Octrooiraad

Nederland

(12) A **Terinzagelegging** (11) **8801444**

(19) **NL**

(54) **Werkwijze voor het genetisch transformeren van cellen van een multicellulair eukaryotisch organisme.**

(51) Int.Cl[5]: C12N15/87, A01H5/10, C12N15/90, C12N15/82.

(71) Aanvragers: Solvay & Cie, Société Anonyme te Brussel en Clovis Matton N.V. te Avelgem-Kerkhove, België.

(74) Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8801444.

(22) Ingediend 6 juni 1988.

(32) - -

(33) - -

(31) - -

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 2 januari 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Nw 1057

Werkwijze voor het genetisch transformeren van cellen van een multicellulair eukaryotisch organisme.

De uitvinding ligt op het gebied van de DNA recombinant technologie en meer in het bijzonder op het gebied van de genetische transformatie van cellen van een multicellulair eukaryotisch organisme, waarbij vreemd DNA in de cellen wordt gebracht en in het genoom wordt geïntegreerd.

Er zijn diverse methoden beschreven om vreemd DNA in cellen te brengen, zoals conjugatie, transformatie, transfectie, e.d. Sommige van deze bekende transformatie-methoden (hier en verder wordt de term "transformatie" in de ruime betekenis van wijziging van de genetische informatie gebruikt) zijn gebaseerd op natuurlijke mechanismen van DNA opname, zoals bij bepaalde soorten bacteriën bestaan, of op het gebruik van virussen die bij bepaalde gastheercellen RNA of DNA naar binnen kunnen brengen, alsook op het gebruik van Agrobacterium tumefaciens bacteriën om DNA in cellen van bepaalde soorten planten te brengen. Ook zijn methoden beschreven, waarbij DNA opname door de te transformeren cellen mogelijk wordt gemaakt door een behandeling van deze cellen met bijvoorbeeld calciumchloride of polyethyleenglycol, of door protoplasten te gebruiken. Ook is wel voorgesteld om DNA direct via micro-injectie in de te transformeren cellen te brengen.

In theorie zouden een aantal van deze bekende methoden ook bruikbaar moeten zijn voor het transformeren van voortplantingscellen (cellen van de germinatieve lijn) of totipotente cellen (cellen die tot uiteenlopende typen cellen kunnen differentiëren) van multicellulaire eukaryotische organismen, opdat uiteindelijk een volledig getransformeerd organisme kan worden gevormd, maar in de praktijk blijkt elk van de bekende methoden een of meerdere zwaarwegende nadelen te bezitten. Zo is microinjectie van cellen een tijdrovende methode, waarmee het

niet mogelijk is om vele duizenden cellen tegelijk te behandelen. Bovendien is daarvoor kostbare apparatuur vereist. Protoplastentransformatie heeft het nadeel van beperkt te zijn tot die soorten van gastheercellen, die vanuit protoplasten geregenereerd kunnen worden. Evenzo heeft de A. tumefaciens technologie het zwaarwegende nadeel van beperkt te zijn tot die soorten van planten, die voor infectie met Agrobacterium stammen ontvankelijk zijn, terwijl ook de noodzaak om na de transformatie de bacteriën te elimineren een nadeel is.

Voor de integratie van het vreemde DNA in het genoom van de gastheercellen kan gebruik worden gemaakt van zg. transposons, zoals in het Amerikaanse octrooischrift 4.670.388 is beschreven. Een transposon is een DNA fragment met aan de uiteinden nucleotidesequenties die door een transposase enzyme worden herkend en het daardoor mogelijk maken dat het gehele fragment door middel van een aanwezig integratiesysteem, dat het transposase omvat, ergens in het genoom wordt geïntegreerd. In genoemd Amerikaans octrooischrift wordt uiteengezet dat voor de transformatie van cellen van multicellulaire organismen, zoals van Drosophila melanogaster (fruitvliegjes), een mengsel kan worden gebruikt van een transposon, omvattende het te integreren vreemde DNA tussen sites die herkend kunnen worden door een transposase, en een actief transposon, d.w.z. een DNA fragment dat het voor het transposase coderende DNA tussen de herkenningssequenties van het transposase omvat. Via de methode van microinjectie wordt dit mengsel van transposons in de te transformeren cellen gebracht.

De onderhavige uitvinding maakt eveneens gebruik van transposons om een integratie van vreemd DNA in het genoom van gastheercellen van multicellulaire eukaryotische organismen te realiseren, maar vermijdt de nadelen van de microinjectie methode door gebruik te maken van het inzicht dat cellen van droge weefsels ten gevolge

van een negatieve osmotische gradiënt in staat zijn om water en daarin aanwezige DNA molekulen op te nemen.

De uitvinding verschaft een werkwijze voor het genetisch transformeren van cellen van een multicellulair eukaryotisch organisme, waarbij vreemd DNA in de cellen wordt gebracht en in het genoom wordt geïntegreerd, die gekenmerkt wordt door het behandelen van in een droge abiotische toestand verkerende cellen, die een dergelijke droge abiotische toestand kunnen overleven, met een DNA-bevattend waterig medium, dat een transposon bevat, omvattende het te integreren vreemde DNA tussen herkennings-sequenties van een transposase.

De uitvinding maakt gebruik van negatieve osmotische potentialen van droge weefsels, welke na mechanische en/of chemische en/of enzymatische behandeling, nucleïnezuren kunnen opnemen te samen met de waterstroom tengevolge van een osmotische gradiënt. Dit is mogelijk dankzij de permeabiliteit van de membranen van droge cellen, welke nog kan worden bevorderd door behandeling met chemische stoffen of enzymen die de membranen aantasten, evenwel zonder de cellen te doden.

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van weefsels van droge embryo's van plantezaden, maar in principe kan de techniek toegepast worden op elk type cel, weefsel of organisme dat een droge abiotische toestand kan overleven, zoals micro-organismen, sporen, pollen, eieren, andere weefsels uit zaden en zelfs dierlijke organismen, zoals mosbeertjes (Tardigrada) en raderdiertjes (Rotifera).

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van cellen of weefsels die aan de basis liggen van de ontwikkeling van een compleet organisme, zoals totipotente cellen of cellen van de germinatieve lijn of weefsels waaruit germinatieve cellen kunnen ontstaan, zoals apicale meristemen of bloemknopmeristemen. Het is echter ook mogelijk gedeelten van droge embryo's te gebruiken en deze dan door <u>in vitro</u> kweek te regenereren tot volledige organismen.

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van droge weefsels waarvan de cellen onderling verbonden zijn door plasmodesmata, welke na wegname van de epidermale cellen of gedeelten daarvan, blootgesteld worden. Deze plasmodesmata vindt men bij plantaardige cellen: het zijn kanalen met een opening van 20 tot 40 nm, welke zelfs virusdeeltjes kunnen doorlaten. De verbindingskanalen tussen dierlijke cellen hebben een kleinere diameter: 2 nm bij zoogdiercellen en 3 nm bij insectencellen. In principe zouden deze verbindingskanalen bij dierlijke cellen slechts naakte enkelstrengige DNA molekulen kunnen doorlaten.

