTGCTAAA TTATTAAATG
```

SEQUENCE 4

```

10          30          50          70          90
.          .          .          .          .
AAAAAGAAAAAAAAAATGAACTTCCTCAAAAGCTTCCCCTTTTTTGCCTTCCTTTATTTTGGCCAATACTTTGTAGCTGTTACTCATGCT
MetAsnPheLeuLysSerPheProPhePheAlaPheLeuTyrPheGlyGlnTyrPheValAlaValThrHisAla

110          130          150          170
.          .          .          .
GCCACTTTTGACATTGTCAACAAATGCACCTACACAGTCTGGGCCGCGCTCTCCAGGTGGAGGCAGGCGGCTCGACTCAGGCCAATCT
AlaThrPheAspIleValAsnLysCysThrTyrThrValTrpAlaAlaAlaSerProGlyGlyGlyArgArgLeuAspSerGlyGlnSer

190          210          230          250          270
.          .          .          .          .
TGGAGCATTAAATGTGAACCCAGGAACAGTCCAGGCTCGCATTGGGGTTCGAACCAATTGCAACTTCGATGGCAGTGGCCGAGGTAATTGT
TrpSerIleAsnValAsnProGlyThrValGlnAlaArgIleTrpGlyArgThrAsnCysAsnPheAspGlySerGlyArgGlyAsnCys

290          310          330          350
.          .          .          .
GAGACTGGAGACTGTAACGGGATGTTAGAGTGTCAAGGCTATGGAAAAGCACCTAACACTTTAGCTGAATTTGCACTTAATCAACCCAAT
GluThrGlyAspCysAsnGlyMetLeuGluCysGlnGlyTyrGlyLysAlaProAsnThrLeuAlaGluPheAlaLeuAsnGlnProAsn

370          390          410          430          450
.          .          .          .          .
CAGGACTTTGTCGACATCTCTCTTGTGATGGATTAAACATCCCCATGGAATTCAGCCCGACCAATGGAGGATGTCGTAATCTCAGATGC
GlnAspPheValAspIleSerLeuValAspGlyPheAsnIleProMetGluPheSerProThrAsnGlyGlyCysArgAsnLeuArgCys

470          490          510          530
.          .          .          .
ACAGCACCTATTAAACGAACAATGCCAGCACAGTTGAAAAACACAAGGTGGATGTAAACAACCCATGTAAGTGTGATAAAAAACCAATGAATAT
ThrAlaProIleAsnGluGlnCysProAlaGlnLeuLysThrGlnGlyGlyCysAsnAsnProCysThrValIleLysThrAsnGluTyr

550          570          590          610          630
.          .          .          .          .
TGTGTACAAATGGGCCTGGATCATGTGGGCCTACTGATTTGTGCGAGATTTTAAAGGAAAGATGCCCTGATGCTTATAGTTATCCACAG
CysCysThrAsnGlyProGlySerCysGlyProThrAspLeuSerArgPhePheLysGluArgCysProAspAlaTyrSerTyrProGln

650          670          690          710
.          .          .          .
GATGATCCAACCAGTTTGTGTACGTGTCCTTCTGGTACTAATTACAGGGTTGTCTTCTGCCCTTGAAATTGAAGCCTGCAAAATTATGAC
AspAspProThrSerLeuPheThrCysProSerGlyThrAsnTyrArgValValPheCysProEnd

730          750          770          790          810
.          .          .          .          .
TATGTAATTTGTAGTTTCAAATATATAAGCTACACAAGTAGTACTAAGCACTATTAAATAAAAAAGAGAGTGACAAAGAGGAGAGGCTGT

830          850          870          890
.          .          .          .
GGGTCAGATTCTCTTGTTGCTGTTGTGCTGTTGTAGCATTCTGGTTTAAAGAAATAAAGAAGATATATATCTGCTAAATTATTAAATG

```

SEQUENCE 4 (a): Sequence 4 plus amino acid sequence of
 polypeptide encoded by the coding region of
 the gene

```

1   GAGCTCCTCT AGGGGGCCAA GGCAAACCTT TTTGCTAATG GGAAAAAAT
51  ATTAGACCAA GAGTTTGTAA TAGCTACTCA ATTTCAATTT ACAAAGGGGA
101 AAATTTAACT GTTTTGCCCT TATATCTTTT GGTCCCGAAA CATAAAATAT
151 CCCATCCGAA ATTCCAAATG GTCCATTATC GGCAAGTAGC TTTCTTTTAT
201 TATAGTTAGT TGACAAAACA CTATCGAGAT ATCATTAGTA TAATAATAAC
251 TTCAAAGTCC ATCTTCTTAG CTGCCTCCTC ATTAGAGCCG CCACTAAAAT
301 AAGACCGATC AAATAAAAGC CGCCATTAAA ATAATGAATT TTAGGACTCT
351 CAATTGTCAC GTAAGTGCCA AAACCTCTTC AATACTTTGC TGCAACTTGG
401 GGCTGCTAGC TTCTGAGCTT CCTGGGATAT TTCTATGTTT ATCTCTTAAT
451 TTACATCTCA ACTAATATCA AGAAATTAAA CAGGTGCAGC AAATCATAAA
501 ATTTTCCTCT AAAGAAGAAA ATGACTCCGG TTACTGATTC ATTGGCCTTT
551 TCAGAGTCTG CGTGCCATAT TCACTAATGG GTCGTTTGGT ACAAGAAATA
601 ATGATAATAA TTTCGAAATA GAATTTGGGA TTTCATTTAT TTCATATTTA
651 ATTATAAATA TTAGCTAATT TCGAAATAAA TTTTACATTA AAATAGTGAA
701 ATCAACTATC TCATATATAA GGTGGAATAG CTAATCTCAT AGCCACCTCA
751 GTTAGAATCC AGTTTCCTCT AATAAATGCA GCGAAATATT AGAAGACTTT
801 CATTAAATCA ATTCATATAA TTTAAAAATA CTAGACATGG AAAAAAAAAA
851 CGATTGAGAG CTGTTATGGA AGGCGTTGCC TTCGATGTAG ATTCTCATCC
901 ATTGCTTTTCG TGCAATAGCA ATATGACATC TTATTCTTAG AACTACTTTT
951 AAATGAAAGT CATATAGAAC TTTAAAATCT CTCAACTAGT TTTAAGGGAA
1001 TTCAAAATAC GACCAATATT TATTACTTAC TTATGGATAA ATTTAAATAA
1051 TATGTATTTT ATCTTGAAAT TGAATTGAAA ATATTAAATT ACTTGGTTTA
1101 ATATAAACAA TAGATATCGT TAAGTATTTA CCACAAACAT TTTATTAGTT
1151 GTAACGATGA TTAAGCAGGA ATTCCTCTGG TTGTGCAGGA TGAAAGAAAC
1201 TAACTAGCTA TAATTTCTTT TGTAAGTCA AGATAGTACG GCACCTTATG
1251 GAGAAAATAA ATAACCTTAC ATCATCAAAC TCATCTTCTT TTTTCCACAA
1301 AATGATCAAG TTGACATGTT AATAGCCAGG TCACCGGGGG CGGCTCTTAA
1351 CTTCATTAGC CTACGAATAA CAAATCCAAT ATTATATTTA CACAAGGCTA

```

SEQUENCE 5 (1)

```

1401 TATATATATC TCAATATAAA TAGCTCGTTG TTCATCTTAA TTCTCCCAAC
1451 AAGTCTTCCC ATCATGTCTA CCTCACATAA ACATAATACT CCTCAAATGG
1501 CTGCTATCAC ACTCCTAGGA TTACTACTTG TTGCCAGCAG CATTGACATA
1551 GCAGGTTTCT GGTCAAATAT TTGAACTTCC CAGCCAAAAA TATTGTCTTA
1601 TAATTTTGTG TCGCGAAAAT TTTAATTTAG TTGATAGTTA TTTGCTTATT
1651 TTTCTTTTCA AATTGCTTGT GTTTTTTTCT CAAATTAACT TGCACCGTAT
1701 TCATTTAGCG ATAGTTATTT GCTCTATTTT TGTGTAACAC TCACTCACAA
1751 ACTTTTCAAT TTGAGGGGAG GACAGTGAAT CTAAGATTGA AATTTATGAG
1801 TTTAATTAGA CTAATTCCCA TTTGATTTAT TGGCTAGAAG TCAATTATTT
1851 GCATAGTGAG TCTTTTAACA CACAGATTG AGTTAAAGCT ACTACGTTG
1901 TATTAACCCA TAACATATAC ACCTTCTGTT CTAATTTCTT TGACACTTTT
1951 TGTTAGTTTG TTCCAAAAAG GACGGACATA TTTGATATTT GAGAATACTT
2001 TACCTTAACC TTAATAGAAT TTTTATGAC ATCACATATA TTATGGAATA
2051 TATACGACCA TAATTTTCAA ATATCTTATA GTCGTACAAA TATTATAGCA
2101 TGTTTAATAC CACAACTTTC AAATTCTTCT TTTCCTTAAA AACAAAATAT
2151 GTCACATAAA TTAAAATAGA GGAAGTATAC TACATCAATC AGCCCCTAGT
2201 GGAGGGGACC CTACTGTAAG TTTTAAAGTT TTCAAGAATT CAGTAATTGA
2251 TTAGGAGCCC GTCTGGACAT AAAAAAAAAA TCCTTTTTTT CCAAAAAATG
2301 CCCACTAAAT TTCTAACACT ATTTTGTAAT TCTTATTGAG CAGGGGGCTC
2351 AATCGATAGG TGTTTGCTAT GGAATGCTAG GCAACAACCT GCCAAATCAT
2401 TGGGAAGTTA TACAGCTCTA CAAGTCAAGA AACATAGGAA GACTGAGGCT
2451 TTATGATCCA AATCATGGAG CTTTACAAGC ATTAAAAGGC TCAAATATTG
2501 AAGTTATGTT AGGACTTCCC AATTCAGATG TGAAGCACAT TGCTTCCGGA
2551 ATGGAACATG CAAGATGGTG GGTACAGAAA AATGTTAAAG ATTTCTGGCC
2601 AGATGTTAAG ATTAAGTATA TTGCTGTTGG GAATGAAATC AGCCCTGTCA
2651 CTGGCACATC TTACCTAACC TCATTTCTTA CTCCTGCTAT GGTAATATT
2701 TACAAAGCAA TTGGTGAAGC TGGTTTGGGA AACAAACATCA AGGTCTCAAC
2751 TTCTGTAGAC ATGACCTTGA TTGGAACTC TTATCCACCA TCACAGGGTT
2801 CGTTTAGGAA CGATGCTAGG TGGTTTGTTG ATCCCATTGT TGGCTTCTTA
2851 AGGGACACAC GTGCACCTT ACTCGTTAAC ATTTACCCCT ATTTCAGTTA

```

2901 TTCTGGTAAT CCAGGCCAGA TTTCTCTCCC CTATTCTCTT TTTACAGCAC
 2951 CAAATGTGGT GGTACAAGAT GGTTCCTGCC AATATAGGAA CTTATTTGAT
 3001 GCAATGCTGG ATTCTGTGTA TGCTGCCCTC GAGCGATCAG GAGGGGCATC
 3051 TGTAGGGATT GTTGTGTCCG AGAGTGGCTG GCCATCTGCT GGTGCATTTG
 3101 GAGCCACATA TGACAATGCA GCAACTTACT TGAGGAACTT AATTCAACAC
 3151 GCTAAAGAGG GTAGCCCAAG AAAGCCTGGA CCTATTGAGA CCTATATATT
 3201 TGCCATGTTT GATGAGAACA ACAAGAACCC TGAAGTGGAG AAACATTTTG
 3251 GATTGTTTTT CCCCACAAG CAGCCCAAAT ATAATATCAA CTTTGGGGTC
 3301 TCTGGTGGAG TTTGGGACAG TTCAGTTGAA ACTAATGCTA CTGCTTCTCT
 3351 CGTAAGTGAG ATGTGAGCTG ATGAGACACT TGAAATCTCT TTACATACGT
 3401 ATTCCTTGGA TGGAAAACCT AGTAAAAACA AGAGAAATTT TTTCTTTATG
 3451 CAAGATACTA AATAACATTG CATGTCTCTG TAAGTCCTCA TGGATTGTTA
 3501 TCCAGTGACG ATGCAACTCT GAGTGGTTTT AAATTCCTTT TCTTTGTGAT
 3551 ATTGGTAATT TGGCAAGAAA CTTTCTGTAA GTTTGTGAAT TTCATGCATC
 3601 ATTAATTATA CATCAGTTCC ATGTTTGATC AGATTGGGAT TTGGTAACTT
 3651 CAATGTTTAG TTATTTATTA ATTAGTGTCT TTATCATTTG ACTATCAATT
 3701 AATCTTTATT TGGCAAGGCT TGATATATTT GAGTTACTCT TAGGTATTTG
 3751 CAAGCAACTG ATCTTTCTTT TATCCCGTTT CTCCGTAAA CCTCATTAGA
 3801 AATATATTAT AATGTCACCT ACTCTGTGGT TTAAGACATT CCCTTACATT
 3851 ATAAGGTATT TCACGTCGTA TCAGGTCGAA AAAAATAATG GTACGCTCTT
 3901 TCTTATCACA AATTTCTCTC AACTTCTAGA CCAATTGAAT CTTGTCTCCA
 3951 ATAAGCATTG CTTTACTGT ATGTTTCTCT CTATCAATTC AAGGCTCAAG
 4001 CCATCAAATC GCTTGGTATT TCTCGCTCCC ATTTAACCAA TCGAGCTGTT
 4051 AGCTCTGCTA AAGTCTCATT CTTCAGCTTC TCAAACCACT CAGAGCTTCT
 4101 CCAACCAAAA ATGTAGAAAA AATCTTTGAT CCACATGTAA AACCCAGAA
 4151 TTGTCATTTC AGTGAAGGAA GGTGCTGGAA ACGCGACATC AAACACGGAT
 4201 TTGCCAGCTG ATTGTCATAG GAAAAAGAAA AGTTGATCAG ATAGTTCGTG
 4251 CGGGGTATTT CCTACCTCGC CTTTGATCAT AGCTCTAGGC TTGCGAACT
 4301 AAGTTATGCA CGAGGCCCCC TGCGAATCCA TAAATCTAAG AAGCATGCCA
 4351 CAACAAACGG GATAACTTCC AGCTAAGAGA TCTATTTTGA TCTTACCCAC
 4401 AAAGTAGCTC CGTGTGAATT GTCCATTTCA TCAACTCCAA AGGCAGGAAA
 4451 GAAGACTCTA TTCAGAGAGC AGCAAAAGAG CTC

```

1   GAGCTCCCTT GGGGGGCAAG GGCAAACTT TTTGCTAAAT GGAAAAATAT
51  TATACCAAGT GTTTGTAATA GTTACTCAAT TTGAATTAAC AAAGGGGCAA
101 ATTTGACTAT TTTGCCCTTA TATCTTTTGG TCACAAAAAC ATAAAAATATC
151 CCATCCGAAA TTCCAAATGG TCCATTATCG GCAAGTAGCT TTCTTTAATT
201 ATAGTTAGTT GACAAAACAC TATCAAGATA TCATTATTAT AATAATAACT
251 TCAAAGTCCA TCATCTTAGC TGCCTCCTCA GTAGAGCCGC CAGTAAATA
301 AGACCGATCA AATAAAGCC GCCATTAAAA TAATGAATTT TAGGACTCTC
351 GATTGGCACG TAAGTGCCAA AACTCTTCCA ATACTTTGCT GCAACTTGGG
401 GCTGCTAGGT TCTGAGCTTC CAGATATGGG ATATTTCTAA GTTTATCTCC
451 TAATTTACAT CTCAACTAAT ATTAAGAAAT TAAACAGGTA CAGCAAATCA
501 TAAAATTTTC CTCTAAAGAA GACAATGAAT CCGGTTACTG ATTCATTGGC
551 CTTTTCAGAG TCTGCATGCC ATATTCACTA AGGGGTCGTT TGGTACAAGA
601 AATAATAATA ATAATTTTCGG GATAGAATTT GAGATTGCAT TTATCTTGTG
651 TTTAATTATA AGTATTAGCT AATTTCAGAA TAAATTTTAC ACTAAAATAG
701 TAAAATCAAC TATCACATGT AGAAGGTGGA ATGGAATAGC TAATCCCATA
751 GCCACTCACA TAGAATATCC TTATTTATCT CACTATTTTA CCAAATGATC
801 GGTTAGTCTT CATGAGAATC CAGTATCCTC AATAAATGCA GTAAGAAGTT
851 AGAAAATTTT CATTAAATCA ATTCATATAA TTTAAAAATA TTAGATATGG
901 AGCACTTAAG ATACAATAAA AGATGTACCG TTAATAATAA AAGATAAGAT
951 AGAGTTTTTA ATAGGAAAAA AAAAACGGTT CGAGACACTC TTATGGAAGG
1001 CGTTGTCTTC AAAGTAGATT CTCATTCATT GCTCTGGTGC AATAGCAAAA
1051 TGACATCTTA CTCTTAAGAT ACAGCGAGCC ACTCTACAAT CTTCTATTGT
1101 ATACTCAAAT GAAAGTTTTA GAGAACTTTC AAATCTCTCA ACTACTTTTA
1151 AGGGAATTCA AAATACGACC AATATTTATT ACTTACTTAC TTATAGTTAA
1201 ATGATATGAA TTTTATTTTA AATTTGAATT GAAAATATTA AATTACTTGA
1251 TTTAATATAA ACAATAGATA TCGCTAAGTA TTTACCACAA ACATGGAGAT
1301 ACTACAGAAG ATTTTATTAT TTGTAACGAT GATTAAGCAG CTATTCATCT
1351 GGTTGTGCAG GATGAAAGAA AGTAACTAGC TATAATTTCT TTTGTAAAGT

```

