



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0412/86

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 15/82

(22) Indleveringsdag: 28 jan 1986

(41) Alm. tilgængelig: 29 jul 1987

(44) Fremlagt: 21 okt 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *Danisco A/S; Langebrogade 1; 1411 København K, DK

(72) Opfinder: Kjeld Adrian *Marcker; DK, Jens Stougaard *Jensen; DK

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Fremgangsmåde til ekspression af gener i bælgplante-celler, DNA-fragment, rekombineret DNA-fragment samt plasmid til brug ved udøvelsen af fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 122791

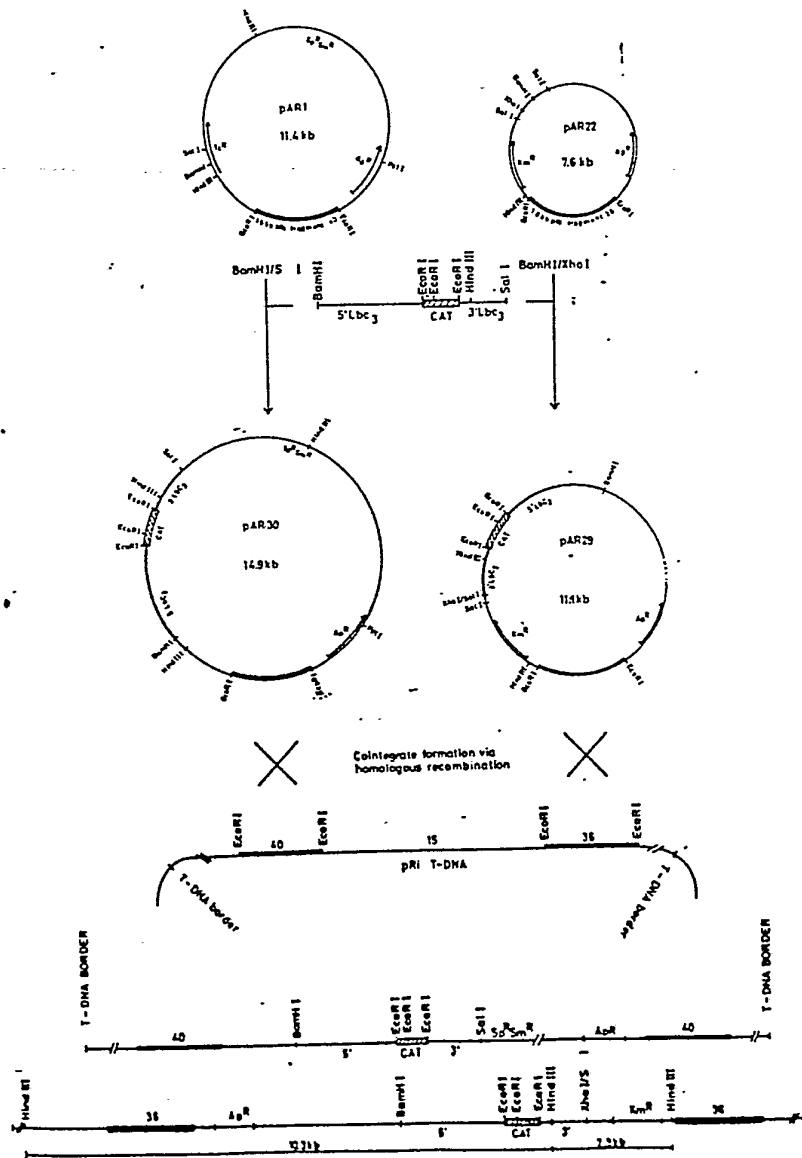
412-86

(57) **Sammendrag:**

Fremgangsmåde til ekspression af gener i planter, plantedele og plante-cellekulturer, ved hvilken der anvendes et DNA-fragment, der indeholder en inducerbar plantepromotor fra rodknoldspecifikke gener, DNA-fragmenter, der indeholder en inducerbar plantepromotor, til brug ved udøvelse af fremgangsmåden, hvilke DNA-fragmenter er identiske med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra rodknoldspecifikke gener af enhver oprindelse samt plasmider og transformerede Agrobacterium rhizogenes-stammer, der kan bruges ved udøvelse af fremgangsmåden.

Skema 6.

412-86



Opfindelsens tekniske område.

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til ekspression af gener i bælglplanteceller ved transformering af cellerne med et rekombineret DNA-fragment, der indeholder dels det gen, der ønskes udtrykt, dels en 5'-flankerende region, hvori indgår en promotor, og eventuelt en 3'-flankerende region, og dyrkning af de transformerede celler i et egnet vækstmedium; et DNA-fragment til brug i et rekombineret DNA-fragment ved fremgangsmåden; et rekombineret DNA-fragment til brug ved fremgangsmåden; samt et plasmid til brug ved fremgangsmåden.

Med begrebet "rodknoldspecifikke gener" menes i forbindelse med den foreliggende opfindelse plantegener, som kun er aktive i bælglplanters rodknolde, eller gener, hvis udtryk er forøget i rodknolde. Rodknoldsspecifikke plantegener udtrykkes på bestemte udviklingstrin og aktiveres koordineret som led i den symbiose, hvorved der sker en nitrogenfiksering og optagelse af det fikserede nitrogen i plantens metabolisme.

Med begrebet "inducerbar plantepromotor" forstås generelt en promotoraktiv 5'-flankerende region fra plantegener, som kan induceres fra en lav aktivitet til en høj aktivitet. I forbindelse med den foreliggende opfindelse skal der ved "inducerbar plantepromotor" forstås en sådan promotor, som er afledt af, indeholdt i eller identisk med en 5'-flankerende region med en ledersekvens fra rodknoldspecifikke gener og som kan fremme og regulere ekspressionen af et gen, som karakteriseret i forbindelse med den foreliggende opfindelse.

Med begrebet "ledersekvens" forstås generelt en DNA-sekvens, som transskriberes til en mRNA, men ikke yderligere translateres til protein. Leder-sekvensen består således af DNA-fragmentet fra transskriptionsstart til ATG-koden, som udgør translationsstart. Ved en "leder-sekvens" forstås i forbindelse med den foreliggende opfindelse et kort DNA-fragment, som er indeholdt i den ovenfor beskrevne inducerbare plantepromo-

tor, og som typisk har 40-70 basepar, og som kan indeholde sekvenser, der er mål for en posttranskriptionel regulering.

5 Med begrebet "promotorregion" forstås i forbindelse med den foreliggende opfindelse et DNA-fragment, som indeholder en promotor, som omfatter målsekvenser for RNA-polymerase samt eventuelle aktiveringsområder, som indeholder målsekvenser for transkriptionseffektorstoffer. I den foreliggende opfindelse kan målsekvenser for transkriptionseffektorer også være be-
10 liggende 3' for promotoren, dvs. i et rodknoldsspecifikt gens kodesekvenser, intervenerende sekvenser eller på genets 3'-flankerende region.

Desuden anvendes en række for fagfolk almindeligt kendte molekylærbiologiske begreber, herunder de nedenfor anførte.
15

CAP-additionspunkt: Det nucleotid, hvor 7-methyl-GTP adderes på den tilsvarende mRNA.

20 DNA-sekvens eller DNA-segment: En lineær række af nucleotider, som er forbundet til hinanden via phosphordiesterbindinger mellem 3'- og 5'-carbonatomer i nabopentoser.

Ekspression: Den proces, et strukturelt gen undergår til fremstilling af et polypeptid. I processen indgår transkription og translation samt eventuelle posttranslatoriske modifikationer.
25

Flankerende regioner: DNA-sekvenser, som omkranser kodende regioner. 5'-flankerende regioner indeholder en promotor. 3'-flankerende regioner kan indeholde en transkriptionsterminator m.m.
30

Gen: En DNA-sekvens bestående af tre eller fire dele, nemlig
35 (1) den kodende sekvens for genproduktet, (2) de sekvenser i promotorregionen, som styrer, hvorvidt genet vil blive udtrykt, (3) de sekvenser i 3'-enden, som betinger transskrip-

tionsterminering og eventuelt polyadenylering, samt evt. (4) intervenserende sekvenser.

5 Homolog rekombination: En rekombination mellem sekvenser, som viser en høj grad af homologi.

10 Intervenerende sekvenser: DNA-sekvenser, som optræder i et gen, og som ikke koder for noget peptidfragment. De intervenserende sekvenser transskriberes til præ-mRNA og elimineres ved modifikation af præ-mRNA til mRNA. De kaldes også introns.

15 Kimærisk gen: Gen, der er sammensat af dele fra forskellige gener. F.eks. er det kimæriske Lbc₃-5'-3'-CAT sammensat af en chloramfenicol-acetyltransferase-kodesevens stammende fra E.coli og 5'- og 3'-flankerende regulerende regioner fra sojabønnes Lbc₃-gen.

20 Kloning: Proces til opnåelse af en population af organismer eller DNA-sekvenser, der hidrører fra en sådan organisme eller sekvens ved ukønnet reproduktion eller nærmere bestemt en proces til isolering af en bestemt organisme eller del heraf og opformering af denne underfraktion som en homogen population.

25 Kodende sekvenser: DNA-sekvenser, der bestemmer et polypeptids aminosyresekvens.

30 Krydsinokuleringsgruppe: Gruppe af bælglplantearter, der kan danne funktionelt aktive rodknolde med Rhizobium-bakterier, som er isoleret fra rodknolde af gruppens andre arter.

35 Leghæmoglobin (Lb): Et oxygenbindende protein, der udelukkende syntetiseres i rodknolde. Lb-proteinerne regulerer oxygenpartialtrykket i rodknoldvævet og transporterer oxygen til bakteroiderne. Herved beskyttes det oxygenfølsomme nitrogenaseenzym. Lb-generne er rodknoldspecifikke gener.

Messenger-RNA (mRNA): RNA-molekyle, der er dannet ved transkription af et gen og evt. modifikation af mRNA. mRNA-molekylet viderebringer det genetiske budskab, som bestemmer aminosyresekvensen i et polypeptid, ved at en del af mRNA-molekylet translateres til dette peptid.

Nedstrøms: Stedsangivelse i en DNA-sekvens. Defineres i forhold til transskriptionsretningen 5'→3' for det gen, i forhold til hvilket stedsangivelsen finder sted. Den 3'-flankerende region findes således nedstrøms for genet.

Nucleotid: En monomer enhed af DNA eller RNA, som består af en sukkerdel (pentose), fosfat og en nitrogenholdig heterocyklisk base. Basen er bundet til sukkerdelen gennem en glycosidisk binding (1'-carbon i pentose), og denne kombination af base og sukker er et nucleosid. Basen karakteriserer nucleotidet. De fire DNA-baser er adenin (A), guanin (G), cytosin (C) og thymin (T). De fire RNA-baser er A, G, C og uracil (U).

Opstrøms: Stedsangivelse i en DNA-sekvens. Defineres i forhold til transskriptionsretningen 5'→3' for det gen, i forhold til hvilket stedsangivelsen finder sted. Den 5'-flankerende region findes således opstrøms for dette gen.

Plantetransformation: Processer, der fører til indbygning af gener i plantecellers genom således, at disse gener nedarves stabilt gennem mitose og meiose eller således, at disse gener kun vedligeholdes for kortere perioder.

Plasmid: En ekstra-kromosomal, dobbeltstrenget DNA-sekvens, der omfatter et intakt replikon således, at plasmidet replikeres i en værtscelle. Når plasmidet er placeret inde i en encellet organisme, ændres eller transformeres denne organismes egenskaber som et resultat af plasmidets DNA. F.eks. transformerer et plasmid, som bærer genet for tetracyklinresistens (Tc^R), en tidligere tetracyklinfølsom celle til en celle, som er resistent over for tetracyklin. En celle, som er transformeret af et plasmid, kaldes en transformant.

Polypeptid: En lineær række af aminosyrer, som er forbundet til hinanden ved hjælp af peptidbindinger mellem α -amino- og carboxygrupper i naboaminsyrer.

- 5 Rekombination: Dannelse af et nyt DNA-molekyle ved kombination af DNA-fragmenter med forskellig oprindelse.

Replikation: Proces, hvorved DNA-molekyler reproduceres.

- 10 Replikon: Et selvreplikerende genetisk element med et origin til initiering af DNA-replikation og gener, der specificerer de funktioner, som er nødvendige for replikation og reguleringen heraf.

- 15 Restriktionsfragment: Et DNA-fragment, som er resultatet af dobbeltstrengt kløvning med et enzym, som genkender en specifik mål-DNA-sekvens.

- 20 RNA-polymerase: Enzym, der bevirker transskription af DNA til RNA.

- Rodknold: Specialiseret væv, der dannes efter infektion af fortrinsvis bælgplanterødder med Rhizobium-bakterier. Selve vævet dannes af værtsplanten og består derfor af planteceller, mens Rhizobium-bakterierne efter infektionen bliver omgivet af en plantecellemembran og differentierer til bacteroider. Rodknolde dannes på andre plantearter efter infektion af nitrogenbindende bakterier, der ikke tilhører Rhizobium-slægten. I disse knolde udtrykkes også rodknoldspecifikke plantegener.

- 30 Southern-hybridisering: Denatureret DNA overføres efter størrelsesseparering i agarosegel til en nitrocellulosemembran. Overført DNA analyseres for en given DNA-sekvens eller et givet gen ved hybridisering. Denne proces tillader enkeltstrengede, radioaktivt mærkede DNA-sekvenser (sonder) at bindes til komplementære, enkeltstrengede DNA-sekvenser, der er bundet på membranen. Beliggenheden af DNA-fragmenter på membranen, der binder sonden, kan derefter påvises på røntgenfilm.
- 35

Symbiotisk nitrogenfiksering: Det samlivsforhold, hvorunder bacteroider i rodknolde omdanner luftens nitrogen (dinitrogen) til ammonium, som optages af planten, mens planten forsyner bacteroiderne med carbonforbindelser som en carbonkilde.

5

Symbiont: Den ene deltager i et symbiotisk forhold, specielt kaldes Rhizobium for microsymbionten.

Transformation: Den proces, hvorved en celle bringes til at optage et DNA-molekyle.

10

Translation: Den proces, hvorved der produceres et polypeptid ud fra mRNA, eller den proces, hvorved den genetiske information, som er til stede i et mRNA-molekyle, dirigerer rækkefølgen af specifikke aminosyrer under syntesen af et polypeptid.

15

Transskription: Den proces, hvorved der med udgangspunkt i en DNA-sekvens syntetiseres en komplementær RNA-sekvens.

Vektor: Et plasmid, phag-DNA eller andre DNA-sekvenser, som er i stand til at replikere i en værtselle, og som har et eller et lille antal endonucleasegenkendelsespunkter, på hvilke sådanne DNA-sekvenser kan kløves på en bestemt måde uden medfølgende tab af en essentiel biologisk funktion .

20

25

Grundlaget for opfindelsen

Traditionel planteforædling bygger på gentagne sammenkrydsninger af plantelinier, der hver især bærer ønskede egenskaber. Identifikation af afkomstlinier, der bærer alle de ønskede egenskaber, er en særdeles tidskrævende proces, da den bioke-

30

35

miske og genetiske baggrund for egenskaberne som oftest er ukendt. Nye linier vælges derfor efter deres fænotype, som oftest efter screening af mange linier i markforsøg.

Gennem tiderne har der været en direkte sammenhæng mellem befolkningens ernæringstilstand og dermed sundhed og landbrugets

mulighed for at sikre en tilstrækkelig tilførsel af assimilerbart nitrogen til opnåelse af tilfredsstillende afgrødeudbytter. Allerede i 1600 tallet blev man opmærksom på, at planter af ærteblomstfamilien, hvortil foruden ærter bl.a. hører bønner, lupiner, sojabønne, kællingetand, vikker, lucerne, espargette og kløver, var i stand til at forbedre afgrøder, som blev dyrket, hvor disse planter havde stået. I dag ved man, at dette skyldes, at ærteblomstfamiliens medlemmer er i stand til selv at opbygge nitrogenreserver. De har på deres rødder bakterier, med hvilke de lever i symbiose.

Infektion af disse bælgplanters rødder med Rhizobium-bakterier fører til dannelse af rodknolde, som er i stand til at omdanne atmosfærisk nitrogen til bundet nitrogen, en proces, der kaldes nitrogenfiksering.

Atmosfærisk nitrogen omsættes herved til former, der kan udnyttes af værtsplanten samt af de planter, der senere vokser på samme sted.

I 1800-tallet udnyttedes denne mulighed for nitrogentilførsel til at opnå en ikke tidligere set forøgelse af afgrødeudbyttet.

De senere, yderligere afgrødeforøgelser er imidlertid især opnået ved hjælp af naturgødning og nitrogenholdig kunstgødning. Den heraf følgende forurening af miljøet gør det ønskeligt at anvise andre muligheder for at sikre den til opnåelse af de bedst mulige afgrødeudbytter nødvendige nitrogentilførsel.

Det ville således være værdifuldt at kunne forbedre de eksisterende nitrogenfikserende systemer i bælgplanter samt at indføre nitrogenfikserende systemer også i andre planter.