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van stoffen die de permeabiliteit van de celmembranen verhogen. Droge cellen zoals men aantreft in zaden bijvoorbeeld, zullen bij wateropname (imbibitie) intracellulaire stoffen verliezen; ionen, aminozuren, suikers, organische zuren, fenolen en zelfs eiwitten. Dit duidt op een lekken van de membranen, die door het binnenstromende water gefragmenteerd worden (gradiënten van ongeveer 1000 bar). Studies met kleurstoffen (zoals Evan's blauw), die door normale levende cellen niet worden opgenomen, hebben aangetoond dat deze kleurstoffen binnen een periode van twee uur tot 4 cellagen diep in de weefsels van het embryo binnendringen.

Aangenomen wordt, dat de cellen van de buitenste laag van het embryo openbreken door de waterstroom, maar dat de dieper gelegen cellen van het embryo water opnemen via de plasmodesmata zodat het waterfront geleidelijk in het embryo binnentreedt. Het verloop van het elektrisch geleidingsvermogen van het water waarin de zaden of embryo's liggen duidt er op dat het uitlekken van intracellulaire stoffen doorgaat tot het embryo volledig geïmbibeerd is. Embryo's, beschermd in zaden door de zaadhuid, nemen trager water op en worden minder beschadigd. Embryo's, die aan waterdamp worden blootgesteld in plaats van water nemen ook trager water op en vertonen veel minder verlies van intracellulaire stoffen. Embryo's kunnen water opnemen,

weer ingedroogd worden en weer water opnemen zonder hun kiemkracht te verliezen. Er is echter een stadium tijdens de wateropname dat niet bereikt mag worden omdat dan de kiemkracht bij opnieuw indrogen verloren zou gaan. Dit stadium is verschillend van soort tot soort (McKersie en Tomes (1980) Can J. Bot. 58: 471-476). De membranen van de embryocellen bevinden zich nog steeds in de laminaire fase (Vigil et al. (1982) Plant Physiology, 69 (suppl) : 3). Vermoedelijk worden de membranen enkel beschadigd ter hoogte van de plasmodesmata door het binnenstromende water. Verdere beschadiging van de membranen kan gerealiseerd worden door gebruik te maken van:

1. vetoplosmiddelen zoals diëthylether, aceton, chloroform, tetrachloorkoolstof, etc.
2. niet-ionische detergenten zoals Triton-X100, octylglucoside, Nonidet, Brij, etc.
3. enzymen zoals phospholipasen.

De methode die het best gebruikt kan worden verschilt van soort tot soort en moet op voorhand uitgetest worden om de kiemkracht na behandeling te bepalen.

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van lineaire dubbelstrengige DNA molekulen omgeven door histonen of basische proteïnen zoals cytochroom C, of recA proteïne van E. coli, in de vorm van 5-10 nm vezels. Men kan echter ook enkelstrengig DNA gebruiken omgeven door DNA bindende eiwitten zoals het bacteriofaag T4 gen 32 eiwit. Verder is het ook mogelijk naakt dubbelstrengig DNA te gebruiken in aanwezigheid van chelaten die bivalente metaalionen binden en op 1 µm oxiraan-acryl bolletjes gebonden proteasen om de afbraak van het DNA door nucleasen te verhinderen. Ook is mogelijk om dubbelstrengig DNA te gebruiken omgeven door protamine (Korohoda en Strzalka (1979) Z. Pflanzenphysiol 94: 95-99).

Bij voorkeur wordt gebruik gemaakt van een mengsel van DNA molekulen die een aktief transposon bevatten en DNA molekulen die het over te brengen gen bevatten,

gelegen tussen sequenties die door het transposase van het aktief transposon worden herkend. Er kan echter ook gewerkt worden met een DNA molekuul waarop deze twee entiteiten te samen aanwezig zijn of een DNA molekuul waarbij het over te brengen gen gelegen is binnen de grenzen van het aktief transposon. Bij deze laatste mogelijkheid moet men echter rekening houden met de instabiliteit van het ingebrachte gen. Indien de receptorcellen reeds een actief transposon bevatten kan het volstaan een DNA molekuul te gebruiken waarop het over te brengen gen gelegen is tussen de sequenties die door het transposase van het aktief transposon worden herkend. Een andere mogelijke werkwijze maakt gebruik van het enkelstrengige DNA, bezet met eiwitten, dat geïsoleerd kan worden uit tot transfer gestimuleerde Agrobacteriumstammen waarbij het over te brengen gen gelegen is tussen de bordersequenties van het T-DNA (Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium rhizogenes, Agrobacterium rubi); zie J. Bacteriol. 169 (1987) 5035-5045; PNAS 84 (1987) 9006-9010.

Vanzelfsprekend kunnen de transposons resp. het transposon een of meer markers (selectiegenen) bevatten, waardoor het selecteren van getransformeerde cellen of organismen wordt vergemakkelijkt.

Bijzondere voorkeur heeft een werkwijze volgens de uitvinding waarbij cellen van apicaal meristeem weefsel van droge embryo's van plantezaden worden behandeld. Daarbij heeft het verder de voorkeur dat de droge plantezaden van embryo's worden voorbehandeld om het apicaal meristeem weefsel beter toegankelijk te maken voor het DNA-bevattende waterige medium.

Enkele mogelijkheden voor een dergelijke mechanische voorbehandeling zijn:

1. Insnijden van droge embryo's tot in de meristematische weefsels.
2. Embryo's week maken door incubatie in met waterdamp verzadigde lucht alvorens ze in te snijden tot in

de meristematische weefsels.

3. Het boren van een 0,1 mm gat tot in de meristematische weefsels van droge embryo's.
4. Invriezen en ontdooien van zaden of embryo's vooraleer ze in te snijden.
5. Afslijpen van droge zaden tot in de meristematische weefsels (bij monocotyle planten kan men de primaire wortel bijna volledig wegslijpen omdat er vrij spoedig definitieve, secundaire wortels uit de cotyledonaire knoop ontstaan)
6. Verbrijzelen van embryo's in droge toestand en na opname van DNA in vitro secundaire embryo's induceren.

De werkwijze volgens de uitvinding bestaat derhalve bij voorkeur uit drie stappen, nl. een eerste stap waarin droge embryo's van plantezaden tot in meristeemweefsel ingesneden, afgeslepen of anderszins mechanisch beschadigd worden, een tweede stap waarin met behulp van chemische middelen de permeabiliteit van de cellen wordt verhoogd, en tenslotte een derde stap waarin de opname van DNA plaatsvindt.

De uitvinding kan worden gebruikt voor het inbrengen van herbicideresistenties, resistenties tegen pathogenen of resistenties tegen milieufactoren, of voor het realiseren van metabolisme-wijzigingen die rendementverhogend werken. De uitvinding maakt het mogelijk om de voedingswaarde van bepaalde plantensoorten te verbeteren en om andere of betere produktiewegen voor secundaire metabolieten te realiseren. Ook kan de uitvinding gebruikt worden om eigenschappen van de ene soort of variëteit over te brengen op een andere soort of variëteit waardoor de veredeling van landbouwgewassen, tuinbouwgewassen en sierplanten een nieuwe dimensie van variabiliteit krijgt.

De uitvinding wordt aan de hand van de hiernavolgende voorbeelden nader toegelicht.