```

1401 CAAGATAGTA CGGCACCTTT GGANNAAATA TAAAACTTGT ACATCA'CAA
1451 ACTCATTTTC TTTTTTCCAC AAAATGATCA AGTTGACATG TTAATAGCCA
1501 GGTGAGCCGG GGC GGCTCTT AACTTCATTA GCCTACGAAT AACAAATACT
1551 CCAATAATAT TCCACTCGAA TATTTACATT TACACAAGGC TATCTCAATA
1601 TAAATAGCTC ATTGTTTCATC TTAATTCTTC CAACAAGTCT TCTCATCATG
1651 TCTACCTCAG ATAAACATAA TACTCCTCAA ATGGCTGCTA TCACACTGCT
1701 AGGATTACTA CTTGTTGCCA GCACCATTGA GATAGCAGGT TTCTGGTCAA
1751 ATATTTGAAC TTCCGAGCCA AAAATATTGT CTTATAATTT TGTTGGTGCA
1801 AAATCTTAAT TTAGTTGATA GTTATTTGCT TATTTTTCTT ATCAAATTGC
1851 TTGTGTTTTT TTCTCAAATT TACTTGCACT ATATTCATTT AGCGATAGTT
1901 ATTTGCTCTT TTTTCGGGTA ACACTCACTC ACAAGCTTTT CAAATTTGAG
1951 GGGAGGGCGG TGAATCTAAA ATTTGAAATT TATGAGTTTA GACTAGTGTC
2001 CATTTGATTT ATTGGCTAGA CGTCTATTAG TTGTATAGTA AATCTTTTAA
2051 CACATACACC GACCTGAGTC AAAGCTATTA GGTTCGTATT AACACATAAC
2101 ACATATTCCC TCTGTTCTAA TTTATGTGAC ACACTTTCTG TTAGTTTCTT
2151 CCAAAGAGAA TGACATATTT GATATTTTAA AATATTTTAA CTTTAAACTT
2201 TTTATTCTCA ACCTTTTATA ACATCACAAA TATTATGGAA CATATTAGAC
2251 TACAAGTTCC AAATATCTTA TAGTCTGTAC AAATATTATA GCATGTTTAA
2301 TAACACAATT TTCACATTCT TCTTTTTCTT AAACTTTGTG CCGAATTAAA
2351 TTATGTCACA TAAATTAAAA TGGTTACATC ATCCCCTAGT GGAGGGACCT
2401 ACCATGTCTA CTGTAAGTTT TTAACCTTTC AAGAATTACA TAATTGATTT
2451 AGTTTCTAAC ACTAATTCTA ATTCTTATTG AGCAGGGGCT CAATCAATAG
2501 GTGTTTGCTA TGGAATGCTA GGCAACAAC TGCCAAATCA TTGGGAAGTT
2551 ATACAGCTCT ACAAGTCAAG AAACATAGGA AGACTGAGGC TTTATGATCC
2601 AAATCATGGA GCTTTACAAG CATTAAAAGG CTCAAACATT GAAGTTATGT
2651 TAGGACTTCC CAATTCAGAT GTCAAGCACA TTGCTTCCGG AATGGAACAT
2701 GCAAGATGGT GGGTACAAAA AAATGTTAAA GATTTCTGGC CAGATGTTAA
2751 GATTAAGTAT ATTGCTGTTG GGAATGAAAT CAGCCCTGTC ACAGGCACAT
2801 CTTACCTTAC CTCATTTCTT ACTCCTGCCA TGGTAAATAT TTACAAAGCA
2851 ATTGGTGAAG CTGGTTTAGG AAACAACATC AAGGTCTCAA CTTCTGTAGA

```

```

2901 CATGACCTTG ATTGGAACT CTTATCCACC ATCACAGGGT TCGTTTAGGA
2951 ACGATGCTAG GTGGTTTACT GATCCAATTG TTGGGTTCTT AAGGGACACA
3001 CGTGACCTT TACTCGTTAA CATTACCCC TATTCAGCT ATTCTGGTAA
3051 TCCAGGGCAG ATTTCTCTCC CCTATTCTCT TTTTACAGCA CCAAATGTGG
3101 TAGTACAAGA TGGTTCACGC CAATATAGGA ACTTATTTGA TGCAATGCTG
3151 GATTCTGTGT ATGCTGCCCT CGAGCGATCA GGAGGGGCAT CTGTAGGGAT
3201 TGTTGTGTCC GAGAGTGGCT GGCCATCTGC TGGTGCATTT GGAGCTACAT
3251 ATGACAATGC AGCAACTTAC TTGAGGAACT TAATTCAACA CGCTAAAGAG
3301 GGTAGCCCAA GAAAGCCTGG ACCTATTGAG ACCTATATAT TTGCCATGTT
3351 TGATGAGAAC AACAAGAACC CTGAACTGGA GAAACATTTT GGATTGTTTT
3401 CCCCCAACAA GCAGCCCCAA TATAATCTCA ACTTTGGGGT CTCTGGTGGT
3451 GTTTGGGACA GTTCAGTTGA AACTAATGCT ACTGCTTCTC TCATAAGTGA
3501 GATGTGAGAT GAGACACTTG AAATCTCTTT ACATAAGTAT TGCTTAGATG
3551 GAAAGCTTAG TAAAAACAAG AGAAATTTAT TCTTCATGCA AGACACTAAA
3601 TAACATTGCA CGTCTCTGTA AGTCCTCATG GATTGTTATC CAGAGACGAT
3651 GCAACTCTGA GTGGTTTTAA ATCCCTTTTC TTTGTGATGT TGGTAATTTG
3701 GCAAGAACT TTCTGTAAGT TTGTGAATTT CATGACTTTC TGTAAGTTTG
3751 TGAATTTTCA GCACCATCAA TTATACATCT TTTCCATGTT TGATCACATT
3801 AGGATTTGGT AATTGCAAAG TTTAGTTATT TATTAATTAG TGTCTTTATC
3851 ATTTGACTCG ATCAATTAAT CTTTAATTGG TAAGGCTTGA TATATCGGAG
3901 CGACTCTTAG GTAGTGGCAT TCAACTGATC TTTCTGTTAT CCCATGTCTC
3951 CGTTAACCTT CATTAGAAAT ATATTATAAT GTCACCTAAA TCAGAGGTTT
4001 TAGAGCTTCA AAATCGATTG ACAACAGTTT TGGAGTTACA CTGTGGTTTA
4051 GGACATTCTG TTACATTATA AGGTATTTCA CGTCGTATCA AGGTCGAATA
4101 AAATAATGGT ACGCTCTTTC TTATCACAAA TTTCTCTCAA CTTCTAGACC
4151 AATTGAATCT TGTCTCCAAT AAGTATTGCT TTTACTCTAT GTTTCTCTCT
4201 ATCAATTCAA GGCTCAAGCC ATCAAATCGC TTGGTATTTT TCGCTCTCAA
4251 TTAACCAATC GAGCTGTTAA CTCTGCTAAA GTCTCATTCT TCAGCTTCTC
4301 AAACCACTCA AAGCTTCTCC AACAAAAAAA GTAGAAAAAA ACTTTGATCC
4351 ACATGTAAAA CCCATAACC ATGTCATTCT AGTGAAGGAA GGTGCTTGAA

```

4401 ATGCAACGAA CAAACACGGC TTTGCCACTG CTTGTGATAG GTAAAAGAAA
4451 ACTTGATTAG ATAGTTCGTG CGGGGCATTT CCTACCTCGC CTTTGATCTT
4501 AGCTTTAGGC TTGCGAAACT AAGTAGAACC TAAGGCCCCA GCGAATCCGT
4551 AAATCTGAGG AGCATGCCAC AGCAAAAAGG TTAGCTTTCA GATAAGAGAT
4601 CTATTTGATC TTACCCACTA ACTAGCTCTG TGTGAATTGT CCATTTTCATC
4651 AACTCCAAAG GCAGGAAAGA AGACTATTGA GAGAGCAGCA AAAGAGCTC

```

1- 50  AAAAAAAAAA AAAACATAA GAAAGTACAG AGGAAAATGG AGTTTTCTGG
51-100 ATCACCAATG GCATTGTTTT GTTGTGTGTT TTTCTGTTC TTAACAGGGA
101-150 GCTTGGCACA AGGCATTGGT TCTATTGTAA CGAGTGACTT GTTCAACGAG
151-200 ATGCTGAAGA ATAGGAACGA CGGTAGATGT CCTGCCAATG GCTTCTACAC
201-250 TTATGATGCA TTCATAGCTG CTGCCAATTC CTTTCTGGT TTTGGAAC TA
251-300 CTGGTGATGA TACTGCCCCG AGGAAAGAAA TTGCTGCCTT TTTGGTCAA
301-350 ACTTCTCAG AACTACTGG TGGATCCCTG AGTGCAGAAC CATTTACAGG
351-400 AGGGTATTGC TTTGTTAGGC AAAATGACCA GAGTGACAGA TATTATGGTA
401-450 GAGGACCCAT CCAATTGACA AACCGAAATA ACTATGAGAA AGCTGGAAGT
451-500 GCAATTGGAC AAGAGCTAGT TAACAACCCT GATTTAGTGG CCACAGATGC
501-550 TACTATATCA TTCAAACAG CTATATGGTT TTGGATGACA CCACAGGACA
551-600 ACAAGCCATC TTCCCACGAC GTTATCATCG GTCGTTGGAC TCCGTCTGCC
601-650 GCGGATCAGG CGGCGAATCG AGTACCAGGT TACGGTGTA TACCAACAT
651-700 CATTAACGGT GGAATTGAAT GTGGCATAGG ACGGAATGAC GCAGTGAAG
701-750 ATCGAATTGG ATACTACAGG AGGTATTGTG GTATGTTAAA TGTTGCTCCG
751-800 GGGGAAACT TGGACTGTTA CAACCAAAGG AACTTCGGCC AGGGCTAGGC
801-850 TTCGTTACAT AGAATGCAGA TCATGTTATG TATACAAGTT ATATTTGTAT
851-900 TAATTAATGA ATAAGGGGAT TGTGTATCCA TTAAGAATTA GGTGAAATAT
901-950 TTCTGTTATT TGTCTTCTTG GGAAGAACCA ATAGCTCCTA TATATGAGGC
951- 0  GCTTTTAAGT GATGAGGCTA CTGCATTGAT GAAAACGAAA TTTCTATCCA
1001- 20 GAAATAAAAG TTCCTGTCT

```

SEQUENCE 7

