



(12) PATENT

(19) NO

(11) 324769

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A01H 5/00 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/14 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19994795	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.04.03 PCT/US98/06589
(22)	Inng.dag	1999.10.01	(85)	Videreføringssdag	1999.10.01
(24)	Løpedag	1998.04.03	(30)	Prioritet	1997.04.04, US, 42666 1997.04.04, US, 42941
(41)	Alm.tilgj	1999.12.01			
(45)	Meddelt	2007.12.10			
(73)	Innehaver	The Board of Regents of University of Nebraska, Varner Hall, 3835 Holdridge Street, Lincoln, NE 68583, US			
(72)	Oppfinner	Donald P Weeks, 6610 Westshore Drive, Lincoln, NE 68516, US Xiao-Zhuo Wang, 211 Tremont Circle, Chapel Hill, NC 27516, US Patricia L Herman, 9200 Rock Creek Road, Waverly, NE 68462, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			
(54)	Benevnelse	Isolert DNA molekyl, DNA konstruksjon, rensed dicambadegraderende oksygenase, transgen vertscelle og plante, fremgangsmåte for dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba, for selektering av transformerte planteceller og for selektering, eller screening for, transformerte vertsceller, intakte organismer og deler av organismer.			
(56)	Anførte publikasjoner	D. P. Weeks et al., Journal of Cellular Biochemistry, no. 18, 1994, s. 91 X.-Z. Wang et al., Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, 1997, s. 1623-1626			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet isolerte og i det minste delvis-rensede dicamba-degraderings-enzym, isolerte DNA molekyler kodende for dicamba-degraderingsenzym, DNA konstruksjoner kodende for dicamba-degraderingsenzym, transgene vertsceller omfattende DNA kodende for dicamba-degraderingsenzym og transgene planter og plantedeler omfattende en eller flere celler omfattende DNA kodende for dicambadegraderingsenzym. Ekspressjons av dicamba-degraderingsenzym resulterer i produksjon av dicamba-degraderende organismer, inkludert dicamba-tolerante planter. Det er videre beskrevet en fremgangsmåte for kontrollering av ugress på en mark inneholdende transgene dicamba-tolerante planter og en fremgangsmåte for dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba omfattende påføring av en effektiv mengde av en transgen mikroorganisme eller dicamba-degraderende enzym på materialet. Det er videre beskrevet en fremgangsmåte for selektering av transformerte planter og planteceller basert på dicamba-toleranse og en fremgangsmåte for selektering eller screening av transformer-te vertceller, intakte organismer og organismedeler basert på fluorescens til 3,6-diklorsalicylsyre produsert som et resultat av dicamba-degraderingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører isolert DNA molekyl, DNA konstruksjon, rensed
dicamba-degraderende oksygenase, transgen vertscelle og plante, fremgangsmåte for
dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba, for selektering av transformerte
5 planteceller og for selektering, eller screening for, transformerte vertsceller, intakte
organismer og deler av organismer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig transgene organismer som har evne til
å degradere herbicide dicamba, inkludert transgene planter som er gjort tolerante
overfor dicamba. Oppfinnelsen vedrører også dicamba-degraderingsenzymer og DNA
10 molekyler og DNA konstruksjoner kodende for dicamba-degraderende enzymer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte for kontrollering av frø i
marker med dicamba-tolerante transgene planter og en fremgangsmåte for fjerning av
dicamba fra materialer kontamenert med dette (bioremediering). Til slutt vedrører
oppfinnelsen fremgangsmåte for selektering av transformanter basert på dicamba-
15 toleranse eller detektering av fluorescensen til 3,6-diklorsalicylsyre som blir dannet som
et resultat av degradering av dicamba.

Herbicider blir rutinemessig anvendt innen jordbruksproduksjon. Deres effektivitet
blir ofte bestemt ut i fra deres evne til å drepe frøvekst i avlingsjorder og toleranse som
avlingen har overfor herbicider. Dersom avlingen ikke er tolerant overfor herbicidet vil
20 herbicidet redusere produktiviteten til avlingen eller drepe det hele. Derimot hvis
herbicidet ikke er sterkt nok kan det tillate for stor ugressvekst i mark med avling som
igjen vil gjøre produktiviteten til den positive avlingen. Det er derfor ønskelig å produsere
økonomisk viktige planter som er tolerante for herbicider. For å beskytte vann- og miljø-
kvaliteten til jordbruksland er det også ønskelig å utvikle teknologi for å nedbryte
25 herbicider som ved uhell er blitt utgitt eller i tilfeller med uakseptable høye nivåer av
forurensning av jord og vann.