Voorbeeld 1

Expressie van het β-glucuronidasegen van Escherichia

coli onder controle van de 35S promotor van CaMV en de terminatiesignalen van het nos gen van Agrobacterium tumefaciens C58 in maïs (Zea mays).

Stap 1

Het transposon Ac7 van maïs werd geïsoleerd door de groep van Prof. P. Starlinger, Institut für Genetik te Keulen, Duitsland; de sequentie ervan is volledig bepaald. (Müller Neumann et al. (1984) Mol. Gen. Genet. 198:19-24; Pohlmann et al. (1984) Cell 37: 635-643; en erratum in Mol. Gen Genet. (1985) 198: 540).

Dit transposon bevat een groot ORF a (open reading frame) met vier introns dat vermoedelijk codeert voor het transposase (Kunze et al. (1987) EMBO J 6: 1555-1563) (fig. 1). Het transposon Ac7 werd verkregen via Prof. Van Montagu, Labo voor Genetika, Rijksuniversiteit Gent, België, en bevindt zich in het plasmide pMH10 (fig. 1). Door knippen van het plasmide pMH10 met EcoR1 en partiële digestie met HindIII werd na agarosegelelectroforese een lineair plasmide afgezonderd dat de 0,9 kb nucleotidensequentie van positie Ac 1292 tot positie Ac 2197 verloren heeft. Het β-Glucuronidasegen (GUS) van E. coli werd gecloneerd en de sequentie ervan bepaald door de groep van R. Jefferson in het Plant Breeding Institute in Cambridge, Engeland. Van hem werd het plasmide pBI 221 verkregen dat het GUS gen bevat onder de controle van de 35S promotor van CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) en met de terminatiesignalen van het nos gen uit pTiC58 van Agrobacterium tumefaciens C58 (fig. 2). Het volledige chimere GUS gen werd uit de vector geknipt met EcoR1 en HindIII en gecloneerd in het bovenstaand vermelde lineair pMH10 plasmide en getransformeerd naar de E.coli stam HB101 (J. Mol. Biol. 41 (1969) 459-472). Het aldus verkregen plasmide pMG15 (fig. 3) werd verder getransformeerd naar de Agrobacterium tumefaciens stam C58 C1 (pGV3850) [gedeponeerd op 21-12-1983 bij de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen onder DSM nummer 2798 en beschreven in

EP-A-116718] waarin een groot gedeelte van het T DNA vervangen is door de pBR322 sequentie (Zambryski et al. (1983) EMBO J.2: 2143-2150). Het plasmide pMG15 heeft een 3234 bp sequentie van pBR322 behouden welke toelaat door integratieve recombinatie een coïntegraat te verkrijgen van pMG15 in pGV3850. Agrobacteriën met dit coïntegraat zijn resistent tegen carbenicilline (pBR322) en spectinomycine (pMH10) en produceren β-Glucuronidase dankzij de activiteit van de CaMV 35S promotor in Agrobacterium. De A. tumefaciens stam C58 C1 (pGV3850) produceert zelf geen β-Glucuronidase. De testen voor β-Glucuronidase werden uitgevoerd volgens de procedure van de Bactident^{R} test, die door Merck, Darmstadt in de handel wordt gebracht. Om de activiteit van het Ac transposon te testen werd het pMH10 plasmide getransfereerd naar A. tumefaciens C58 C1 (pGV3850) en stammen met het coïntegraat pGV3850::pMH10 afgezonderd als kolonies die resistent zijn tegen carbenicilline en spectinomycine. De activiteit van het Ac transposon werd getest in Nicotiana tabacum W38 na transformatie van bladschijfjes met de A. tumefaciens stammen C58 C1 (pGV3850:pMG15) en (pGV3850::pMH10), screening voor nopaline op bladweefsel van de geregenereerde scheuten (NB nopaline verspreidt zich in de symplast via de plasmodesmata) en Southern hydridisatie van DNA van verschillende getransformeerde planten met een GUS probe (het GUS insert van pBI221) en een Ac probe (intern HindIII fragment van Ac in pMH10).

Stap 2

Van maïszaden werd de zaadhuid boven het embryo verwijderd met een scalpel, waarna deze zaden gedurende 4 uur werden geïncubeerd bij 30°C in een gesloten container met 90% relatieve vochtigheid. De embryo's werden vervolgens met een fijn scalpel ingesneden volgens hun lengteas, door coleoptiel en eerste bladeren heen tot in het apicaal meristeem, en opnieuw gedroogd in een luchtstroom bij

25°C.

De zaden werden gedurende 2 à 3 minuten in aceton gelegd en opnieuw gedroogd. Met een tranferpettor (Brandt) uitgerust met een glascapillaire pipet, waarvan het uiteinde versmald was door uitrekking onder hitte (Capillary puller, Narashige Scientific Instrument Lab., Japan) werd 50 tot 100 nl DNA oplossing in de snede gebracht. Deze DNA oplossing bestond uit met SalI gelineariseerde pMH10 en pMG15 plasmiden in 1 mM Na_2EDTA, 10 mM $KHPO_4$, pH 6,8, waaraan onoplosbaar papaïne, gebonden aan oxiraan-acryl bolletjes van 1 µm, ongeveer 10 units per ml, was toegevoegd. De zaden werden gekiemd bij 25°C en 1000 lux op zand, verzadigd met Murashige en Skoog medium, teneinde het verlies aan ionen door uitlekken en EDTA behandeling te compenseren. De combinatie van EDTA en papaïne verhinderde een snelle afbraak van het naakte lineaire dubbelstrengige DNA. Als alternatief werd in plaats van papaïne, cytochroom C (1 mg/ml) gebruikt om het DNA tegen afbraak te beschermen. Ook kon het recA proteïne van E. coli (100 /ug/ml) worden toegepast.

Stap 3 T° generatie

1 week na de behandeling werd de helft van de scheut verwijderd, in kleine stukjes geknipt en in een oplossing van X-glucuronide (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B D glucuronide, 40 microgram/ml) in ethyleenglycol-monoethylether in het donker bij 30°C overnacht geïncubeerd. Scheuten die het X-glucuronide omzetten in de blauwe kleurstof 5-bromo-4-chloro-3-indool werden als positief beschouwd en verder in Jiffy potjes in de serre geacclimatiseerd en zo spoedig mogelijk in volle grond in de serre of in het veld overgebracht, al naar het seizoen.

Stap 4 T° generatie

Voor de bloei werden de maïskolven met kunststof-zakjes en de pluimen met papieren zakken afgedekt. Toen

het pollen rijp was werden de kolven op de gewone wijze bestoven met het pollen waarbij de kolf met de papieren zak, die het pollen bevat, afgedekt bleef. De rijpe kolven werden geoogst en gedroogd in een warme luchtstroom. Hierna werden de zaden uit de kolven verwijderd en bewaard bij 4°C.

Stap 5 T1 generatie

Van het geoogste zaad werden twee weken na kieming stukjes blad gesneden en geëxtraheerd met zand in een porceleinen mortier met stamper in extractiebuffer: 50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 10 mM Na_2EDTA, 0,1% Triton X100, 10 mM mercapto-ethanol, 1 mM PMSF. 50 microliter extract werd toegevoegd aan 50 microliter extractiebuffer met 10 micromolair 4-methylumbelliferyl-B D glucuronide en bij 37°C gedurende 2 uur in microtiterplaten geïncubeerd. De positieve extracten gaven een intense fluorescentie onder UV belichting (365 nm). Door toevoegen van Na_2CO_3 oplossing tot finaal 0,1 M werd de fluorescentie nog met een factor 7 verhoogd (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6: 3901-3907).

