(19) DANMARK (11) **DK 175254 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 12 N 15/00** **C 12 N 9/10** **C 12 N 15/54** **C 12 N 15/64** **C 12 P 41/00**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1987 04378**

(22) Indleveringsdag: **1987-08-21**

(24) Løbedag: **1987-08-21**

(41) Alm. tilgængelig: **1988-02-24**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-07-26**

(30) Prioritet: **1986-08-23 DE 3628747** **1986-11-03 DE 3637307** **1986-12-16 DE 3642829**
1987-01-08 DE 3700313

(73) Patenthaver: **Hoechst Aktiengesellschaft, Brüningstrasse 45, D-65926 Frankfurt/Main, Tyskland**

(72) Opfinder: **Eckhard Strauch, Rosenheide 2, D-4800 Bielefeld, Tyskland**
Wolfgang Wohlleben, Menzelstrasse 1, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Walter Arnold, Am Gottesberg 25, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Renate Alijah, Koesterkamp 14, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Alfred Puehler, Am Waldschloesschen 2, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Ruediger Marquardt, Guenthersburgallee 69, D-6000 Frankfurt am Main, Tyskland
Susanne Grabley, Hoelderlinstrasse 7, D-6240 Koenigstein/Taunus, Tyskland
Dieter Brauer, Berliner Strasse 14, D-6093 Floersheim am Main, Tyskland
Klaus Bartsch, Memelstrasse 2, D-6233 Kelkheim (Taunus), Tyskland
Gerhard Woehner, Floersheimer Strasse 27, D-6093 Floersheim am Main, Tyskland

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

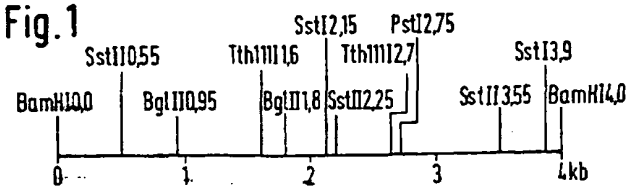
(54) Benævnelse: **Resistensgensekvens mod phosphinothricin og anvendelse deraf**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Resistensgen mod phosphinothricin, der kan fås fra hele DNA'et af med hensyn til phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistens selekteret Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 ved skæring med BamHI, kloning af et 4,0 kb stort fragment og selektion med hensyn til PTC-resistens, kan anvendes til fremstilling af PTC-resistente planter, som PTT-resistensmarkør i bakterier, som PTC-resistensmarkør i planteceller og til selektiv N-acetylering af L-formen af racemisk PTC.

Fig. 1



Phosphinothricin (PTC, 2-amino-4-methylphosphinosmørsyre) er en glutaminsyntetase-inhibitor. PTC er en "byggesten" i antibiotikummet phosphinothricyl-alanyl-alanin. Dette tripeptid (PTT) er aktivt overfor gram-positive og gram-negative bakterier og ligeledes overfor svampen Botrytis cinerea (Bayer et al., Helv. Chim. Acta 55 (1972) 224). PTT produceres af stammen Streptomyces viridochromogenes Tü 494 (DSM 40736, DSM 4112).

Fra tysk patentskrift nr. 2.717.440 er det kendt, at PTC virker som totalherbicid. I den offentliggjorte PCT-ansøgning WO nr. 86/02.097 er beskrevet planter, hvis resistens mod PTC skyldes, at de overproducerer glutaminsyntetase. Sådanne overproduktioner, eksempelvis som følge af en genamplifikation, gemmer dog risikoen for ustabilitet i sig. Såfremt der er tale om en sådan ustabilitet, ville overproduktionen af glutaminsyntetase således gå tilbage, og den kompetitive inhibitorvirkning af PTC ville atter blive virksom.

Opfindelsen, som er defineret i patentkravene, angår i modsætning hertil en resistensgensekvens mod PTC og anvendelsen deraf til fremstilling af PTC-resistente planter. Yderligere kan denne gensekvens ligeledes finde anvendelse som resistensmarkør. Endvidere egner genet sig til selektiv N-acetylering af L-formen af racemisk PTC.

Resistensgensekvensen ifølge opfindelsen mod PTC kan fås ud fra hele DNA'et af Streptomyces viridochromogenes DSM 4112, der er selekteret med hensyn til PTT-resistens, ved klipning med BamHI, kloning af et 4,0 kb stort fragment og selektion med hensyn til PTT-resistens. Restriktionskortet (figur 1) karakteriserer dette 4,0 kb-fragment nærmere.