Gener kodende for enzymer som inaktiverer herbicider og andre xenofobe
forbindelser er tidligere blitt isolert fra en mengde prokaryote og eukaryote organismer. I
noen tilfeller er disse genene blitt genetisk omkonstruerte for vellykket ekspressjon i
30 planter. Ved hjelp av denne metoden er det blitt utviklet planter som er tolerante overfor
herbicidene 2,4-diklorfenoksyeddisyre (Streber and Willmitzer (1989) Bio/Technology

7:811-816; 2,4-D), bromoxynil (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423; varemerke Buctril), glyfosat (Comai et al (1985) Nature 317:741-744; varemerke Round-up) og fosfinotrikin (De Block et al (1987) EMBO J. &:2513-2518; varemerke Basta).

Dicamba (varemerke Banvel) blir anvendt som et pre-fremspirende og post-
 5 fremspirende herbicid for kontrollering av ett-årig og flerårige bredbladede ugress og flere gressaktige ugress i mais, dura, småkorn, beitemark, høy, sukkerroer, asparges, torv og gressfrøavlinger. Se Crop Protection Reference, p. 1803-1821 (Chemical & Pharmaceutical Press, Inc. New York, NY 11. utg, 1995). Dicamba kan dessverre skade mange kommersielle avlinger (inkludert bønner, soyabønner, bomull, erter, poteter,
 10 solsikker, tomater, tobakk og frukttrær), ornamentale planter og trær, og andre bredbladede planter når det kommer i kontakt med disse. Dicamba er kjemisk stabil og kan noen ganger være vedvarende i omgivelsene. Dicamba er i samme klasse som benzosyreherbicider. Det er blitt foreslått at planter tolerante overfor benzosyreherbicider, inkludert dicamba, kan bli produsert ved inkorporering av et 1-aminocyklo-
 15 propan-1-karboksytsyre (ACC) syntaseantisensgen, et ACC oksidaseantisensgen, et ACC deaminasegen eller kombinasjoner derav, inn i plantene. Se Kanadisk patent-søknad 2,165,036 (publisert 16. juni, 1996). Ingen eksperimentelle data er derimot presentert i denne søknaden som demonstrerer en slik toleranse.

Bakterier som metaboliserer dicamba er kjent. Se US patent nr. 5,445,962;
 20 Krueger et al., J. Agric. Food Chem., 37, 534-538 (1989); Cork og Krueger, Adv. Appl. Microbiol., 38, 1-66 (1991); Cork og Khalil, Adv. Appl. Microbiol., 40, 289-320 (1995). Det er blitt foreslått at de spesifikke genene ansvarlige for dicambametabolisme ved disse bakteriene kan bli isolert og anvendt for å produsere dicamba-resistente planter og andre organismer. Se id. og Yang et al., Anal. Biochem., 219:37-42 (1994). Før
 25 foreliggende oppfinnelse var det derimot ikke blitt identifisert eller isolert slike gener.

X.-Z. Wang et al., Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, 1997, s. 1623-1622 beskriver deteksjon av en enzymaktivitet som omdanner dicamba til 3,6-diklorsalicylsyre *in vitro* i cellelysater av *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Det beskrives separering av et delvis rensset lysat i tre fraksjoner, forsøksvis identifisert som en
 30 oksygenase, et ferredoksin og en reduktase. Fraksjonene ble ikke fullstendig rensset og ingen enzymkomponent ble klonet eller sekvensert.

D.P. Weeks et al., Journal of Cellular Biochemistry, no. 18, 1994, s. 91 er et sammendrag som bekrefter at første trinnet i dicamba degraderingen er produksjon av 3,6-diklorsalicylsyre. Det foreslås å karakteriser et system av aktuelle mutanter avledet fra *Pseudomonas maltophilia* DI-6 ved genomisk komplementasjon i et forsøk på å isolere demetylasegenet (ene). Ingen gener eller proteiner er rensset, isolert, klonet eller sekvensert.