Stap 6 T1 en T2 generatie

Positieve planten werden verder opgegroeid en het zaad geoogst zoals in stap 4. Planten, homozygoot voor GUS, gaven geen uitsplitsing van GUS^- zaden. De heterozygote planten gaven zowel GUS^+ als GUS^- zaden. De testen werden uitgevoerd zoals beschreven in stap 5. Homozygote planten werden verder opgegroeid en het zaad geoogst zoals in stap 3.

Stap 7 T2 generatie

Uit bladeren van de homozygote planten werd totaal DNA bereid volgens de methode van Lemmers et al. (1980) J.Mol.Biol. 144: 353-376. Hoeveelheden van 10 microgram DNA werden afgebroken met EcoR1 en HindIII

afzonderlijk. Deze restrictie-enzymen knippen elk één van de uiteinden van het chimere GUS gen, zodat in de verzameling van ontstane fragmenten, sommige fragmenten het GUS gen aan één van hun uiteinden vertoonden. Door Southern hybridisatie met het EcoRlHindIII fragment uit pBI221 dat het chimere GUS gen bevat, werden twee klassen van bandenpatronen verkregen: klasse A, waarin het GUS gen in een beperkt aantal banden te vinden was, en klasse B, waarbij het GUS gen met vele banden hybridiseerde.

Klasse A planten worden beschouwd als homozygote GUS^+ planten die het aktieve transposon verloren hebben of waarin het transposon inaktief geworden is (Chomet et al. (1987) EMBO J. 6: 295-302).

Klasse B planten worden beschouwd als homozygote GUS^+ planten die nog steeds een aktief transposon bevatten of tenminste gedurende één generatie bevat hebben.

Voorbeeld 2

Expressie van het chloramphenicol acetyltransferase gen van het pBR325 plasmide onder controle van de nos promotor en terminatiesignalen van Agrobacterium tumefaciens C58 in Kool (Brassica oleracea).

Stap 1

Zoals in voorbeeld 1 werd gebruik gemaakt van het transposon Ac 7 van maïs dat in Brassicaceae aktief is (Van Sluys et al. (1987) EMBO J.6: 3881-3889). Het chloramphenicol acetyltransferase gen (CAT) met de regelelementen van het nos gen van A. tumefaciens C58 werd gecloneerd door De Block et al. (1984) EMBO J.3: 1681-1689. Uit pNCAT4 (fig. 4) werd het 5600 bp grote StuI-SalI fragment afgezonderd. Het plasmide pMH10 werd partieel geknipt met BclI en vervolgens partieel met BamHI, waarna een 8,1 kb groot lineair plasmide, dat de sequentie tussen Ac 1531 en Ac 4498 verloren heeft, door agarosegelelectroforese werd geïsoleerd. Na ligatie

werd een pMH10 Ds plasmide verkregen dat nog wel de uiteinden van Ac heeft, maar het grootste gedeelte van het ORF a verloren heeft (fig. 5). Dit plasmide werd getransformeerd naar de E. coli stam HB101. Na partieel knippen met PvuII en vervolgens met XhoI werd het 7,8 kb grote lineaire plasmide pMH10 Ds PX afgezonderd door agarosegelelectroforese en geligeerd met het 5,6 kb StuI-SalI fragment van pNCAT4, dat het chimere CAT gen en een procaryotisch kan^Rgen bevat. Het aldus verkregen 13,3 kb grote plasmide pMC34 werd naar HB101 getransformeerd (fig. 6). Transformanten waren resistent tegen spectinomycine en kanamycine.

De activiteit van het chimere CAT gen en van het transposon werd getest op Nicotiana tabacum W38. Hiervoor werd het plasmide pMH10 getransfereerd naar A. tumefaciens C58 C1 (pGV3850) en kolonies, die het coïntegraat pGV3850::pMH10 bevatten, werden afgezonderd op carbenicilline, spectinomycine platen. Het plasmide pMC34 werd eveneens op dezelfde manier getransfereerd en de kolonies met het coïntegraat pGV3850::pMC34 werden geïsoleerd op kanamycine, carbenicilline platen.

Bladschijfjes van tabaksplanten werden getransformeerd met beide A. tumefaciens stammen. Na induktie van callus op callus-inducerend medium, werden de jonge calli getest op hetzelfde medium met 75 mg/l chloramphenicol. De resistente calli werden overgebracht op scheut-inducerend medium en na 1 maand overgezet op wortel-inducerend medium, alles zoals beschreven door De Block et al. (1984) EMBO J.3: 1681-1689. Jonge plantjes werden geacclimatiseerd in de serre en verder in potten met teelaarde opgegroeid. Uit jonge bladeren werd totaal DNA bereid volgens de methode van Lemmers et al. (1980) J.Mol.Biol. 144: 353-376. Door Southern hybridisatie van BglII en SalI digesten van dit DNA met de probes CAT (Sau3A fragment van pBR325) en Ac (intern HindIII fragment van Ac uit pMH10) vond men drie klassen van planten: deze welke het CAT gen bevatten, maar geen Ac (integratie bewerkt door A. tumefa-

ciens), deze welke CAT en Ac bevatten op een beperkt aantal banden, en deze welke CAT en Ac vertonen op een groot aantal banden. Dit bewees dat het transposon aktief was zowel in cis als in trans.

Stap 2

Zaden van Brassica oleracea (rapid cycling populations, Crucifer Genetics Cooperative, University of Wisconsin, verkregen van Prof. P.H. Williams) werden ontdaan van hun zaadhuid ter hoogte van het apicaal meristeem.Na opname van waterdamp gedurende 2 uur, werd het apicaal meristeem ingesneden en aan de lucht gedroogd. Na behandeling met aceton gedurende 2 à 3 minuten en opnieuw drogen, werd ongeveer 50 nl DNA oplossing in de snede aangebracht. Deze DNA oplossing bevatte met SalI gelineariseerde plasmiden pMH10 en pMC34 gepreïncubeerd gedurende 10 minuten bij 20°C in een buffer (pH 6,8) die 10 mM $KHPO_4$, 1 mM Na_2EDTA en 1 mg/ml cytochroom C bevatte. De zaden werden op droog zand in een atmosfeer van 90% relatieve vochtigheid in petrischalen gekiemd. Hierdoor werd verdere beschadiging van het embryo en de meristematische cellen voorkomen.

Stap 3 T° generatie

De jonge plantjes werden in Jiffy potjes geacclimatiseerd in de serre en verder opgegroeid in potten met teelaarde. Na ongeveer één maand werden de planten van eenzelfde experiment onderling bevrucht door middel van een wattenstaafje door het pollen op de stampers te brengen. Na ongeveer 2 maanden kon zaad worden geoogst.