Ved kloning af delområder af dette 4 kb-fragment lokaliseres beliggenheden af kodeområdet nærmere. Herved viser det sig, at resistensgenet ligger på det 1,6 kb lange SstII-SstI-fragment (positionerne 0,55 - 2,15 i fig. 1). Ved nedbrydning med BglII fås det 0,8 kb store fragment, som efter indbygning i et plasmid og transformation af S.

lividans giver PTT-resistens. Denne resistens er betinget af N-acetyleringen af PCT.

Sekvenseringen ifølge Maxam og Gilbert af det 0,8 kb lange fragment giver DNA-sekvensen I (bilag). Fra de åbne læserammer i denne sekvens kan man finde beliggenheden af resistensgenet (fra stilling 258). Slutningen af gensekvensen ligger ved den næstsidste af de gengivne nucleotider (stilling 806), dvs., at det sidste nucleotid (stilling 807) er begyndelsen af stop-kodonet.

I DNA-sekvensen I er "Shine-Dalgarno-Sekvensen" fremhævet ved understregning, ligesom det som start-kodon virkende GTG. Den bestemmende læseramme er ligeledes udtrykt i den øverste linie.

DNA-sekvensen II viser restriktionsskæringsstederne i det sekvenserede gen. Enzymer, som skærer sekvensen mere end seks gange, er ikke angivet.

Antibiotikummet PTT optages af bakterier og nedbrydes til dannelse af PTC. Dette inhiberer i bakterier ligeledes glutaminsyntetasen, således at bakterierene dør af glutaminmangel. PTT-producerende bakterier skal følgelig besidde en mekanisme, som beskytter dem mod virkningen af PTT, altså enten hindrer genoptagelsen af det producerede PTT eller muliggør en ændring af nedbrydningsproduktet PTC. Overraskende er PTT-producenten S. viridochromogenes DSM 4112 imidlertid følsomt overfor dets eget antibiotikum. Uventet er det imidlertid lykkedes, ved selektion med hensyn til PTT-resistens med den overraskende høje rate på ca. 10^{-5} at finde selektanter, som er resistente overfor PTT og ligeledes undertrykker baggrundsvæksten af de nærliggende kolonier.

Ud fra DNA fra disse selektanter anlægges en genbank ved, at DNA'et isoleres, spaltes med BamHI og ligeres til en streptomycetvektor. Ligeringsblandingen transformeres i den i handelen gængse stamme S. lividans TK 23, idet der for hver 1 mg ligeringsblanding fås fra ca. 5000 til 10.000 transformanter med en indbygning fra ca. 1 til ca. 5 kb.

Blandt transformanterne befinder sig PTT-resistente S. lividans-stammer. Ved isolering af plasmidet og retransformation i S. lividans kan det vises, at resistensen er plasmidkodet. Det for resistensen ansvarlige gen ligger på et 4 kb-BamHI-fragment (fig. 1). Kodeområdet er lokaliseret på det 0,8 kb lange BglII-fragment. BamHI-fragmentet indeholder ikke nogle skæringssteder for enzymerne ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, PvuI, PvuII og XhoI.

Sammenligningen med restriktionskortet for et ikke nærmere karakteriseret resistensgen fra S. hygroscopicus FERM BP-130/ATCC 21705 (europæisk patentansøgning med offentliggørelsesnummeret 173.327, fig. 7) viser, at resistensgensekvensen ifølge opfindelsen er forskelligt fra det kendte gen, hvilket man har fundet ved søgningen efter PTT-biosyntesegenerne.

Ved inkubation af celleekstrakter af S. viridochromogenes DSM 4112 og S. lividans TK 23 på den ene side og de PTT-resistente S. viridochromogenes-selektanter og en plasmidbærende S. lividans-transformant på den anden side med PTC og acetyl-koenzym A kan det vises, at de sidstnævnte celler viser en acetylerende aktivitet. Chromatografiske undersøgelsesresultater viser, at acetyleringen sker på aminogruppen.

Da man ligeledes i E. coli kan konstatere en PTT-resistens, og resistensmekanismen således ligeledes fungerer i gram-negative bakterier, kan en resistens på grund af transportfænomener udelukkes. Resistensgesekvensen ifølge opfindelsen kan følgelig efter kobling til vegetabilske promotorer med egnede vektorer transformeres til planter, og der kan således fremstilles PTT-resistente planter.