```

1- 50   CAGGTGCTCA AGCAGGAGTT TGTTATGGAA GGCAAGGGAA TGGATTACCA
51-100  TCTCCAGCAG ATGTTGTGTC GCTATGCAAC CGAAACAACA TTCGTAGGAT
101-150 GAGAATATAT GATCCTGACC AGCCAACTCT CGAAGCGCTT AGAGGCTCCA
151-200 ACATTGAGCT CATGCTAGGT GTCCCGAATC CGGACCTTGA GAATGTTGCT
201-250 GCTAGCCAAG CCAATNCAGA TACTTGGGTC CAAAACAATG TTAGGAACTA
251-300 TGGTAATGTC AAGTTCAGGT ATATAGCAGT TGGAAATGAA GTTAGTCCCT
301-350 TAAATGAAAA CTCTAAGTAT GTACCTGTCC TTCTCAACGC CATGCGAAAC
351-400 ATTCAAACCTG CCATATCTGG TGCTGGTCTT GGAAACCAGA TCAAAGTCTC
401-450 CACAGCTATT GAAACTGGAC TTACTACAGA CACTTCTCCT CCATCAAATG
451-500 GGAGATTCAA AGATGATGTT CGACAGTTTA TAGAGCCTAT CATCAACTTC
501-550 CTAGTGACCA ATCGCGCCCC TTTGCTTGTC AACCTTTATC CTTACTTTGC