Oppfinnelsen tilveiebringer et DNA molekyl, kjennetegnet ved at det omfatter en DNA sekvens kodende for en dicamba-degraderende oksygenase, hvori nevnte dicamba-degraderende oksygenase er valgt fra gruppen bestående av:

- a) en dicamba-degraderende oksygenase med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4;
- b) et fragment av SEKV.ID.NR:4 som har et jern-svovel kluster og katalyserer oksydasjon av dicamba til 3,6-diklorsalicylsyre (DCSA); og
- c) en dicamba-degraderende oksygenase med en aminosyresekvens som er minst 85% identisk med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4, som omfatter et jern-svovel kluster og som katalyserer oksydasjonen av dicamba til 3,6-diklorsalicylsyre (DCSA).

Oppfinnelsen tilveiebringer også et isolert DNA molekyl som nevnt ovenfor omfattende en DNA sekvens kodende en dicamba-degraderende oksygenase med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre DNA molekyl ifølge krav 1, kjennetegnet ved at det omfatter nukleotid-sekvensen ifølge SEKV.ID.NR:3.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre en DNA konstruksjon, kjennetegnet ved at den omfatter et DNA molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 operativt koblet til ekspresjonskontroll sekvensene. Ifølge oppfinnelsen er denne DNA konstruksjonen en vektor.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre transgen vertscelle, kjennetegnet ved at den er transformert med DNA kodende en dicamba-degraderende oksygenase ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 operabelt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser.

Transgen verticelle kan være en plantecelle eller en prokaryotisk eller eukaryotisk mikroorganisme.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre rensset dicamba-degraderende oksygenase, kjennetegnet ved at den har aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4.

I tillegg tilveiebringer oppfinnelsen en transgen plante eller plantedel omfattende DNA kodende en dicamba-degraderende oksygenase ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 operabelt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser. Den transgene planten
10 kan videre være en bredbladet plante som er tolerant ovenfor dicamba som et resultat av ekspresjonen av dicamba-degraderende oksygenase. Den transgene planten eller plantedelen er en plante valgt fra gruppen bestående av bønner, soyabønner, bomull, erter, poteter, solsikker, tomater, tobakk, frukttrær, ornamentale planter, ornamentale trær, mais, sorghum, småkorn, sukkerroe, asparges, gress og soyabønneplante. Den
15 transgene planten eller plantedelen er tolerant overfor dicamba eller toleransen overfor dicamba er øket som et resultat av ekspresjon av dicamba-degraderende.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre en fremgangsmåte for kontrollering av ugress på en mark inneholdende en transgen plante ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 15, kjennetegnet ved at den omfatter påføring av en mengde dicamba på marken
20 inneholdende en transgen plante ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 15 som effektivt kontrollerer ugresset på marken.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåte for dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba, kjennetegnet ved at den omfatter påføring av en mengde av en transgen mikroorganisme ifølge krav 11 på materialet, idet mengden
25 effektivt degraderer minst noe av dicamba i materialet. I en utførelse omfatter fremgangsmåten påføring av en mengde av rekombinant dicamba-degraderende oksygenase kodende for DNA molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, til materialet, idet mengden er effektiv til å degradere minst noe av dicamba i materialet.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre en fremgangsmåte for selektering av
30 transformerte planteceller, kjennetegnet ved at den omfatter:

- a) tilveiebringning av en populasjon av planteceller;

- b) transformering av minst noen av plantecellene i populasjonen av plantecellene med en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6; og
- c) la den resulterende populasjon av planteceller vokse i et kulturmedium inneholdende dicamba i en konsentrasjon valgt slik at transformerte planteceller vil vokse og at ikke-transformerte planteceller ikke vil vokse.

I en utførelse omfatter fremgangsmåten:

- a) tilveiebringning av en populasjon av planter antatt å omfatte en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6; og
- b) påføring av en mengde dicamba til plantene selektert slik at transformerte planter vil vokse, og veksten av uttransformerte planter vil bli hemmet.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre en fremgangsmåte for selektering, eller screening for, transformerte vertsceller, intakte organismer og deler av organismer, kjennetegnet ved at den omfatter:

- a) tilveiebringning av en populasjon av vertsceller, intakte organismer eller deler av organismer antatt å omfatte en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6;
- b) kontakting av vertscellene, intakte organismer eller deler av organismene med dicamba; og
- c) bestemme tilstedeværelse eller nivå av fluoresens forårsaket av 3,6-diklorsalisylsyre, idet 3,6-diklorsalisylsyren blir dannet i transformerte vertsceller, intakte organismer eller deler av organismer som et resultat av degradering av dicamba.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1. Et diagram av antatt elektrontransportskjema for dicamba O-demetylase.