N-acetyleringen af PTC kan ligeledes anvendes til racematadskillelse af syntetisk D,L-PTC, da der selektivt kun sker en acetylering af L-formen.

Opfindelsen angår følgelig også anvendelsen af resistensgensekvensen til selektiv N-acetylering af L-formen af racemisk PTC.

Den af resistensgensekvensen ifølge opfindelsen kodede PCT--acetyltransferase kan altså benyttes til at adskille racemisk PCT, såsom den eksempelvis kan fremstilles ifølge tysk patentskrift nr.2.717.440, i de optiske antipoder ved, at racematet udsættes for den acetylerende virkning af dette enzym, idet L-formen selektivt angribes, medens D-formen forbliver uændret. Den således tilvejebragte blanding kan derefter på baggrund af dens forskellige egenskaber adskilles på i og for sig kendt måde.

Det er kendt at bringe N-acyl-D,L-aminosyrer i kontakt med eventuelt bærerfikserede acylaser, idet L-aminosyren selektivt frigives, hvilken syre kan ekstraheres fra blandingen med N-acyl-D-aminosyre efter syrning med ikke-vandblandbare opløsningsmidler (britisk patentskrift nr. 1.369.462). En tilsvarende adskillelse af N-acyl-D,L-PTC er eksempelvis kendt fra tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.939.269 eller US-patentskrift nr. 4.226.941.

Det ifølge opfindelsen tilbageblevne D-PCT kan på kendt måde racemiseres (europæisk patentansøgning med offentliggørelsesnummeret (EP-A) 137.371, eksempel 8), og derpå føres tilbage til processen.

Isoleringen af enzymet, hvorved man her og i det følgende ligeledes altid skal forstå den enzymatisk virksomme del, er mulig, men ikke nødvendig. Såfremt enzymet isoleres, kan det anvendes i fri eller bærerfikseret form. Egnede bærere er eksempelvis beskrevet i EP-A nr. 141.223. Hensigtsmæssigt isoleres enzymet dog ikke, men man anvender vilkårlige PTC-resistente celler, som eksprimerer enzymet ifølge opfindelsen. Således kan man hensigtsmæssigt anvende de PTT-resistente selektanter af S. viridochromogenes DSM 4112. Fordelagtigt kan imidlertid også komme en vilkårlig, med gensekvensen ifølge opfindelsen transformeret celle til anvendelse, som er i stand til at eksprimere PTC-acetyltransferasen. Genet ifølge opfindelsen, hvorved man her ligeledes skal forstå aktive dele af dette, kan i den forbindelse i plasmidintegreret form eller med andre gængse

gentekniske metoder, eksempelvis ved transfektion. Hensigtsmæssig er eksempelvis indbygningen i et E. coli-ekspressionsplasmid og transformation af E. coli med et sådant plasmid, eksempelvis ifølge de fra EP-A nr. 163.249 og 171.024 kendte fremgangsmåder.

Til N-acetylering ifølge opfindelsen af L-PTC i racematet kan man anvende de celler, som eksprimerer PTC-acetyltransferasen, i fri eller fikseret form, idet de gængse fikseringsmetoder finder anvendelse (eksempelvis tysk offentliggørelsesskrift nr. 3.237.341 og deri citeret litteratur).

Den enzymetiske acetylering ifølge opfindelsen af L--PTC sker på den for enzymatiske omsætninger gængse måde, idet fremgangsmådebetingelserne retter sig efter den anvendte organismes givne forhold. Principielt kommer hertil de samme metoder som for den ovennævnte selektive afacyleringsfremgangsmåde i betragtning.

I de følgende eksempler belyses opfindelsen nærmere. Dele og procentangivelser er på vægtbasis, medmindre intet andet er angivet.

Eksempel 1: PTT-resistente selektanter

Stammen S. viridochromogenes DSM 4112 dyrkes på minimal medium (Hopwood et al., Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, England (1985), s. 233), og der tilsættes PTT i stigende koncentrationer. Ved en koncentration på 100 µg/ml findes der en resistent koloni pr. ca. 10^5 kolonier.

Eksempel 2: Fremstilling af vektoren

Plasmidet pSVH1 (europæisk patentskrift nr. 070.522) skæres med BglII, det ca. 7,1 kb store fragment isoleres og ligeres med 1,1 kb BclI-fragmentet med thiostrepton-resistensen (europæisk patentansøgning med offentliggørelsesnummeret 158.201). Man får det 8,15 store plasmid pEB2 (fig. 2).