551-600 AATAGCAAAC AATGCAGATA TTAAGCTTGA GTATGCACTT TTTACATCCT
601-650 CTGAAGTTGT TGTAATGAT AACGGAAGAG GATACCGAAA CCTTTTGTAT
651-700 GCCATCTTAG ATGCCACATA CTCGGCCCTT GAAAAGGCTA GTGGCTCGTC
701-750 TTTGGAGATT GTTGTATCAG AGAGTGGTTG GCCTTCAGCT GGAGCAGGAC
751-800 AATTAACATC CATTGACAAAT GCCAGGACTT ATAACAACAA CTTGATTAGT
801-850 CACGTGAAGG GAGGGAGTCC CAAAAGGCTT CCGGTCCAAT AGAGACCTAC
851-900 GTTTTCGCTC TGTTTGATGA AGATCAGAAA GACCCTGAAA TTGAGAAGCA
901-950 TTTTGGAATA TTTTCAGCAA ACATGCAACC AAAGTACCAG ATCAGTTTTA
951- 0   ACTAGTTAAA AGCAAGAGGA GAGCATTAAT AGGAATAAGG ACTTTCCTTT
1001- 50 GTATGAAGAG AAAGTAGTCC ATTGGCACTA TGTAAGTAAA CTATATATCA
1051-100 TGCTCATAAA GAAAGCAGTT ATTACAAATA TGAAACACTT ACAAGAAAAG
1101-107 CCATCAA

```

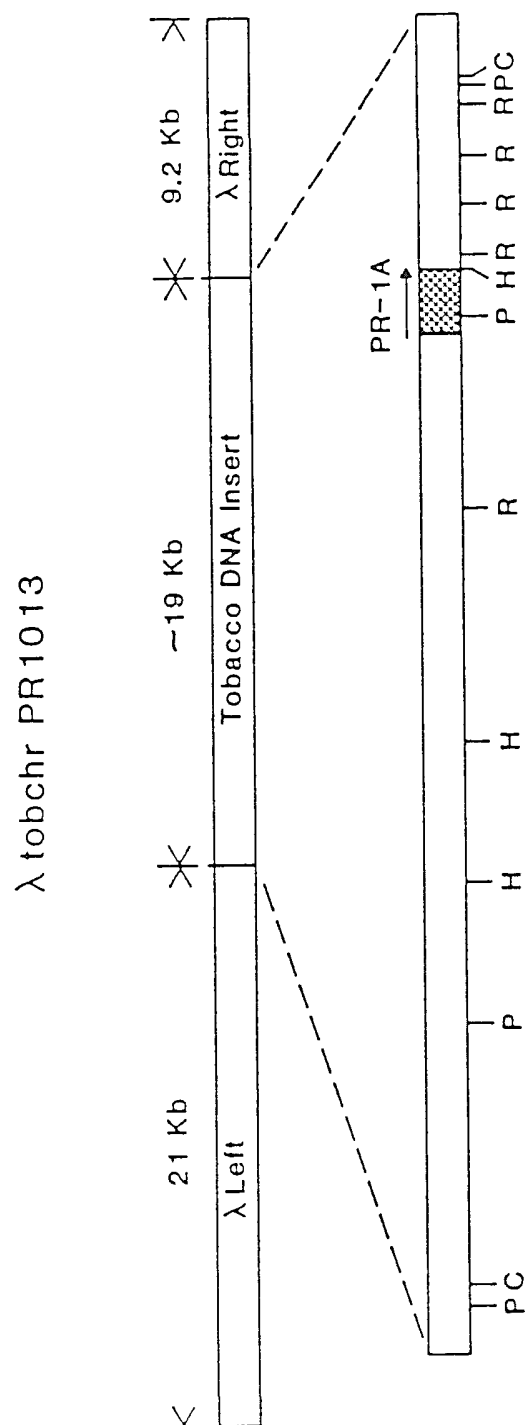