Elektroner fra NADH blir overført sekvensielt fra reduktase_{DIC} til ferredoksin_{DIC} og deretter til oksygenase_{DIC}. Reaksjonen av oksygen med substratet dicamba for å danne 3,6-diklorsalicylsyre blir katalysert av oksygenase_{DIC}, oks, oksidert; red; redusert.

Tidligere studier (Cork og Kreuger, Advan. Appl. Microbiol. 36:1-56 og Yang et al (1994) Anal. Biochem. 219:37-42) har vist at jordbakterien, *Pseudomonas maltophilia*, stamme DI-6, har evne til å ødelegge herbicidaktiviteten til dicamba gjennom en en-trinns reaksjon hvor dicamba (3,6-diklor-2-metoksybenzoesyre) blir omdannet til 3,6-diklorsalicylsyre (3,6-DCSA). 3,6-DCSA har ingen herbicidal aktivitet og er ikke blitt vist å ha noen ødeleggende effekter på planter. I tillegg blir 3,6-DCSA lett degradert av den normale bakteriefloraen som er tilstede i jord.

Eksperimenter beskrevet heri bekrefter hypotesen til Yang et al. (se id.) som omfatter at en O-demetylase er ansvarlig for omdanning av dicamba til 3,6-DCSA av *P. maltophilia* stamme DI-6 og har vist at O-demetylase er et tre-komponentenzymsystem bestående av en reduktase, et ferredoksin og en oksygenase. Se eksempel 1 som beskriver i detalj isolering, produksjon og karakterisering av *P. maltophilia* og de tre komponentene derav. Reaksjonsskjemaet for reaksjonen katalysert av de tre komponentene av dicamba O-demetylase er presentert i figur 1. Som illustrert i figur 1 blir elektroner fra NADH ført gjennom en kort elektronkjede bestående av reduktase og ferredoksin til terminal oksygenase som katalyserer oksidasjonen av dicamba for å danne 3,6-DCSA.

"Dicamba-degraderende oksygenase" er definert heri å bety oksygenase rensset fra *P. maltophilia* stamme DI-6 og oksygenaser som har en aminosyresekvens som er minst 85% homolog med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR : 4 som omfatter et jern-svovel kluster og som katalyserer oksydasjonen av dicamba til 3,6-diklorsalicylsyre (DCSA). "Dicamba-degraderende oksygenaser" innbefatter mutante oksygenaser med aminosyresekvensen til *P. maltophilia* oksygenase hvor en eller flere aminosyrer er blitt tilsatt til, deletert fra eller substituert for, aminosyrene til *P. maltophilia* oksygenasesekvensen. Aktiviteten til dicamba-degraderende oksygenaser kan bli bestemt som beskrevet i eksempel 1.

Renset dicamba-degraderende oksygenase ifølge oppfinnelsen er videre kjennetegnet ved at den har aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4 og at den er rekombinant produsert.

Fremgangsmåte for å bestemme homologigraden til aminosyresekvenser er velkjent innenfor fagområdet. Blant annet kan FASTA programmet til Genetics Computing Group (GCG) software package (university of Wisconsin, Madison, WI) bli anvendt for å sammenligne sekvenser i forskjellige proteindatabaser så som Swiss Protein Database.

Dicamba-degraderende oksygenaser ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli isolert og rensset som beskrevet i eksempel 1 fra *P. maltophilia* eller andre organismer. Egnede andre organismer innbefatter bakterier forskjellige fra *P. maltophilia* stamme DI-6 som degraderer dicamba. Flere stammer av slike bakterier er kjente. Se US patent nr. 5.445.962; Krueger et al., *J. Agric. Food Chem.*, 37, 534-538 (1989); Cork og Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.*, 38, 1-66 (1991); Cork og Khalil, *Adv. Appl. Microbiol.*, 40, 289-320. Andre dicamba-degraderende bakterielle stammer kan bli isolert som om de var disse stammene ifølge fremgangsmåter velkjente innenfor fagområdet.