Eksempel 3: Isolering af resistensgenet

Fra selektanterne ifølge eksempel 1 isolerer man hele DNA'et og spalter det med BamHI. Plasmidet pEB2 åbnes ligeledes med BamHI, de to blandinger forenes og ligeres. Ligeringsblandingen transformeres ved S. lividans TK 23 (som kan fås ved John Innes Foundation), idet der pr. 1 µg ligeringsblanding fås fra 5000 til 10.000 transformanter med en indbygning fra ca. 1 til ca. 5 kb. Ved selektion med hensyn til PTT-resistens fås to resistente S. lividans-kolonier. Ud fra disse isoleres det optagne plasmid og skæres med BamHI. Man får et 4 kb BamHI-fragment, som bærer det for resistensen ansvarlige gen. Dette plasmid får betegnelsen pPR1 (fig. 3).

Ved retransformation til S. lividans TK 23 kan det vises, at PTT-resistensen er plasmidkodet, da transformanterne vokser på minimalmedium, som indeholder 100 µg PTT pr. ml.

Eksempel 4: Påvisning af inaktiveringen af PTC ved N-acetylering

Til påvisning af den acetylerede aktivitet af det klonede fragment undersøges følgende stammer:
S. viridochromogenes DSM 40736, S. viridochromogenes (PTT--resistente mutanter), S. lividans TK23 og S. lividans TK 23 (pPR1).

Dertil podes stammerne i lysemedium A (europæisk patentansøgning med offentliggørelsesnummeret 158.872, s. 6) og inkuberes i 2 dage ved 30°C i et rundrysteapparat. Efter høsten oplukkes 1 g mycelium i en egnet puffer (eksempelvis RS-buffer: C. J. Thompson et al., J. Bacteriol. 151 (1982), 678-685) med ultralyd. Et typisk eksperiment til måling af PTT-nedbrydningen forløber som følger:

Til 250 µliter råekstrakt sættes der 100 µliter PTC--opløsning (250 µg/ml) og 50 µliter (4 mg/ml) acetyl-CoA, og der inkuberes i 2 timer ved 30°C. De derefter endnu tilstedeværende PTC-mængder måles ved hjælp af HPLC. Derved får man følgende resultat:

Stamme	ikke-omsat PTC anvendt PTC
S. lividans TK23	100%
S. viridochromogenes (DSM 40736)	72%
S. viridochromogenes selektanter	7%
S. lividans TK 23 (pPR1)	31%

At det drejer sig om en N-acetylering af PTC, kan påvises ved sammenligning med referencestoffer ved tyndtlags-chromatografi (ingen farvning med ninhydrin).

DNA-Sekvens I

IleTrpSerAspValLeuGlyAlaGlyProValLeuProGlyAspAspPhePheSerLeuGlyGlyThrSerIle
AspLeuGluArgArgProGlyGlyArgSerGlyAlaAlaArgGlyArgLeuLeuLeuProArgArgHisLeuHis
ArgSerGlyAlaThrSerTrpGlyProValArgCysCysProGlyThrThrSerSerProSerAlaAlaProPro
AGATCTGGAGCGACGTCCTGGGGGCCGGTCCGGTGCTGCCCGGGGACGACTTCTTCTCCCTCGGCGGCACCTCCA 75
TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCCTGCTGAAGAAGAGGGAGCCGCCGTGGAGGT
SerArgSerArgArgGlyProProArgAspProAlaAlaArgProArgSerArgArgGlyArgArgCysArgTrp
AspProAlaValAspGlnProGlyThrArgHisGlnGlyProValValGluGluGlyGluAlaAlaGlyGlyAsp
IleGlnLeuSerThrArgProAlaProGlyThrSerGlyProSerSerLysLysGluArgProProValGluMet