FIGURE 1

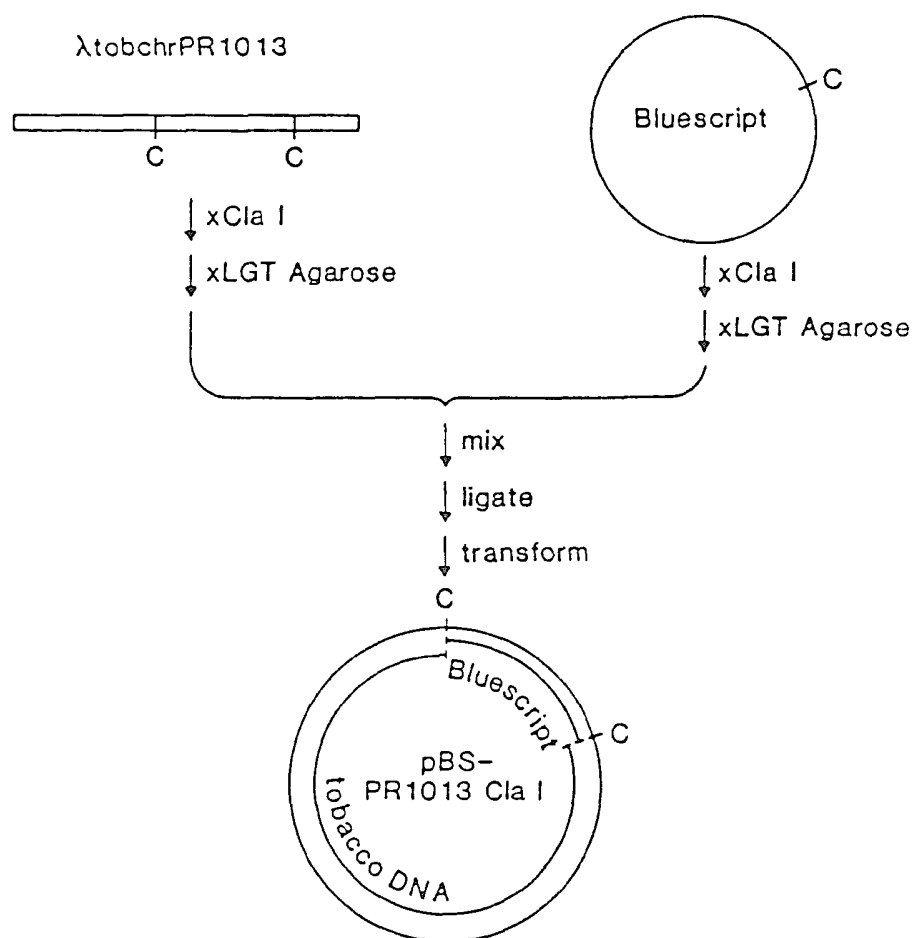
Construction of pBS-PR1013 *cia* From λ tobchr PR1013

FIGURE 2

Construction of pBS-PR1013 Eco
From λ tobchr PR1013

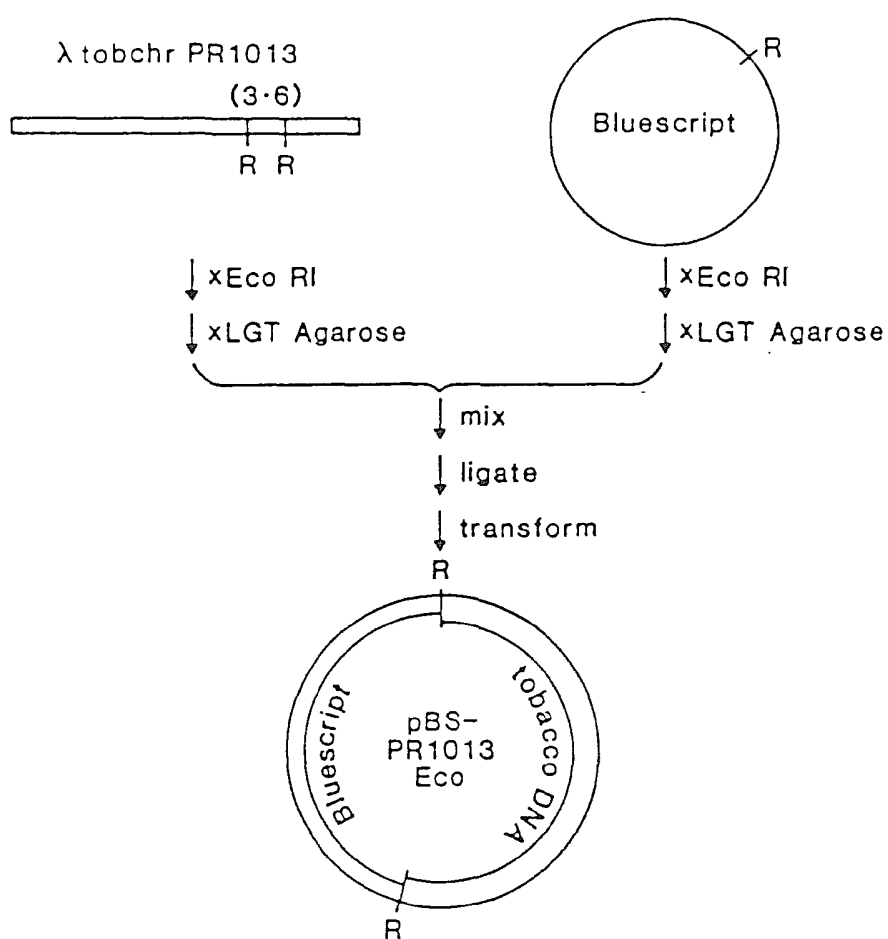


FIGURE 3

Construction of pBS-PR1013 Eco
From pBS-PR1013 Cla

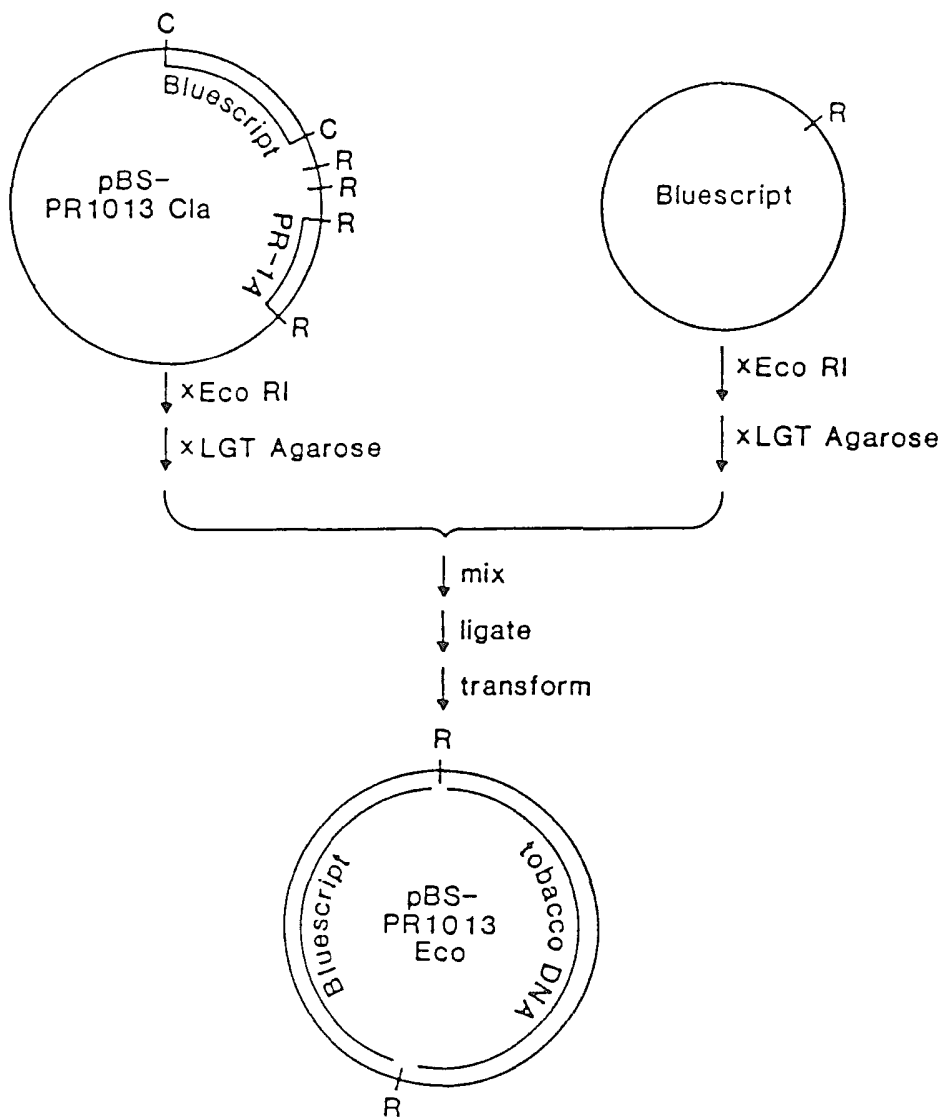


FIGURE 4

Construction of pBS-PR1013 Eco Δ Pst
From pBS -PR1013 Eco

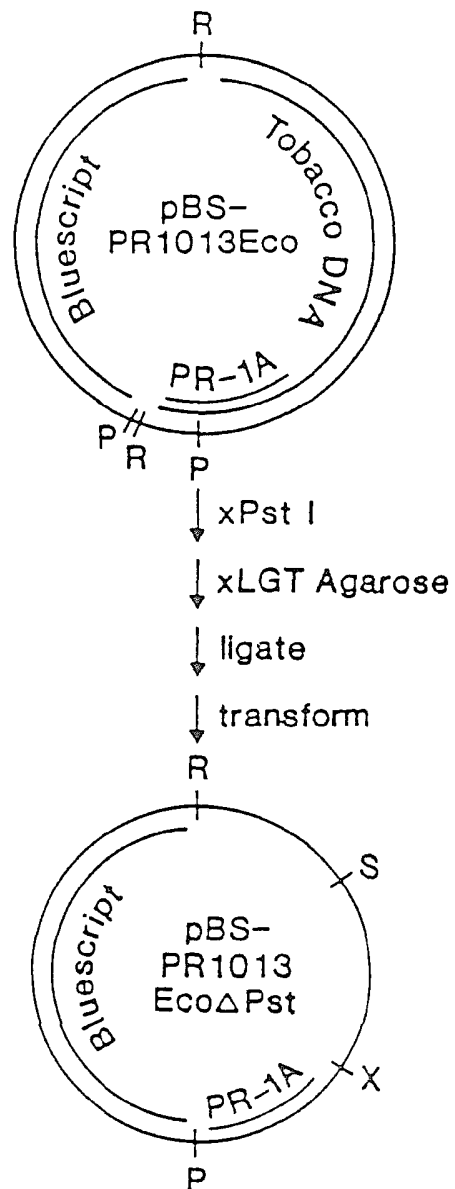


FIGURE 5

Construction of pBS-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho
From pBS-PR1013 Eco Δ Pst

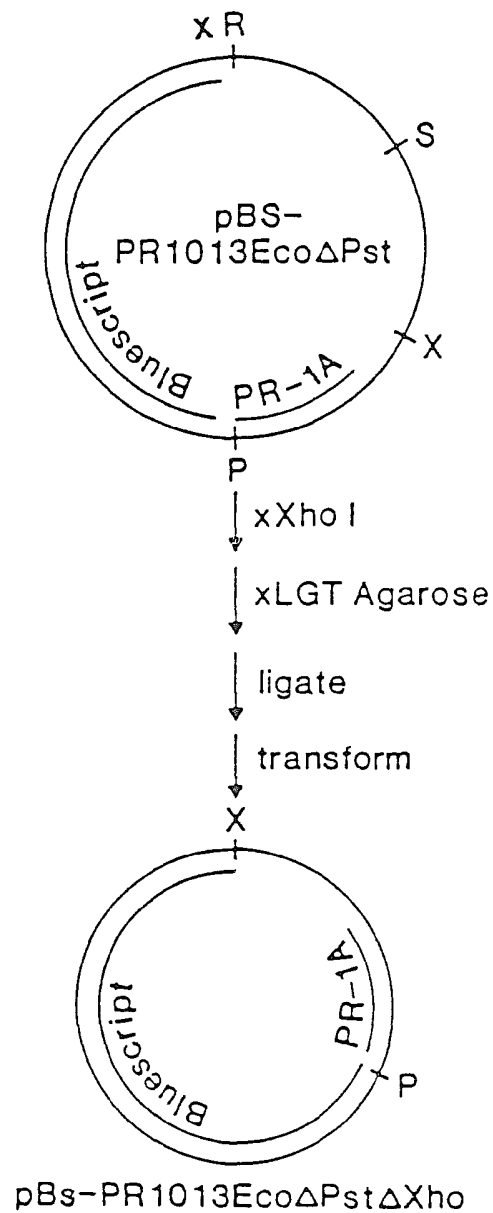


FIGURE 6

Construction of pCIB270

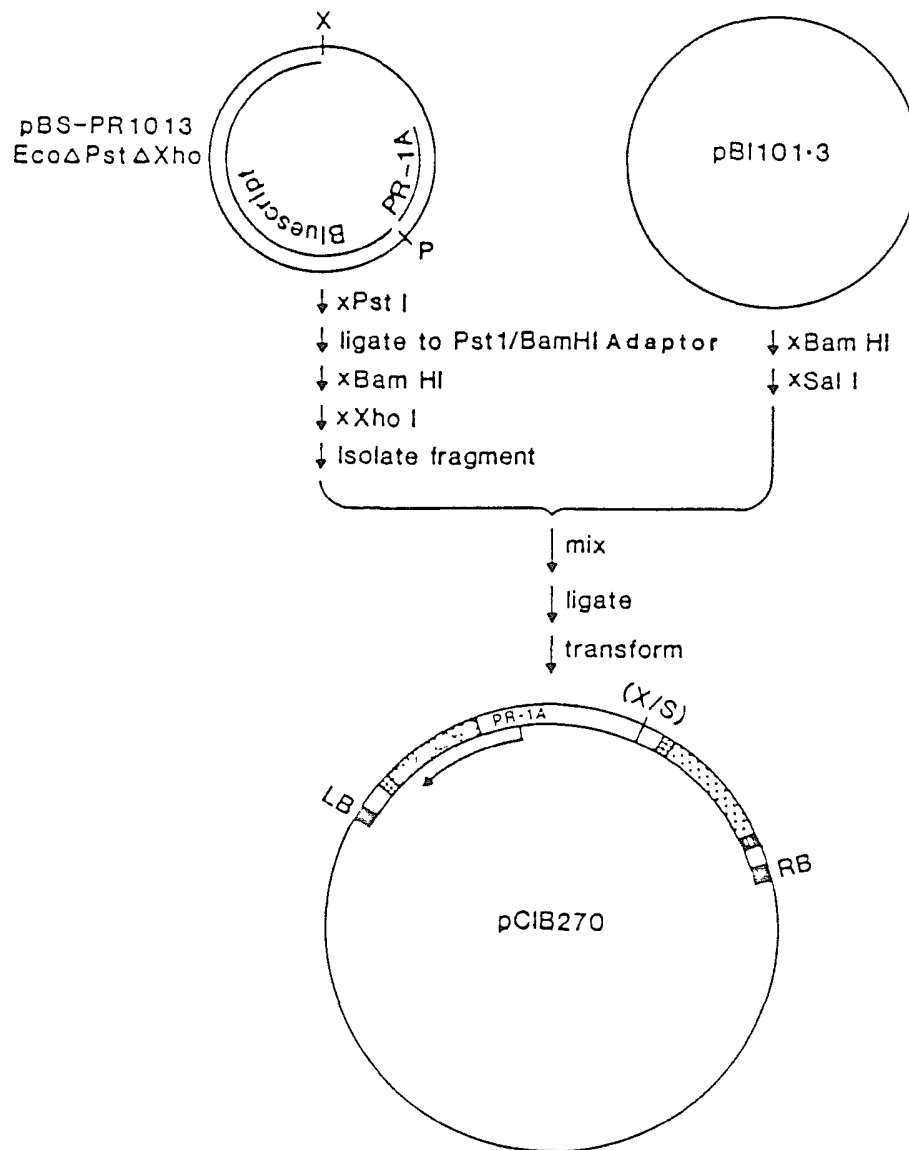


FIGURE 7