Stap 4 T1 generatie

Droge zaden werden op steriele wijze uit de hauwtjes gehaald en gekiemd op Murashige en Skoog medium met 0,8% agar en 50 mg/l chloramphenicol in petriplaten. Ongeveer 3% van de zaden ontwikkelde zich tot groene plantjes, de andere hadden witte tot bleekgele kiembladen,

maar plantjes met wit en groen gevlekte kiembladen kwamen ook voor. De groene plantjes werden verder opgekweekt in de serre. Jonge bladeren werden geoogst en ongeveer 100 mg bladweefsel werd in Eppendorf buisjes van 1,5 ml fijngemalen bij 4°C met 50 microliter extractiebuffer: 0,25M Tris HCl pH 7,8, 10 mM Na_2EDTA, 1 mM leupeptine, 10 mM Na-ascorbaat, 1 mM cysteïne.

Na afcentrifugeren in een Eppendorf centrifuge met 13.000 rpm gedurende 10 minuten bij 4°C werd 50 microliter bovenstaande vloeistof afgenomen. Hieraan werd 5 microliter ^{14}C chloramphenicol (0,1 microcurie, NEN radioactive chemicals) en 10 microliter acetyl-coënzyme A (8 mg/ml) toegevoegd. Na incubatie gedurende 1 uur bij 37°C werd het reactiemengsel tweemaal met 0,2 ml ethylacetaat geëxtraheerd. De organische fase werd gedroogd in een vacuumcentrifuge en weer in 10 microliter ethylacetaat opgenomen. De monsters werden aangebracht op een dunne laag (cellulose) chromatografieplaat en in een gesloten container met een mengsel van methanol/chloroform (5/95 V/V) gedurende 1 uur bij kamertemperatuur doorgeleid.

Na drogen werd de chromatografieplaat te samen met een X-ray film in een cassette opgeborgen voor ongeveer 14 dagen. Planten die het CAT gen tot expressie brachten zetten chloramphenicol om in 3-acetylchloramphenicol dat spontaan omgezet werd in 1-acetylchloramphenicol. Brassicaceae vertonen een laag niveau van chloramphenicol acetyl transferase activiteit. Getransformeerde planten echter vertoonden een duidelijke activiteit en waren resistent tegen het antibioticum tijdens de kieming.

Stap 5 T2 generatie

De CAT^+ planten werden opgegroeid in de serre en onderling gekruist. Na 2 maanden kon reeds zaad geoogst worden en met het zaad van die planten, die slechts chloramphenicol resistente zaden opleverden, werd opnieuw

verder gewerkt. Uit bladeren werd DNA geïsoleerd volgens de methode van Lemmers et al. (1980) J.Mol.Biol. 144: 353-376. Zoals beschreven in de experimenten met tabak werden BglII en SalI digesten onderzocht door Southern hybridisatie tegenover de CAT probe en de Ac probe.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het genetisch transformeren van cellen van een multicellulair eukaryotisch organisme, waarbij vreemd DNA in de cellen wordt gebracht en in het genoom wordt geïntegreerd, gekenmerkt door het behandelen van in een droge abiotische toestand verkerende cellen, die een dergelijke droge abiotische toestand kunnen overleven, met een DNA-bevattend waterig medium, dat een transposon bevat, omvattende het te integreren vreemde DNA tussen herkenningssequenties van een transposase.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij een DNA-bevattend waterig medium wordt toegepast, dat tevens een transposon bevat, omvattende voor het transposase coderend DNA tussen herkenningssequenties van het transposase.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij het DNA wordt toegepast in de vorm van lineaire dubbelstrengige DNA molekulen, omgeven door histonen of basische proteïnen zoals cytochroom C of recA proteïne van E. coli, in de vorm van vezels, of in de vorm van naakte dubbelstrengige DNA molekulen in tegenwoordigheid van een chelaatvormende stof en een op een kunststofdrager gebonden protease, zoals papaïne.

4. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, waarbij droge cellen worden toegepast, die een voorbehandeling ter verhoging van hun permeabiliteit hebben ondergaan.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij de permeabiliteit van de cellen is verhoogd door een voorbehandeling met een vetoplosmiddel zoals aceton, diethylether, chloroform, tetrachloorkoolstof e.d., een niet-ionogeen detergent zoals Triton X100, octylglucoside, Nonidet, Brij, e.d., en/of een enzym zoals een fosfolipase.

6. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-5,

waarbij cellen van droge embryo's van plantezaden worden behandeld.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij cellen van apicaal meristeem weefsel van droge embryo's van plantezaden worden behandeld.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij de droge plantezaden en embryo's worden voorbehandeld om het apicaal meristeem weefsel beter toegankelijk te maken voor het DNA-bevattende waterige medium.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, waarbij de droge plantezaden en embryo's worden ingesneden of afgeslepen tot in meristeem weefsel.

10. Multicellulair eukaryotisch organisme, afstammend van met de werkwijze volgens een der voorgaande conclusies genetisch getransformeerde cellen.