SerAlaLeuArgValValSerArgIleArgLysGluLeuGlyValProLeuArgLeuAlaValIlePheGluThr
LeuGlyValAlaGlyGlyLeuAlaHisProGlnGlyThrArgArgAlaThrProAlaArgArgAspLeuArgAsp
SerArgArgCysGlyTrpSerArgAlaSerAlaArgAsnSerAlaCysHisSerGlySerProOP SerSerArg
TCTCGGCGTTGCGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCGTGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCGAGA 150
AGAGCCGCAACGCCCACCAGAGCGCGTAGGCGTTCCTTGAGCCGCACGGTGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCT
ArgProThrAlaProProArgAlaCysGlyCysProValArgArgAlaValGlyAlaArgArgSerArgArgSer
ArgArgGlnProHisAspArgAlaAspAlaLeuPheGluAlaHisTrpGluProGluGlyHisAspGluLeuArg
GluAlaAsnArgThrThrGluArgMetArgLeuSerSerProThrGlySerArgSerAlaThrIleLysSerVal

ProSerLeuGluAlaValAlaGluSerValLeuArgGluLeuLysGlyThrAM OC ArgGlyAlaArgHisPro
AlaValProGlySerGlyGlyArgIleArgThrProArgThrGluGlyAspValValLysArgCysProProPro
ArgArgProTrpLysArgTrpProAsnProTyrSerAlaAsnOP ArgGlyArgSerLysGluValProAlaThr
CGCCGTCCCTGGAAGCGGTGGCCGAATCCGTACTCCGCGAACTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACC 225
GCGGCAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGCATGAGGCGCTTGACTTCCCCTGCATCATTTCTCCACGGGCGGTGG
AlaThrGlyProLeuProProArgIleArgValGlyArgValSerProSerThrThrPheLeuHisGlyGlyGly
ArgGlyGlnPheArgHisGlyPheGlyTyrGluAlaPheGlnLeuProArgLeuLeuSerThrGlyAlaValArg
GlyAspArgSerAlaThrAlaSerAspThrSerArgSerSerPheProValTyrTyrLeuProAlaArgTrpGly

LeuSerGlnAsnThrGluGlyArgProHisValSerProGluArgArgProValGluIleArgProAlaThrAla
AlaPheAlaGluHisArgArgLysThrThrArgGluProArgThrThrProGlyArgAspProSerArgHisArg
ArgPheArgArgThrProLysGluAspHisThrOP AlaGlnAsnAspAlaArgSerArgSerValProProPro
CGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCG 300
GCGAAAGCGTCTTGTGGCTTCCTTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGCTGCGGGCCAGCTCTAGGCAGGGCGGTGGC
AlaLysAlaSerCysArgLeuPheValValArgSerGlyLeuValValGlyProArgSerGlyAspArgTrpArg
LysArgLeuValGlyPheSerSerTrpValHisAlaTrpPheSerAlaArgAspLeuAspThrGlyGlyGlyGly
SerGluCysPheValSerProLeuGlyCysThrLeuGlySerArgArgGlyThrSerIleArgGlyAlaValAla

AlaAspMetAlaAlaValCysAspIleValAsnHisTyrIleGluThrSerThrValAsnPheArgThrGluPro
ArgArgHisGlyGlyGlyLeuArgHisArgGlnSerLeuHisArgAspGluHisGlyGlnLeuProTyrGlyAla
ProProThrTrpArgArgSerAlaThrSerSerIleThrThrSerArgArgAlaArgSerThrSerValArgSer
CCGCCGACATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTACGGAGC 375
GGCGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAGCAGTTAGTGATGTAGCTCTGCTCGTGCCAGTTGAAGGCATGCCTCG
ArgArgCysProProProArgArgCysArgOP AspSerCysArgSerSerCysProOP SerGlyTyrProAla
GlyValHisArgArgAspAlaValAspAspIleValValAspLeuArgAlaArgAspValGluThrArgLeuArg
AlaSerMetAlaAlaThrGlnSerMetThrLeuOP AM MetSerValLeuValThrLeuLysArgValSerGly

GlnThrProGlnGluTrpIleAspAspLeuGluArgLeuGlnAspArgTyrProTrpLeuValAlaGluValGlu
AlaAspSerAlaGlyValAspArgArgProGlyAlaProProGlyProLeuProLeuAlaArgArgArgGlyGly
ArgArgLeuArgArgSerGlySerThrThrTrpSerAlaSerArgThrAlaThrProGlySerSerProArgTrp
CGCAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGGACCGCTACCCCTGGCTCGTCGCCGAGGTGG 450
GCGTCTGAGGCGTCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGAGGTCCTGGCGATGGGGACCGAGCAGCGGCTCCACC
AlaSerGluAlaProThrSerArgArgGlyProAlaGlyGlyProGlySerGlyArgAlaArgArgArgProPro
LeuSerArgLeuLeuProAspValValGlnLeuAlaGluLeuValAlaValGlyProGluAspGlyLeuHisLeu
CysValGlyCysSerHisIleSerSerArgSerArgArgTrpSerArgAM GlyGlnSerThrAlaSerThrSer