Construction of M13 mp18-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho
and M13mp19-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho

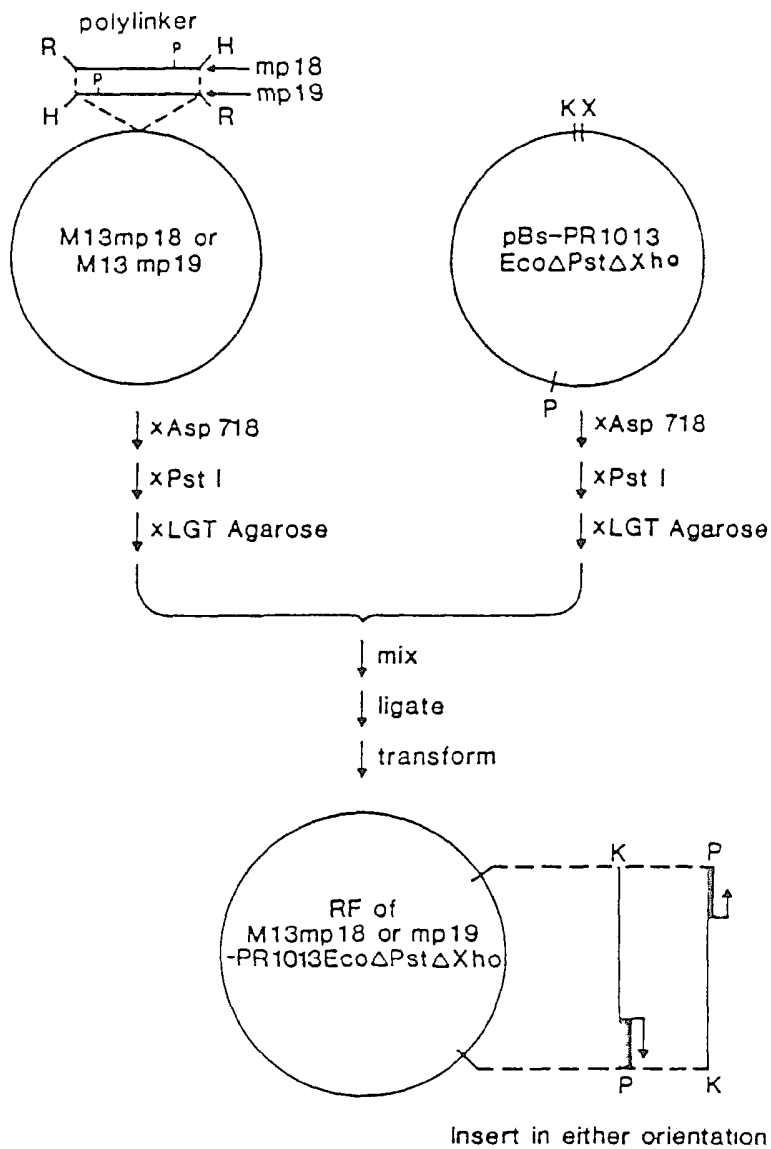


FIGURE 8

Conversion of ATG to Nco I Site

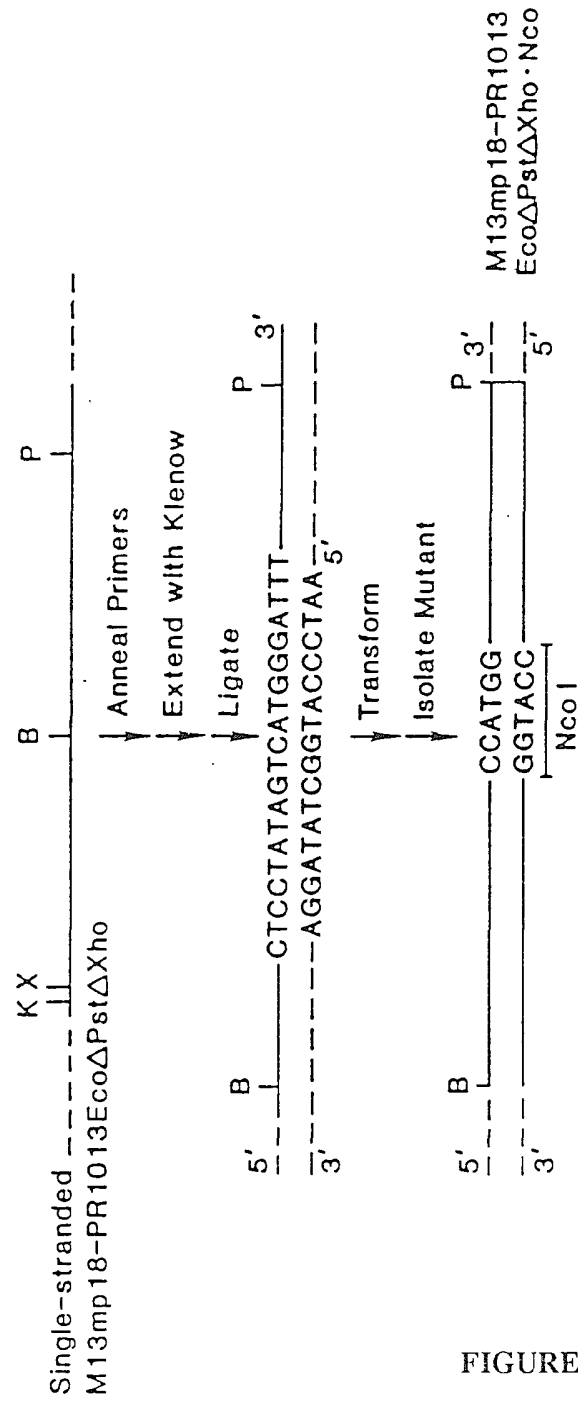


FIGURE 9

Construction of pCIB268

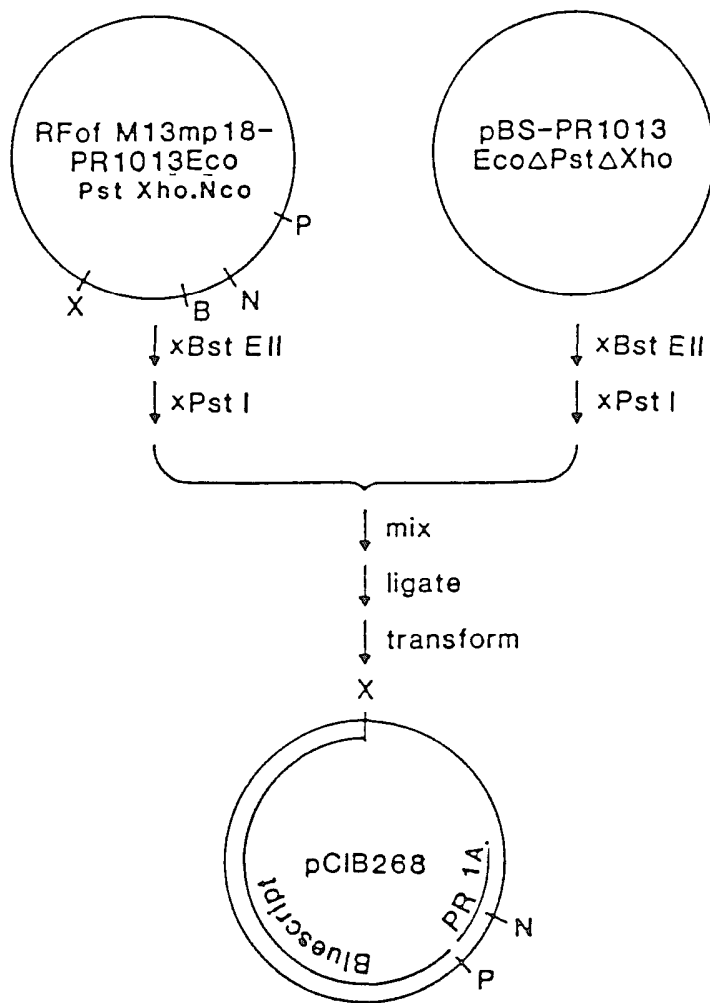


FIGURE 10

Construction of pCIB269

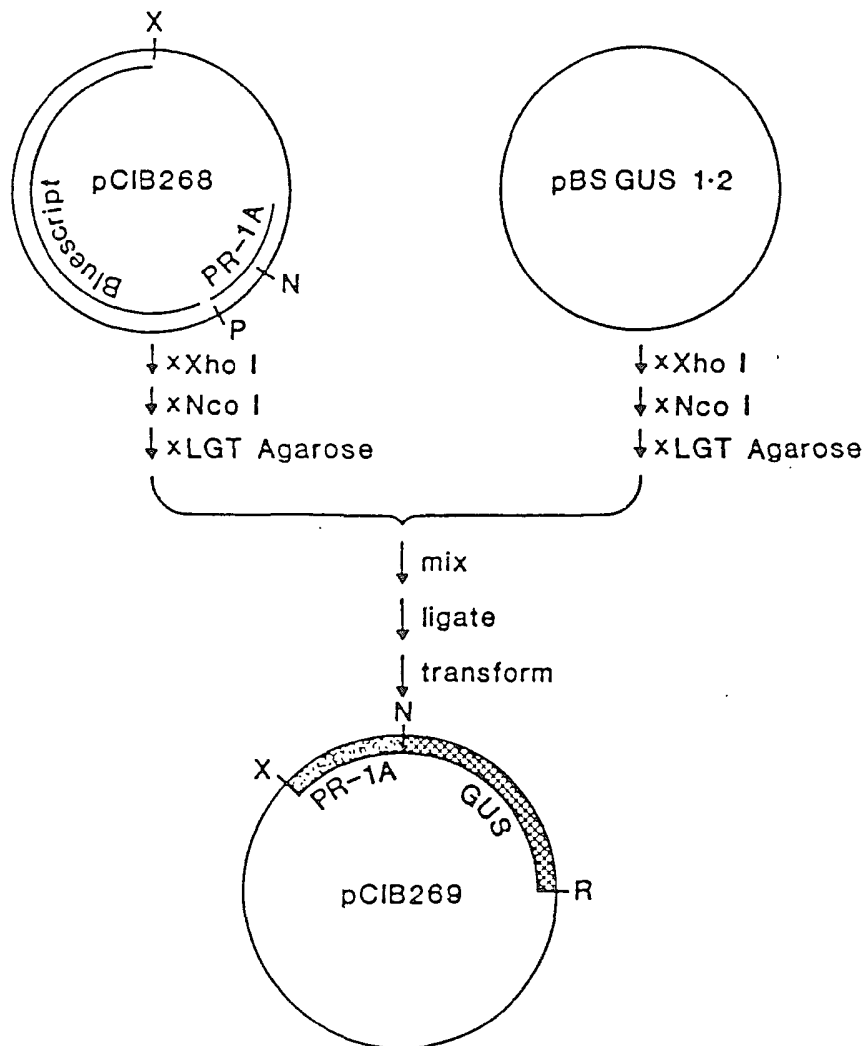


FIGURE 11

Construction of pBS GUS 1-2

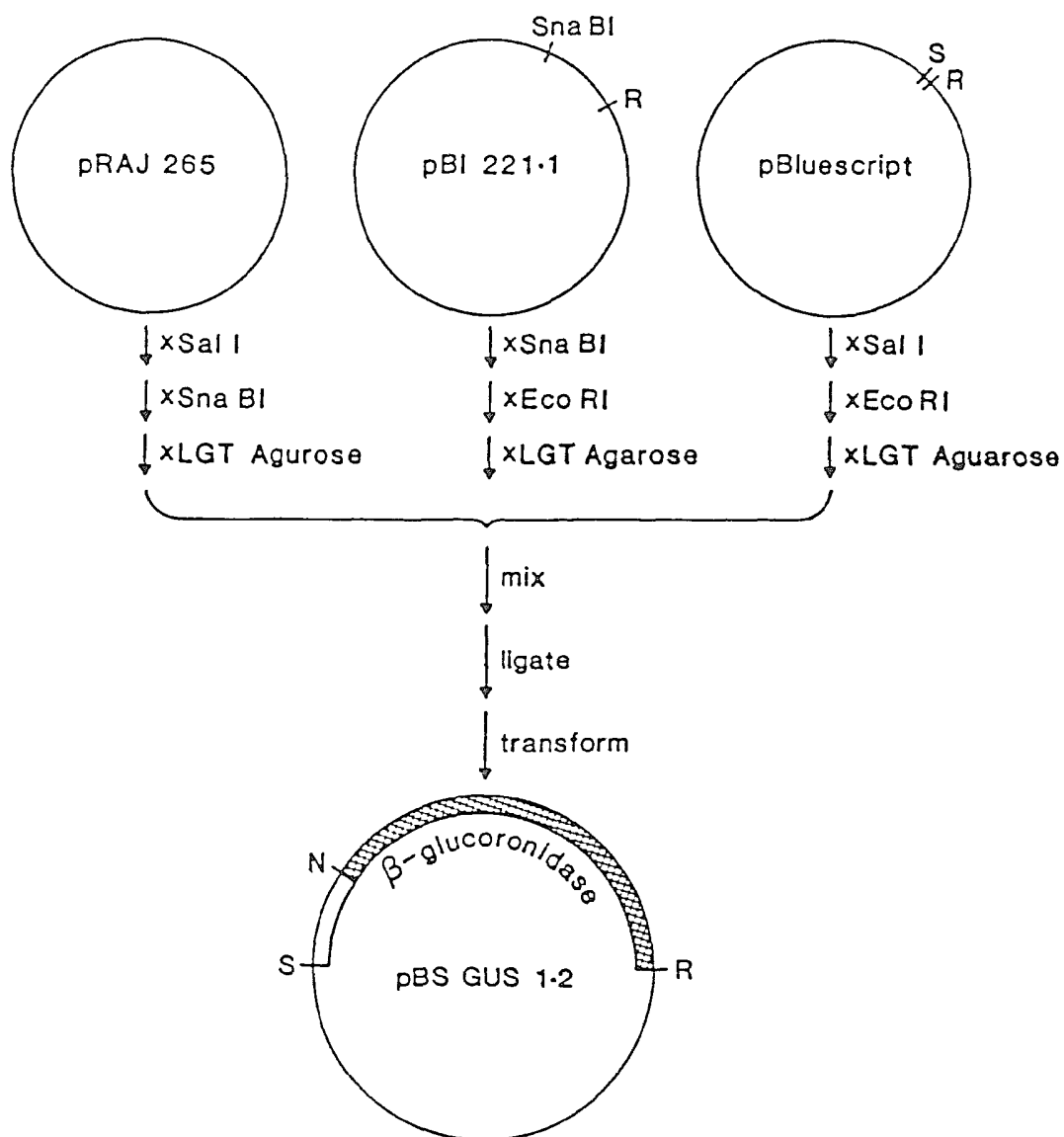


FIGURE 12

Construction of pCIB271

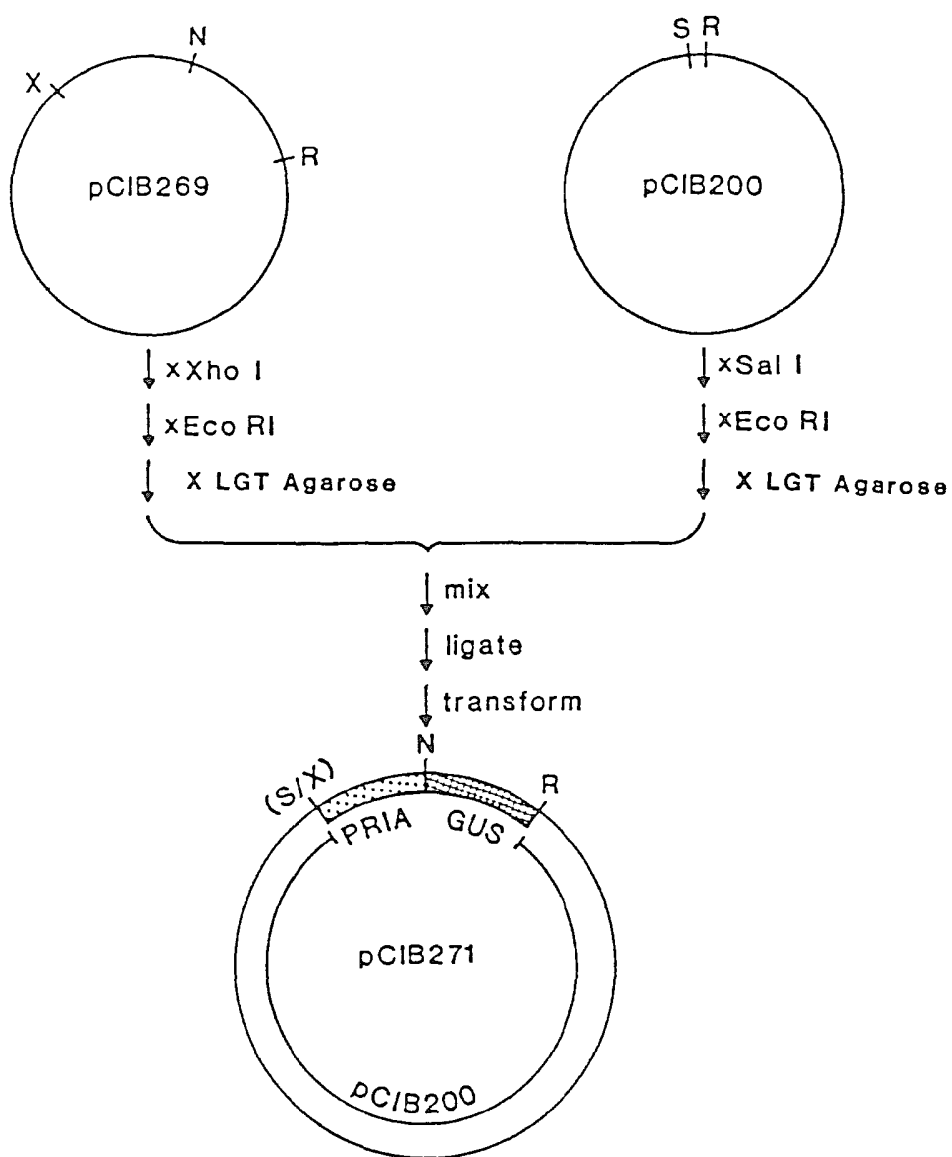


FIGURE 13

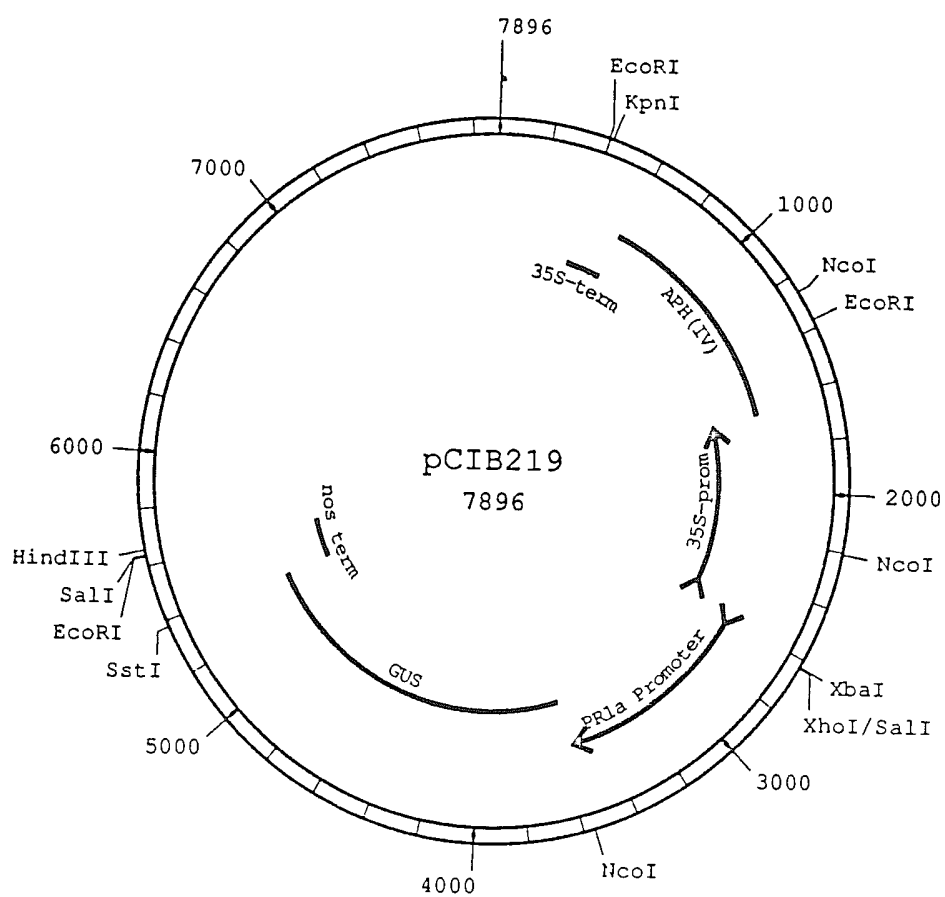


FIGURE 14

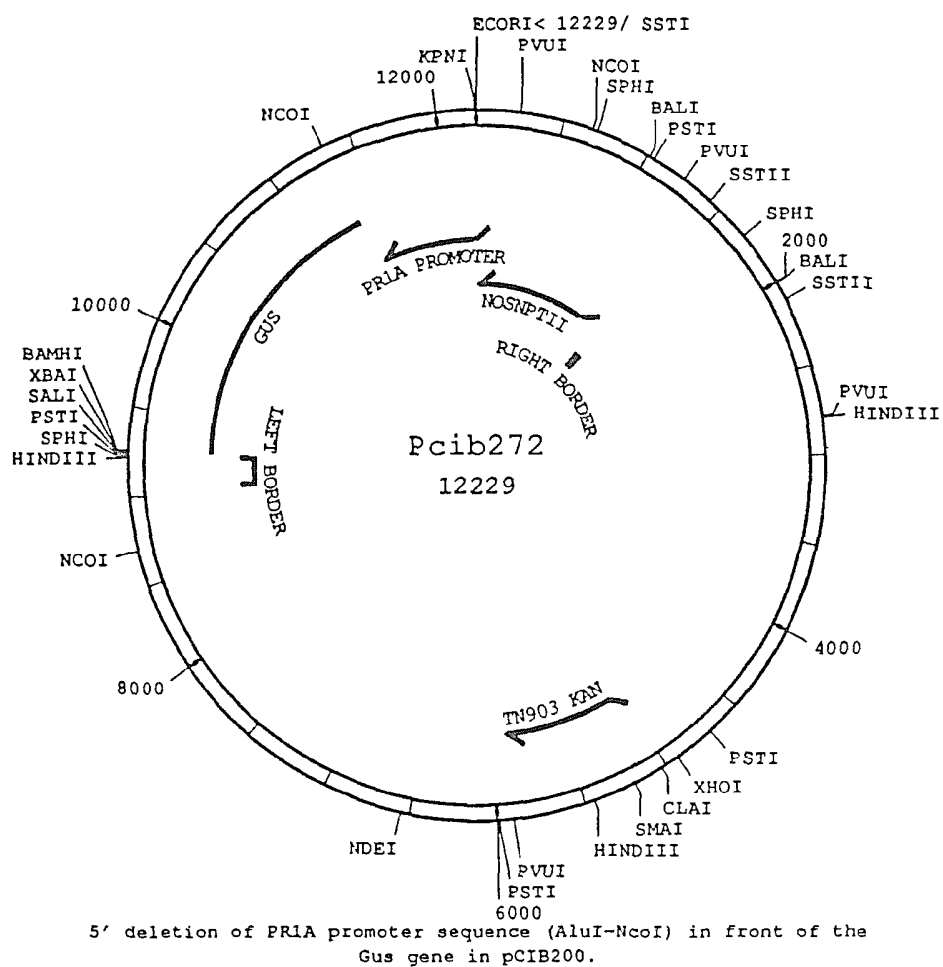


FIGURE 15

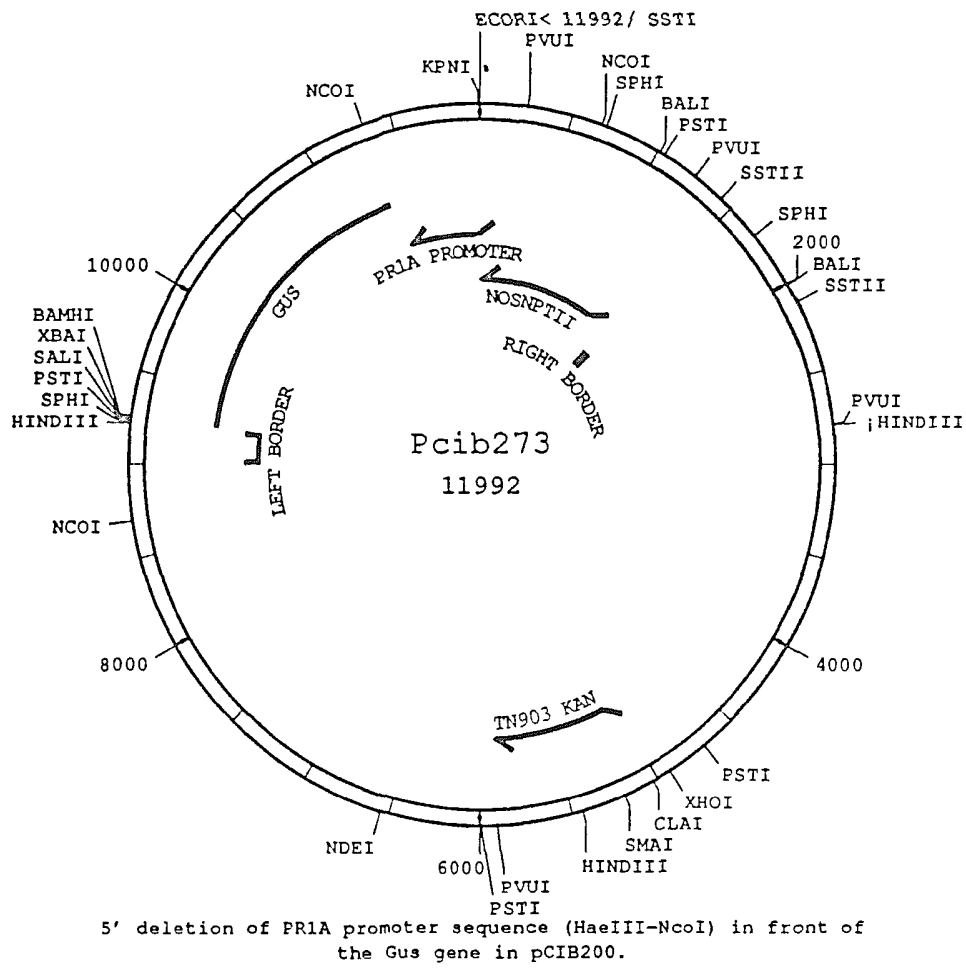