Ved hjælp af rekombinant DNA-teknik og de udviklede plante-transformationssystemer er det nu muligt at tilføre planter

nye egenskaber på velkontrolleret måde. Disse egenskaber kan stamme ikke blot fra samme planteart, men fra alle andre prokaryote eller eukaryote organismer. DNA-teknikkerne tillader ligeledes hurtig og specifik identifikation af afkomstlinier, 5 der bærer de ønskede egenskaber. En given plantelinie kan på denne måde tilføres en eller flere ønskede egenskaber på en hurtig og veldefineret måde.

10 Planteceller kan på samme måde tilføres veldefinerede egenskaber og derefter vedligeholdes som plantecellelinier ved hjælp af kendte vævskulturmetoder. Sådanne planteceller vil kunne udnyttes til produktion af biologiske produkter af særlig interesse, såsom farvestoffer, aromastoffer, plantehormoner, farmaceutiske produkter, primære og sekundære metabolitter 15 samt polypeptider (enzymmer).

En række faktorer og funktioner, som er nødvendige for biologisk produktion af et givet genprodukt, er kendte. Både initiering og regulering af transskription såvel som initiering 20 og regulering af posttransskriptionelle processer kan karakteriseres.

På genniveau vides det, at disse funktioner hovedsageligt udføres af 5'-flankerende regioner. En lang række 5'-flankerende 25 regioner fra prokaryote og eukaryote gener er sekvensbestemte, og på baggrund blandt andet heraf er tilvejebragt en omfattende viden om reguleringen af genekspression og om hvilke sub-regioner og sekvenser, der er af betydning for regulering af ekspression af genet. Der er store forskelle på reguleringsmekanismen i prokaryote og eukaryote organismer, men inden 30 for de to grupper er der mange fælles træk.

Regulering af genekspression kan finde sted på transskriptionsniveau og sker da fortrinsvis ved regulering af transskriptionens initieringsfrekvens. Dette er velkendt og beskrevet af bl.a. Benjamin Lewin, Gene Expression, John Wiley & Sons, vol I, 1974, vol. II, Second Edition 1980, vol. III, 35

1977. Alternativt kan reguleringen finde sted på posttransskriptionsniveau, herunder ved regulering af frekvensen for translationsinitieringen, af translationshastigheden samt af translationstermineringen.

5

Den foreliggende opfindelse er baseret på den overraskende kendsgerning, at 5'-flankerende regioner fra rodknoldspecifikke gener, eksemplificeret med den 5'-flankerende region fra sojabønneleghæmoglobin-Lbc₃-genet, kan anvendes til inducerbar
10 ekspression af et fremmed gen i en artsfremmed bælgplante. Promotorens induktion og regulering udøves fortrinsvis i form af regulering og induktion på transskriptionsniveau og adskiller sig derved fra den i patentansøgning nr. 4889/85 angivne inducerbarhed, som fortrinsvis finder sted på transla-
15 tionsniveau.

Transskriptionen af såvel sojabønnens Lbc₃-gen som et til kællingetand overført kimærisk Lbc₃-gen starter på et lavt niveau lige efter rodknoldene bliver synlige på planterødderne.
20 Derefter er der en kraftig forøgelse af transskriptionen, lige før rodknoldene bliver røde. Transskriptionen af en række andre rodknoldspecifikke gener påbegyndes på netop dette tidspunkt. Denne samtidige induktion af transskriptionen af Lb-generne og andre rodknoldspecifikke gener betyder, at der må
25 findes en fælles DNA-sekvens/sekvenser for de forskellige gener, der styrer dette udtryksmønster. Leghæmoglobin-c₃-genet er således en repræsentant for én klasse af gener, og Lbc₃-genets promotor og ledersekvens, målområder for aktivering samt kontrolelementer for organspecificitet er således repræsentanter
30 for en hel genklasses kontrolelementer.

Promotoren fra de 5'-flankerende regioner i Lb-generne fungerer i sojabønner og er ansvarlig for transskriptionen af Lb-generne i rodknolde. Det er endvidere kendt, at effektiviteten
35 af både transskriptionsinitiering og efterfølgende translation-sinitiering på Lb-genernes ledersekvens er høj, idet Lb-proteinerne udgør ca. 20% af det totale proteinindhold i rodknolde.

Sekvensen af 5'-flankerende regioner fra de fire sojabønneleg-
hæmoglobingener, Lba, Lbc₁, Lbc₂ og Lbc₃, er angivet i det ved-
lagte sekvensskema, fig. 1, hvor sekvenserne er angivet såle-
des, at det tydeligt fremgår, at der er homologi imellem de
5 fire 5'-flankerende regioner.

I dette sekvensskema betyder "-", at der ikke er nogen base i
pågældende position. Til højre i sekvensskemaet er angivet ge-
nernes navne og baseposition talt opstrøms for ATG-startkoden.
10 Desuden er de betydende sekvenser understregede.

Som det fremgår af sekvensskemaet, er der en udtalt grad af
homologi imellem de fire 5'-flankerende regioner, og i posi-
tionen 23-24 basepar opstrøms for CAP-additionspunktet inde-
holder de alle en TATATAAA-sekvens, som svarer til "TATA"-
15 boksen, som normalt i eukaryote celler er lokaliseret et til-
svarende antal basepar opstrøms for CAP-additionspunktet. Des-
uden findes en CCAAG-sekvens 64-72 basepar opstrøms for CAP-
additionspunktet, hvilken sekvens svarer til "CCAAT"-boksen,
20 som normalt er lokaliseret 70-90 basepar opstrøms for CAP-
additionspunktet. Fra CAP-additionspunktet til translations-
startkoden, ATG, findes ledersekvenser på 52-59 basepar, som
udviser en udstrakt grad af homologi af størrelsesordenen ca.
75-80%.

25 Det er i forbindelse med den foreliggende opfindelse blevet
vist, eksemplificeret med Lbc₃-genet, at de 5'-flankerende re-
gioner fra sojabønneleghæmoglobingenerne er funktionelt aktive
i andre plantearter. Dette er blevet vist ved at fusionere E.
30 coli chloramphenicol-acetyl-transferase-(CAT)-genet med de 5'-
og 3'-flankerende regioner fra sojabønne-Lb₃-genet således, at
ekspressionen af CAT-genet kontrolleres af Lb-promotoren. Det-
te fusionsfragment blev klonet ind i integrationsvektorerne
pAR1 og pAR22. Herved dannedes plasmiderne pAR29 og pAR30.
35 Sidstnævnte plasmider blev via homolog rekombination integre-
ret ind i Agrobacterium rhizogenes T-DNA-regionen. Transforma-
tion af Lotus corniculatus(kællingetand)planter (dvs. overfør-

sel af T-DNA-regionen) blev opnået ved sårinfektion på kimstængelen. Rødder, der var udviklet fra de transformerede planteceller, blev dyrket in vitro og befriet for A. rhizogenes-bakterier ved brug af antibiotika. Fuldstændigt regenererede planter blev dannet af disse rodkulturer på konventionel måde gennem somatisk embryogenese eller organogenese.

Regenererede planter blev derefter inokuleret med Rhizobium loti-bakterier, og der blev høstet rodknolde til analyse. Transskription og translation af det kimæriske Lbc₃-CAT-gen kunne herefter påvises i rodknolde på transformerede planter som aktiviteten af det dannede chloramphenicolacetyl-transferaseenzym.

Det kan således konkluderes, at de promotorholdige 5'-flankerende regioner fra rodknoldspecifikke gener, eksemplificeret med sojabønne-Lbc₃-promoterer, er funktionelt aktive i artsfremmede planter. Dette er en overraskende observation, idet rodknolde kun udvikles som følge af en meget specifik reaktion mellem bælgplanten og dens tilsvarende Rhizobium-mikrosymbiont.

Sojabønner danner kun knolde efter infektion af arten Rhizobium japonicum og Lotus corniculatus kun efter infektion af arten Rhizobium loti. Sojabønne og Lotus corniculatus tilhører derfor to forskellige krydsinokuleringsgrupper, der hver især danner rodknolde med to forskellige Rhizobium-arter. Ekspresion af et kimærisk sojabønnegen i Lotus corniculatus påviser derfor et uventet universelt reguleringssystem, der gælder for rodknoldspecifikke geners udtryk. De involverede regulerende DNA-sekvenser kan placeres på genernes 5'- og 3'- flankerende regioner, her eksemplificeret ved de 2.0 Kb 5'- og 0.9 Kb 3'- flankerende regioner af Lbc₃-genet. Denne overraskende observation vil muliggøre brugen af rodknoldspecifikke promotorer og regulerende sekvenser i enhver anden planteart og enhver anden plantecellelinie.

I andre eksperimenter blev den 5'-flankerende region af det knoldspecifikke N23-gen sammensluttet med CAT-genet og den 3'-flankerende Lbc₃-region på en sådan måde, at ekspressionen af CAT-genet kontrolleres af N23-promotoren. Dette fusions-fragment blev klonet ind i integrationsvektoren pAR22 til fremstilling af plasmidet N23-CAT, der derefter blev rekombineret ind i A. rhizogenes og overført til Lotus corniculatus og Trifolium repens (hvid kløver) ved den ovenfor beskrevne metode. Den rodknoldspecifikke ekspression af det overførte N23-CAT-gen, opnået i L. corniculatus, som var inficeret med Rhizobium loti og i T. repens, som var inficeret med Rhizobium trifolii, viste yderligere, at ekspression af rodknoldspecifikke gener er uafhængig af plantearten og Rhizobium-arten. Et universelt regulatorisk system regulerer derfor ekspressionen af rodknoldspecifikke gener i de forskellige symbiotiske systemer, der dannes mellem bælgplanter og Rhizobium-arterne fra de forskellige krydsinokuleringsgrupper.

Det er kendt fra EP-patentansøgning nr. 122.791.A1, at plantegener fra én art ved Agrobacterium-formidlet transformation kan overføres til en anden planteart. Det er også kendt fra EP 122.791.A1, at et overført gen, som koder for frølagringsproteinet "Phaseolin", kan udtrykkes i tobak og lucerne. Fra litteraturen er det også kendt, at denne ekspression er frøspecifik (Sengupta-Gopalan et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 3320-3324).

Den foreliggende opfindelse angår derfor en hidtil ukendt fremgangsmåde til ekspression af overførte gener på en rodknoldspecifik måde under anvendelse af DNA-regulatorsekvenser fra 5'-promotorregionen, den kodende region eller den 3'-flankerende region fra rodknoldspecifikke gener, her eksemplificeret med leghæmoglobin-Lbc₃-genet og N23-genet. Denne metode adskiller sig både fra den Agrobacterium-formidlede transformationsmetode og ekspression af genet for frølagringsproteinet phaseolin, som er karakteriseret i EP 122.791.A1. Ekspression af det overførte phaseolingen i EP 122.791.A1 vi-

ser kun, at phaseolingenfamilien med sine særlige regulatoriske krav kan udtrykkes i tobak og lucerne. Den hverken viser eller antyder, at noget andet gen med dets særlige regulatoriske krav kan udtrykkes i nogen anden plante eller plantevæv.

5

Formål med opfindelsen

Et formål med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe en mulighed for at udtrykke ønskede gener i bælgplanter, bælgplantedele og bælgplantecellekulturer.

10

Det er desuden et formål med opfindelsen at kunne udtrykke gener af enhver oprindelse under kontrol af en inducerbar rodknoldspecifik promotor.

15

Yderligere formål med opfindelsen er at forbedre de eksisterende nitrogenfikserende systemer i bælgplanter.

Et yderligere formål med opfindelsen er at tilvejebringe en mulighed for i visse tilfælde at kunne anvende specifikke sekvenser fra den 3'-flankerende region fra kodesekvensen og fra intervenserende sekvenser til indvirkning på rodknoldspecifikke promotorers regulering.

20

Det er desuden et formål med opfindelsen at tilvejebringe plasmider, der indeholder den ovennævnte inducerbare plantepromotor.

25

Yderligere formål med opfindelsen fremgår umiddelbart af den følgende beskrivelse.

30

Beskrivelse af opfindelsen

Disse formål opnås ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til ekspresion af gener i bælgplanter ved transformering af cellerne med et rekombineret DNA-fragment, der indeholder dels det gen, der ønskes udtrykt, dels en 5'-flankerende

35

de region, hvori indgår en promotorsekvens og eventuelt en 3'-flankerende region, og dyrkning af de transformerede celler i et egnet vækstmedium, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes 5'- eller i givet fald 5'- og 3'-flankerende regioner fra et rodknoldspecifikt plantegen, og at promotoren er en inducerbar plantepromotor, som regulerer, at 5 ekspressionen sker i rodknoldene på bestemt udviklingstrin og som led i den symbiotiske nitrogenfiksering. Om ønsket regenereres de transformede celler til planter.

10

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det muligt på veldefineret måde at udtrykke fremmede gener i bælgplanter, bælgplantedele og bælgplantecellekulturer. Her tænkes især på gener, som vil tilføre planter ønskede egenskaber, som f.eks. 15 resistens mod plantesygdomme og forøget indhold af værdifulde polypeptider.

En anden anvendelse vil være fremstillingen af værdifulde produkter som f.eks. farvestoffer, aromastoffer, plantehormoner, 20 farmaceutiske produkter, primære og sekundære metabolitter og polypeptider ved brug af fremgangsmåden ifølge opfindelsen i plantecellekulturer og planter.

Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til ekspres- 25 sion af rodknoldspecifikke gener bliver det muligt at udtrykke rodknoldspecifikke gener, der er nødvendige for dannelsen af et aktivt nitrogenfikserende system i både bælgplanter og andre planter. Den korrekte udviklingsmæssige kontrol (eksempel 8) muliggør etablering af et symbiotisk nitrogenfikserende system i ikke-bælgplanter. Herved bliver det overras- 30 kende muligt at forbedre de eksisterende nitrogenfikserende systemer i bælgplanter samt at indføre nitrogenfikserende systemer i andre planter.

35 Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til ekspres- sion af fremmede gener i rodknolde er det muligt at bringe bælgplanter forbedrede egenskaber, såsom herbicidresistens og resistens mod sygdomme og skadedyr.

Ved en særlig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes et DNA-fragment, der indeholder en inducerbar plantepromotor, og som er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra leghæmoglobingener. Herved opnås udtryk af et hvilket som helst gen.

Eksempler på sådanne DNA-fragmenter er DNA-fragmenter fra de fire 5'-flankerende regioner fra sojabønne-leghæmoglobin-generne, nemlig

Lba med sekvensen:

```

GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATAACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAACTGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
TAATTAATAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAATTAAT AGAAATAACA GAAATTTAAA
AAAGAAATAT G.

```

Lbc₁ med sekvensen:

```

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATACATACA TTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TACAAATAGA GAGAGTTTTC
GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTTCGATTAA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAATAA CAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

Lbc₂ med sekvensen:

```

5   TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTAA  AAAAACTCT  CTAGTGTCCA.
    TTTATTCGGC GAGAAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
    ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
    TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG:
    ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT:
    TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA.
    ACTATTTAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT.
    TTAECTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
    GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
    TTGACAAATT ATTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
    TTTAAGATT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC.
10  CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
    TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTGCATAAC TTGCATTGAA
    CAATAGAAAT AACACAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.

```

og Lbc₃ med sekvensen:

```

15  TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACA AAAA
    GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAACTCTT
    GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
    ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
    AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
    TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
    TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
    CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
    AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
    GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
20  CTAAAAAAAT ATATATTAAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
    TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
    TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
    GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
    TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACCTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
    CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

Ved en yderligere udførelsesform for fremgangsmåden ifølge
25 opfindelsen anvendes et DNA-fragment, som er identisk med,
 afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra
 Lbc₃-5'-3'-CAT-genet med sekvensen:

30

35

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACRAAA
 GTRACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCRATCTT
 GTAGATTTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
 ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
 AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
 TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCCT CCGAGTTTGA
 TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
 5 CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
 AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
 GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTA TATTTTATTT TATATGGAAA
 CTAAAAAAT ATATATTAAT ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATAT
 TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
 TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACRAGCCAG AGAGACATAA
 GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
 10 TTGGATGTGA AGTTGTTCGA TAACCTTGCAT TGAACAATA ATAGAAATAA
 CAGAAAAGTA GAATTCATAA ATG.

Ved en særlig foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden
 ifølge opfindelsen anvendes der yderligere en 3'-flankerende
 region fra rodknoldspecifikke gener, især sekvenser fra den
 15 3'-flankerende region, som kan indvirke på styrken eller regu-
 leringen hos en promotor fra rodknoldspecifikke gener eller på
 transskriptionsterminering, eller som på anden måde kan på-
 virke udbyttet af det ønskede genprodukt.