Fortrinnsvis blir derimot dicamba-degraderende oksygenaser ifølge oppfinnelsen fremstilt ved anvendelse av rekombinante DNA teknikker (se nedenfor). Spesielt blir mutante enzymer med aminosyresekvensen til *P. maltophilia* enzymet hvori en eller flere aminosyrer er blitt tilsatt til, deletert fra, eller substituert med, aminosyrene til *P. maltophilia* sekvensen fremstilt på denne måten ved anvendelse av for eksempel oligonukleotid-rettet mutagenese, linker-scanning mutagenese, mutagenese ved anvendelse av polymerasekjedereaksjon og lignende. Se Ausubel et al. (red.) *Current Protocols In Molecular Biology* (Wiley Interscience 1990) og McPherson (red.) *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende isolerte DNA molekyler kodende for dicamba-degraderende oksygenaser ifølge oppfinnelsen. "Isolerte" blir anvendt heri for å innbefatte at DNA molekylet er blitt fjernet fra dets naturlige miljø eller er ikke et naturlig-forekommende DNA molekyl. Fremgangsmåte for fremstilling av disse DNA molekylerne er velkjente innenfor fagområdet. Se for eksempel Maniatis et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Blant annet kan DNA molekyler ifølge oppfinnelsen være isolert cDNA eller genomiske kloner. Identifikasjon og isolering av kloner kodende for dicamba-degraderende oksygenase og ferredoksin til *P. maltophilia* stamme DI-6 er beskrevet i eksemplene 2 og 3. Ytterligere kloner kodende for dicamba-degraderende enzymer, inkluderer kloner kodende for dicamba-degraderende reduktase kan bli oppnådd på en lignende måte. De isolerte klonene, eller deler av disse, kan bli anvendt som prober for å identifisere og isolere ytterligere kloner fra organismer forskjellige fra de hvorifra klonene ble opprinnelig isolert.

Egnede organismer innbefatter bakterier som degraderer dicamba. Som angitt ovenfor, i tillegg til *P. maltophilia* stamme DI-6 er flere bakteriestammer som degraderer dicamba kjent. Se US patent nr. 5,445,962; Krueger et al, J. Agric. Food Chem., 37, 534-538 (1989); Cork og Krueger, Adv. Appl. Microbiol., 38, 1-66 (1991); Cork og Khalil, Adv. Appl. Microbiol., 40, 289-320 (1995).

DNA molekyler ifølge oppfinnelsen kan også bli syntetisert kjemisk ved anvendelse av sekvenser av isolerte kloner. Slike teknikker er velkjente innenfor fagområdet. Blant annet kan DNA sekvenser bli syntetisert ved fosfoamididkjemi i en automatisert DNA syntetisator. Kjemisk syntese har mange fordeler. Spesielt er kjemisk syntese ønskelig på grunn av kodoner foretrukket av verten hvori DNA sekvensen vil bli uttrykt kan bli anvendt for å optimalisere ekspressjonen. Ikke alle kodoner trenger å bli endret for å oppnå forbedret ekspressjon, men i det minste kodonene som sjelden blir anvendt i verten blir endret til verts-foretrukne kodoner. Høye ekspressjonsnivåer kan bli oppnådd ved å forandre mer enn omtrent 50%, mest foretrukket minst omtrent 80% av kodonene til verts-foretrukne kodoner. Kodonpreferansene til mange vertceller er kjente. Se for eksempel Maximizing Gene Expression, s. 225-85 (Reznikoff & Gold, red., 1986), PCT WO 97/31115, PCT WO 97/11086, EP 646643, EP 553494 og US patent nr. 5.689.052, 5.567.862, 5.567.600, 5.552.299 og 5.017.692. Kodonpreferansene til andre vertceller kan bli avledet fra fremgangsmåter som er kjent innenfor fagområdet. Ved anvendelse av kjemisk syntese kan sekvensen til DNA molekylet eller proteinet som blir kodet derav lett bli forandret for å for eksempel optimalisere ekspressjonen (for eksempel eliminere mRNA sekundære strukturer som interfererer med transkripsjon

eller translasjon), tilføye unike restriksjonssteder ved hensiktsmessige steder, deletere proteinspaltningssteder osv.

I en tredje utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse følgende DNA konstruksjoner omfattende DNA kodende for et dicamba-degraderende enzym som er operabelt koblet til ekspressjonskontrollsekvenser. "DNA konstruksjoner" er definert heri å være konstruerte (ikke-naturlig forekommende) DNA molekyler nyttige for innføring av DNA inn i vertceller og betegnelsen innbefatter chimeriske gener, ekspressjonskassetter og vektorer.

Som anvendt heri angir "operabelt koblet" kobling av DNA sekvenser (inkludert de andre sekvensene, orientering av sekvensene og relativ plassering av de forskjellige sekvensene) på en slik måte at de kodede proteinene blir uttrykt. Fremgangsmåter for operativ kobling av ekspressjonskontrollsekvenser til kodende sekvenser er velkjente innenfor fagområdet. Se for eksempel Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989).