FIGURE 16

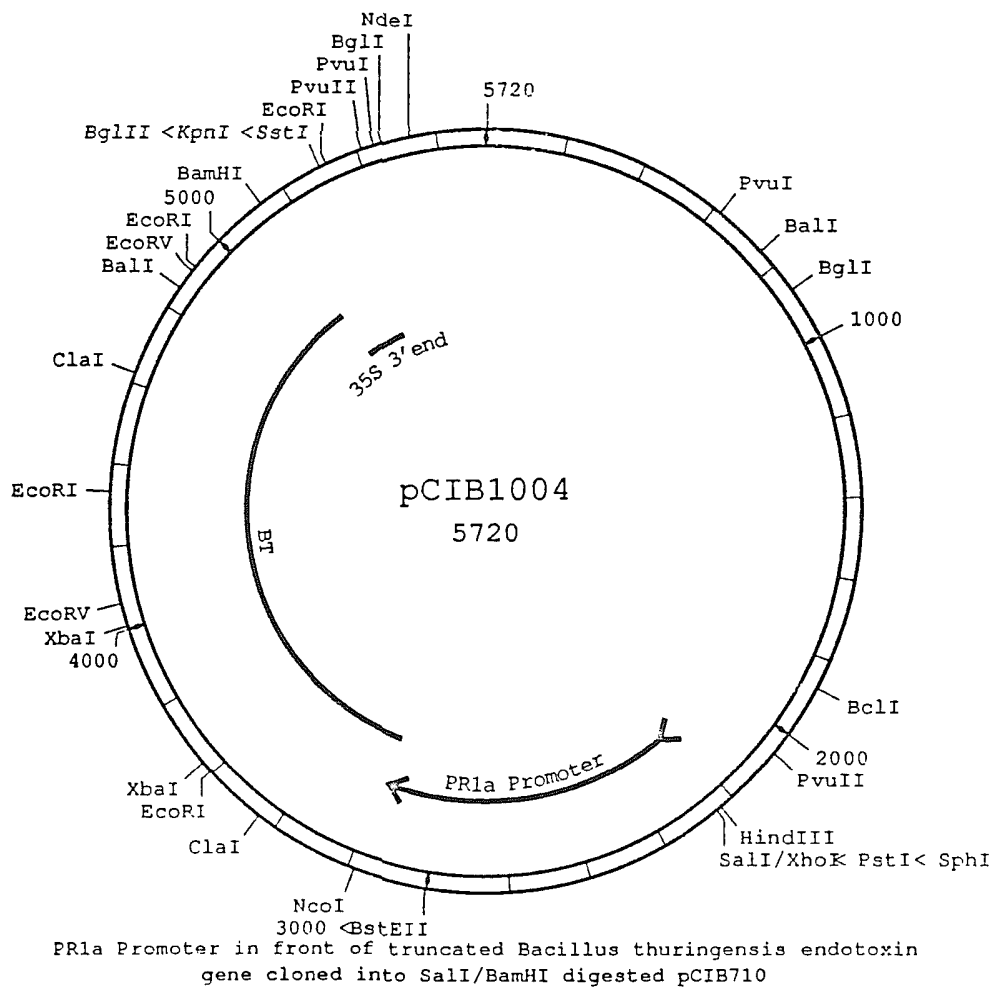


FIGURE 17

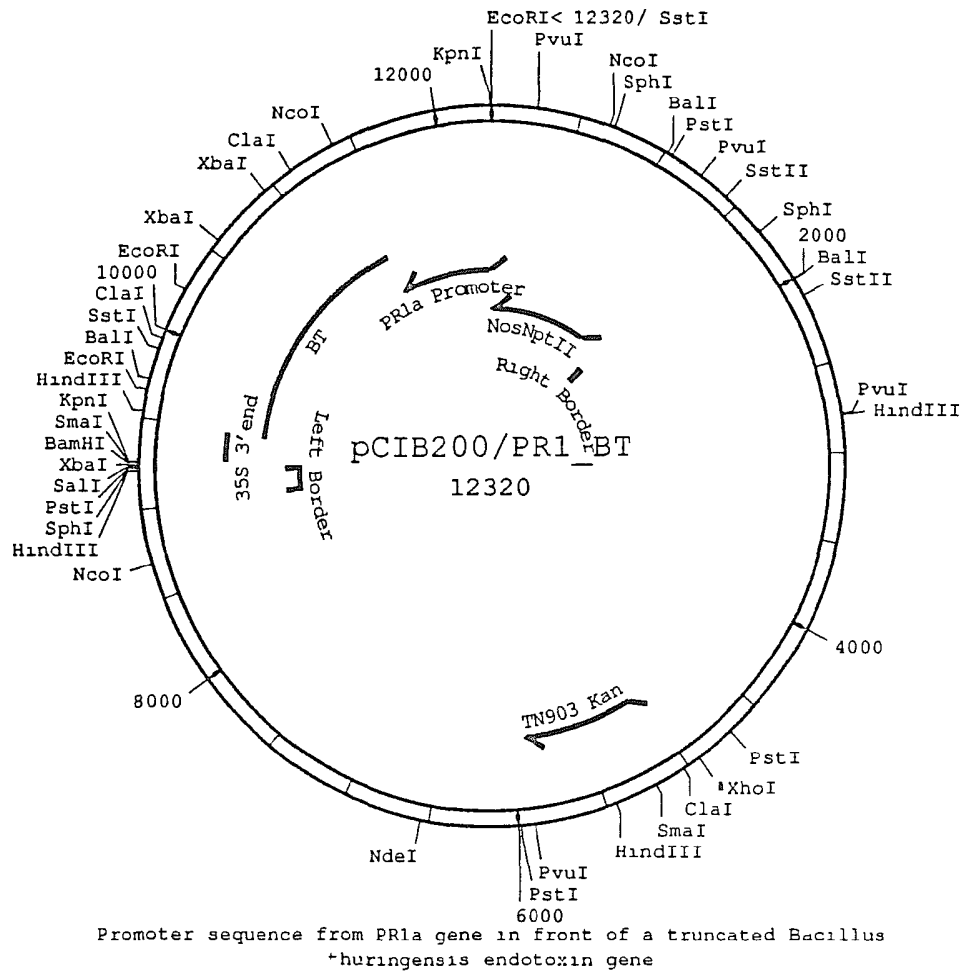


FIGURE 18

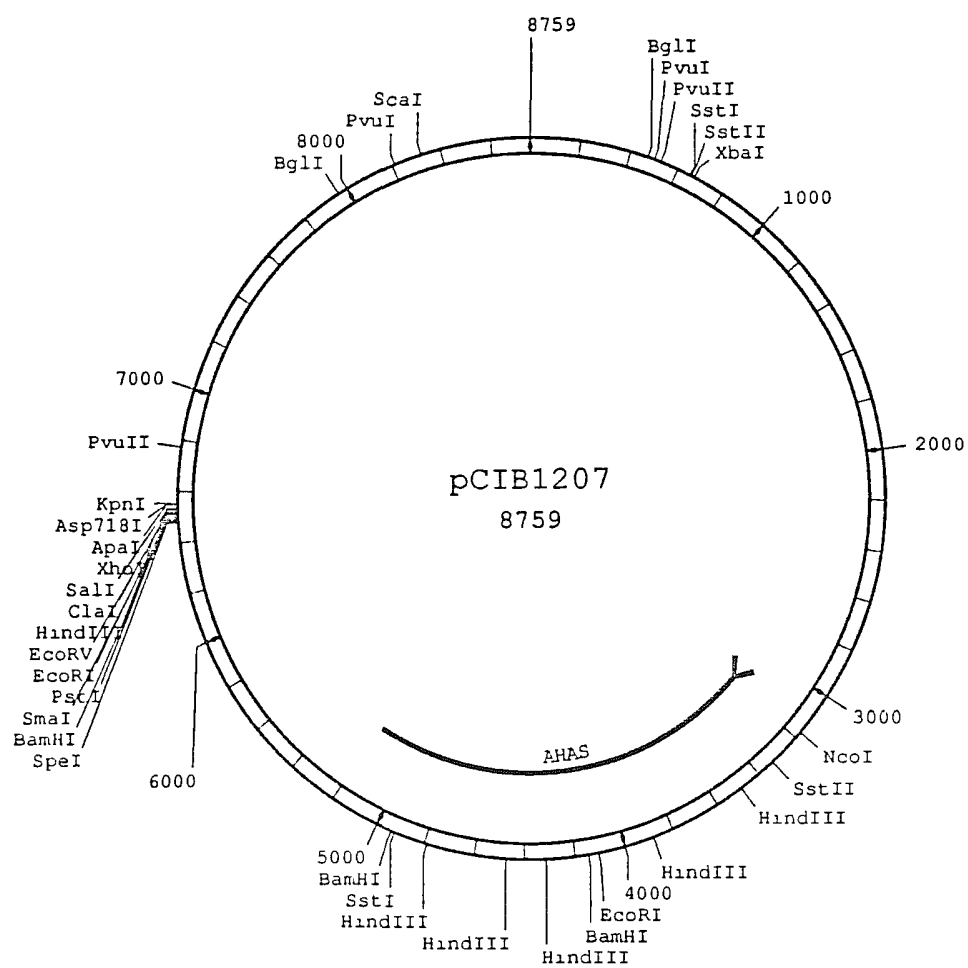


FIGURE 19

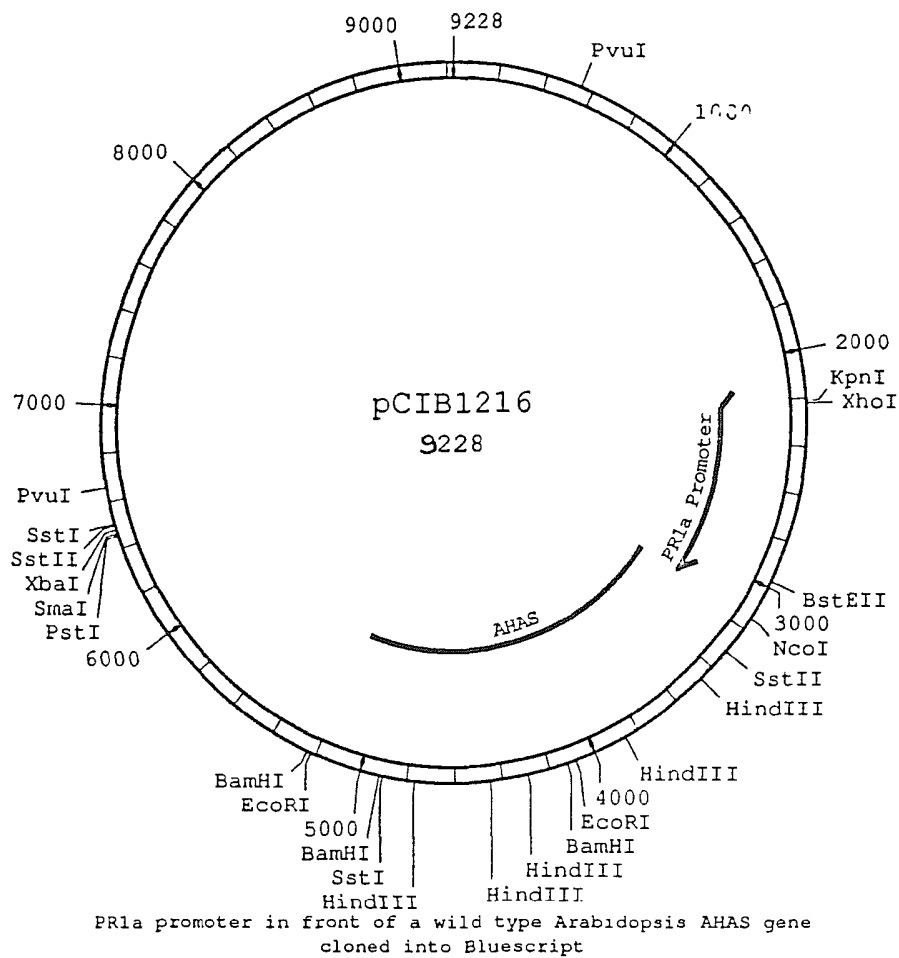


FIGURE 20

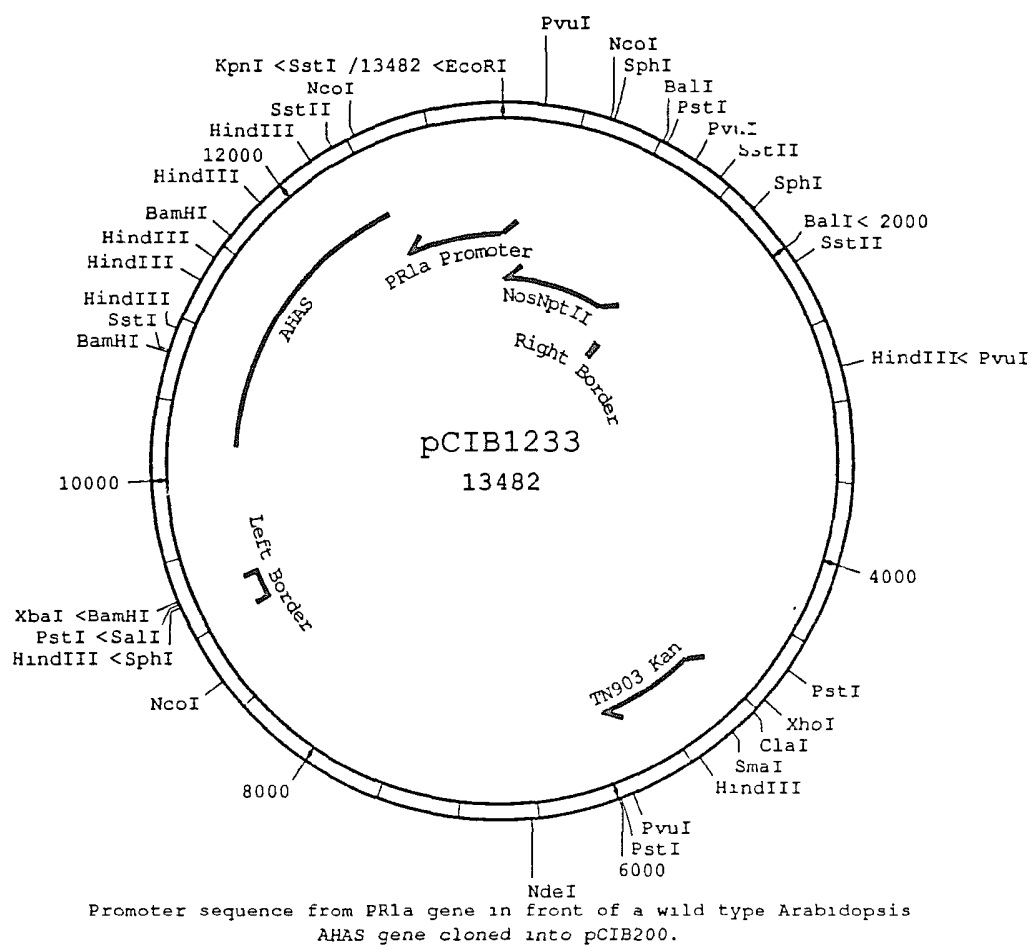


FIGURE 21

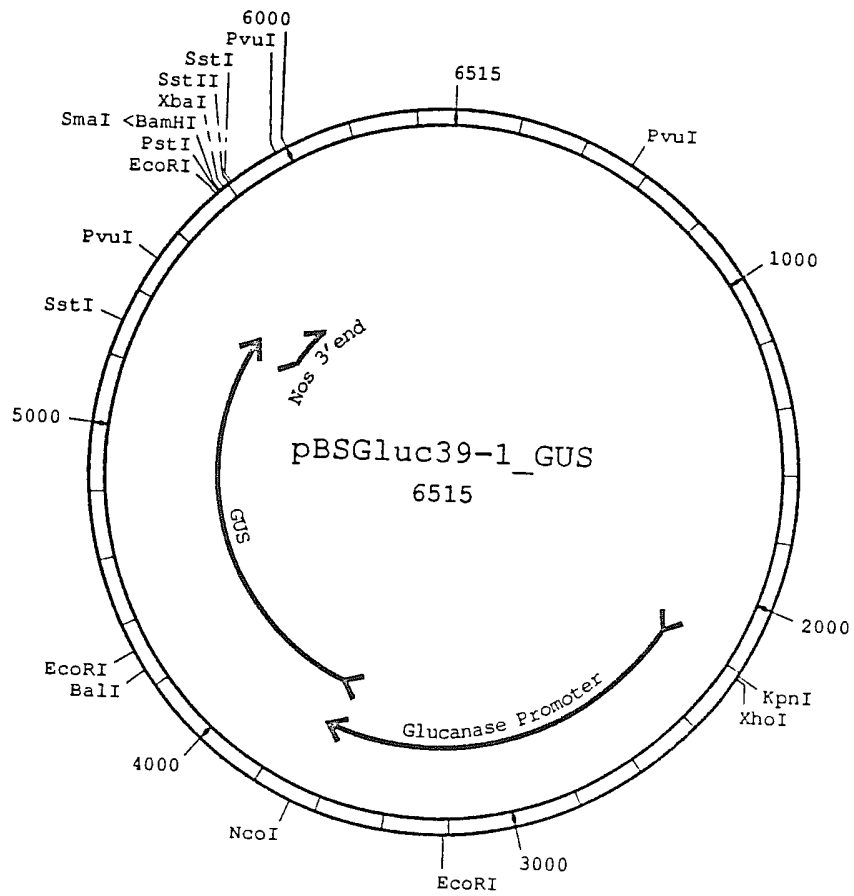


FIGURE 22

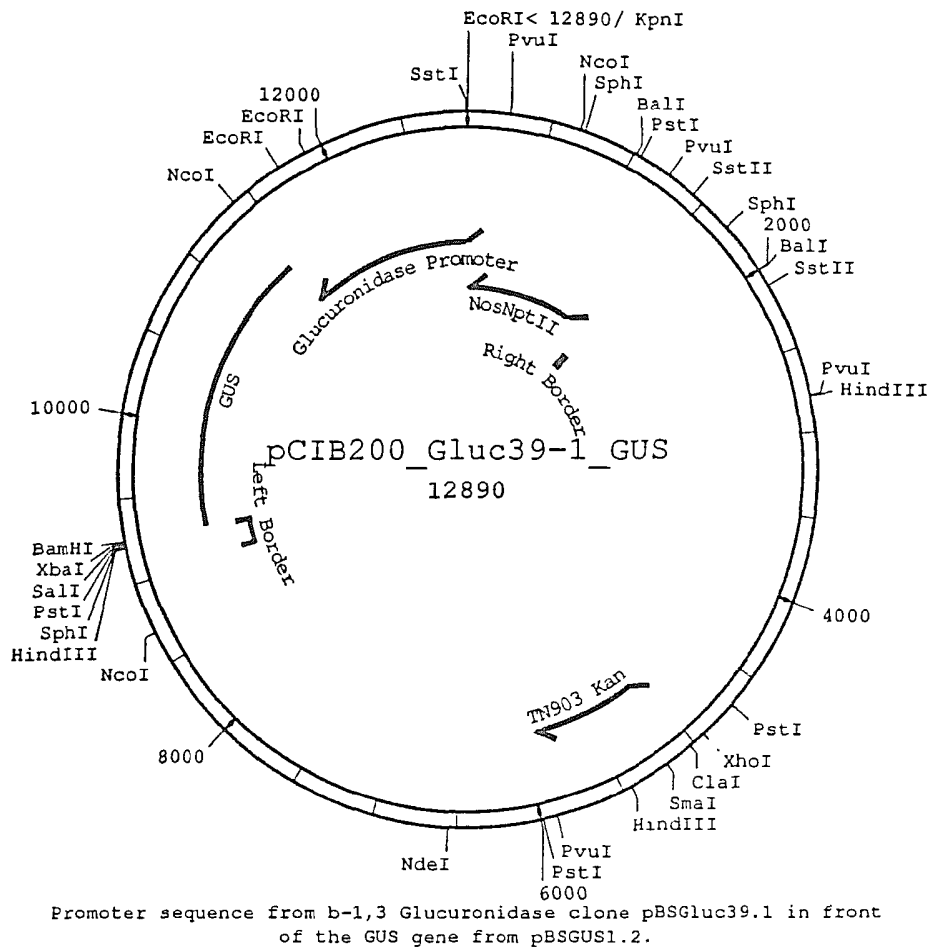


FIGURE 23

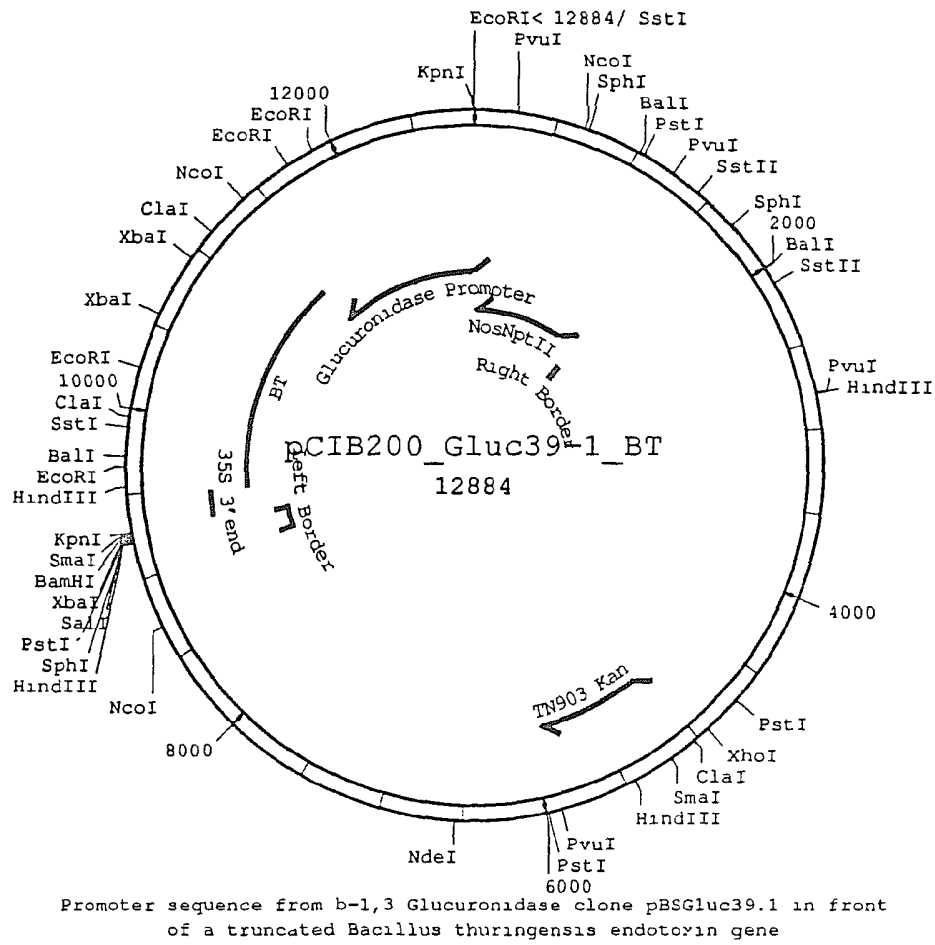


FIGURE 24

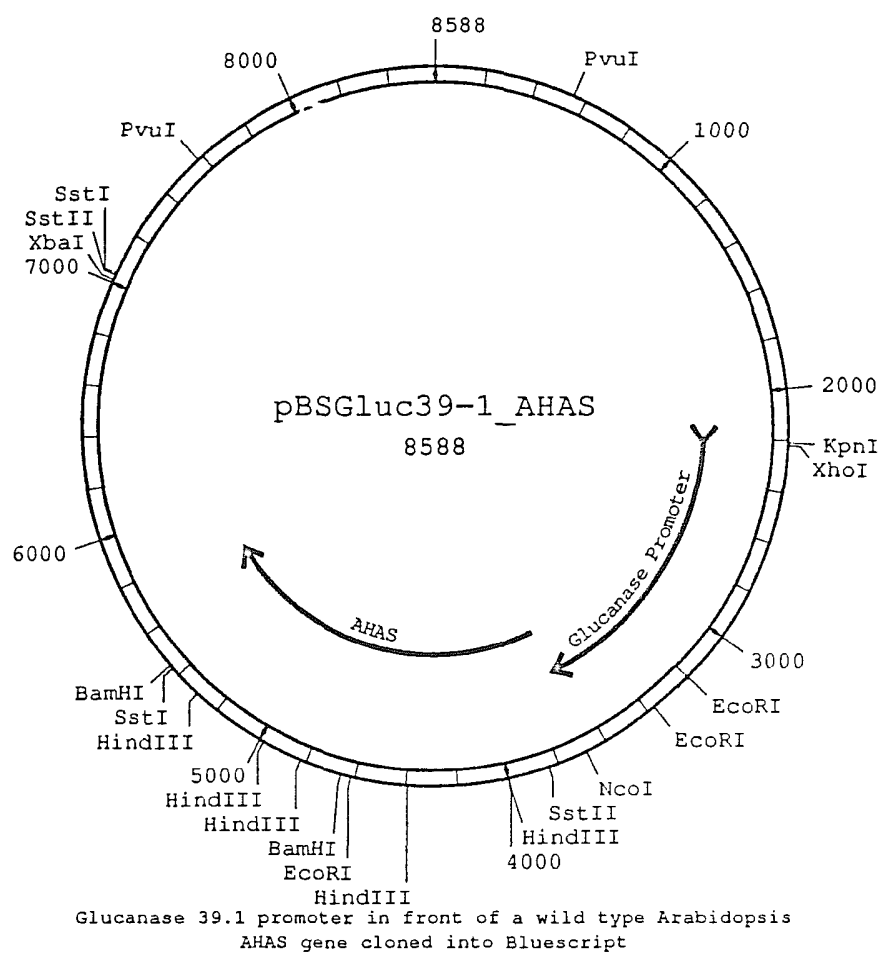


FIGURE 25

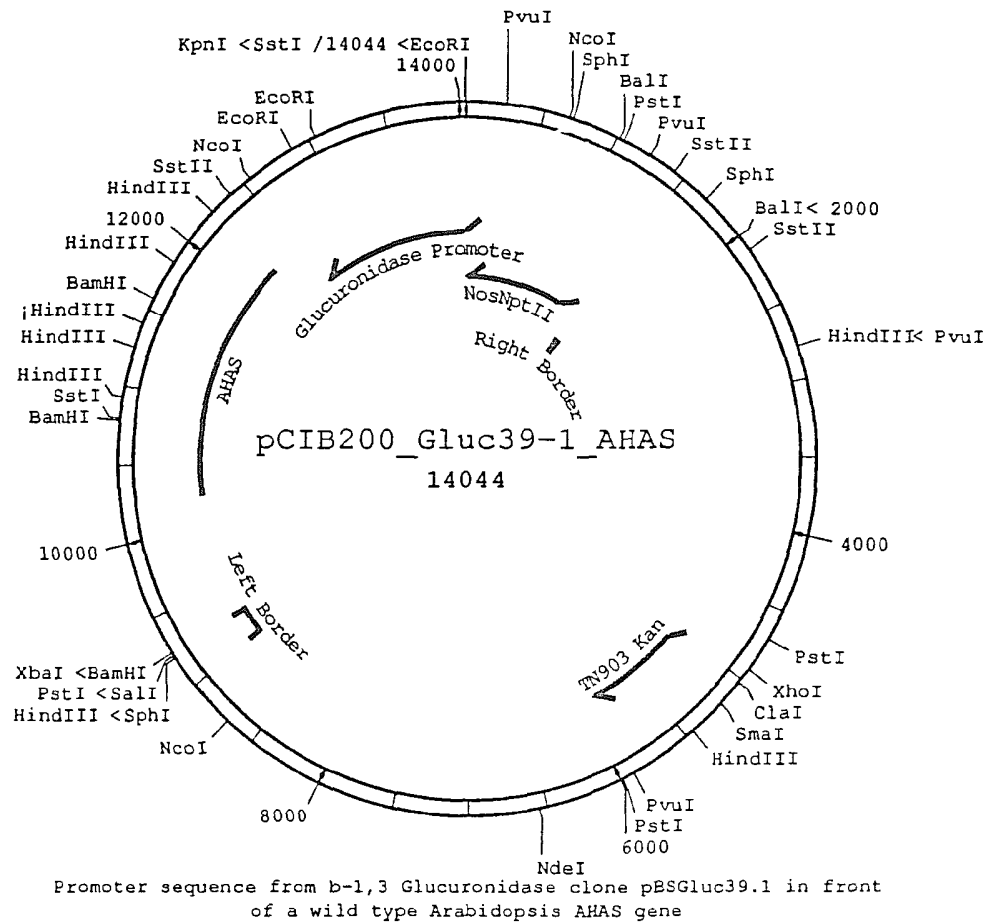


FIGURE 26

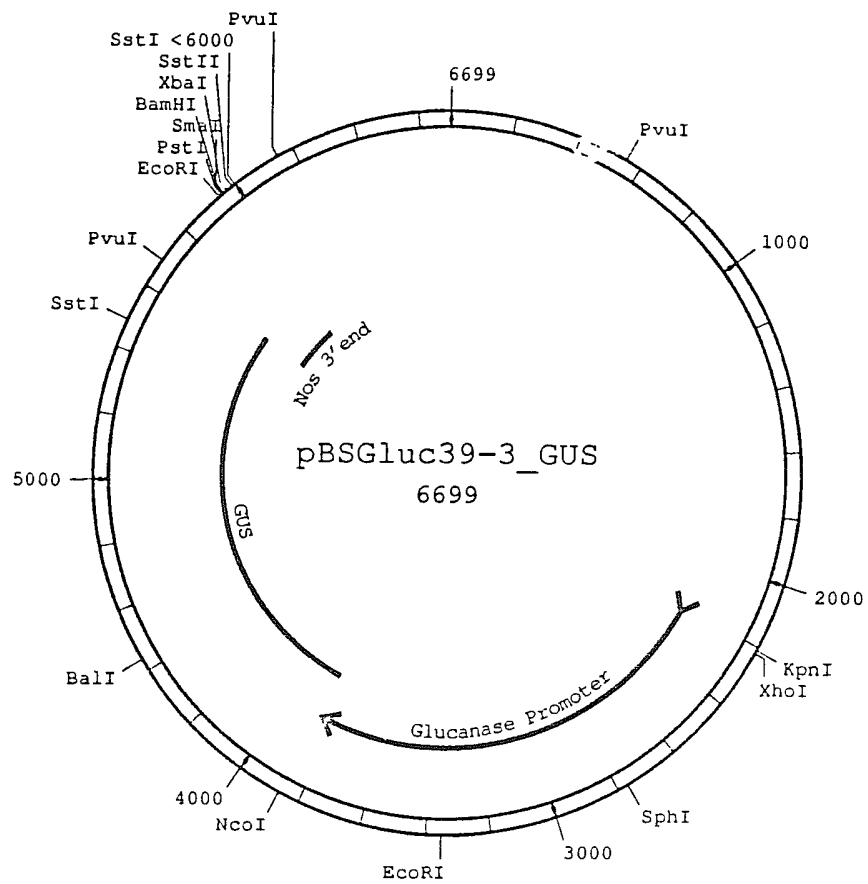


FIGURE 27

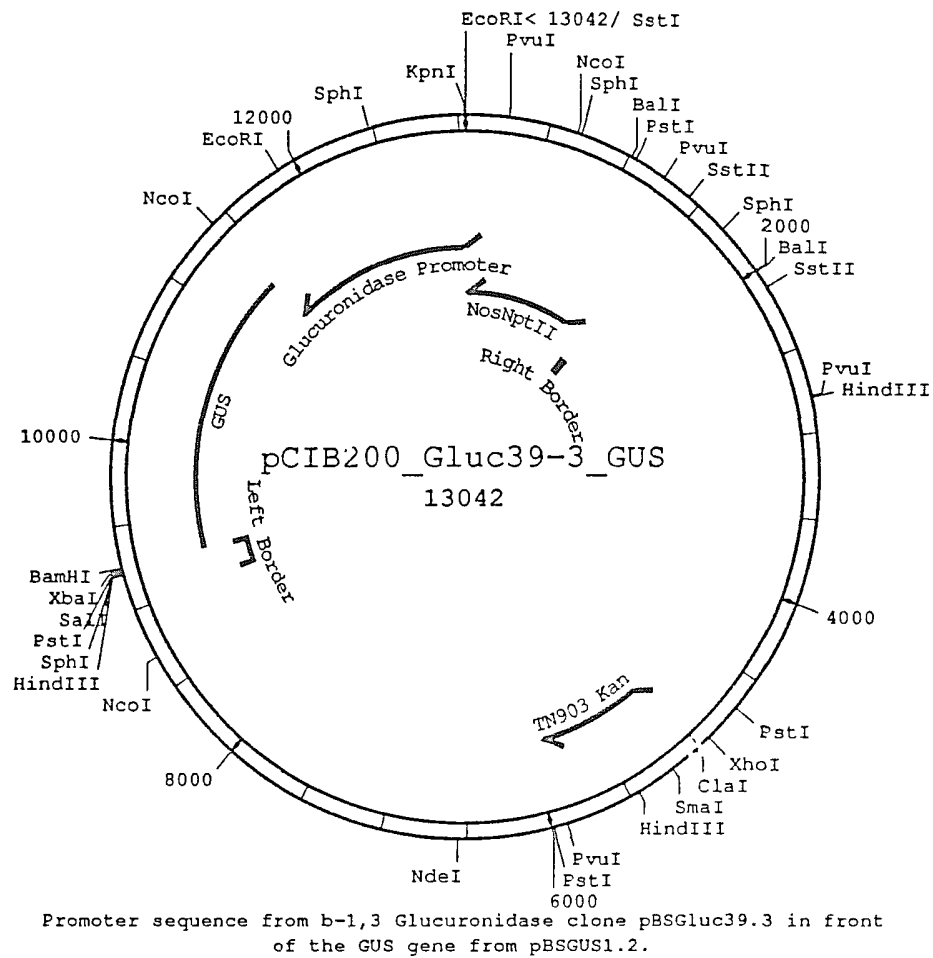
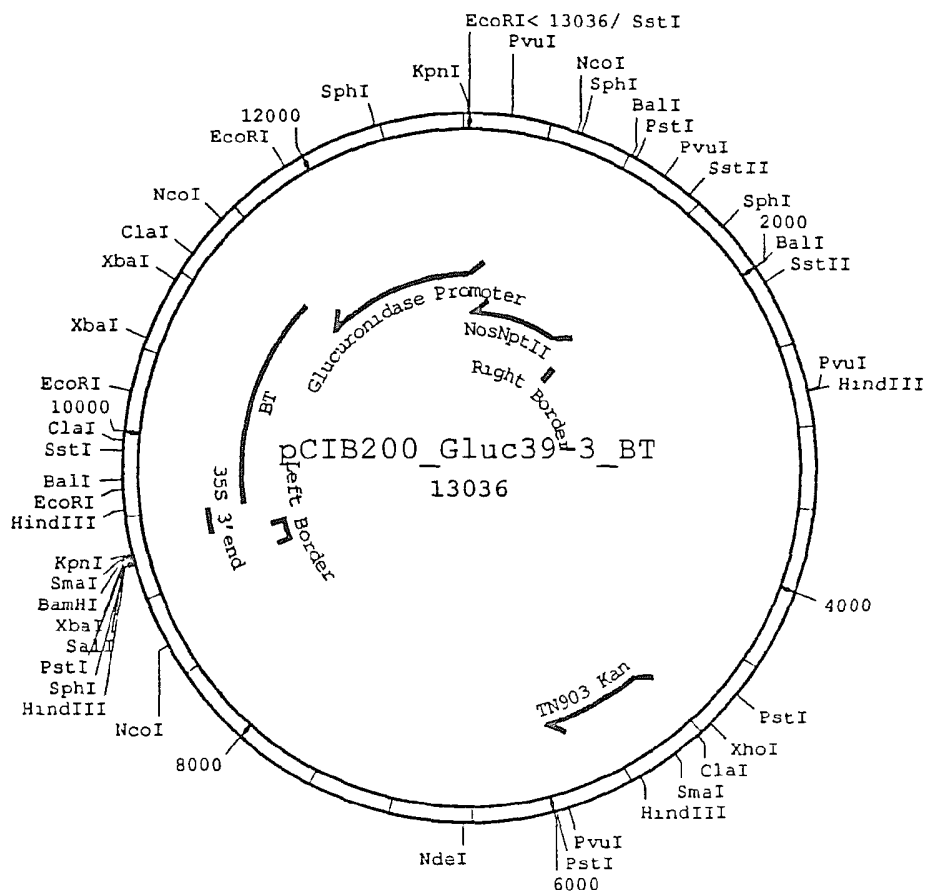


FIGURE 28