DNA-Sekvens I (fortsat)

```
  GlyValValAlaGlyIleAlaTyrAlaGlyProTrpLysAlaArgAsnAlaTyrAspTrpThrValGluSerThr
 GlyArgArgArgArgHisArgLeuArgArgProLeuGluGlyProGlnArgLeuArgLeuAspArgArgValAsp
ArgAlaSerSerProAlaSerProThrProAlaProGlyArgProAlaThrProThrThrGlyProSerSerArg
AGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCCTACGCCGGCCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCTACGACTGGACCGTCGAGTCGA 525
TCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGCCGGGGACCTTCCGGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCT
ProArgArgArgArgCysArgArgArgArgGlyArgSerProGlyCysArgArgArgSerSerArgArgThrSer
  AlaAspAspGlyAlaAspGlyValGlyAlaGlyProLeuGlyAlaValGlyValValProGlyAspLeuArgArg
 ProThrThrAlaProMetAlaAM AlaProGlyGlnPheAlaArgLeuAlaAM SerGlnValThrSerAspVal

  ValTyrValSerHisArgHisGlnArgLeuGlyLeuGlySerThrLeuTyrThrHisLeuLeuLysSerMetGlu
 GlyValArgLeuProProAlaProAlaAlaArgThrGlyLeuHisProLeuHisProProAlaGluValHisGly
ArgCysThrSerProThrGlyThrSerGlySerAspTrpAlaProProSerThrProThrCysOP SerProTrp
CGGTGTACGTCTCCCACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGG 600
GCCACATGCAGAGGGTGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGTACC
ProThrArgArgGlyGlyAlaGlyAlaAlaArgValProSerTrpGlyArgCysGlyGlyAlaSerThrTrpPro
  HisValAspGlyValProValLeuProGluSerGlnAlaGlyGlyGluValGlyValGlnGlnLeuGlyHisLeu
 ThrTyrThrGluTrpArgCysTrpArgSerProSerProGluValArgAM ValTrpArgSerPheAspMetSer

  AlaGlnGlyPheLysSerValValAlaValIleGlyLeuProAsnAspProSerValArgLeuHisGluAlaLeu
 GlyProGlyLeuGlnGluArgGlyArgArgHisArgThrAlaGlnArgProGluArgAlaProAlaArgGlyAla
ArgProArgAlaSerArgAlaTrpSerProSerSerAspCysProThrThrArgAlaCysAlaCysThrArgArg
AGGCCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGCCTGCACGAGGCGC 675
TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACGCGGACGTGCTCCGCG
ProGlyProSerOP SerArgProArgArgOP ArgValAlaTrpArgGlySerArgAlaGlyAlaArgProAla
  GlyLeuAlaGluLeuAlaHisAspGlyAspAspSerGlnGlyValValArgAlaHisAlaGlnValLeuArgGlu
 AlaTrpProLysLeuLeuThrThrAlaThrMetProSerGlyLeuSerGlyLeuThrArgArgCysSerAlaSer

  GlyTyrThrAlaArgGlyThrLeuArgAlaAlaGlyTyrLysHisGlyGlyTrpHisAspValGlyPheTrpGln
 ArgIleHisArgAlaArgAspAlaAlaGlySerArgLeuGlnAlaArgGlyLeuAlaArgArgGlyValLeuAla
SerAspThrProArgAlaGlyArgCysGlyGlnProAlaThrSerThrGlyAlaGlyThrThrTrpGlySerGly
TCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGCACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGC 750
AGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCGGCCGATGTTCGTGCCCCCGACCGTGCTGCACCCCAAGACCG
ArgIleCysArgAlaArgSerAlaAlaProLeuArgSerCysAlaArgProSerAlaArgArgProThrArgAla
  SerValGlyArgAlaProArgGlnProCysGlyAlaValLeuValProAlaProValValHisProGluProLeu
 ProTyrValAlaArgProValSerArgAlaAlaProAM LeuCysProProGlnCysSerThrProAsnGlnCys

  ArgAspPheGluLeuProAlaProProArgProValArgProValThrGlnIle
 AlaArgLeuArgAlaAlaGlyProAlaProProArgProAlaArgHisThrAsp
SerAlaThrSerSerCysArgProArgProAlaProSerGlyProSerHisArgSer
AGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCCGCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT 807
TCGCGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGGCGGGGCAGGCCGGGCAGTGTGTCTAGA
AlaArgSerArgAlaAlaProGlyAlaGlyGlyArgGlyAlaArgOP ValSerArg
  AlaValGluLeuGlnArgGlyArgGlyAlaGlyAspProGlyAspCysLeuAsp
 ArgSerLysSerSerGlyAlaGlyGlyArgGlyThrArgGlyThrValCysIle
```