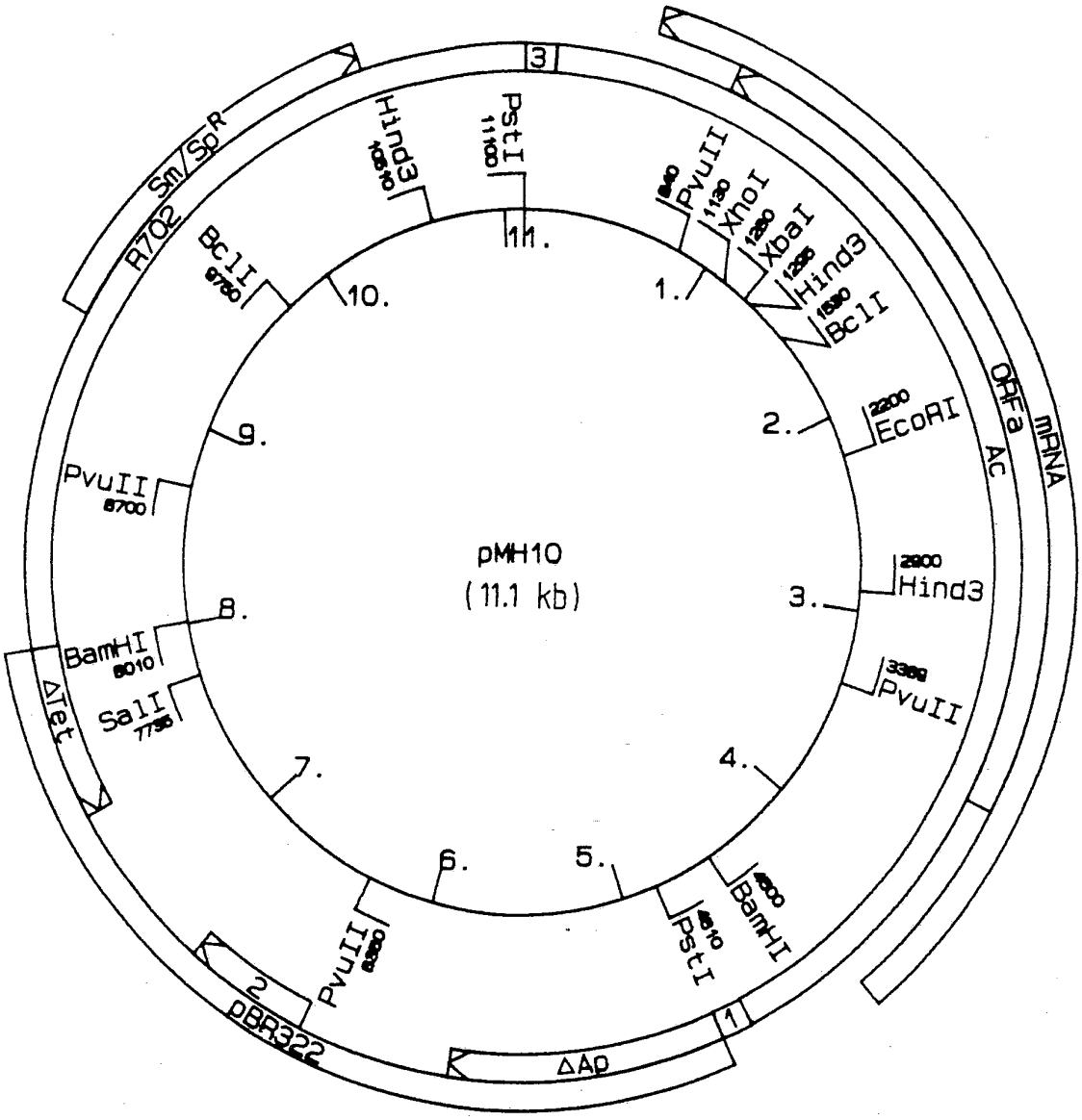


FIG.1

1 Maize DNA

2 ori ColEI

3 Maize DNA

SOLVAY & CIE ,SOCIETE ANONYME EN CLOVIS MATTON N.V.

8801444

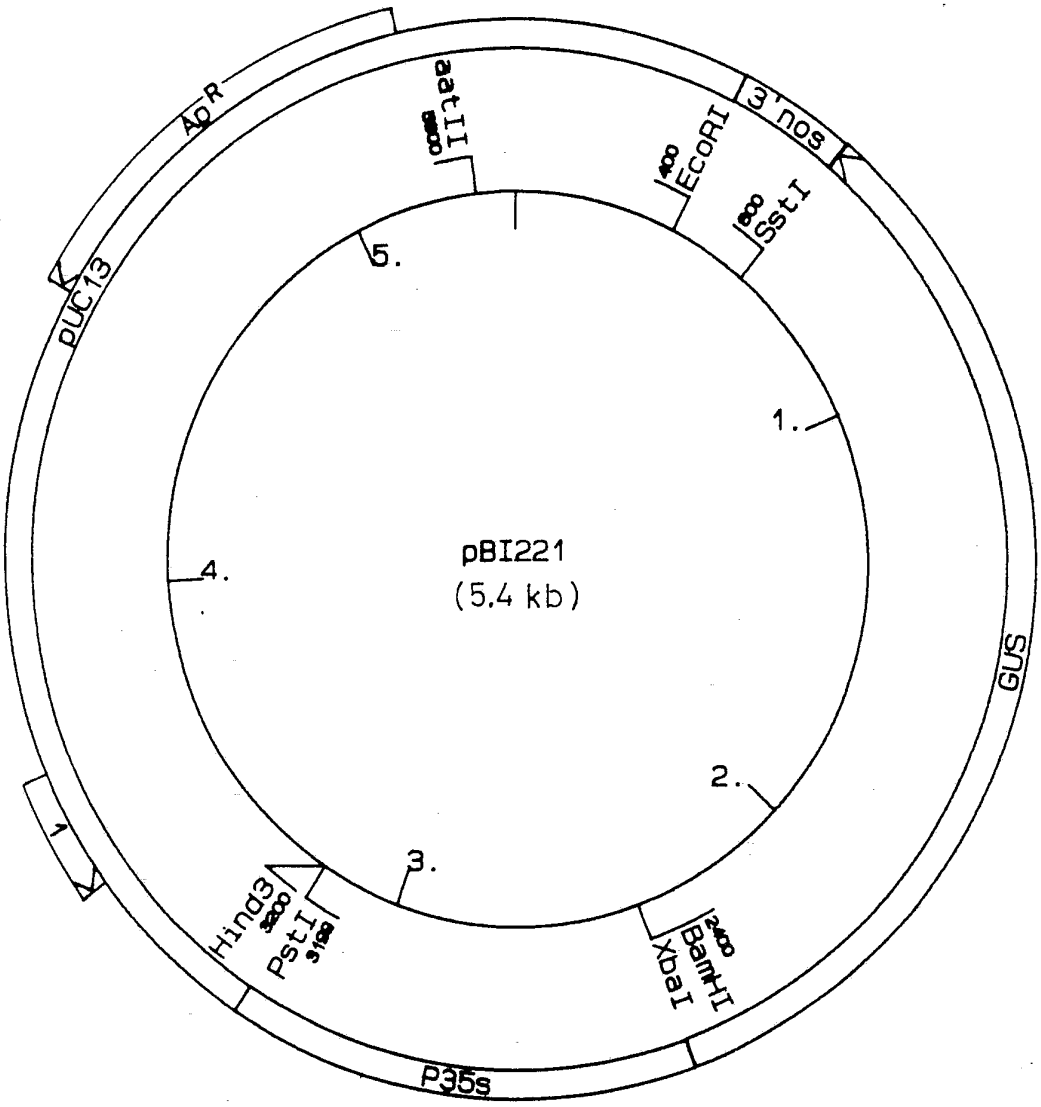
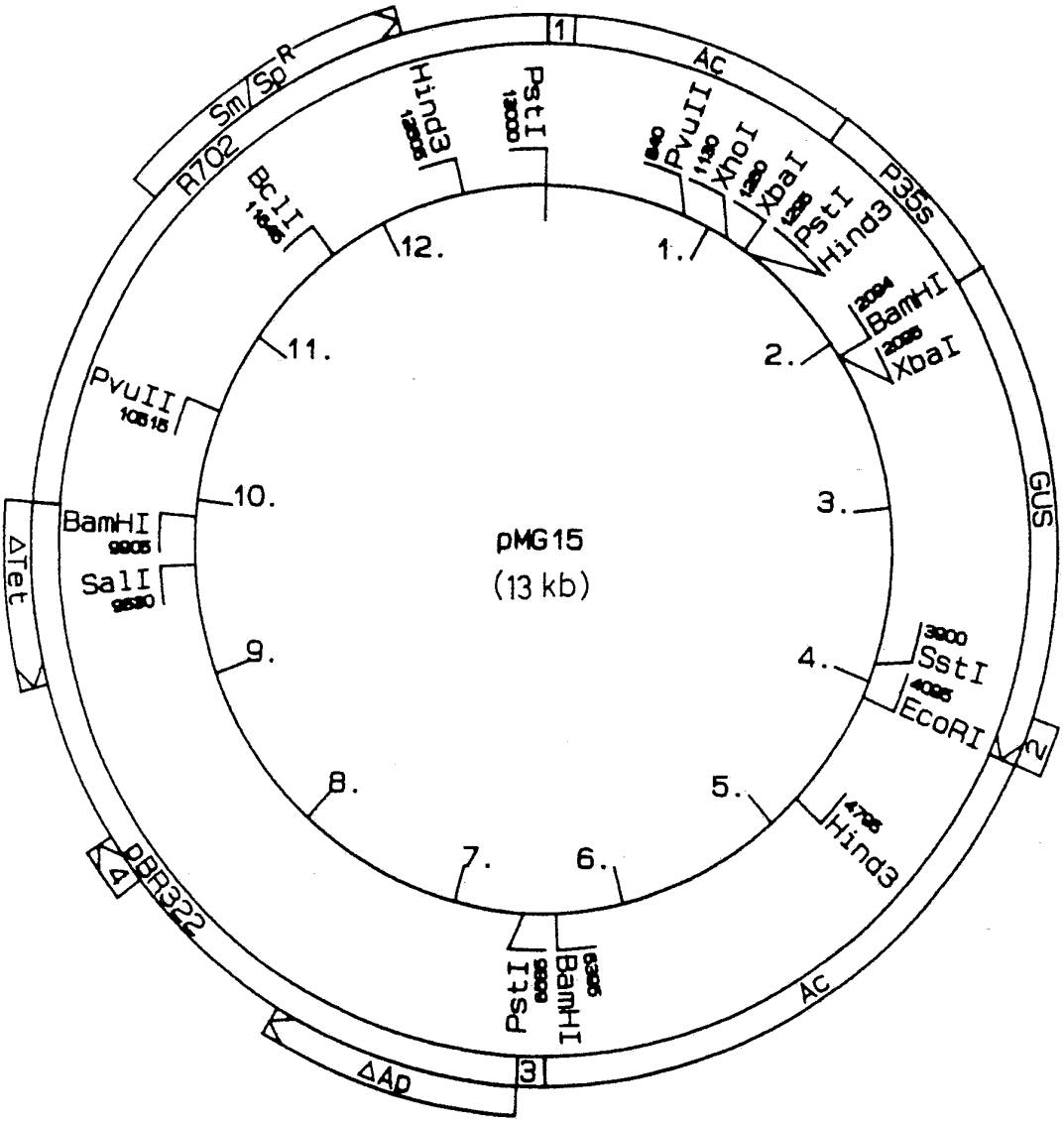