"Ekspressjonskontrollsekvenser" er DNA sekvenser involvert på en hvilken som helst måte i kontroll av transkripsjon eller translasjon i prokaryoter og eukaryoter. Egende ekspressjonssekvenser og fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse derav er velkjente innenfor fagområdet.

Ekspressjonskontrollsekvensene må innbefatte en promoter. Promoteren kan være en hvilken som helst DNA sekvens som viser transkripsjonell aktivitet i den valgte vertcellen eller organismen. Promoteren kan være induserbar eller konstitutiv. Den kan være naturlig-forekommende, kan bestå av deler av forskjellige naturlig-forekommende promotere, eller kan være delvis eller totalt syntetiske. Rettledning for konstruksjon av promotere er gitt ut i fra studier av promoterstrukturen, så som de til Harley og Reynolds, *Nucleic Acids Res.*, 15, 2343-61 (1987). Beliggenheten til promotoren i forhold til transkripsjonsstart kan bli optimalisert. Se for eksempel Roberts, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 760-4 (1979). Mange egnede promotere for anvendelse i prokaryoter og eukaryoter er velkjente innenfor fagområdet.

Blant annet omfatter egnede konstitutive promotere for anvendelse i planter: promotore fra planteviruser, så som 35S promoteren fra blomkålmosaikvirus (Odell et

al., Nature 313: 810-812 (1985), promotere fra Chlorella virus metyltransferasegener (US patent nr. 5,563,328), og full-lengde transkriptpromoterer fra figwort mosaikvirus (US patent nr. 5,378,619); promotere fra slike gener som risaktin (McElroy et al., Plant Cell 2: 163-171 (1990)), ubiquitin (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12: 619-632 (1989) og Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689 (1992)), pEMU (Last et al, Theor. Appl. Genet. 81: 581-588 (1991)), MAS (Velten et al., EMBO J. 3: 2723-2730 (1984)), mais H3 histon (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285 (1992) og Atanassova et al., Plant Journal 2(3): 291-300 (1992), Brassica napus ALS3 (PCT søknad WO 97/41228); og forskjellige Agrobacteriumgener (se US patent nr. 4.771.002, 5.102.796, 5.182.200, 5.428.147).

Egnede induserbare promotere for anvendelse i planter innbefatter: promotere fra ACE1 systemet som reagerer overfor kobber (Mett et al. PNAS 90:4567-4571 (1993)); promotoren fra mais In2 genet som reagerer overfor benzensulfonamidherbicid-trygghetsmidler (Hershey et al., Mol. Gen. Genetics 227:229-237 (1991) og Gatz et al., Mol. Gen. Genetics 243:32-38 (1994)) og promotoren til Tet reseptoren fra Tn10 (Gatz et al., Mol. Gen. Genet. 227:229-237 (1991)). En spesiell foretrukket induserbar promoter for anvendelse i planter er en som reagerer overfor et induseringsmiddel som plantene vanligvis ikke reagerer overfor. Et eksempel på induserbar promoter av denne typen er den induserbare promotoren fra en steroidhormongen, den transkripsjonelle aktiviteten som blir indusert av et glukokortikosteoridhormon. Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421 (1991). Andre induserbare promotere som kan anvendes i planter er beskrevet i EP 332104, PCT WO 93/21334 og PCT WO 97/06269.

Egnede promotere som kan anvendes i bakterier innbefatter promotoren fra Bacillus stearothermophilus maltogen amyrasegen, Bacillus licheniformis alfa-amylasegen, Bacillus amyloliquefaciens BAN amyrasegen, Bacillus subtilis alkaliprotasegen, Bacillus pumilus xylosidasegen, faglambda P_R og P_L promotere og Escherichia coli lac, trp og tac promotere. Se PCT WO 96/23898 og PCT WO 97/42320.

Egnede promotere som kan anvendes i gjærvertceller innbefatter promotere fra gjærglykolytiske gener, promotere fra alkoholdehydrogenasegener, TPI1 promoteren og ADH2-4c promoteren. Se PCT WO 96/23898.

Egnede promotere som kan anvendes i filamentøse sopp innbefatter ADH3 promoteren, tpiA promoteren, promotere fra gener kodende for *Aspergillus oryzae* TAKA amylase, *Rhizomucor miehi* aspartisk proteinase, *Aspergillus niger* nøytral alfa-amylase, *A. niger* syrestabil alfa-amylase, *A. niger* eller *Aspergillus awamori* glukoamylase, R. miehei lipase, *A. oryzae* alkalisk protease, *A. oryzae* triose fosfarisomerase og *Aspergillus nidulans* acetamidase. Se PCT WO 96/23898.