DNA-Sekvens II

```
  1  AGATCTGGAGCGACGTCCTGGGGGCCGGTCCGGTGCTGCCCGGGGACGACTTCTTCTCCC
     TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCCTGCTGAAGAAGAGGG

     1 BGLII XHOII, 2 DPNI SAU3A, 5 GSUI, 12 AATII ACYI, 13 MAEII
     , 17 APYI ECORII, 26 RSRII, 27 AVAII, 35 BBVI, 39 AVAI NCII
     SMAI, 40 NCII, 52 MBOII, 59 MNLI,

 61  TCGGCGGCACCTCCATCTCGGCGTTGCGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCG
     AGCCGCCGTGGAGGTAGAGCCGCAACGCCCACCAGAGCGCGTAGGCGTTCCTTGAGCCGC

     66 HGICI, 70 MNLI, 97 FNUDII, 100 SFANI, 101 FOKI,

121  TGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCGAGACGCCGTCCCTGGAAGCGGTGGCCGAATCCG
     ACGGTGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCTGCGGCAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGC

     122 BGLI, 140 DPNI SAU3A, 142 MBOII, 149 ACYI HGAI TTH111I,
     158 APYI ECORII, 169 CFRI GDIII, 174 HINFI, 180 RSAI,

181  TACTCCGCGAACTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAGAACA
     ATGAGGCGCTTGACTTCCCCTGCATCATTTCTCCACGGGCGGTGGGCGAAAGCGTCTTGT

     186 FNUDII, 201 MAEII, 211 MNLI, 213 HGICI, 214 SDUI,

241  CCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCG
     GGCTTCCTTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGCTGCGGGCCAGCTCTAGGCAGGGCGGTGGC

     247 MBOII, 254 AFLIII, 255 PMACI, 256 MAEII, 260 HGIJII SDUI
     , 271 ACYI HGAI, 275 NCII, 283 XHOII, 284 BINI DPNI SAU3A,

301  CCGCCGACATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCA
     GGCGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAGCAGTTAGTGATGTAGCTCTGCTCGTGCCAGT

     303 BGLI, 308 NLAIII, 324 TTH111I, 350 HGIAI SDUI, 357 HINCI
     I,

361  ACTTCCGTACGGAGCCGCAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGG
     TGAAGGCATGCCTCGGCGTCTGAGGCGTCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGAGGTCC

     367 RSAI, 380 HINFI, 384 BINI, 395 DPNI SAU3A, 404 APYI ECOR
     II, 405 GSUI, 409 HAEII, 413 MNLI, 414 GSUI, 416 APYI ECORII
     , 419 AVAII,

421  ACCGCTACCCCTGGCTCGTCGCCGAGGTGGAGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCCTACGCCG
     TGGCGATGGGGACCGAGCAGCGGCTCCACCTCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGC

     430 APYI ECORII, 444 MNLI, 450 MNLI, 453 ACYI, 454 HGAI, 462
      NAEI, 466 SFANI, 477 NAEI,

481  GCCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCTACGACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTACGTCTCCC
     CGGGGACCTTCCGGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCTGCCACATGCAGAGGG

     484 APYI ECORII, 511 AVAII, 519 HINFI, 521 ACCI HINCII SALI,
      530 RSAI, 532 MAEII,
```