20 Eksempler på sådanne 3'-flankerende regioner er de fire 3'-
 flankerende regioner fra sojabønneleghæmoglobingenerne, nemlig
 Lba med sekvensen:

1590 1620
 TAA TTA GTA TCT ATT GCA GTA AAG TGT AAT AAA TAA ATC TTG

25

1650 1680
 TTT CAC TAT AAA ACT TGT TAC TAT TAG ACA AGG GCC TGA TAC AAA ATG TTG GTT AAA ATA

1710 1740
 ATG GAA TTA TAT AGT ATT GGA TAA AAA TCT TAA GGT TAA TAT TCT ATA TTT GCG TAG GTT

30

1770 1800
 TAT GCT TGT GAA TCA TTA TCG GTA TTT TTT TTC CTT TCT GAT AAT TAA TCG GTA AAT TA

1830 1860
 ACA AAT AAG TTC AAA ATG ATT TAT ATG TTT CAA AAT TAT TTT AAC AGC AGG TAA AAT GTT

ATT TGG TAC GAA AGC TAA TTC GTC GA

35

Lbc₁ med sekvensen:

TAA/TT AGG ATC TAC TGC ATT GCC GTA 1320

AAG TGT AAT AAA TAA ATC TTG TTT CAA CTA AAA CTT GTT ATT AAA CAA GTT CCC TAT ATA 1350 1380

5 AAT GTT GTT TAA AAT AAG TAA ATT TCA TTG TAT TGG ATA AAC ACT TTT AAG TTA TAT ATT 1410 1440

TCC ATA TAT TTA CGT TTG TGA ATC ATA ATC GAT ACT TTA TAA AAA TAA ATT CCA AAT AAT 1470 1500

TTA TAC GTT TTA AAA ATT ATT TT

10 Lbc₂ med sekvensen:

TAG/GAT CTA CTA TTG CCG TCA AGT 1140

GTA ATA AAT AAA TTT TGT TTC ACT AAA ACT TGT TAT TAA ACA AGT CCC CGA TAT ATA AAT 1170 1200

15 GTT GGT TAA AAT AAG TAA ATT ATA CCG TAT TGA TAA ACA ATC TTA AGT TTT ATA TAT AGT 1230 1260

TCC ATA TAC TAA AGT TTG TGA ATC ATA ATC GA 1290

20 og Lbc₃ med sekvensen:

TAG/GAT CTA CAA TTG CCT TAA AGT GTA ATA AAT AAA 990 1020

25 TAT TAT TTC ACT AAA ACT TGT TAT TAA ACC AAG TTC TCG ATA TAA ATG TTG GTT AAA CTA 1050 1080

AGT AAA TTA TAT GGT ATT GGA TAA ACA ATC TTA AGC TT 1110

30

Denne sekvens er beliggende på den ifølge opfindelsen anvendte 0,9 kb 3'-flankerende region. En særlig udførelsesform for opfindelsen er derfor anvendelse af sekvenser fra denne region, der udøver eller formidler den ifølge opfindelsen karakteriserede regulering af rodknoldspecifikke promotorregioner.

35

Ved en særlig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes en region fra rodknoldspecifikke geners kodesekvens eller intervenserende sekvens, især sekvenser fra kodesekvensen eller den intervenserende sekvens, som kan indvirke på den knoldspecifikke promotors styrke eller regulering, eller som på anden måde kan påvirke udbyttet af det ønskede genprodukt.

Eksempler på sådanne kodesekvenser og intervenserende sekvenser er de fire leghæmoglobingener fra sojabønne, nemlig Lba med sekvensen:

15

20

25

30

35

120
VAL
ATG/GTT

150
ALA PHE THR GLU LYS GLN ASP ALA LEU VAL SER SEP SEP PHE GLU ALA PHE LYS ALA ASN
GCT TTC ACT GAG AAG CAA GAT GCT TTG GTG AGT ACC TCA TTC GAA GCA TTC AAG GCA AAC

210
ILE PRO GLN TYR SER VAL VAL PHE TYR THR SER
ATT CCT CAA TAG ACC GTT GTG TTC TAC ACT TCVG TAA GTT TTC TCT CTA ACC ATG TGT CTT

270
CCA TTC TAT GTT TTT CTT TTG GAA ATT TGT TGT GTC TGA AAA AAG ATA TAT TGT TAA TGT

330
GAG TGG TTT TGG TTT GAT TAA AAA TGA ATAG/G ATA CTG GAG AAA GCA CCT GCA GCA AAG GAC

390
LEU PHE SER PHE LEU ALA ASN GLY VAL ASP PRO THR ASN PRO LYS LEU THR GLY HIS ALA
TTG TTC TCA TTT CTA GCA AAT GGA GTA GAC CCC ACT AAT CCT AAG CTC ACC GCC CAT GCT

450
GLN LYS LEU PHE ALA LEU
GAA AAG CTT TTT GCA TTG/GTAA GTA TCA CCC AAC TAA AAT TAT AAC TAT TTT ATG TGA

510
TYA ATT TYA ACA TYA ACC ATC ATG TAT TTT AAC ACT CTT AAA ACA TCA ATG AAC ATT AAT

570
TGT TTG AAT TGT ATT TYA TAT TTT TGC CAT ATC TTG AAC TAG GAA TAG TAT ATA AAT TTC

630
TAT TAG TAT TTG TTG ATA ATT ATT TTT CTT TCA TAA CTA TCT TGT CAC ATA TYA TAT ATT

690
VAL ARG ASP SER ALA GLY GLN LEU LYS ALA SER GLY THR VAL VAL ALA
TTT TCA ATT GTAG/GTG CGT GAC TCA GCT GCT CAA CTT AAA GCA AGT GGA ACA CTG GTG GCT

750
ASP ALA ALA LEU GLY SER VAL HIS ALA GLN LYS ALA VAL THR ASP PRO GLN PHE VAL
GAT GCC GCA CTT GGT TCT GTT CAT GCC CAA AAA GCA CTC ACT GAT CCT CAG TTC GTG/GT

810
ATC ATA AAT AAT GAA ATC TYA TAA TAA ATT ATG CAT ACT TCA ATT TTT CAT GCA GCA GTA

870
TAA TCA TCA ACA CAC ACT TCT TTT CTT TCA TGC ATT TGA TAA CTA CAA TCT TAA AAT GTT

930
GCA ATC TYA AAA ATA GTA TYA AAA ATA TAA CAT TYA ATY AGC TCA TCA ATA TTT TTC TGT

990
TGC AAT TTT TYA TGA AAA AAT TAT AAT TAT GAA TTC TTT GAG CAA TGT TYA ATT AAA AAA

1050
TTG ATT TAA TAA TGA AAT AAC TAA GCT ACC TCT GTC TCG TTT TTC ATT TAA ACT ATG ACA

1110
TAA ACA ATG AAT AAA GTA AAC TAA ACC ATG ACA TGT TYA TTT TTG AAT GAG GTT ATT AAT

1170
AAT TTT TTT TCA CTA TGT ATT GCA ATG TTC ATT GAT TAT CAA TYA TCT TCG TTG CAT TGA

1230
TTC TCT CGA TTT TTT TCT TGA GCT TAA GCT TCA CTT CAA TAT ATA TTC ATT TTT TGA TAA

1290
AAA AAA ATA CTA CAA TAT ATT TTC ATT TAG CTG ATC ATA TTT ATT TAA GTT CAA CTT AAA

1350
ATT TYA TAG ATG TYA ATT GAT ATA ATT TGT TGA GAT GAT GAG AAG ACC AAT ACC ATT ACC

1410
TAC TCT TTT GAA ACT CTT ATA TGG ATT TYA ATT ATA AGG AAA AAT GTA ACA CCT AAA CCA

1470
VAL VAL LYS GLU ALA LEU LEU LYS THR ILE LYS ALA ALA VAL
TTG CTG ATG ATT TTG AAG/GTG GTT AAA CAA GCA CTG CTG AAA ACA ATA AAG GCA GCA GTT

1530
GLY ASP LYS TRP SER ASP GLU LEU SER ARG ALA TRP GLU VAL ALA TYR ASP GLU LEU ALA
GGG GAC AAA TGG AGT GAC GAG TTG ACC CGT GCT TGG GAA GTA GCC TAC GAT GAA TTG GCA

ALA ALA ILE LYS LYS ALA
GCA GCT ATT AAG AAG GCA TAA,

Lba-proteinets aminosyresekvens er angivet over den kodende sekvens.

Lbc₁ med sekvensen:

5

180
GLY
ATGCGT

210
ALA PHE THR GLU LYS GLN GLU ALA LEU VAL SER SER SER PHE GLU ALA PHE LYS ALA ASN 240
GCT TTC ACT GAG AAG CAA GAG GCT TTG GTG AGT AGC TCA TTC GAA GCA TTC AAG GCA AAC

270
ILE PRO GLN TYR SER VAL VAL PHE TYR ASN SER 300
ATT CCT CAA TAG AGC GTT GTG TTC TAC AAT TC/GTAA GTT TTC TCT ATA AGC ATG TGT CTT

10

330
TCA TTC TAT GTT TTT CTT CTG GAA ATT TTT TGT GTT TGA AAA AAG ATA TAT ATA TAT ATA 360

390
TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT TTT GTT AAT GTG AGT GGT TTT 420

450
ILE LEU GLU LYS ALA PRO ALA ALA LYS ASP LEU PHE SER 480
GGT TTG ATT AAA AAT AAA TAG/GATT CTG GAG AAA GCA CCT GCA GCA AAG GAC TTG TTC TCA

15

510
PHE LEU ALA ASN GLY VAL ASP PRO THR ASN PRO LYS LEU THR GLY HIS ALA GLU LYS LEU 540
TTT CTA GCA AAT GGA GTA GAC CCC ACT AAT CCT AAG CTC ACG GGC CAT GCT GAA AAG CTT

570
PHE ALA LEU 600
TTT GCA TTG/GT AAG TAT CAG CCA ACT AAA ATT ATA ACT ATT TTA TGT GAT TAA TTT TAA

630
GAT TAA ACA TCA TGT ATT TTA ACA CTC TTA AAA TAT CAA TGA ACA TTA ATT TTT TGA ATT 660

690
GTA TTT TAT ATT TTT ACC ATA TCT TGA ACT AGG AAT AAT ATA TAA ATT TCT ATT AGT ATT 720

20

750
TGT TGG TAA TTA CAT ATA TAT ATA TAT ATA TAA TCC TTG TGA TAA TTA TTT TTC GAA TTT 780

810
VAL ARG ASP SER ALA GLY GLN LEU LYS THR ASN GLY THR VAL VAL ALA ASP ALA ALA 840
GTAG/GTG CCT GAC TCA GCT GGT CAA CTT AAA ACA AAT GGA ACA GTG GTG GCT GAT GCT GCA

870
LEU VAL SER ILE HIS ALA GLN LYS ALA VAL THR ASP PRO GLN PHE VAL 900
CIT GTT TCT ATC CAT GCC CAA AAA GCA GTC ACT GAT CCT CAG TTC GTG/GT ATG ATA AAT

930
AAT ACT AGT AAA ATG TTA CAA TAA ATG CAA ACT TAA GTT TTA CGT ACA TAG TGA TCA TGA 960

25

990
CIT CAT GCA TGG CTA TTA TTT TTT CAT ATT TAT TGA AGT CAA CTT AAA ATT TTG TAA ATA 1020

1050
CAG ATC GAT GCT AGT AAT TTG TTG AGA TCA TGA GAA AAC GTA CCA CTA CTC CAA TAG CAT 1080

1110
TAC TCA TTT TGA AAA TTG TAT AAC TGT GAT CTA ATT ATA AGG AAA AAG TGT ATA TAA GAC 1140

1170
CTA ATC CAT TAT TAA TGT TTT TTA TAT TTT GTAG/GTG GTT AAA GAA GCA CTC CTC AAA ACA 1200
VAL VAL LYS GLU ALA LEU LEU LYS THR

30

1230
ILE LYS GLU ALA VAL GLY GLY ASN TRP SER ASP GLU LEU SER SER ALA TRP GLU VAL ALA 1260
ATA AAG GAA GCT CTT GGC GGC AAT TGG AGT GAC GAA TTG AGC AGT GCT TGG GAA GTA GCC

1290
TYR ASP GLU LEU ALA ALA ALA ILE LYS LYS ALA
TAT GAT GAA TTG GCA GCA GCA ATT AAA AAG GCA TAA.

35

Lbc₁-proteinets aminosyresekvens er angivet over den kodende sekvens.

Lbc₂ med sekvensen:

5

GLY
G/GGT
180

ALA PHE THR GLU LYS GLN GLU ALA LEU VAL SER SER SER PHE GLU ALA PHE LYS ALA ASN
GCT TTC ACT GAG AAG CAA GAG GCT TTG GTG AGT AGC TCA TTC GAA GCA TTC AAG GCA AAC
210 240

10

ILE PRO GLN TYR SER VAL VAL PHE TYR THR SER
ATT CCT CAA TAC AGC GTT GTG TTC TAC ACT TC/GTA AGT TTT CTC TTA AAG CAT GTA TCT
270 300

TTC ATT CTC TGT TTT TCC TTT CGA CAT TTT TTG TGT TTG AAA AGA GAT AGT GTC AAT GTG
330 360

AGT GGG TAT TTT TTT TTA TTA AAA ATT AAC ILE LEU GLU LYS ALA PRO ALA ALA LYS
AG/G ATA CTG GAG AAA GCA CCC GCA GCA AAG
390 420

15

ASP LEU PHE SER PHE LEU SER ASN GLY VAL ASP PRO SER ASN PRO LYS LEU THR GLY HIS
GAC TTG TTC TCG TTT CTA TCT AAT GGA GTA GAT CCT AGT AAT CCT AAG CTC ACG GGC CAT
450 480

ALA GLU LYS LEU PHE GLY LEU
GCT GAA AAG CTT TTT GGA TTG/GTA AGT ATC ATC CAA CTA AAA TTA TAG CTA TTT TAT GTG
510 540

ATT AAT TTT AAG ATT AAA CAT GTA TTT AAC ACT CTT AAA CAT GTA TTT AAC ACT CTT AAG
570 600

20

ATT AAA CAT GTA TTT AAC TAA AAC ATG TAT TTG CTG ATT ATT TTT TTT TTA TAA TTA TCT
630 660

TGT CAC ATA TTA TAT ATT TTT TGA ATT GTA VAL ARG ASP SER ALA GLY GLN LEU LYS ALA
G/GTG CGT GAC TCA GCT GGT CAA CTT AAA GCA
690 720

ASN GLY THR VAL VAL ALA ASP ALA ALA LEU GLY SER ILE HIS ALA GLN LYS ALA ILE THR
AAT GGA ACA GTA GTG GCT GAT GCC GCA CTT GGT TCT ATC CAT GCC CAA AAA GCA ATC ACT
750 780

ASP PRO GLN PHE VAL
GAT CCT CAG TTC GTG/GT ATG ATA AAT AAT AAA ATG TTA CAA TAA ATG CAC ATA TAC TTA
810 840

25

AAT TTT ACA TGG TGC AGT GTT ATG ATC ATC ATT TTT GTT TAG TAA TGA ATT TAC TTA AAA
870 900

TCT TAA ATT ATG TAC TTT TTG AAA GTT TTA TAT GGA ATT TTA ATT ATA GGG AAA AAT GTA
930 960

AGA GCT AAT CCA TTA GTG ATG TTT TGT CTG VAL VAL LYS GLU ALA LEU LEU LYS THR
TAG/GTG GTT AAA GAA GCA CTG CTG AAA ACA
990 1020

30

ILE LYS GLU ALA VAL GLY ASP LYS TRP SER ASP GLU LEU SER SER ALA TRP GLU VAL ALA
ATA AAG GAG GCA GTT GGG GAC AAA TGG AGT GAT GAA TTG AGC AGT GCT TGG GAA GTA GCC
1050 1080

TYR ASP GLU LEU ALA ALA ALA ILE LYS LYS ALA PHE
TAT GAT GAA TTG GCA GCA GCT ATT AAG AAG GCA TTT TAC
1110

35

Lbc₂-proteinets aminosyresekvens er angivet over den
kodende sekvens.

Lbc₃ med sekvensen:

5
 GLY ALA PHE THR ASP
 G/GGT GCT TTC ACT GAT 120
 LYS GLN GLU ALA LEU VAL SER SER SER PHE GLU ALA PHE LYS THR ASN ILE PRO GLN TYR
 AAG CAA GAG GCT TTG GTG AGT AGC TCA TTT GAA GCA TTC AAG ACA AAC ATT CCT CAA TAC 150
 SER VAL VAL PHE TYR THR SER 180
 AGT GTT GTG TTC TAC ACC TC/GTA AGT ATT CTA TCT AAA TTA TGT GTC TTA TTG TAT CTT 210
 240
 10
 TAA CTT TCG TGG TTT GTT GTG TTT GAA AAA AAG ATA TAT ATT GTT AAT GTG AGT CCT TTT 270
 300
 ILE LEU GLU LYS ALA PRO VAL ALA LYS ASP LEU PHE SER
 GGT TTG ACT AAA AAT GAA TAG/G ATA CTG GAG AAA GCA CCT GTA GCA AAG GAC TTG TTC TCA 330
 360
 PHE LEU ALA ASN GLY VAL ASP PRO THR ASN PRO LYS LEU THR GLY HIS ALA GLU LYS LEU
 TTT CTA GCT AAT GGA GTA GAC CCC ACT AAT CCT AAG CTC ACG GGC CAT GCT CAA AAA CTT 390
 420
 PHE GLY LEU
 15
 TTT GGA TTG/GT AAG TAT CCA GCC TAC TAA AAT TAA AAT CCT ATT AGT ATT TTT TAT TAT 450
 480
 TTT TCT TCC ATG ATT GTC TTG TCA CAT ATT ATA TAT TTT TTG AAT TAT AG/GTA CCT GAT TCA 510
 VAL ARG ASP SER 540
 ALA GLY GLN LEU LYS ALA SER GLY THR VAL VAL ILE ASP ALA ALA LEU GLY SER ILE HIS
 GCT GGT CAA CTT AAA GCA AGT GGA ACA GTG GTG ATT GAT GCC GCA CTT GGT TCT ATC CAT 570
 600
 ALA GLN LYS ALA ILE THR ASP PRO GLN PHE VAL
 20
 GCC CAA AAA GCA ATC ACT GAT CCT CAA TTT GTG/G TAT GAT AAA TAA TGA AAA CCT ACA 630
 660
 ATA AAT GCA CAA ATA CTT AAT TTT ACA TAG TGC AGT GCT ATA TGA TCA TCA CTT TTG CTT 690
 720
 AGT AAT GAA TTT ACT TTT TTT TTT TAC AGA AGT AAT GGA TTT ACT TAA AAT CTT AAA TTA 750
 780
 TGT ACT TCT TTA AAG AGT TTT GTA TGG AAT TTT AAT TAT AGG AAA AAT GTA AGA GCT AAA 810
 840
 VAL VAL LYS GLU ALA LEU LEU LYS THR ILE LYS GLU ALA
 CCA TTG CTG ATG ATT TCG AAG/GTG GTT AAA GAA GCA CTG CTG AAA ACA ATA AAG GAG GCA 870
 900
 VAL GLY ASP LYS THR SER ASP GLU LEU SER SER ALA TRP GLU VAL ALA TYR ASP GLU LEU
 GTT GGG GAC AAA TGG AGT GAC GAG TTG AGC AGT GCT TGG GAA GTA GCC TAT GAT GAA TTG 930
 960
 ALA ALA ALA ILE LYS LYS ALA PHE!
 GCA GCA GCT ATT AAG AAG GCA TTT TAG.