FIG.2

1 ori ColEI

SOLVAY & CIE ,SOCIETE ANONYME EN CLOVIS MATTON N.V.



1 maize DNA

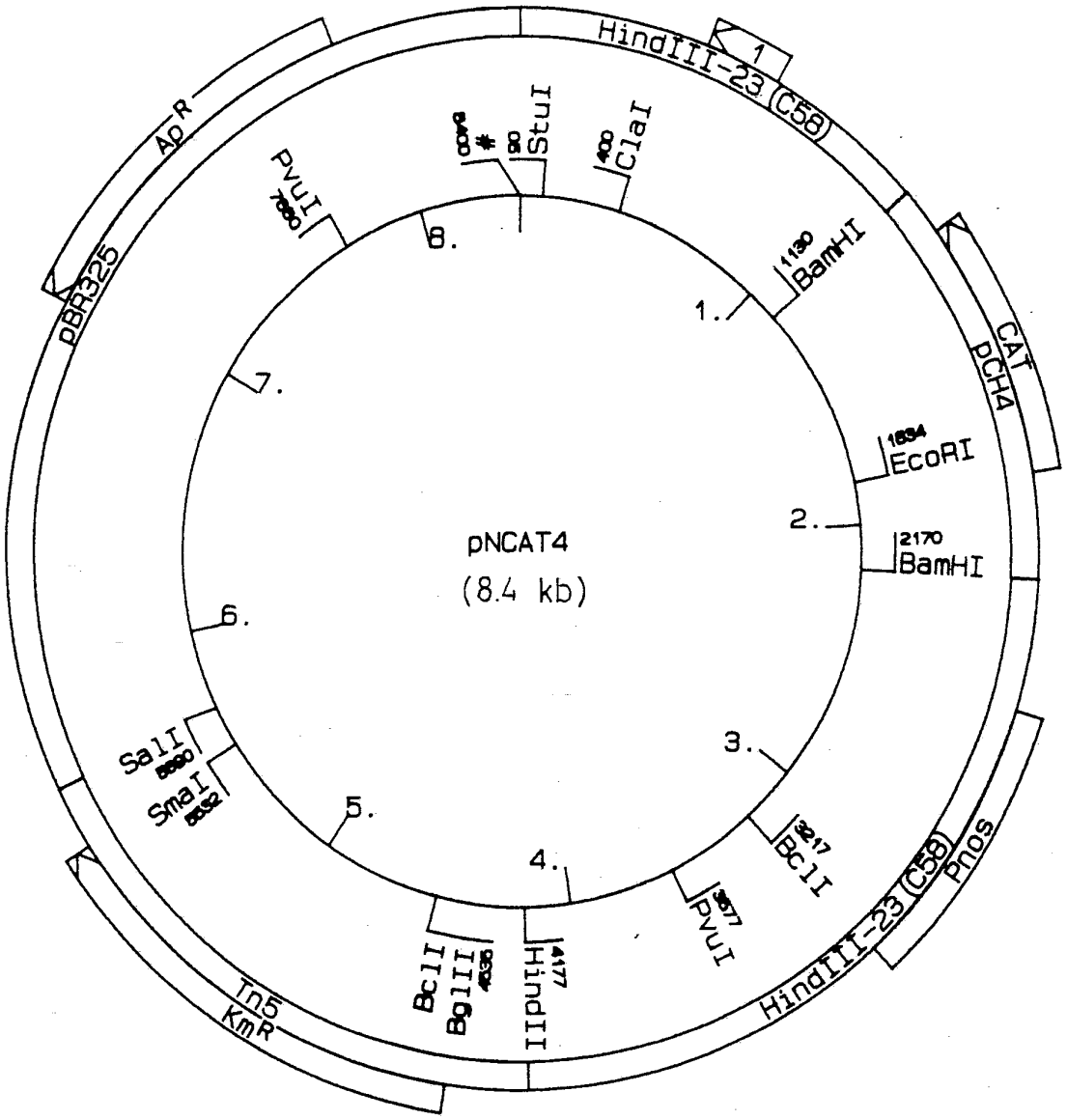
2 3'nos

3 maize DNA

4 ori ColEI

FIG.3

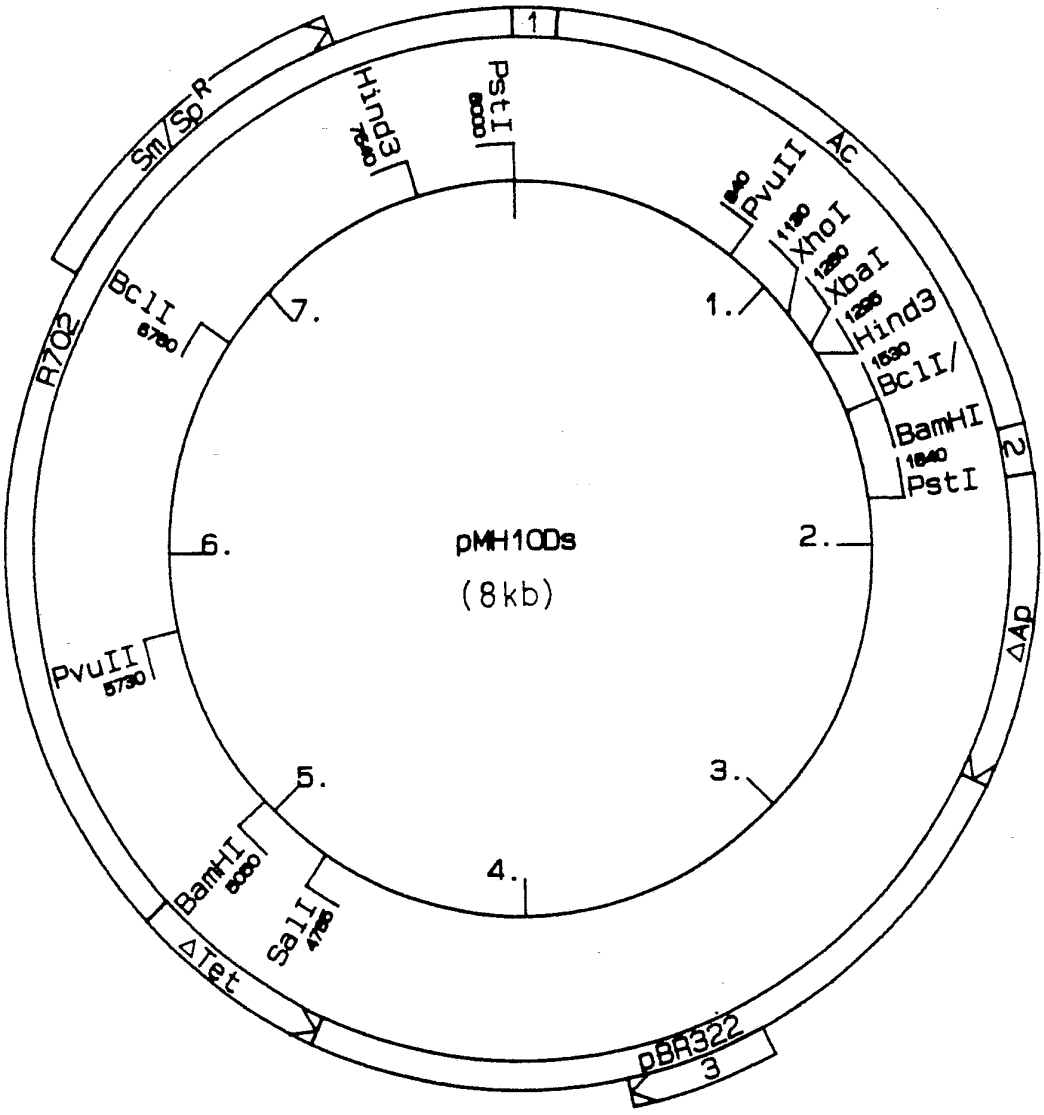
SOLVAY & CIE ,SOCIETE ANONYME EN CLOVIS MATION N.V.



1 3'nos

FIG.4

SOLVAY & CIE ,SOCIETE ANONYME EN CLOVIS NATION N.V.