DNA-Sekvens II (fortsat)

```
541  ACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCC
     TGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGT
        ^    ^            ^        ^     ^    ^           ^^

     544 HGICI, 549 NSPBII, 563 HGIJII SDUI, 572 MNLI, 578 TAQII,
      583 BSPMI, 595 NCOI STYI, 596 NLAIII, 600 MNLI,

601  AGGCCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGC
     TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACG
        ^                                                ^

     605 APYI ECORII, 650 AVAI,

661  GCCTGCACGAGGCGCTCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGC
     CGGACGTGCTCCGCGAGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCGGCCGATGTTCG
            ^ ^              ^^^ ^    ^  ^      ^  ^       ^

     669 MNLI, 671 HAEII, 686 FNUDII, 687 BSSHII, 688 FNUDII, 690
      FNUDII, 695 HGAI, 698 BBVI, 705 BBVI, 708 NAEI, 716 TTH111I
     I,

721  ACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGCAGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCC
     TGCCCCCGACCGTGCTGCACCCCAAGACCGTCGCGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGG
               ^   ^            ^   ^         ^^  ^

     732 DRAIII, 736 MAEII, 749 BBVI, 753 FNUDII, 763 ALUI, 764 B
     BVI, 767 NAEI,

781  GCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT
     CGGGGCAGGCCGGGCAGTGTGTCTAGA
                  ^      ^^

     795 MAEIII, 802 BGLII XHOII, 803 DPNI SAU3A,
```

P A T E N T K R A V.

1. Resistensgensekvens mod phosphinothricin (PTC), der fås fra hele DNA'et af med hensyn til phosphinothricyl--alanyl-alanin (PTT)-resistens selekteret Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 ved skæring med BamHI, kloning af et 4,0 kb stort fragment og selektion med hensyn til PTT-resistens.

2. Gensekvens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved restriktionskortet ifølge fig. 1.

3. Gensekvens ifølge krav 1 og 2, k e n d e t e g n e t ved DNA-sekvensen I (bilag), fra position nr. 258 til nr. 806.

4. Anvendelse af gensekvensen ifølge krav 1 til 3 til fremstilling af PTT-resistente planter.

5. Anvendelse af gensekvensen ifølge krav 1-3 som PTT-resistens-markør i bakterier.

6. Anvendelse af gensekvensen ifølge krav 1-3 som PTC-resi-stens-markør i planteceller.

7. Anvendelse af gensekvensen ifølge krav 1-3 til selektiv N-acetylering af L-formen af racemisk PTC.

Fig. 1

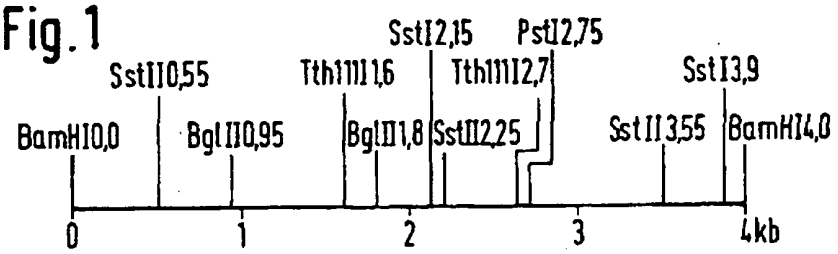


Fig. 2

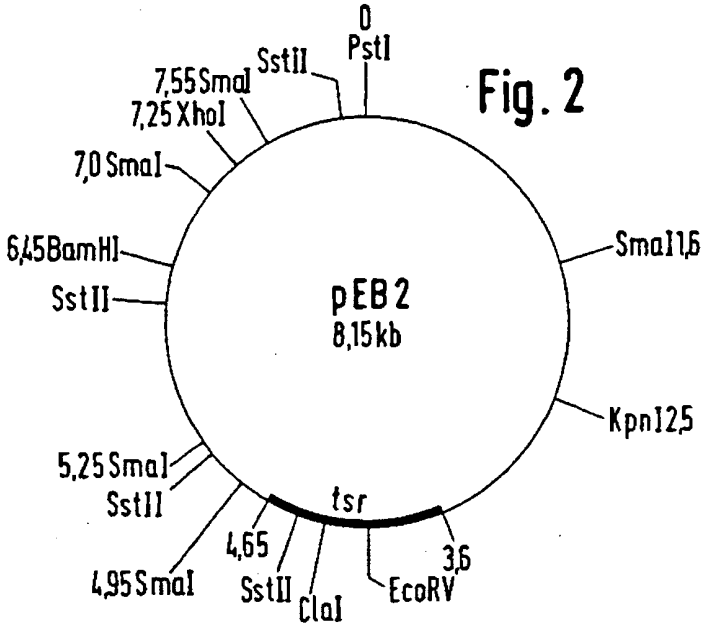


Fig. 3