30

Lbc₃-proteinets aminosyresekvens er angivet over den kodende sekvens.

35

Den foreliggende opfindelse angår endvidere et hidtil ukendt DNA-fragment til brug ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilket DNA-fragment er ejendommeligt ved, at det omfatter en inducerbar plantepromotor, som regulerer, at ekspressionen sker i rodknoldene på bestemte udviklingstrin og som led i den symboistiske nitrogenfiksering, og er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra rodknoldspecifikke gener. Eksempler på sådanne DNA-fragmenter er DNA-fragmenter, som er identiske med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra planteleghæmoglobingener. Foretrukne eksempler herpå er ifølge opfindelsen DNA-fragmenter, som er identiske med, afledt af eller indeholder en 5' flankerende region fra de fire sojabønneleghæmoglobingener, nemlig:

15 Lba med sekvensen:

```

GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
20 GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAAC TGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTT TTAATTTGAT
TAATTA AAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAATAAT TGGAGTGAAG
25 TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAAATTAAT AGAAATAACA GAAATTTAAA
AAAGAAATAT G

```

Lbc₁ med sekvensen:

```

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATACATACA TTTAAAAAAA
30 AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
35 GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTTA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAAATA CAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG,

```

Lbc₂ med sekvensen:

```

5      TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGTCCA
      TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
      ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
      TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
      ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
      TTATATTTTT TGTTACCCT TTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
      ACTATTAAT AGTTGGGCT CAAGTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
      TTAACCTAAT AATAGAGAGA GTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
10     GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
      TTGACAATTT ATTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAAT ACTTATTTAC
      TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
      CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
      TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCAATAC TTGCATTGAA
      CAATAGAAAT AACACAAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.

```

15 og Lbc₃ med sekvensen:

```

      TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
      GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCATCTT
      GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
      ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATT TATATAAGA TGAATTTTAA
      AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
20     TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCTT CCGAGTTTGA
      TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
      CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
      AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
      GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTAA TATTTATTT TATATGGAAA
      CTAAAAAAAT ATATATTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
      TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
      TTCACCATAC CAATTGATCA CCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
25     GTTTTATTAG TTATCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
      TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
      CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

Et andet eksempel på et foretrukket DNA-fragment ifølge opfindelsen er et DNA-fragment, som er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra Lbc₃-5'-3'-CAT-genet med sekvensen:

```

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
G TACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAAAT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
5 TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTAAT ATTTTAAAT CAGAATAATA CTTAATTTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTTGCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCTCCTCCA ACAAGCCFAG AGAGACATAA
10 GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTCCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAATTCATAA ATG.

```

Opfindelsen angår desuden et rekombineret DNA-fragment til
15 brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen karakteriseret ved
det i krav 21's kendetegnende del anførte, samt et plasmid,
til brug ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen,
som er ejendommeligt ved det i krav 22's kendetegnende del
anførte. Egnede plasmider ifølge opfindelsen er pAR11, pAR29,
20 og pAR30 (eksempel 3 og 4). Disse plasmider tillader rekombination
ind i A. rhizogenes-T-DNA-regionen.

Til udøvelse af opfindelsen anvendes f.eks. en Agrobacterium-
25 stamme, som er karakteriseret ved at have et DNA-fragment in-
deholdende en inducerbar plantepromotor fra rodknoldspecifikke
gener indbygget i T-DNA-regionen og som derfor er i stand
til at transformere den inducerbare promotor ind i planter.
Egnede bakteriestammer er f.eks. A. rhizogenes-stammerne
AR1127, som bærer pAR29, AR1134, som bærer pAR30, og AR1000,
30 som bærer pAR11.

Det er velkendt, at leghæmoglobingenerne i alle bælgplanter
har samme funktion, jvf. Appleby (1974) i The Biology of Ni-
trogen Fixation, Quispel. A. Ed. North-Holland Publishing Com-
35 pany, Amsterdam, Oxford, side 499-554, og det er desuden for
havebønne-PvLb1-genet vist, at der er en udstrakt grad af ho-
mologi med sekvenserne af sojabønne-Lbc₃-genet. Det er ligele-

des velkendt, at ekspressionen af andre rodknoldspecifikke gener reguleres på lignende måde som leghæmoglobingenerne. Opfindelsen omfatter således anvendelsen af 5'-flankerende regioner fra leghæmoglobingener eller andre rodknoldspecifikke gener fra alle planter, såfremt anvendelsen af sådanne DNA-fragmenter gør ekspressionen af et ønsket genprodukt til genstand for den i forbindelse med den foreliggende opfindelse karakteriserede regulering.

10 Det er velkendt, at det er muligt at ændre nucleotidsekvenser i ikke-betydende subregioner i 5'-flankerende regioner uden, at dette indebærer ændret promotoraktivitet og -regulering. Det er også velkendt, at det, ved at ændre sekvenser i betydende subregioner i 5'-flankerende regioner, er muligt at ændre
15 bindingsaffiniteter imellem nucleotidsekvenser og de til transkriptionsinitiering og translationsinitiering nødvendige eller ansvarlige faktorer eller effektorstoffer og dermed muligt at forbedre promotoraktivitet og/eller -regulering. Den foreliggende opfindelse omfatter selvsagt også anvendelsen af DNA-
20 fragmenter, der indeholder sådanne ændrede sekvenser fra 5'-flankerende regioner, og specielt kan nævnes DNA-fragmenter, der er frembragt ved at rekombinere sekvenser fra 5'-flankerende regioner fra vilkårlige gener med 5'-flankerende regioner fra rodknoldspecifikke gener, såfremt anvendelsen af
25 sådanne DNA-fragmenter gør ekspressionen af et ønsket genprodukt til genstand for den i forbindelse med den foreliggende opfindelse karakteriserede regulering.

Det skal bemærkes, at transformation af mikroorganismer foretages på i og for sig kendt måde, jf. f.eks. Maniatis et al.,
30 (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

Transformation af planteceller, dvs. introduktion af plasmid-DNA i planteceller, sker ligeledes på i og for sig kendt måde, jf. Zambryski et al., (1983), EMBO J. 2, 2143-2150.

Kløvning med restriktionsendonucleaser og digestion med øvrige DNA-modificerende enzymer er velkendt teknik og udføres som anbefalet af leverandørerne.

5 Den i forbindelse med den foreliggende opfindelse anvendte Agrobacterium rhizogenes 15834-rif^R anvendtes som en typisk repræsentant for *A. rhizogenes*, se White et al., J. Bact. Vol. 141 (1980), 1134-1141, og er isoleret af J.A. Lippincott, Department of Biological Sciences, Northwest University, Evanston, Illinois 60201, USA.
10

På tegningen viser

15 fig. 1 nukleotidsekvenserne for 5'-flankerende regioner fra generne *Lba*, *Lbc₁*, *Lbc₂* og *Lbc₃*,

fig. 2 skema for subkloning af *Lbc₃*-genet,

20 fig. 3 skema for subkloning af 5'-flankerende sekvenser fra *Lbc₃*-genet,

fig. 4 skema for subkloning af 3'-flankerende region fra *Lbc₃*-genet, og konstruktion af *Lb*-promotorkassette,

25 fig. 5 skema for konstruktion af *Lbc₃*-5'-3'-CAT-genet,

fig. 6 skema for kloning og integrering af sojabønne-*Lbc₃*-5'-3'-CAT-genet,

30 fig. 7 skema for kloning og integrering af sojabønne-*Lbc₃*-genet,

35 fig. 8 påvisning af sojabønne-*Lbc₃*-5'-3'-CAT-genet i transformerede kallingetandplanter, som beskrevet i eksempel 4a),

fig. 9 påvisning af sojabønne-*Lbc₃*-genet i transformerede kallingetandplanter som beskrevet i eksempel 4b),

fig. 10 ekspresion af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i forskellige væv fra kællingetand som beskrevet i eksempel 5a),

5 fig. 11 transskriptionsanalyse på væv fra Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede og Lbc₃-transformerede Lotus-planteliner, som beskrevet i eksempel 6,

10 fig. 12 bestemmelse af transskriptionsinitieringssted for sojabønne-Lbc₃-promotoren i transformerede kællingetand-rodknolde som beskrevet i eksempel 7,

15 fig. 13 påvisning af Lbc₃-protein i kællingetandplanter med en transformeret sojabønne-Lbc₃-gen som beskrevet i eksempel 9, og

fig. 14 viser den N-terminale aminosyresekvens fra Lbc₃-transformerede planter sammenlignet med tilsvarende fra Lotus corniculatus-leghæmoglobiner.

20 Opfindelsen belyses af de efterfølgende eksempler.

I eksemplerne gennemførtes transformation af Lotus corniculatus(kællingetand)planter som tidligere beskrevet ved sårintektion på kimstængelen. Rødder, der var udviklet fra de transformerede planteceller, blev dyrket in vitro på Gamborg-B-5-medieum fra Sigma, St. Louis, Missouri, USA, og befriet for A. rhizogenes-bakterier ved brug af antibiotika. Fuldstændigt regenererede planter blev dannet af disse rodkulturer på konventionel måde spontant gennem somatisk embryogenese eller organogenese under lys og uden brug af plantehormoner.

25

30

Transformation af planteceller gennemførtes som beskrevet af Zambryski et al., (1983) EMBO J. 2. 2143-2150.

35 Mobilisering af plasmider ind i A. rhizogenes-bakterier gennemførtes under anvendelse af et plasmidhjælper-system, se E. Van Haute et al., (1983), EMBO J., 3, 411-417.

Eksempel 1.Sekvensbestemmelse af 5'-flankerende regioner fra sojabønneleghæmoglobingener.

5

Fra en sojabønne-genbank er, som beskrevet af E. Ø. Jensen et al., Nature Vol. 291, nr. 3817, 677-679 (1981) tilvejebragt de fire sojabønneleghæmoglobingener, Lba, Lbc₁, Lbc₂ og Lbc₃. Den genetisk stabile, indavlede, invariable sojabønneart "Glycine max. var. Evans" anvendtes som udgangsmateriale for det DNA, der anvendtes til opbygningen af denne genbank. De 5'-flankerende regioner fra de fire sojabønneleghæmoglobingener er isoleret, som beskrevet af E. Ø. Jensen, Licentiatafhandling, Institut for Molekylær Biologi, Århus Universitet (1985), og DNA-sekvenserne er bestemt ved anvendelse af didesoxymetoden, som beskrevet af F. Sanger, J. Mol. Bio. 143, 161-178 (1980), og angivet i sekvensskemaet, fig. 1.

10

15

Eksempel 2.

20

Konstruktion af Lbc₃-5'-3'-CAT.

Konstruktionen er foregået i en række delprocesser, som er beskrevet i det følgende:

25

Subkloning af Lbc₃-genet.

Lbc₃-genet blev isoleret på et 12 kb EcoRI-restriktionsfragment fra et sojabønne-DNA-bibliotek, hvilket er beskrevet i Wiborg et al., Nucl. Acids. Res. (1982) 10, 3487. Et udsnit af dette fragment er vist øverst i vedlagte fig. 2. Dette fragment blev fordøjet med de opgivne enzymer for derefter at blive ligeret til pBR322, som vist på figuren. De resulterende plasmider, Lbc₃HH og Lbc₃HX, blev derefter fordøjet med PvuII og religeret, hvilket resulterede i to plasmider, der benævnes som pLpHH og pLpHX.

30

35

Subkloning af 5'-flankerende sekvenser fra Lbc₃-genet.

Til dette anvendtes pLpHH, som vist i vedlagte fig. 3. Dette plasmid blev åbnet med PvuII og behandlet med exonuklease
 5 Bal31. Reaktionen blev stoppet på forskellige tidspunkter, og de afkortede plasmider blev ligeret til fragmenter fra pBR322. Disse var i forvejen blevet behandlet, som vist i fig. 3, således at de i den ene ende havde en DNA-sekvens

10 TTC _____
 AAG _____

Efter ligeringen blev der fordøjet med EcoRI, og de fragmen-
 ter, der indeholdt 5'-flankerende sekvenser, blev ligeret til
 EcoRI-fordøjet pBR322. Disse plasmider blev transformeret ind
 15 i E. coli K803 (som er en typisk repræsentant for E. coli
 K12-recipientstammerne), og plasmiderne i transformanterne
 blev undersøgt ved sekvensanalyse. Et plasmid, p213 5'Lb,
 isoleret fra en af transformanterne, indeholdt en 5'-flanke-
 rende sekvens, der slutter 7 basepar før Lb ATG-startkoden,
 20 således at sekvensen er som følger:

2kb

- 5'-flankerende --- AAAGTAGAATTC

Lbc₃-sekvens

25

Subkloning af 3'-flankerende region fra Lbc₃-genet.

Til dette anvendtes pLpHX, der blev fordøjet med XhoII. Ender-
 ne blev delvis udfyldt, og overskydende enkeltstrenget DNA
 30 blev fjernet med S1-nuklease som vist i vedlagte fig. 4. Det
 viste fragment blev ligeret til pBR322, der var forbehandlet
 som angivet på figuren. Konstruktionen blev transformeret ind
 i E. coli K803. En af transformanterne indeholdt et plasmid,
 der blev benævnt Xho2a-3'Lb. Da XhoII-genkendelsessekvensen er
 35 beliggende umiddelbart efter Lb-stopkoden (se fig. 2), inde-
 holdt plasmidet ca. 900 af den 3'-flankerende regions basepar,
 og sekvensen startede med GAATTCTACAA---.

Konstruktion af Lb-promotorkassette.

Et EcoRI/SphI-fragment fra Xho2a-3'Lb blev blandet med et BamHI/EcoRI-fragment fra p213-5'Lb. Disse to fragmenter liggeredes via BamHI/SphI-kløvningspunkterne til et pBR322-derivat, hvor EcoRI-genkendelsessekvensen var blevet fjernet (fig. 4). De liggerede plasmider blev transformeret ind i E. coli K803. Et plasmid i en af transformanterne indeholdt de korrekte fragmenter, og det blev benævnt pEJLb 5'-3'-1.

Konstruktion af Lbc3-5'-3'-CAT-genet.

CAT-genet fra pBR322 blev isoleret på flere mindre restriktionsfragmenter, som angivet på vedlagte fig. 5. Den 5'-kodende region blev isoleret som et AluI-fragment, der efterfølgende blev ligeret til pBR322, der er behandlet som angivet på figuren. Dette blev transformeret ind i E. coli K803. Adskillelige transformanter indeholdt det korrekte plasmid. Der blev udtaget et, som blev benævnt Alu11. Den 3'-kodende region blev isoleret på et TaqI-fragment. Dette fragment blev behandlet med exonuklease Bal31, hvorefter der blev adderet EcoRI-koblere. Dernæst blev det fordøjet med EcoRI og ligeret til EcoRI-fordøjet pBR322. Dette blev transformeret ind i E. coli K803, og transformanterne blev analyseret. Et plasmid (Taq 12) indeholdt den 3'-kodende region fra CAT-genet plus 23 basepar 3'-flankerende sekvenser for derefter at slutte i følgende sekvens _____ CCCC GAATTC. Herefter blev følgende fragmenter ligeret samlet til EcoRI-fordøjet pEJLb 5'-3'-1: EcoRI/PvuII-fragment fra AluI, PvuII/DdeI-fragment fra pBR322 og DdeI/EcoRI-fragment fra Taq 12. Denne ligeringsblanding blev transformeret ind i E. coli K803. Adskillelige transformanter indeholdt det korrekte plasmid. Der blev udtaget et, som blev kaldt pEJLb 5'-3' CAT 15.

Eksempel 3.a.5 Kloning og integrering af sojabønne-Lbc₃-5'-3'-CAT-genet.

To EcoRI-fragmenter (nr. 36 og nr. 40) fra T_L-DNA-regionen af A. rhizogenes 15834 pRi-plasmidet anvendtes som "integrationssteder". Lbc₃-5'-3'-CAT-genet blev derfor underklonet (som 3,6
10 kb BamHI/SalI-fragment) i to vektorer pAR1 og pAR22, som bærer ovenstående EcoRI-fragmenter. De resulterende plasmider, pAR29 og pAR30, mobiliseredes separat ind i A. rhizogenes 15834-rif^R under anvendelse af et plasmidhjælper-system, se E. Van Haute et al., (1983), EMBO J., 3, 411-417. Hverken pAR29 eller pAR30
15 kan repliceres i Agrobakte-rium. Selektion med rifampicin 100 µg/ml og plasmidmarkørerne spectinomycin 100 µg/ml, streptomycin 100 µg/ml eller kanamycin 300 µg/ml vil derfor selekttere A. rhizogenes-bakterier, der har integreret plasmiderne via homolog rekombination gennem EcoRI-fragmenterne 36 eller 40.
20 Strukturen af de herved dannede T_L-DNA-regioner - overført til de transformerede plantelinier L5-9 og L6-23 - er angivet nederst på vedlagte fig. 6. Der er tillige for L6-23linien vist de EcoRI- og HindIII-fragmenter, der bærer Lbc₃-5'-3'-CAT-genet og derfor hybridiserer til radioaktivt mærket Lbc₃-5'-3'-
25 CAT-DNA, der anvendes som en sonde, jf. eksempel 4a.

b.30 Kloning og integrering af sojabønne-Lbc₃-genet.

EcoRI-fragmentet nr. 40 er her brugt som "integrationssted". Lbc₃-genet blev derfor underklonet (som 3,6 kb BamHI-fragment) i pAR1-vektoren under dannelse af plasmidet pAR11, som blev overført til T_L-DNA-regionen, som anført i a.. Strukturen af
35 T_L-DNA-regionen, overført til den transformerede plantelinie L8-35, er vist nederst på vedlagte fig. 7. Der er tillige vist de EcoRI- og HindIII-fragmenter, der bærer Lbc₃-genet og

derfor hybridiserer til radioaktivt mærket Lbc₃-DNA, der anvendes som en sonde, jf. eksempel 4b.

Eksempel 4.

5 a.

Påvisning af sojabønne-Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i transformerede kallingetandplanter (Fig. 8)

10 DNA, der var ekstraheret fra transformerede linier (L6-23) eller utransformerede kontrolplanter, og som er skåret med restriktionsenzymene EcoRI og HindIII, blev analyseret ved Southern-hybridisering. Resultatet ses på fig. 8. Radioaktivt mærket Lbc₃-5'-3'-CAT-gen blev anvendt som en sonde til at
15 påvise tilsvarende sekvenser i de transformerede linier. De med tal markerede bånd svarer til restriktionsfragmenter, som udgør dele af Lbc₃-5'-3'-CATgenet, som angivet i eksempel 3a's restriktionskort (fig. 6).

20 b.

Påvisning af sojabønne-Lbc₃-genet i transformerede kallingetandplanter (Fig. 9)

25 DNA, der var ekstraheret fra transformerede linier (L8-35) eller utransformerede kontrolplanter, og som var skåret med restriktionsenzymene EcoRI og HindIII, blev analyseret ved Southern-hybridisering. Resultatet ses på fig. 9. Radioaktivt Lbc₃-gen blev anvendt som en sonde til at påvise tilsvarende
30 sekvenser i de transformerede linier. De med tal markerede bånd svarer til restriktionsfragmenter, som udgør dele af Lbc₃-genet, som angivet i eksempel 3b's restriktionskort (fig. 7).

35

Eksempel 5.a. Ekspression af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i forskellige væv fra kællingetand (Fig. 10)

5

Aktiviteten af chloramphenicol-acetyltransferase (CAT)-enzymet målt som mængden af acetyleret chloramphenicol (AcCm), dannet fra ¹⁴C-chloramphenicol. På fig. 10 ses de acetylerede former 1AcCm og 3AcCm, der blev adskilt fra Cm ved tyndtlagskromatografi i chloroform/methanol (95:5). Kolonne 1-3 viser, at der ikke er CAT-aktivitet i rod (R), knold (N) samt blad+stængel (LS) af utransformerede kællingetandplanter. Kolonne 4-6 og 7-9 viser CAT-aktiviteten i tilsvarende væv af Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede L6-23- og L5-9-planter. Omdannelse af chloramphenicol i kolonne 5 og 8 viser den organspecifikke ekspression af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i rodknolde. Kolonne 10-12 viser manglen på CAT-aktivitet i planter, der er transformeret med Lbc₃-genet.

20

b.

Tabel

25

	L6-23 CAT-aktivitet	L5-9 CAT-aktivitet
Rod	0	0
Knold	68830 cpm/μg protein·time	154.000 cpm/μg protein·time
Blade + stængel	0	0

30

35

I tabellen (b) er CAT-aktiviteten i Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede L5-9- og L6-23-planter opgjort som den mængde af ¹⁴C-chloramphenicol, der er omsat til acetylerede derivater. Mængden af radioaktivitet i de acetylerede derivater er optalt ved væskescintillation og angivet i cpm/μg protein.time.

Ekspression af leghæmoglobin-Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i Trifolium repens (hvidkløver) viser den bevarede mekanisme, som reguler-

rer ekspressionen af rodknoldspecifikke gener.

CAT-aktivitet i transformeret
T. repens cpm/ μ g protein/time.

5

Rod	0
Knold	50.000

Eksempel 6.

10

Transskriptionsundersøgelse (Northern-analyse) på væv fra Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede og Lbc₃-transformerede Lotus-plantelinier (Fig. 11).

15

5 μ g totalt RNA, der var ekstraheret fra rod (R), knold (N) eller blad + stængel (LS), og adskilt i formaldehydagarosegeler, overførtes til nitrocellulose. Resultaterne ses på fig. 11. Kolonne 1 indeholder 5 μ g totalt RNA fra 20 dage gamle sojabønneknolde som kontrolplanter. Kolonne 2-4 og 5-7 indeholder totalt RNA fra henholdsvis rod, knold eller blad + stængel fra de Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede linier L5-9 og L6-23. Kolonnerne 8-10 indeholder RNA fra tilsvarende væv af kællingetand, der var transformeret med A. rhizogenes bærende Lbc₃-genet i T_L-DNA. I (a) er radioaktivt DNA fra CAT-kodese-

20 kvensen anvendt som en sonde til hybridisering. Den organspecifikke transkription af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i rodknolde fra L5-9- og L6-23-linierne ses i kolonne 3 og 6. I (b) er vist transskriptet for konstitutive under anvendelse af en cDNA-sonde for det humane ubiquitingen til hybridiseringen. I (c)

25 er vist den organspecifikke transskription af kællingetands egne leghæmoglobingener. En cDNA-sonde fra sojabønnens Lba-gen er brugt til denne hybridisering.

20

25

30

35

Eksempel 7.

Bestemmelse af transkriptionsinitieringssted (CAP site) for
sojabønne-Lbc3-promotoren i transformerede kællingetandrodknol-
de (Fig. 12)

5

Beliggenheden af "CAP site" bestemmes på nucleotidniveau ved hjælp af primer-forlængelse. Et syntetisk oligonucleotid, 5' CAACGGTGGTATATCCAGTG 3', som er komplementær til nucleotiderne 15 - 34 i CAT-genets kodesekvens, anvendtes som primer for enzymet omvendt transskriptase. Herved dannes et enkeltstrengt DNA, hvis længde svarer til afstanden mellem primerens 5'-ende og det primede mRNA's 5'-ende. En 83 nucleotider lang DNA-streng ville forventes ud fra kendskab til sojabønne-Lbc3-genets transkriptionsinitieringssted. Resultaterne ses på fig. 12. I kolonne 2, 3 og 4 - talt fra venstre mod højre - er vist de dannede DNA-streng, når primer-forlængelsen er kørt på polyA⁺oprenset mRNA fra henholdsvis transformerede kællingetandrodknolde, transformerede kællingetandblade + stængel og utransformerede kællingetandrodknolde. De i kolonne 2 viste 85, 86, 87, 88 og 90 nucleotider lange cDNA-streng påviste korrekt Lbc3-promotorfunktion i kællingetand. CAP-stederne ("CAP sites"), svarende til de dannede cDNA-sekvenser, er angivet med * på den givne delsekvens af Lbc3-5'3'-CAT-regionen. I sekvensen er Lbc3-promotorens TATA-box og den tilsvarende translationsinitieringskode for CAT-kodesekvensen markeret ved understregning.

30

35

Eksempel 8.Påvisning af korrekt udviklingsmæssig kontrol af Lbc₃-5'-3'-
CAT-genet i transformerede kællingetandplanter (L6-23).

5

10