1 maize DNA

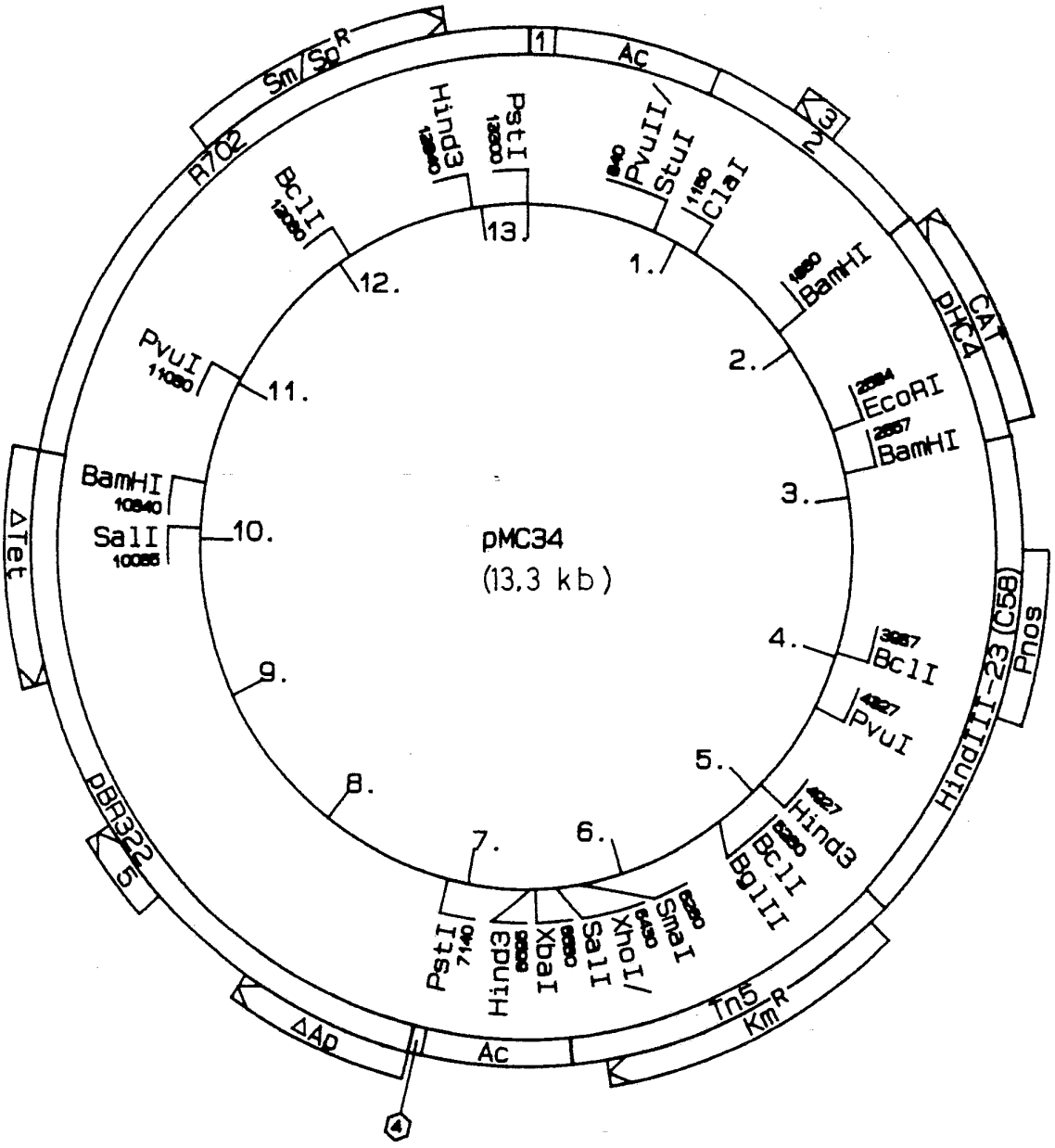
2 maize DNA

3 ORI ColEI

FIG.5

SOLVAY & CIE, SOCIETE ANONYME EN CLOVIS MATTON N.V.

8801444.



1 maize DNA

2 HindIII-23 (C58)

3 3'nos

4 maize DNA

5 ori ColEI

FIG.6

8801444

SOLVAY & CIE, SOCIETE ANONYME EN CLOVIS MATTON N.V.