Promoter sequence from b-1,3 Glucuronidase clone pBSGluc39.3 in front of a truncated *Bacillus thuringiensis* endotoxin gene

FIGURE 29

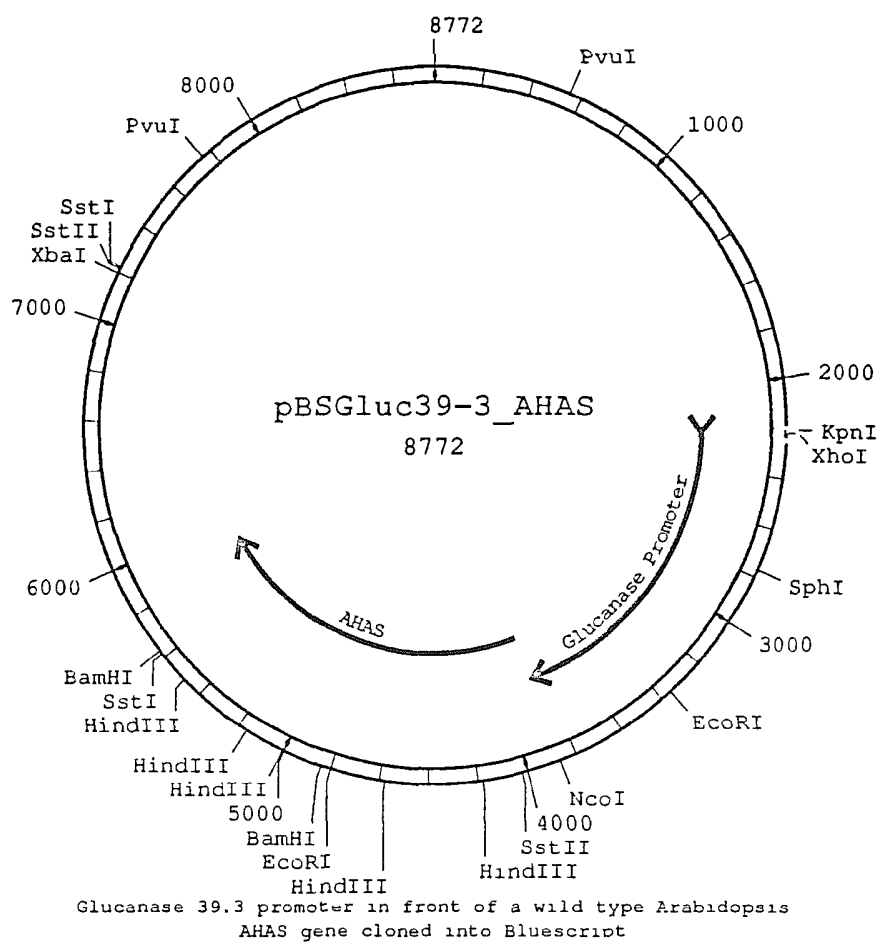


FIGURE 30

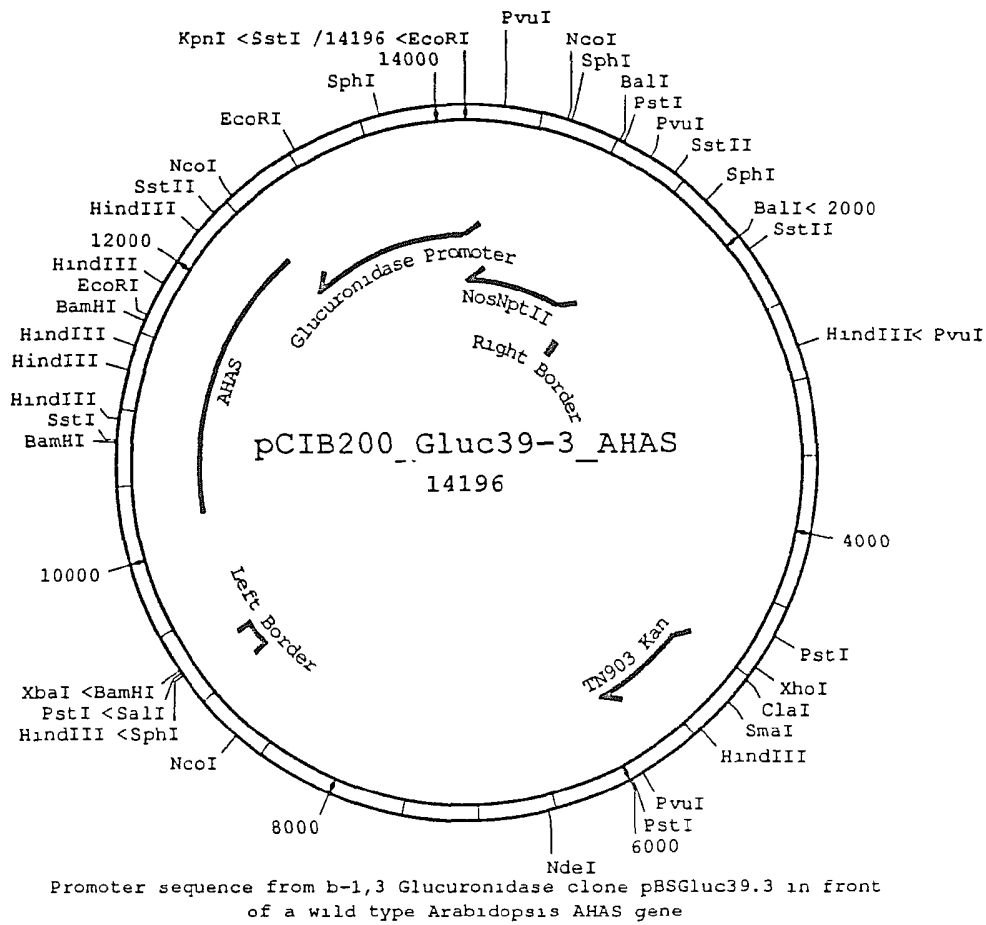


FIGURE 31

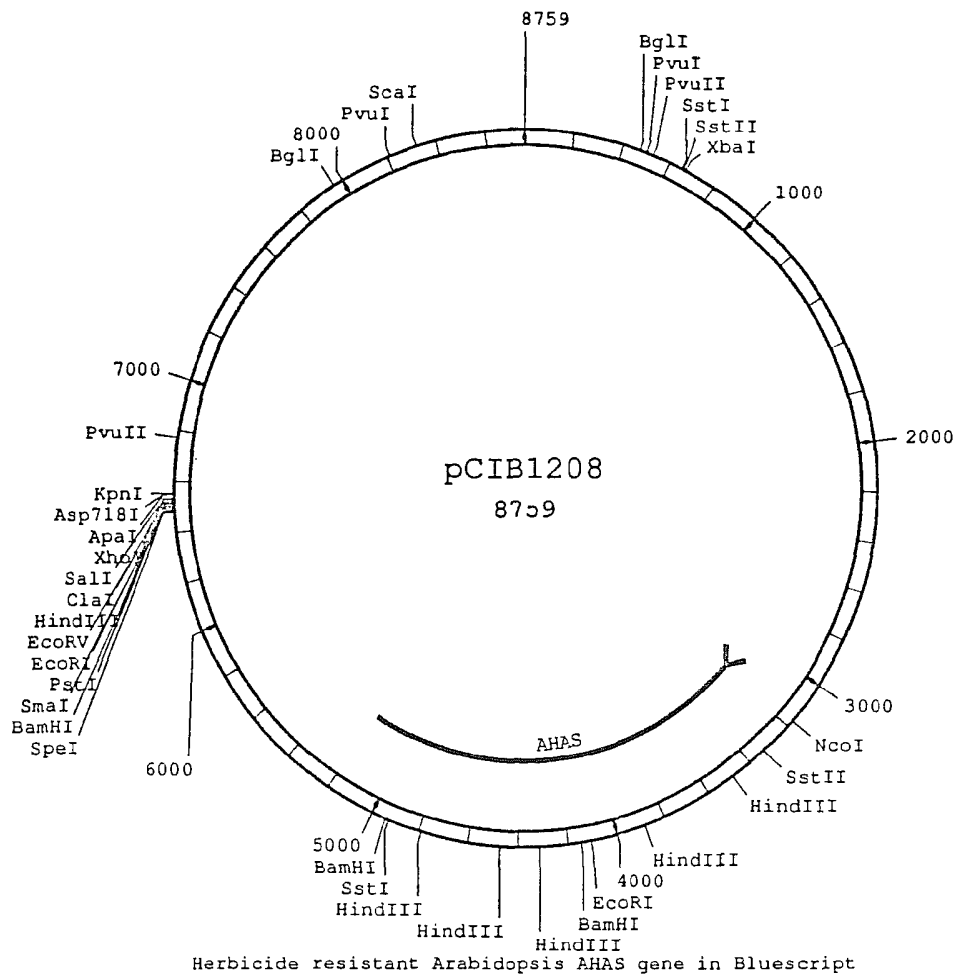


FIGURE 32

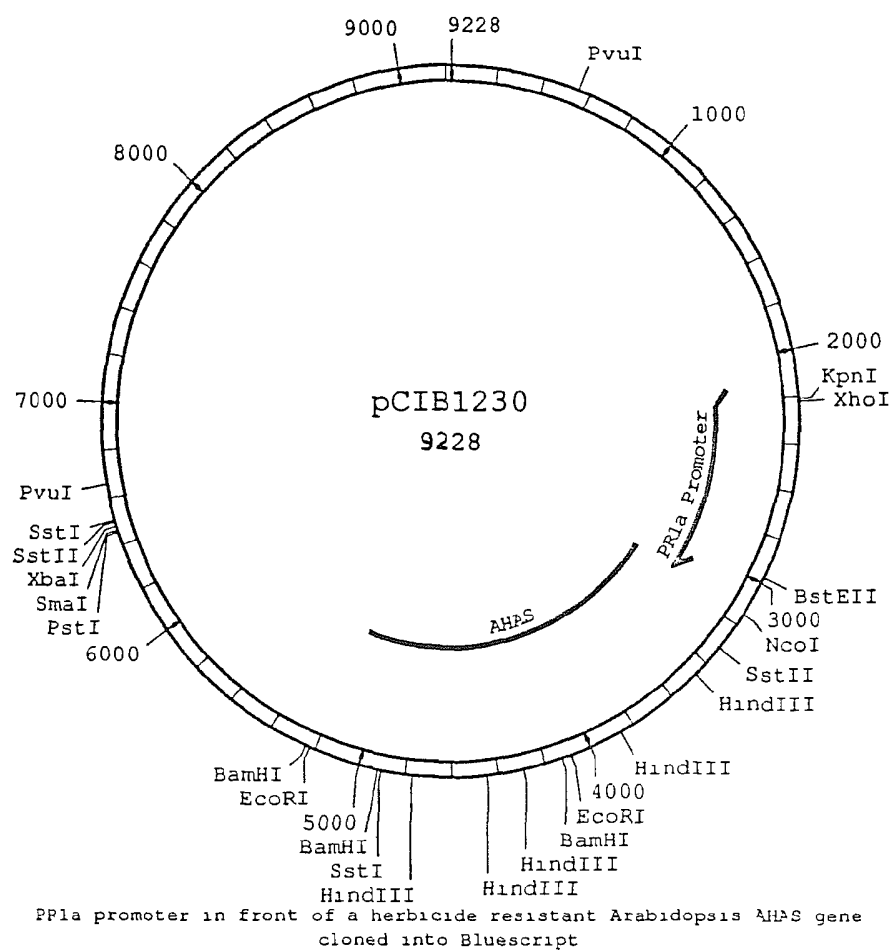
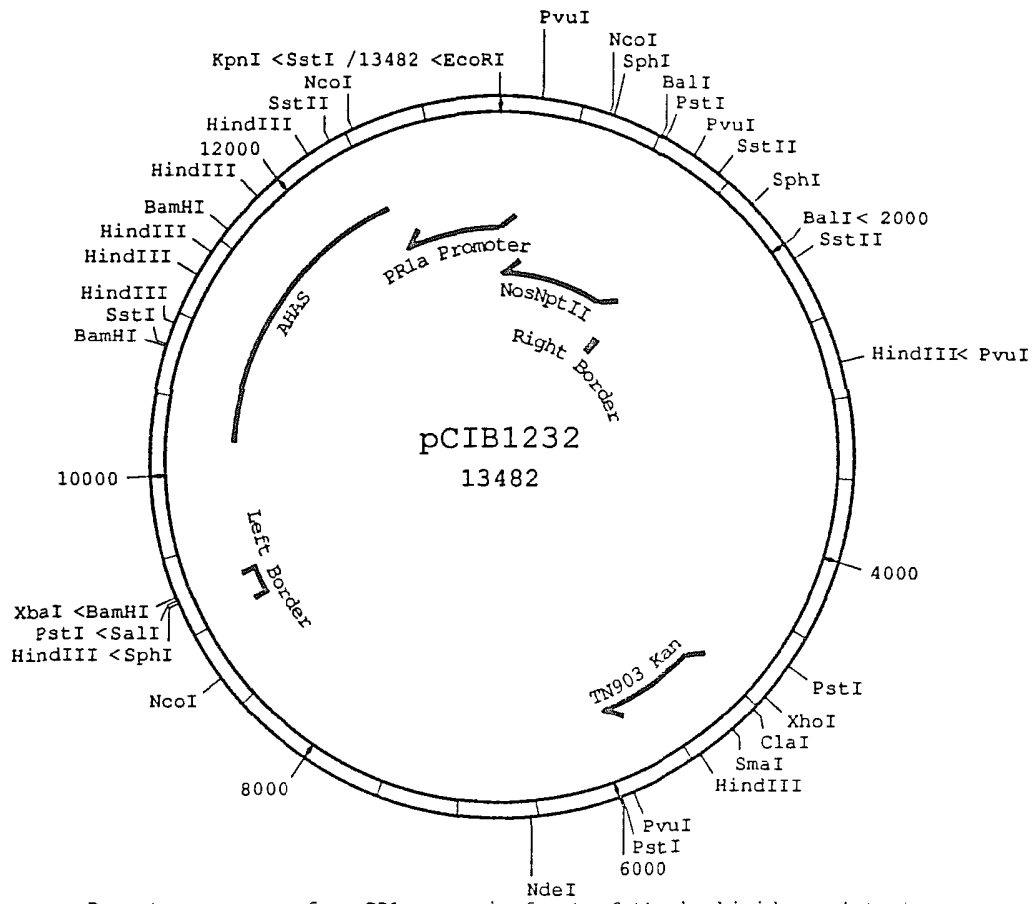


FIGURE 33



Promoter sequence from PR1a gene in front of the herbicide resistant Arabidopsis AHAS gene cloned into pCIB200.

FIGURE 34

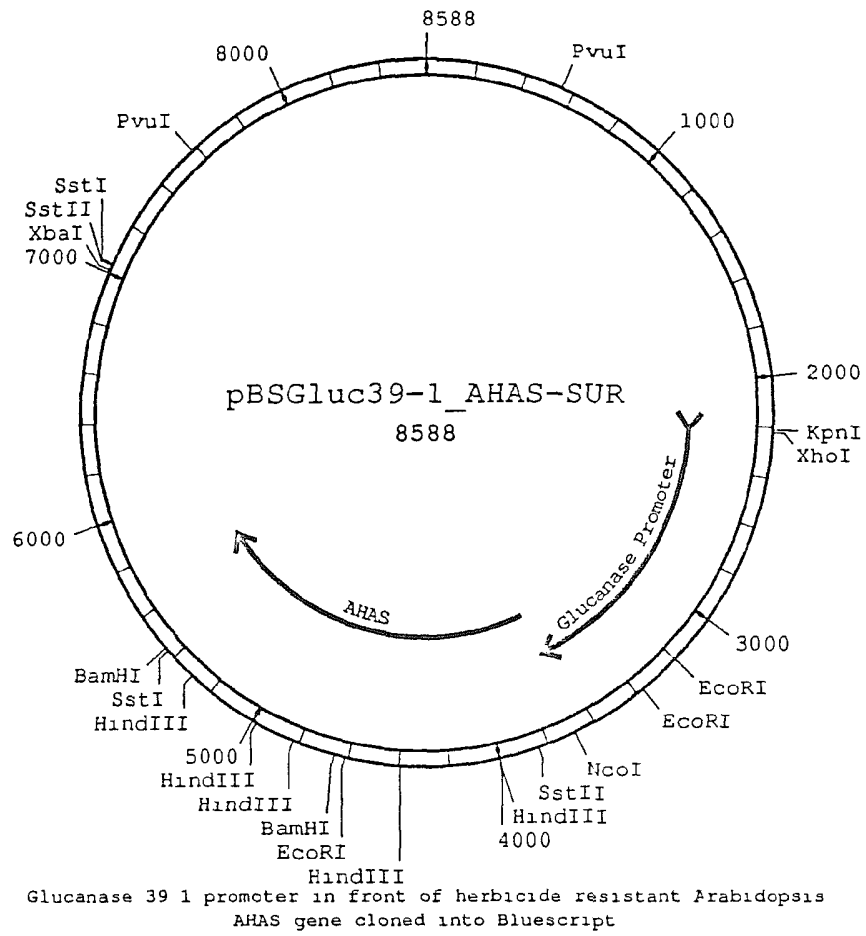


FIGURE 35

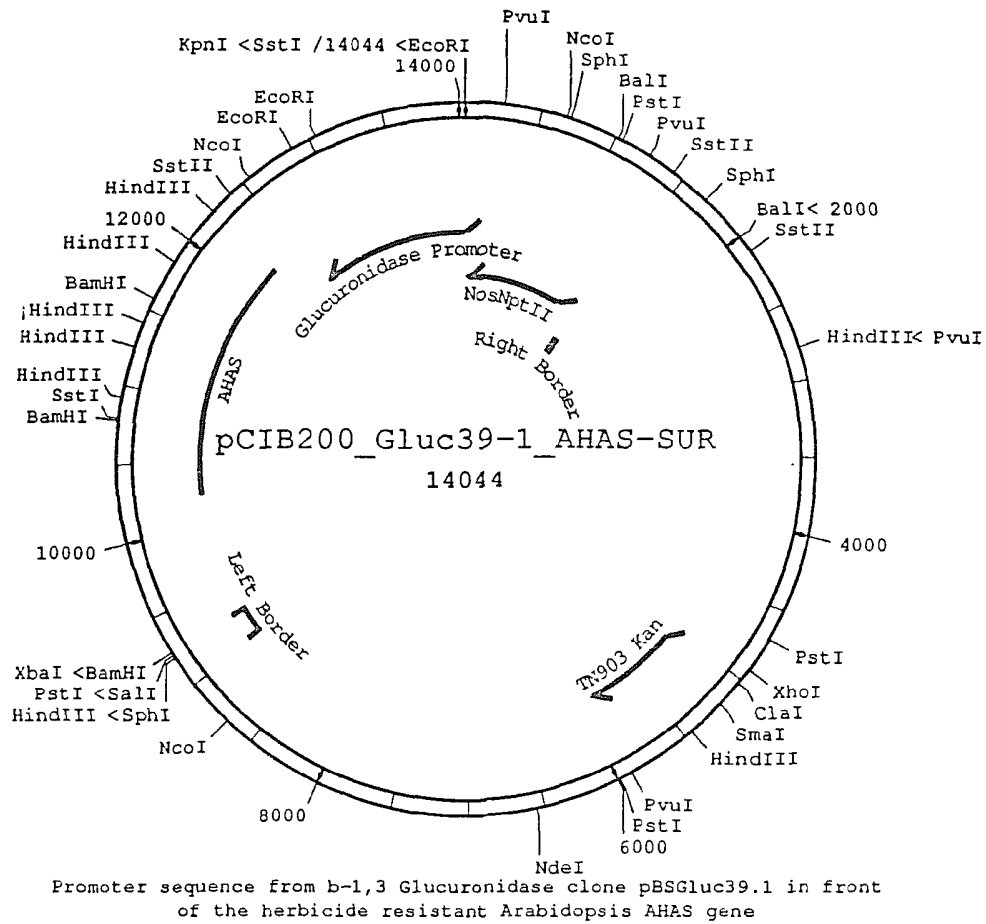


FIGURE 36

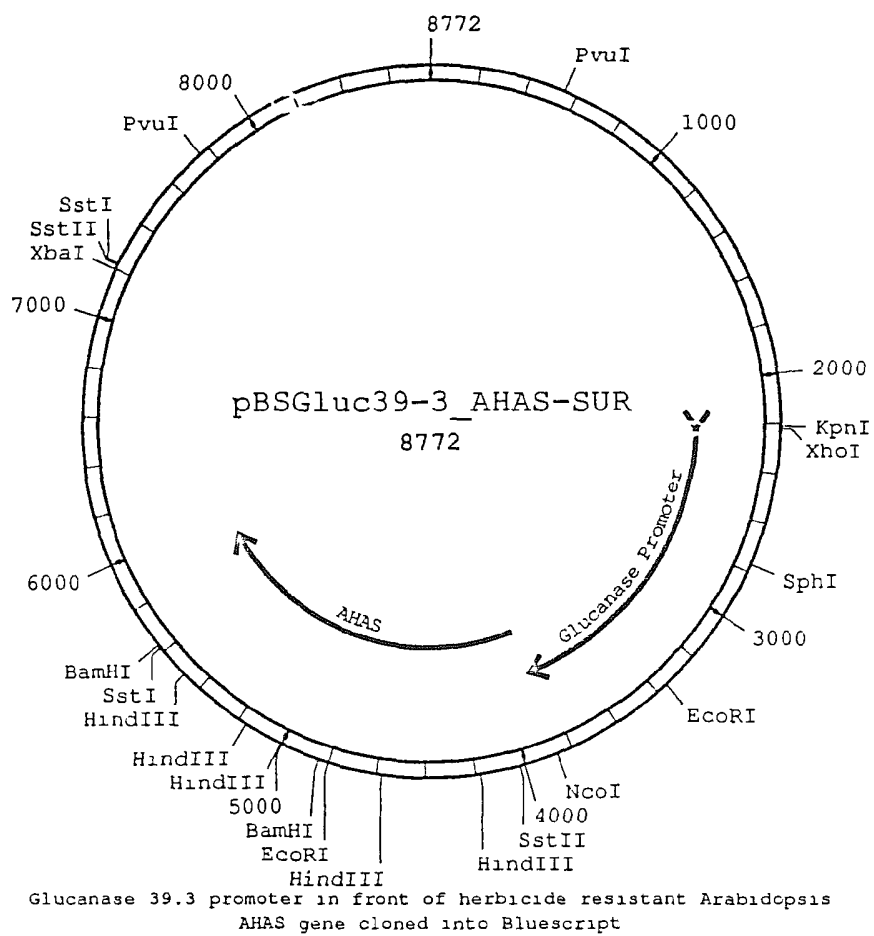


FIGURE 37

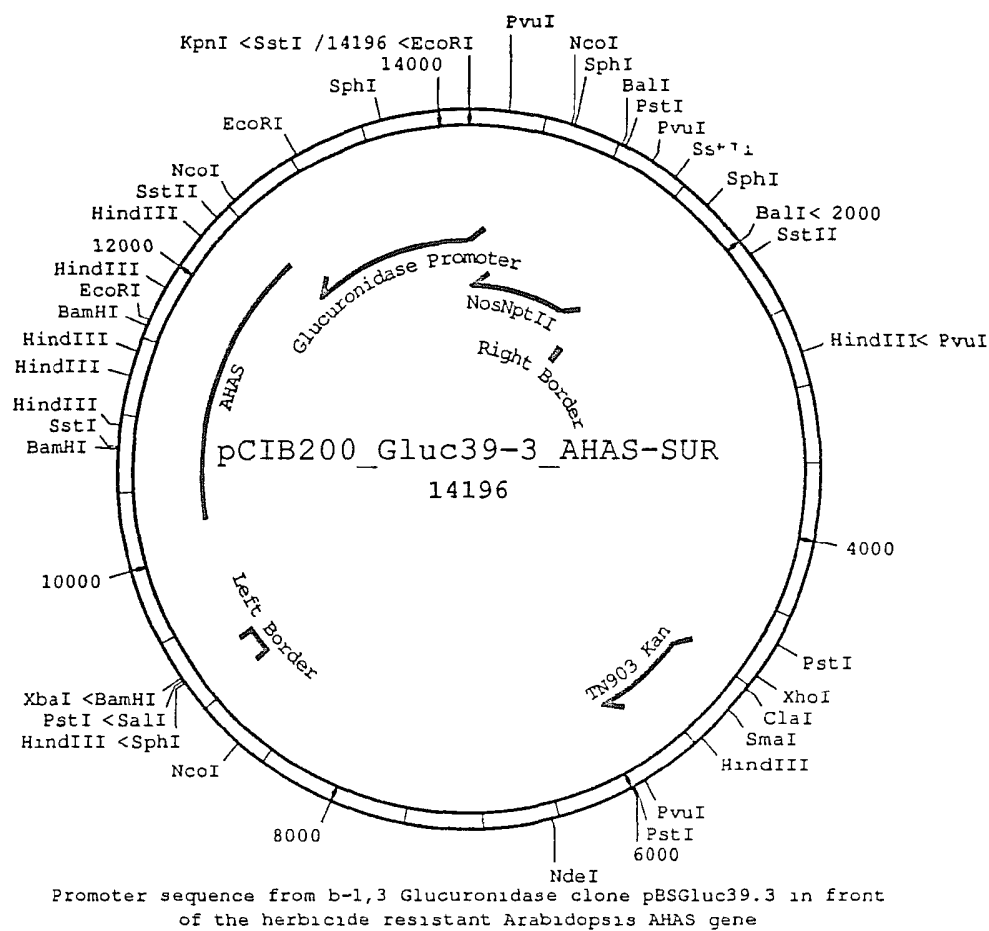


FIGURE 38