	Trin 1: Rod	Trin 2: Små hvid knolde	Trin 3: Hvide distinkte knolde	Trin 4: Små røde knolde	Trin 5: Røde knolde
CAT-aktivitet i cpm/ μ g protein \cdot time	0	0	32,6	342,3	1255*
Nitrogenaseaktivitet nmol ethylen/ μ g protein \cdot time.	0	0	0	0,5	2,7

15

20

* Substratbegrænset reaktion, faktisk aktivitet ca. 68000 cpm/ μ g protein \cdot time.

25

30

Chloramphenicol-acetyltransferase- og nitrogenaseaktivitet målt på afskårne rodstykker med knolde i de angivne forskellige udviklingstrin. CAT-aktivitet kan påvises i de hvide, distinkte knolde, mens nitrogenaseaktivitet først kan påvises i små røde knolde. Dette forløb svarer til det udviklingsforløb, der er kendt fra sojabønnekontrolplanter og beskrevet af Marcker et al. EMBO. J. 1984, 3, 1691-95. CAT-aktiviteten bestemtes som i eksempel 5. Nitrogenaseaktiviteten målt som knoldenes acetylenreduktionsevne med påfølgende gaskromatografisk bestemmelse af ethylen.

35

Eksempel 9.Påvisning af Lbc₃-protein i kællingetandplanter med indtrans-
formeret sojabønne-Lbc₃-gen (Fig. 13)

5

Proteiner, der var ekstraheret fra rodknolde af Lbc₃-trans-
formerede (L8-35), Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede og utransfor-
merede planter adskiltes ved isoelektrisk fokusering ved en
pH-gradient på 4 til 5. Resultaterne ses på fig. 13. Kolonne
10 1, 3, 5, 7 og 9 viser Lbc₁-, Lbc₂-, Lbc₃- og Lba-proteiner,
der er syntetiseret i sojabønnekontrolrodknolde. Kolonne 2
viser proteiner fra rodknolde af Lbc₃-5'-3'-CAT-transformerede
L6-23-kællingetandplanter, mens kolonnerne 6 og 8 viser pro-
teiner fra utransformerede planter. I kolonnerne 4 og 10 ses
15 sojabønne-Lbc₃-protein, der er syntetiseret i rodknolde af
kællingetandplanter, (L8-35), der er transformeret med Lbc₃-
genet. Lbc₃-proteinbåndet er markeret med pil.

20

Det protein, som vandrer som Lbc₃, markeret med pile i spalte
4 og 10, blev elueret fra gelen til isoelektrisk fokusering og
analyseret ved automatisk aminosyreanalyse. Den N-terminale
aminosyresekvens af proteinet blev sammenlignet med den N-ter-
minale aminosyresekvens for totalt leghæmoglobin, der var eks-
traheret fra rodknolde fra utransformeret Lotus corniculatus.
25 Fig. 14 viser overensstemmelsen mellem de to opnåede sekven-
ser. Den øverste sekvens, der er opnået fra Lbc₃-transformede
planter, svarer nøjagtigt til den kendte aminosyresekvens for
sojabønne-Lbc₃-proteinet og er klart forskellig fra Lotus
corniculatus-leghæmoglobinerne.

30

35

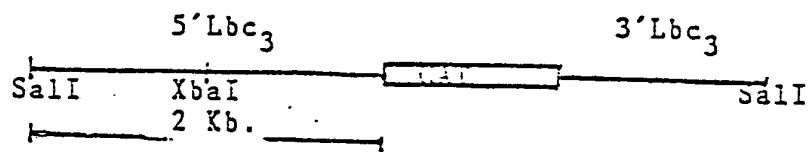
Eksempel 10.

Ekspression af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet kræver 5'-Lbc₃-promotor-regionen.

5

Lbc₃-5'-3'-CAT-genkonstruktionen bærer en 2 kb 5'-Lbc₃-promotorregion. Trinvis fjernelse af sekvenser fra 5'-enden af denne region viste, at denne promotorregion kræves til den karakteristiske ekspression af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet.

10



15

Lbc₃-5'-3'-CAT-genkonstruktionen blev åbnet i det ovenfor viste unikke XbaI-sted og fordøjet med eksonuclease Ba131. Et SalI-koblerfragment blev ligeret til de dannede stumpe ender, og de forkortede SalI-fragmenter bærende Lbc₃-5'-3'-CAT-genet blev overført til L. corniculatus. Virkningen af at fjerne promotorsekvenser blev målt som CAT-aktivitet. Slutpunkter på den fjernede 5'-region gives som afstanden fra CAP-stedet i nucleotider.

25

	5' Lbc ₃	3' Lbc ₃	Rod	CAT-aktivitet Cpm/μg protein/time	
				Knold	Blad
	2000		0	80000	0
30	-950		0	10000	0
	-474		0	3000	0
	-230		0	3000	0
35	-78		0	0	0

Det drastisk reducerede niveau af CAT-aktivitet, udtrykt fra Lbc₃-promotoren, som var fjernet til nucleotid -230 og aktiviteten på nul fra promotoren, som var fjernet til nucleotid -78 viser, at Lbc₃-promotorregionen kræves til den rodknold-specifikke ekspresion af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet.

Eksempel 11.

Konstruktion af N23-CAT-genet.

10

N23-genet blev isoleret fra en sojabønne-DNA-bank, som beskrevet i et fortryk til en artikel i Nucleic Acids Research, kopi vedlagt. N23-CAT-genet blev konstrueret ud fra det modificerede Lbc₃-5'-3'-CAT-gen, der bæres på plasmid pEJ-5'-3'-CAT101, som beskrevet i ansøgernes ligeledes verserende patentansøgning nr. 4889/85, og et 1 kb EcoRI-, DdeI-fragment indeholdende N23-5'-promotorregionen. Beliggenheden af EcoRI- og DdeI-stederne i N23-promotorregionen er angivet på den nedenfor viste DNA-sekvens. Den anvendte kloningsprocedure er vist nedenfor.

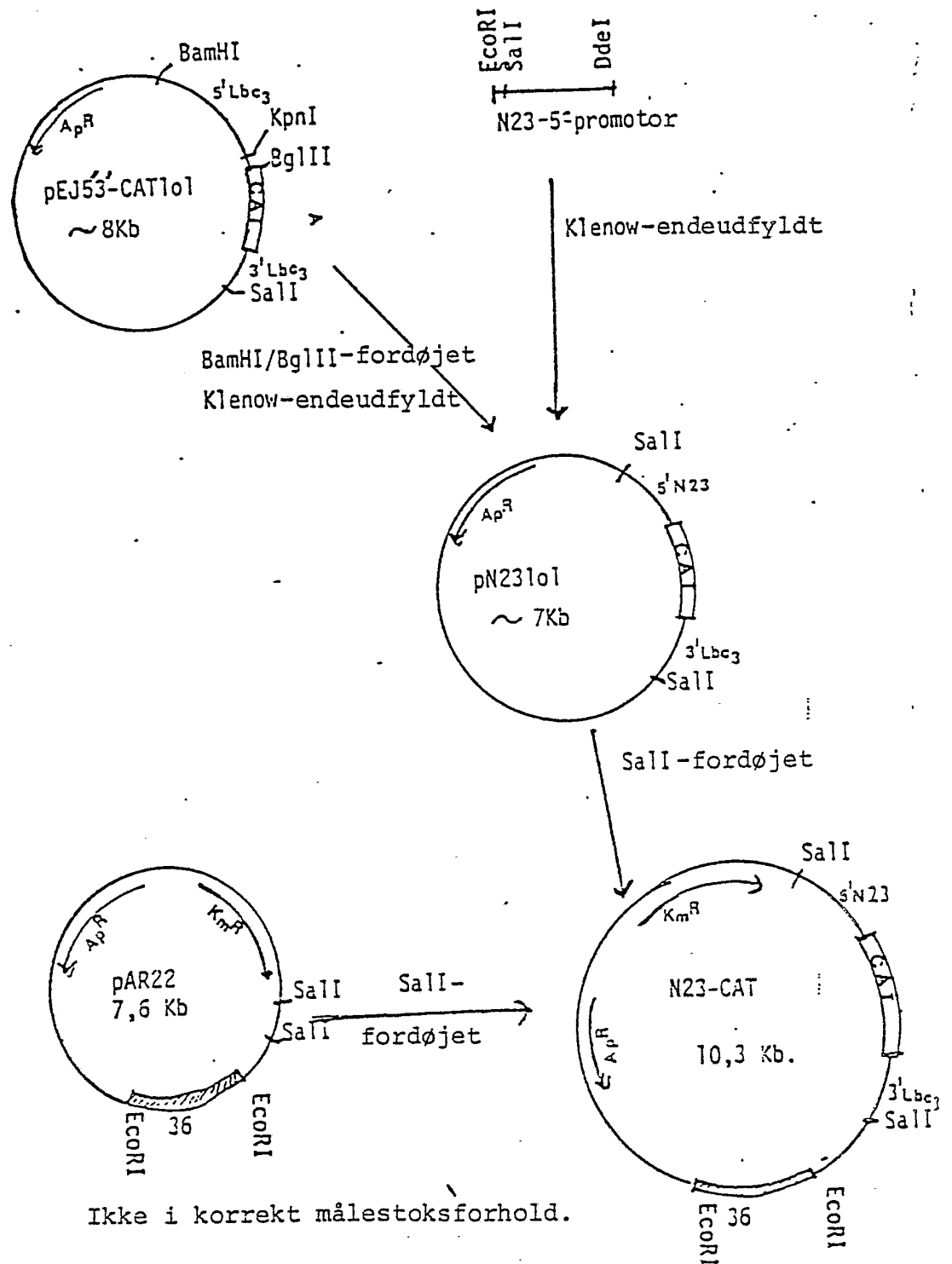
20

N23-CAT-genet blev overført til planter ved hjælp af samme metode som Lbc₃-5'-3'-CAT-genet.

25

30

35



Eksempel 12.Organspecifik ekspression af sojabønne N23-CAT-genet i rod-
knolde fra *L. corniculatus* og *Trifolium repens*.

5

Aktiviteten af chloramphenicolacetyltransferase (CAT) blev målt som i eksempel 5 og er givet i Cpm/ μ g protein/timer.

Tabel a.

10

	CAT-aktivitet	
	N23-CAT-transformeret	Utransformeret
	<u><i>L. corniculatus</i></u>	<u><i>L. corniculatus</i></u>
Rodknold	86150	0
Rod	0	0

15

Tabel b.

20

	CAT-aktivitet	
	N23-CAT-transformeret	Utransformeret
	<u><i>T. repens</i></u>	<u><i>T. repens</i></u>
Rodknold.	148000	0
Rod	0	0

25

Tabel (a) og (b) viser den organspecifikke ekspression af N23-CAT-genet i rodknolde fra *L. corniculatus* og *T. repens*. *L. corniculatus* blev podet med *Rhizobium loti*, mens *T. repens* blev podet med *Rhizobium trifolii*.

30

Eksempel 13Ekspression af N23-CAT-genet kræver 5'-N23-promotorregionen

35

N23-CAT-genkonstruktionen bærer ca. 1 kb af N23-5'-promotorregionen. Trinvis fjernelse af sekvenser fra 5'-enden af denne region viste, at promotorregionen er nødvendig for den karakteriserede ekspression af N23-CAT-genet. Exonukleasen Bal 31

anvendtes til frembringelse af afkortede 5'-regioner, som angivet i eksempel 10. Slutpunkter for N23-5'-regionerne er givet som afstanden fra CAP-stedet i nukleotider.

5	CAT-aktivitet	
	cpm/ μ g protein/timer	
	Rod	Knold
10		
15		

-913	5' N23	CAT	3' Lbc ₃	0	97,000
-347				0	80,000
-294				0	7,000
-166				0	0

Eksempel 14

5'-promotorregionen er tilstrækkelig til rodknoldspecifik expression i stor mængde af N23-genet.

20 Leghæmoglobin-Lbc₃-3'-regionen af N23-CAT-konstruktionen blev erstattet med 3'-regionen fra det T-DNA-afledte Octopinsyntase (OCS)-gen. 900 bp Lbc₃-3'-EcoRI/SalI-restriktionsfragment af N23-CAT-genet blev udskiftet med et 320 bp PvuII/AhaIII-restriktionsfragment indeholdende 3'-OCS-polyadenylenstedet (Gielen et al. 1984 EMBO J. 3. 835-846). Det resulterende gen blev stadigt udtrykt specifikt i rodknolde.

30	CAT-aktivitet	
	cpm/ μ g protein/timer	
	Rod	Knold
35		

	5' N23	CAT	3' OCS	0	60.000
--	--------	-----	--------	---	--------

I forbindelse med opfindelsen er det således blevet påvist, at rodknoldspecifikke gener kan udtrykkes organspecifikt efter

overførsel til andre planter, her Lotus corniculatus og Trifolium repens. Endvidere er det påvist, at de 5'-flankerende regioner, der omfatter promotoren, er under kontrol af den organspecifikke reguleringsmekanisme, idet den organspecifikke kontrol af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i Lotus corniculatus foregik på transskriptionsniveau. Det overførte Lbc₃-5'-3'-CAT-gen blev således kun transskriberet i rodknolde fra transformerede planter og ikke i andre organer, såsom rødder, stængler og blade.

10

Udtrykket af Lbc₃-5'-3'-CAT-genet i rodknolde af transformerede planter fulgte også det fra sojabønnerodknolde kendte udviklingsmæssige forløb. Ingen CAT-aktivitet kunne påvises i rødder eller små hvide rodknolde (eksempel 8). Lav aktivitet var til stede i de mere udviklede hvide distinkte knolde, medens høj aktivitet kunne måles i de senere udviklede små røde knolde og modne knolde.

15

Den organspecifikke ekspression og korrekte udviklingsmæssige ekspression af overførte rodknoldspecifikke gener, her eksemplificeret med Lbc₃-5'-3'-CAT-genet, vil som speciel anvendelse muliggøre funktionel ekspression af rodknoldspecifikke gener også i andre planter end bælgplanter. Overføres alle de rodknoldspecifikke plantegener, som er nødvendige for rodknolddannelse, fra en bælgplante til en ikke-rodknolddannende planteart, vil den korrekte organspecifikke ekspression, som er påvist ovenfor, muliggøre dannelse af funktionelt aktive, nitrogenfikserende rodknolde på denne plante efter infektion med Rhizobium. Disse planter vil på denne måde kunne vokse uden tilførsel af eksterne uorganiske eller organiske nitrogenforbindelser. Rodknoldspecifikke promotorer, her eksemplificeret med Lbc₃-promotoren, må i dette tilfælde bruges til at regulere udtrykket af de overførte gener.

25

30

35

Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes en rodknoldspecifik promotor til at udtrykke gener. Genproduktet eller funktionen af genproduktet forbedrer rodknoldens funktion, f.eks.

ved at ændre oxygentransport, metabolisme, nitrogenfiksering eller nitrogenoptagelse.

5 RodknoIde anvendes således til syntese af biologiske produkter, der forbedrer planten selv, eller som senere kan udvindes af planten. En rodknoldspecifik promotor kan bruges til at udtrykke et gen. Genproduktet selv eller en forbindelse dannet af genproduktet udgør den/de ønskede produkter.

10 Det er i forbindelse med den foreliggende opfindelse ligeledes blevet vist, at sojabønne-Lbc₃-leghæmoglobinproteinet selv (Lbc₃-genproduktet) findes i stor koncentration i rodknoIde af kællingetandplanter, der udtrykker Lbc₃-kodesekvensen under kontrol af Lbc₃-promotoren. Dette er påvist ved at klonе sojabønnens genomiske Lbc₃-gen - indeholdende kodesekvens, inter-
15 venerende sekvenser og 5'- og 3'-flankerende sekvenser - ind i integrationsvektoren pAR1. Et 3,6 kb BamHI-fragment, Lbc₃HH, som vist i eksempel 2, klonedes i pAR1-plasmidet og overførtes til kællingetand, som tidligere angivet.

20 Det i transformerede rodknoIde af kællingetand fundne høje niveau af Lbc₃-protein (eksempel 9), svarende til niveauet i sojabønnerodknoIde, påviser en effektiv transskription af Lbc₃-promotoren og en effektiv bearbejdning og translation af Lbc₃-
25 mRNA i kællingetand.

Det høje niveau af CAT-aktivitet, der findes i transformerede rodknoIde, er ligeledes et resultat af en effektiv translation af mRNA, som er dannet ud fra det kimæriske Lbc₃-gen. Leder-
30 sekvensen på Lbc₃-genet er bestemmende for translationsinitieringen og må bestemme den endelige translationseffektivitet. Denne effektivitet er af betydning for effektiv syntese af genprodukter i planter eller planteceller. Lbc₃- eller en anden leghæmoglobin-ledersekvens kan således bruges til at for-
35 øge det endelige ekspressionsniveau for en given plantepromotor. Konstruktion af et DNA-fragment, der består af en Lb-ledersekvens som første sekvens og en vilkårlig promotor som

anden sekvens vil, når konstruktionen overføres og udtrykkes i planter, være en speciel anvendelse af opfindelsen.

P a t e n t k r a v .

5

- 10 1. Fremgangsmåde til ekspresion af gener i bælgplanteceller ved transformering af cellerne med et rekombineret DNA-fragment, der indeholder dels det gen, der ønskes udtrykt, dels en 5'-flankerende region, hvori indgår en promotor, og eventuelt en 3'-flankerende region, og dyrkning af de transformerede celler i et egnet vækstmedium, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes 5'- eller i givet fald 5'- og 3'-flankerende regioner fra et rodknoldspecifikt plantegen, og at promotoren er en inducerbar plantepromotor, som regulerer, at ekspresionen sker i rodknoldene på bestemte udviklingstrin og som led i den symbiotiske nitrogenfiksering.
- 20 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den 5'-flankerende region er indentisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra rodknoldspecifikke gener.
- 25 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra planteleghæmoglobinerner.
- 30 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra sojabønneleghæmoglobinerner.
- 35 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra Lba-genet med sekvensen:

GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
 GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
 TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
 ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
 GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
 GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
 5 AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
 TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAAC TGAA AATAAATAAA
 CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
 TAATTAAAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTCCTCT
 TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
 TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
 TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAAATTAAT AGAAATAACA GAAATTAATA
 AAAGAAATAT G.

10

6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at
 den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller in-
 deholder 5'-flankerende regioner fra Lbc1-genet med sekven-
 15 sen:

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGGTGAA CATACATACA TTTAAAAAAA
 AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
 CTTTAAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
 TTTCCAACC TGTAGATTTA TTTATTTTATT TATTTATTTT TACAAAAGGAG
 ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
 20 TAATAAECTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
 TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
 TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTC
 GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
 TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
 AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
 TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCCTC
 CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
 25 ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
 TAGAAAATAA CAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATC.

25

30

7. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at
 den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller in-
 deholder 5'-flankerende regioner fra Lbc2-genet med sekven-
 sen:

35

TCGAGTTTTT .ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGCCA
 TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
 ATCCCCACCC CCACCAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
 TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAG
 ATAGGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAA TCACACTTTT
 TTATATTTTT TTGTTACCCT TTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
 5 ACTATTAAT AGTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
 TTAACCTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
 GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAA
 TTGACAATTT ATTTTAAA TTCAGAGTAA TACTTAAAT ACTTATTTAC
 TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
 CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
 TCTATATAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGATAAC TTGCATTGAA
 CAATAGAAAT AACACAAAG AAAATAAGTC AAAAAAGAA TATG.

10

8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at den 5'-flankerende region er identisk med, afledt af eller indeholder 5'-flankerende regioner fra Lbc₃-genet med sekvensen:

15

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAN
 GTRACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
 GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAA AAATACAA
 ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATT TTATATAAGA TGAATTTAA
 AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
 20 TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
 TATAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAT CTCGTAGTGA
 CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
 AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
 GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
 CTAAAAAAT ATATATTA AAATTTAAAT CAGAAATAA CTAAATTAT
 TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
 TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
 25 GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
 TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACCTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
 CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

25

9. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-8, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en 3'-flankerende region fra rodknoldspecifikke gener.

30

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en 3'-flankerende region fra leghæmoglobingener.

35

11. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en 3'-flankerende region fra sojabønneleghæmoglobingener.

5 12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en 3'-flankerende region fra Lba-, Lbc₁-, Lbc₂- eller Lbc₃-genet med de respektive sekvenser:

Lba

10

1590 1620
TAA TTA GTA TCT ATT GCA GTA AAG TGT AAT AAA TAA ATC TTG

1650 1680
TTT CAC TAT AAA ACT TGT TAC TAT TAG ACA AGG GCC TGA TAC AAA ATG TTG GTT AAA ATA

15

1710 1740
ATG GAA TTA TAT AGT ATT GGA TAA AAA TCT TAA GGT TAA TAT TCT ATA TTT GCG TAG GTT

1770 1800
TAT GCT TGT GAA TCA TTA TCG GTA TTT TTT TTC CTT TCT GAT AAT TAA TCG GTA AAT TA

1830 1860
ACA AAT AAG TTC AAA ATG ATT TAT ATG TTT CAA AAT TAT TTT AAC AGC AGG TAA AAT GTT

20

ATT TGG TAC GAA AGC TAA TTC GTC GA

Lbc1

25

1320
TAA/TT AGG ATC TAC TGC ATT GCC GTA

1350 1380
AAG TGT AAT AAA TAA ATC TTG TTT CAA CTA AAA CTT GTT ATT AAA CAA GTT CCC TAT ATA

30

1410 1440
AAT GTT GTT TAA AAT AAG TAA ATT TCA TTG TAT TGG ATA AAC ACT TTT AAG TTA TAT ATT

1470 1500
TCC ATA TAT TTA CGT TTG TGA ATC ATA ATC GAT ACT TTA TTA AAA TAA ATT CCA AAT AAT

TTA TAC GTT TTA AAA ATT ATT TT

35

Lbc2

TAG/GAT CTA CTA TTG CCG TCA AGT
1140GTA ATA AAT AAA TTT TGT TTC ACT AAA ACT TGT TAT TAA ACA AGT CCC CGA TAT ATA AAT
1170 1200

5

GTT GGT TAA AAT AAG TAA ATT ATA CGG TAT TGA TAA ACA ATC TTA AGT TTT ATA TAT AGT
1230 1260TCC ATA TAC TAA AGT TTG TGA ATC ATA ATC GA
1290

Lbc3

10

TAG/GAT CTA CAA TTG CCT TAA AGT GTA ATA AAT AAA
990 1020TAT TAT TTC ACT AAA ACT TGT TAT TAA ACC AAG TTC TCG ATA TAA ATG TTG GTT AAA CTA
1050 1080

15

AGT AAA TTA TAT GGT ATT GGA TAA ACA ATC TTA AGC TT
1110

13. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af et polypeptid ved transformering af bælgplante celler med et rekombineret plasmid, kendetegnet ved, at der som det rekombinerede plasmid anvendes et plasmid der indeholder 5'- eller 5'- og 3'-flankerende regioner fra et rodknoldspecifikt plantegen, og at der i den 5'-flankerende region indgår en inducerbar plantepromotor, som regulerer, at ekspressionen sker i rodknoldene på bestemte udviklingstrin og som led i den symbiotiske nitrogenfiksering.

14. DNA-fragment til brug i et rekombineret DNA-fragment ved fremgangsmåden ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det omfatter en inducerbar plantepromotor, som regulerer, at ekspressionen sker i rodknoldene på bestemte udviklingstrin og som led i den symbiotiske nitrogenfiksering, og er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra rodknoldspecifikke gener.

15. DNA-fragment ifølge krav 14, kendetegnet ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra planteleghæmoglobingener.

16. DNA-fragment ifølge krav 15, k e n d e t e g n e t ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra sojabønneleghæmoglobingener.

5 17. DNA-fragment ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra Lba-genet med sekvensen:

```

10 GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
15 ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAACTGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
15 TAATTA AAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTA AAAGAAATAT G.

```

20 18. DNA-fragment ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra Lbc₁-genet med sekvensen:

```

25 TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATA CATA CA TTTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
GAAAGGGAGC GAA TGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
TAATTA TGTT TACATGAAAA CATA CAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTA ACTGAAA ATTATTTGAT
30 TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAAATA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

35 19. DNA-fragment ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra Lbc₂-genet med sekvensen:

5
10

```

TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGTCCA
TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
TTATATTTTT TTGTTACCCCT TTTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
TTAACTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAAGT
GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
TTGACAATTT ATTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCAATAAC TTGCATTGAA
CAATAGAAAT AACCAACAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.

```

15
20.

DNA-fragment ifølge krav 16, kendetegnet ved, at det er identisk med, afledt af eller indeholder en 5'-flankerende region fra Lbc3-genet med sekvensen:

20
25
30

```

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCT GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAAT ATATATTTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCTCCTCCA ACNAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTCCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

35
21.

Rekombineret DNA-fragment til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1 - 13, kendetegnet ved, at det omfatter dels det gen, der ønskes udtrykt, og dels et DNA-fragment ifølge et hvilket som helst af kravene 14 - 20, og eventuelt en 3'-flankerende region fra et rodknoldspecifikt gen.