Egnede promotere som kan anvendes i pattedyrceller er SV40 promoteren, metallotioneingenpromoteren, murinbrysttumoviruspromoter, Rous sarkomaviruspromoter og adenovirus 2 major late promoter. Se PCT WO 96/23898 og PCT WO 97/42320.

Egnede promotere som kan anvend i insektsceller innbefatter polyhedrin-promoteren, P10 promoteren, *Autographa californica* polyhedrosisvirus hovedprotein-promoter, baculovirus immediateearlygen 1 promoter og baculovirus 39K delayed-earlygenpromoter. Se PCT WO 96/23898.

Til slutt kan promotere bestående av deler av andre promotere og delvis eller totalt syntetiske promotere bli anvendt. Se for eksempel Ni et al., Plant J., 7:661-676 (1995) og PCT WO 95/14098 som beskriver slike promotere for anvendelse i planter.

Promoteren kan innbefatte, eller kan bli modifisert til å innbefatte, en eller flere enhancerelementer. Det er foretrukket at promoteren vil innbefatte en mengde enhancerelementer. Promotere inneholdende enhancerelementer tilveiebringer høyere transkripsjonsnivåer sammenlignet med promotere som ikke innbefatter disse. Egnede enhancerelementer som kan anvendes i planter innbefatter 35S enhancerelementet fra blomkålmosaikvirus (US patent nr. 5,106,739 og 5,164,316) og enhancerelementer fra figwort mosaikvirus (Maiti et al., Transgenic Res. 6, 143-156 (1997)). Andre egnede enhancere som kan anvendes i andre celler er kjente. Se PCT WO 96/23898 og Enhancers And Eukaryotic Expression (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 1983).

For effektiv ekspressjon er de kodende sekvensene også fortrinnsvis operabelt koblede til en 3' ikke-translatert sekvens. Den 3' ikke-translaterte sekvensen inneholder transkripsjons- og/eller translasjonstermineringssekvenser. 3' ikke-translaterte regioner kan bli oppnådd fra flankerende regioner til gener fra bakterielle, plante eller andre

eukaryote celler. For anvendelse i prokaryoter vil den 3' ikke-translaterte region innbefatte en transkripsjons-termineringssekvens. For anvendelse i planter og andre eukaryoter vil den 3' ikke-translaterte regionen innbefatte en transkripsjonstermineringssekvens og en polyadenyleringssekvens. Egnede 3' ikke-translaterte sekvenser som

5 kan anvendes i planter innbefatter de fra blomkålmosaikvirus 35S genet, faseolin-frølagringsproteingenet, erteribulosebifosfatkarboksylase liten subenhet E9 genet, soyabønne 7S lagringsproteingener, oktofinsyntasegenet og nopalinsyntasegenet.

I planter og andre eukaryoter blir en 5' ikke-translatert sekvens også anvendt.

Den 5' ikke-translaterte sekvensen er den delen av et mRNA som utgår fra 5' CAP setet

10 til translasjonsinitieringskodonet. Denne region av mRNA er nødvendig for translasjonsinitiering i eukaryoter og spiller en rolle i regulering av genekspressjonen. Egnede 5' ikke-translaterte regioner som kan anvendes i planter innbefatter de til alfafa mosaikvirus, agurkmosaikviruskappeproteingenet og tobakkmosaikvirus.

Som angitt ovenfor kan DNA konstruksjonen være en vektor. Vektoren kan

15 inneholde en eller flere replikasjonssystemer som muliggjør at den blir replikert i vertscellene. Celle-replikerende vektorer innbefatter plasmider, kosmider og virale vektorer. Alternativt kan vektoren være en integrerende vektor som muliggjør integrasjon inn i vertcellens kromosom av sekvensen kodende for et dicamba-degraderende enzym ifølge oppfinnelsen. Vektoren har også fortrinnsvis unike restriksjonssteder for innskudd

20 av DNA sekvensene. Dersom en vektor ikke har unike restriksjonssteder kan den bli modifisert for å innføre eller eliminere restriksjonssteder for å gjøre den mer egnet for manipulasjoner.