22.

Plasmid til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1 - 13, kendetegnet ved, at det indeholder et rekombineret

DNA-fragment ifølge krav 21.

23. Plasmid ifølge krav 22, k e n d e t e g n e t ved, at det er pAR29 og er fremstillet som beskrevet i eksempel 3a.

5

24. Plasmid ifølge krav 22, k e n d e t e g n e t ved, at det er pAR30 og er fremstillet som beskrevet i eksempel 3a.

10

25. Plasmid ifølge krav 22, k e n d e t e g n e t ved, at det er pAR11 og er fremstillet som beskrevet i eksempel 3b.

15

20

25

30

35

Fig. 2

SUBKLONER AF Lbc3-GENET

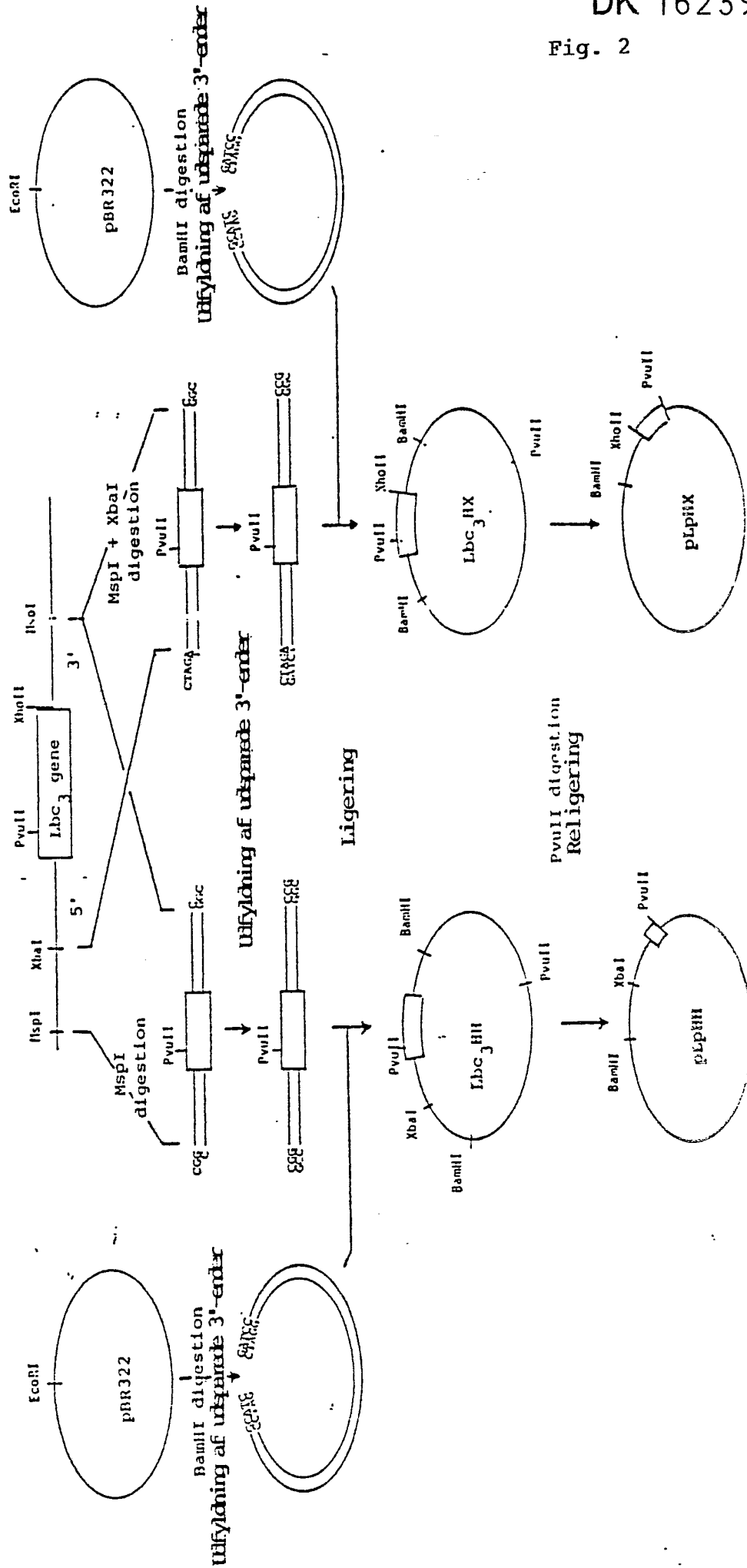


Fig. 3

5' - FLANKERENDE REGION

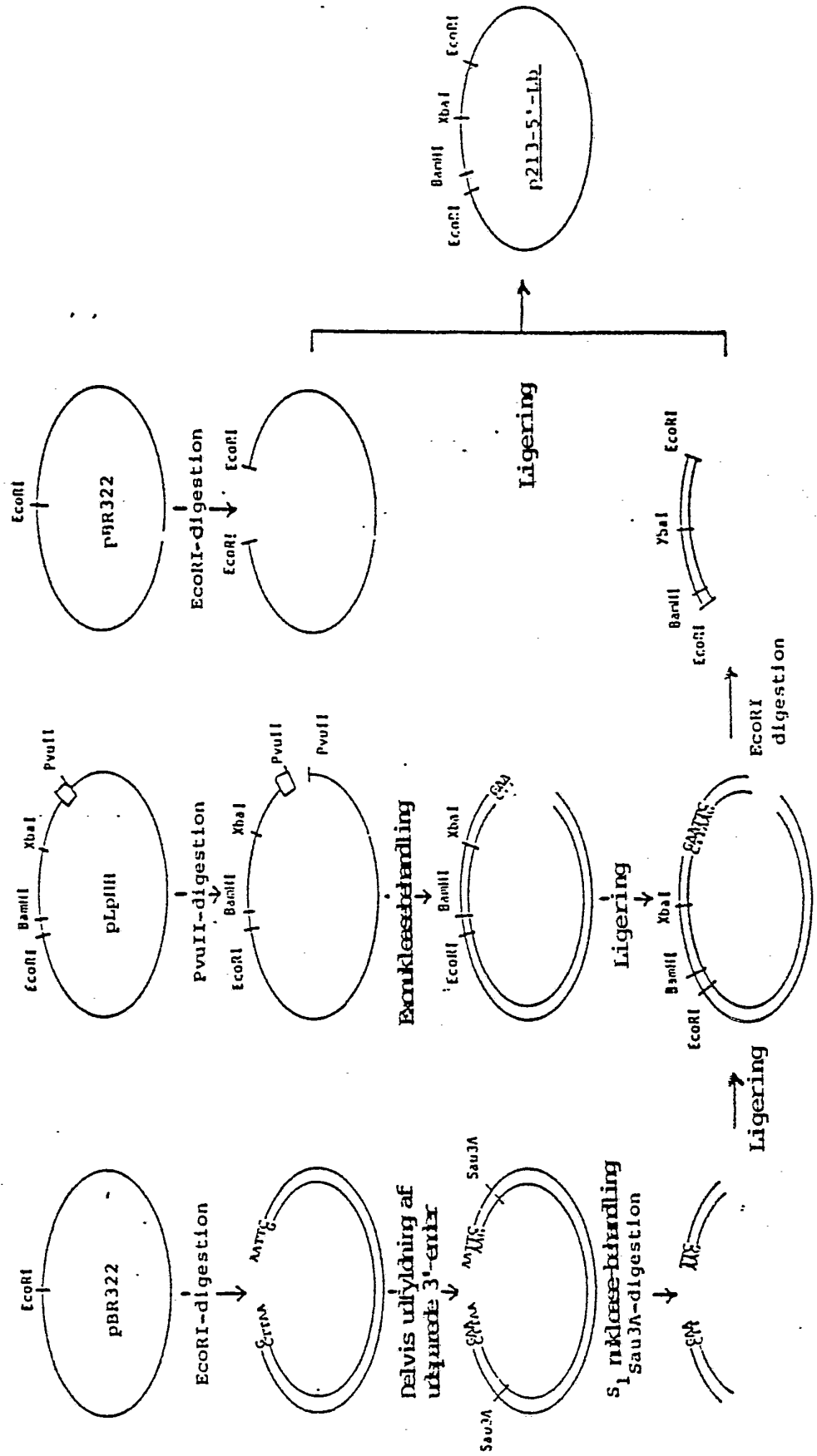


Fig. 4

LB PROMOTERKASSETTE

3'-FLANKERENDE REGION

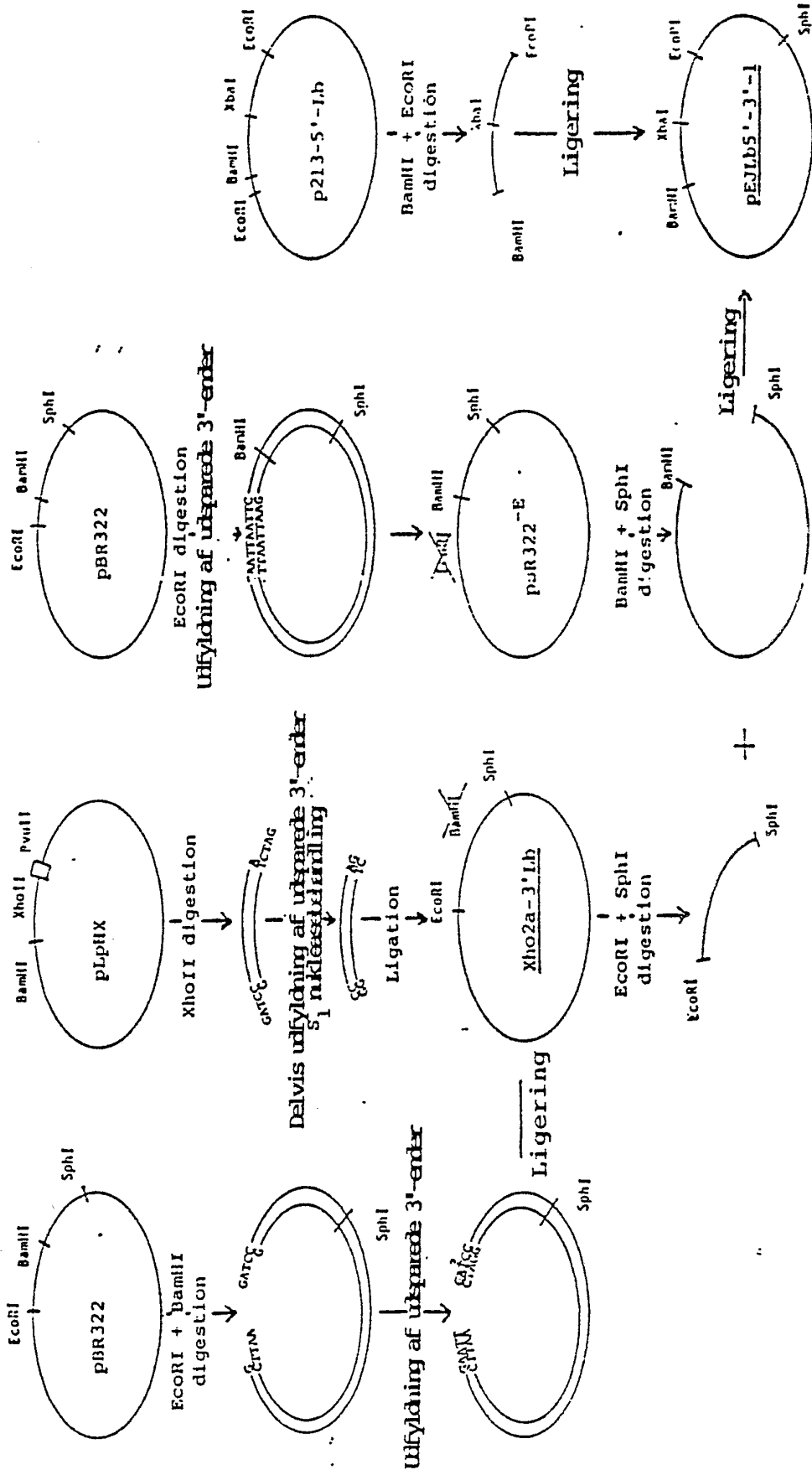


Fig. 5

KIMERISK CAT/Lb GEN

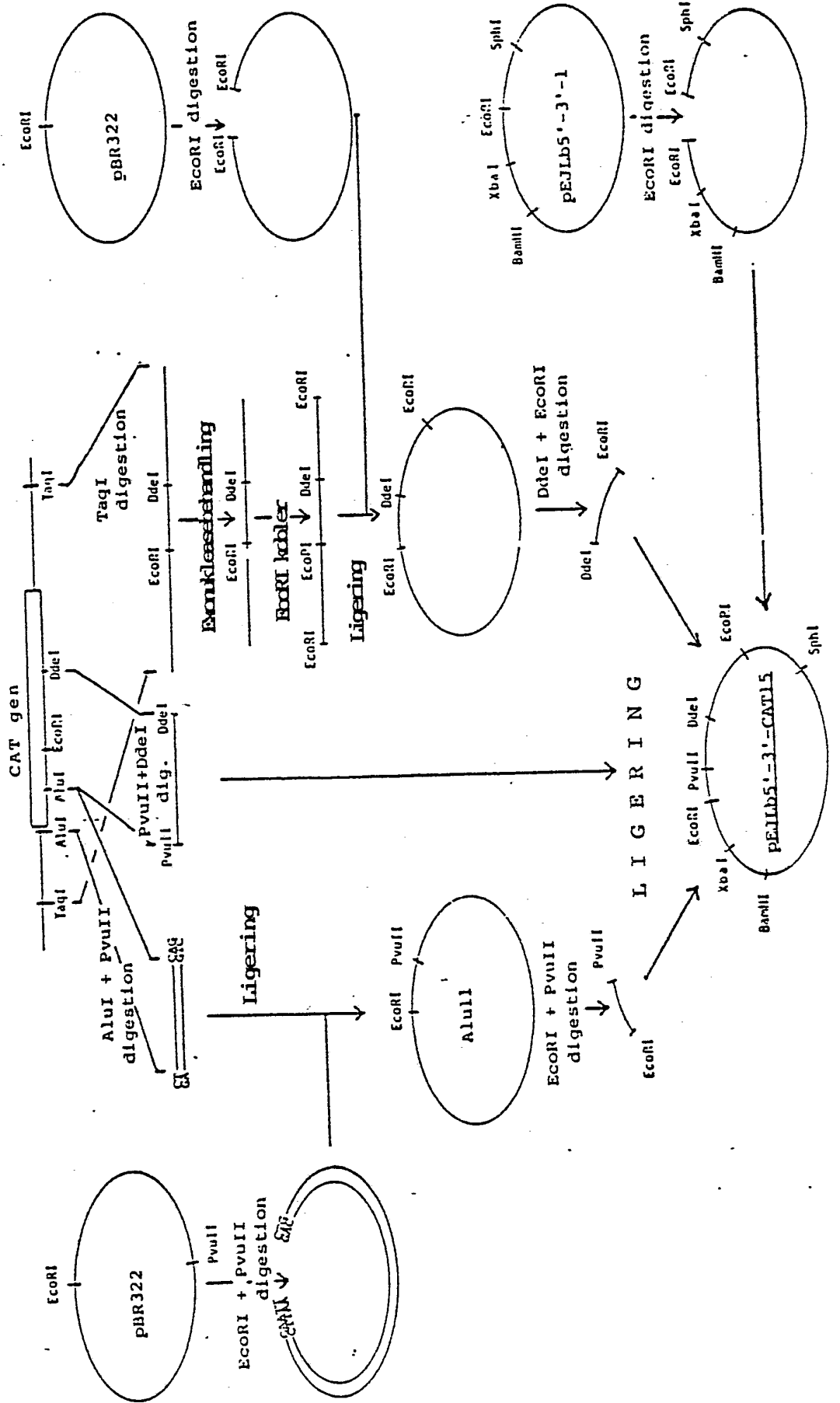


Fig. 6

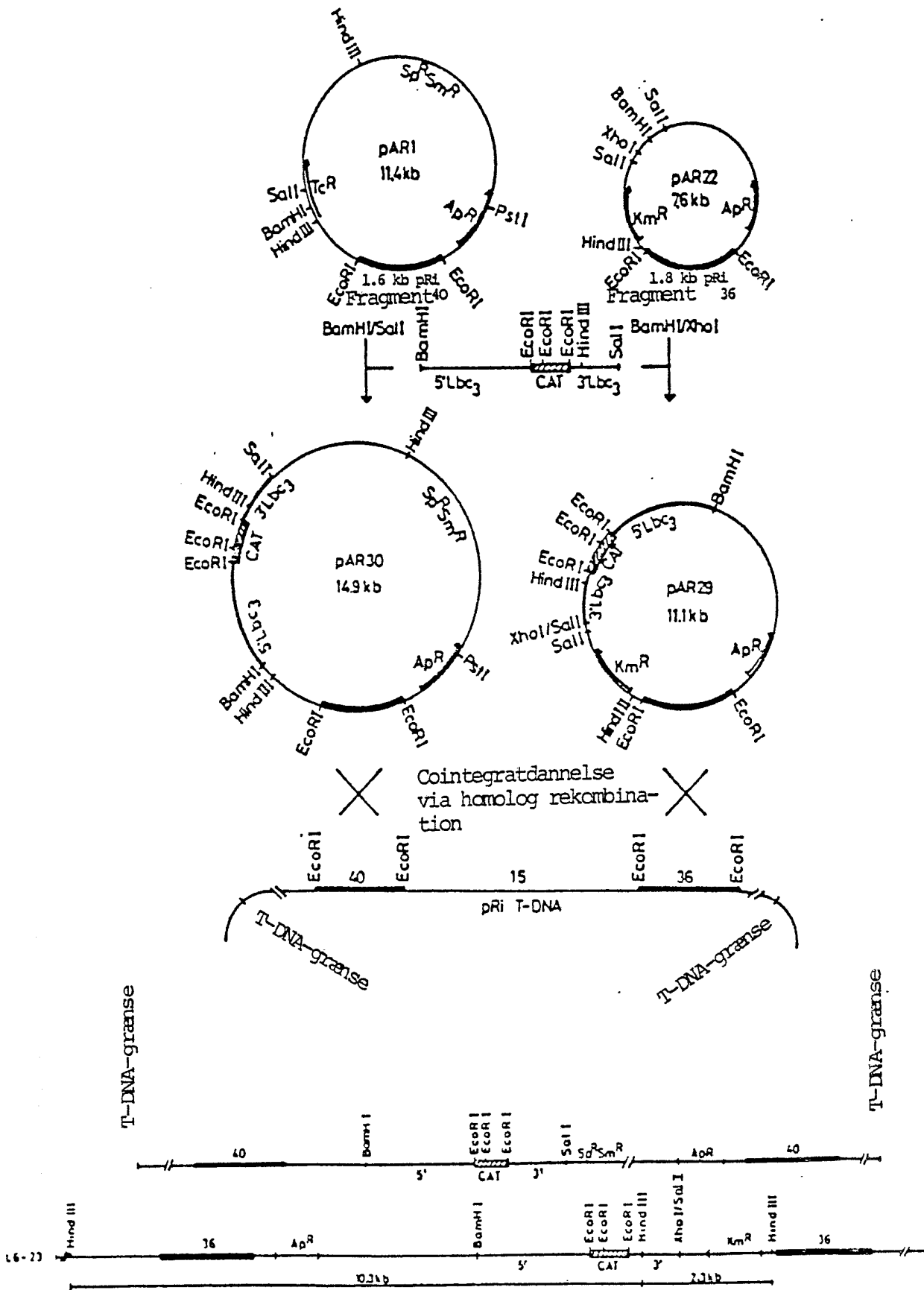


Fig. 7

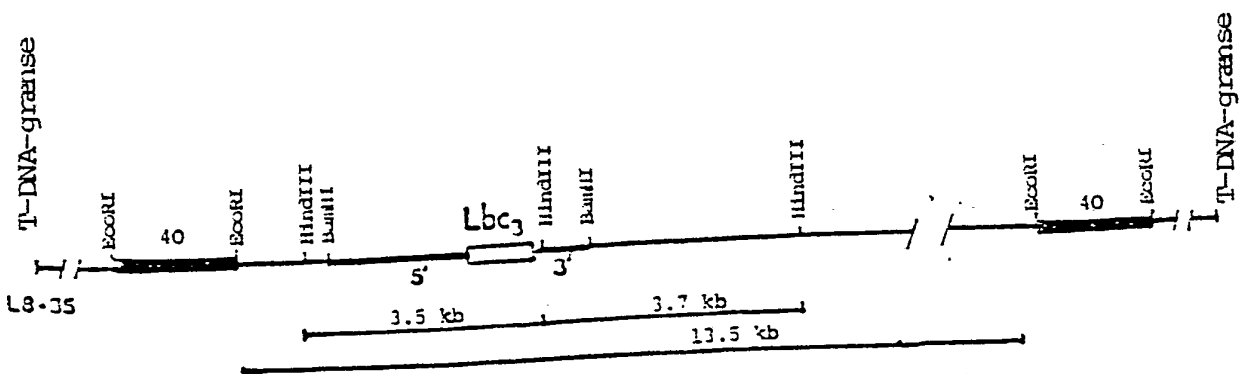
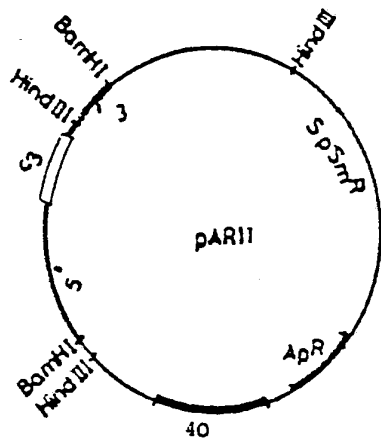
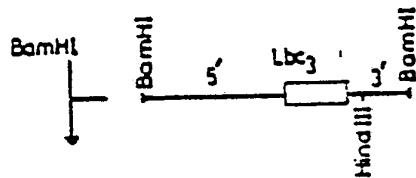
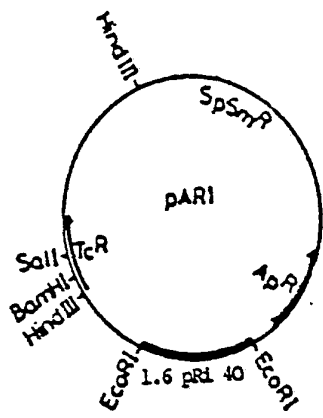


Fig. 8

Påvisning af sojabønne-Lbc3-5'-3'-CAT-genet i transformerede kallingetandplanter.

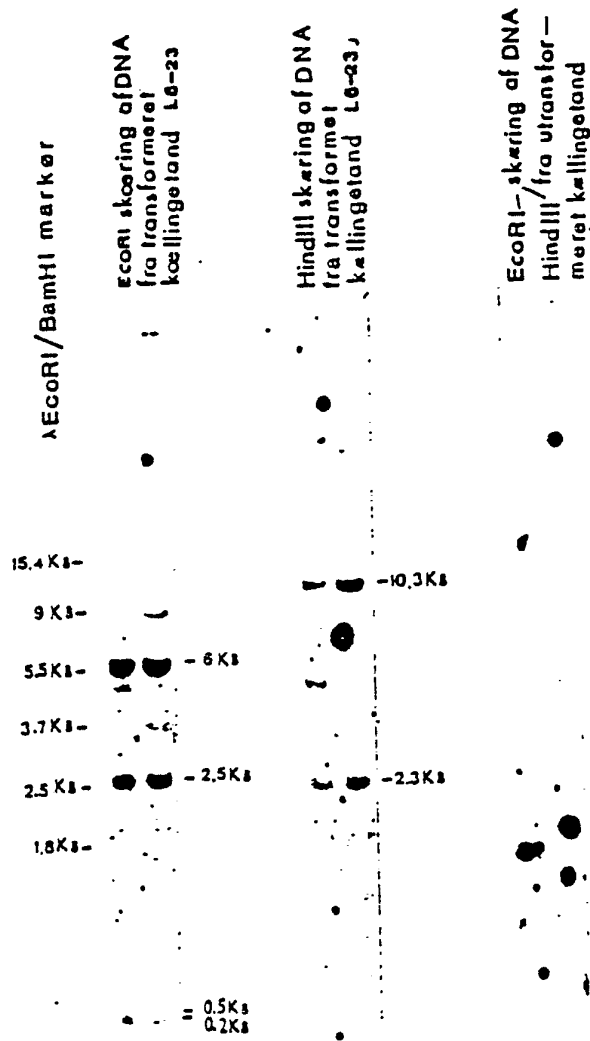


Fig. 9

Påvisning af sojabønne-Lbc₃-genet i transformerede kællingetandplanter.

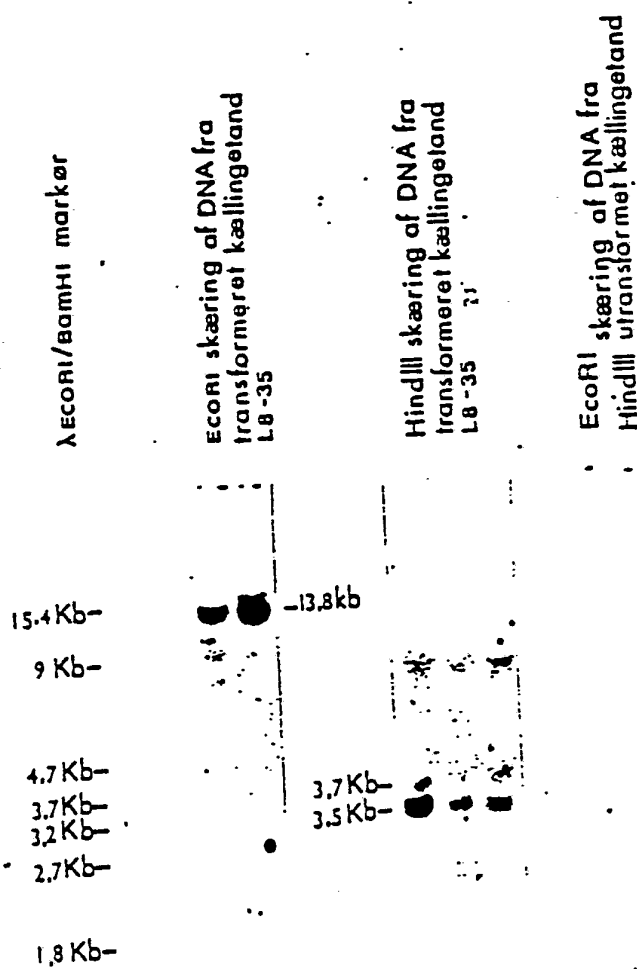


Fig. 10

Ekspression af Lbc3-5'-3'-CAT-genet i forskellige væv fra kallingetand.

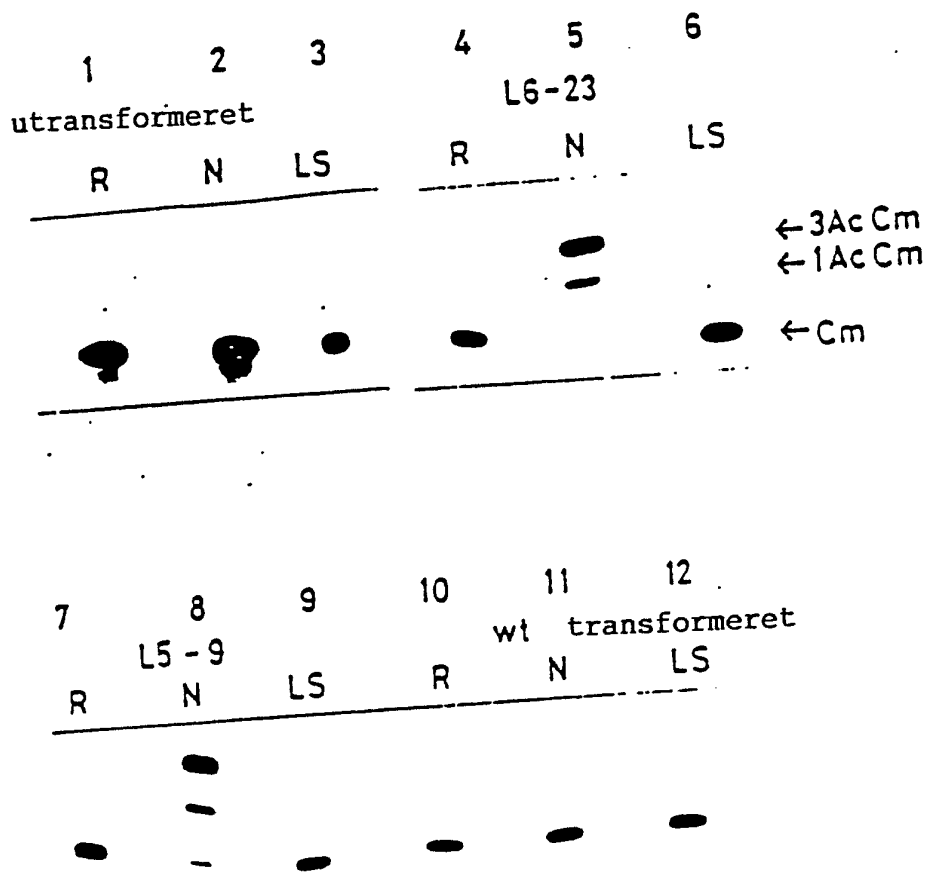


Fig. 11

Transskriptionsundersøgelse (Northern-analyse) på væv fra Lbc₃-5'-3'-CAT-transfor-merede og Lbc3-transformerede Lotus-plantelinier.

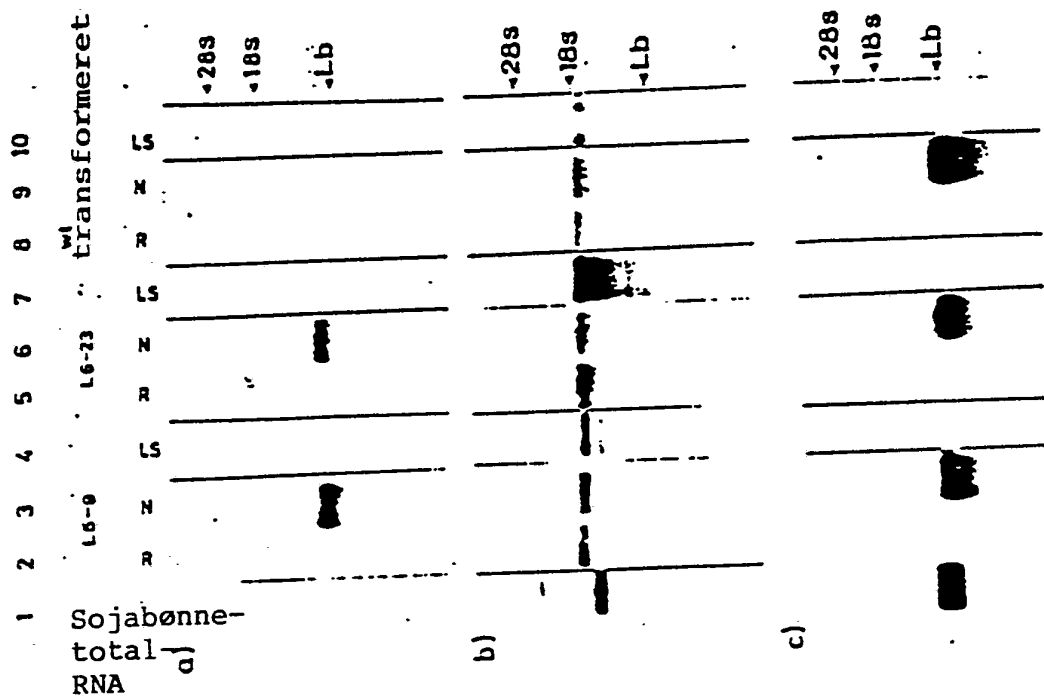
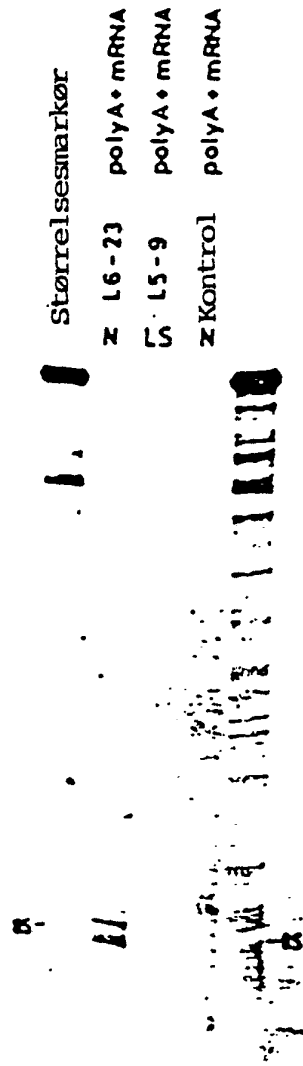


Fig. 12

Bestemmelse af transkriptionsinitieringssted (CAP site) for
sojabønne-Lbc3-promotoren i transformerede kallingetandroknol-
de (Fig. 12)



—TATAAATAAGTATTGGATGTGAAGTTGTTGCTAACT— / —AAATCGAG

Fig. 13

Påvisning af Lbc₃-protein i kallingetandplanter med indtrans-
formeret sojabønne-Lbc₃-gen.

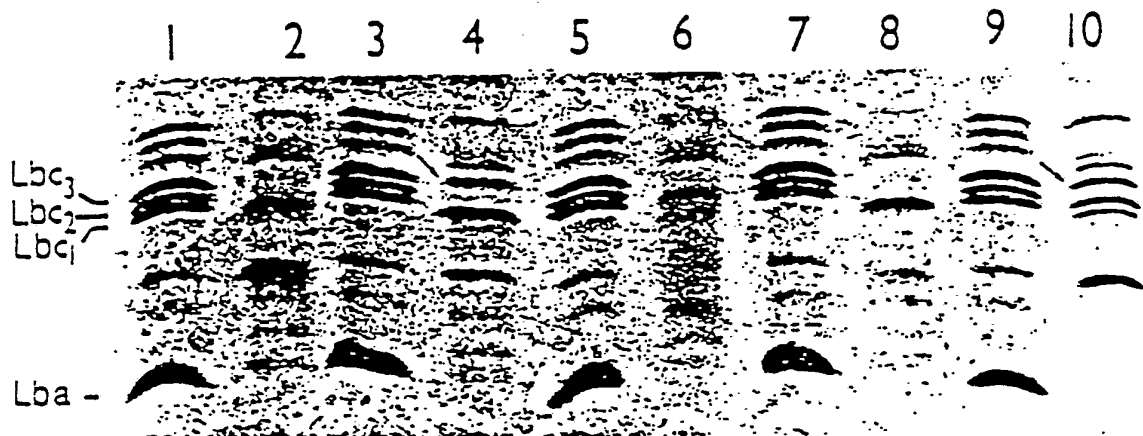


Fig. 14

N-TERMINALE I.b-SEKVENSER