DNA konstruksjonene ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt for å transformere en mengde vertceller (se nedenfor). En genetisk markør kan bli anvendt for selektering av

25 transformerte vertceller ("en seleksjonsmarkør"). Seleksjonsmarkører muliggjør at transformerte celler blir isolert ved negativ seleksjon (dvs. inhibering av resten av cellene som ikke inneholder seleksjonsmarkøren) eller ved screening for et produkt kodet av seleksjonsmarkøren.

Det mest vanlig anvendte selektermarkørgenet for plantetransformasjon er

30 neomycinfosfotransferase II (nptII) genet, isolert fra Tn5, som når plassert under kontroll av planteregulatoriske signaler utviser resistens overfor kanamycin. Fraley et al., Proc.

Natl. Acad. Sci USA, 80:4803 (1983). Et vanlig anvendt annet selekterbart markørgen er hygromycinfosfotransferasegenet som utviser resistent mot antibiotisk hygromycin.

Vanden Elzen et al., Plant. Mol. Biol., 5:299 (1985).

Ytterligere selekterbare markørgener med bakteriell opprinnelse som utviser
 5 resistens overfor antibiotika innbefatter gentamycinacetyltransferase, streptomycinfosfo-
 transferase, og bleomycinresistensterminanten. Hayford et al., Plant. Physiol. 86:1216
 (1988), Jones et al., Mol. Gen. Genet. 210:86 (1987), Svab et al., Plant Mol. Biol. 14:197
 (1990), Hille et al., Plant Mol. Biol. 7:171 (1986). Andre selekterbare markørgener som
 utviser resistens overfor herbicider så som glyfosat, glufosinat eller bromoksynil. Comai
 10 et al., Nature 317:741-744 (1985), Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2: 603-618 (1990) og
 Stalker et al., Science 242:419-423 (1988).

Andre selekterbare markørgener for plantetransformasjon har ikke bakteriell
 opprinnelse. Disse genene innbefatter for eksempel musedihydrofolatreduktase, plante
 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfatsyntase og planteacetolacetatsyntase. Eichholtz et al.,
 15 Somatic Cell Mol. Genet. 13:67 (1987), Shah et al., Science 233:478 (1986), Charest et
 al., Plant Cell Rep. 8:643 (1990).

Vanlig anvendte gener for screening av antatte transformerte celler innbefatter
 β -glukuronidase (GUS), β -galaktosidase, luciferase og kloramfenikolacetyltransferase.
 Jefferson, R.A. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387 (1987), Teeri et al., EMBO J. 8: 343 (1989),
 20 Koncz et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 131 (1987), De Block et al., EMBO J. 3:
 1681 (1984), grønt fluorescensprotein (GFP) (Chalfie et al., Science 263: 802 (1994),
 Haseloff et al., TIG 11: 328-329 (1995) og PCT søknad WO 97/41228). En annen
 metode for identifikasjon av relativt sjeldne transformasjonshendelser er blitt anvendt av
 et gen som koder for en dominant konstitutiv regulator av Zea mays antocyanin
 25 pigmenteringsreaksjonsveien. Ludwig et al., Science 247:449 (1990).

Egende seleksjonsmarkører for anvendelse i prokaryoter og eukaryoter
 forskjellige fra planter er også velkjente. Se for eksempel PCT WO 96/23898 og PCT
 WO 97/42320. Blant annet kan resistens overfor antibiotika (ampicillin, kanamycin,
 tetracylin, kloramfenikol, neomycin eller hygromycin) blir anvendt som seleksjonsmarkør.

30 Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse kan toleranse overfor dicamba
 bli anvendt som en seleksjonsmarkør for planter og planteceller. "Toleranse" betyr at

transformerte planteceller har evne til å vokse (overleve og regenerere til planter) når de bli plassert i kulturmedium inneholdende et nivå av dicamba som forhindrer at ikke-transformerte celler fra å vokse. "Toleranse" betyr også at transformerte planter har evne til å vokse etter påføring av en mengde dicamba som inhiberer veksten av ikke-transformerte planter.

Fremgangsmåte for selektering av transformerte planteceller er velkjent innenfor fagområdet. I det minste noen av plantecellene i en populasjon av planteceller (for eksempel en eksplant eller en embryonisk suspensjonskultur) blir transformert med en DNA konstruksjon ifølge oppfinnelsen som tilveiebringer dicamba-degradering. Den resulterende populasjon av planteceller blir plassert i et kulturmedium inneholdende dicamba i en konsentrasjon som blir valgt slik at transformerte planteceller vil vokse, mens ikke-transformerte planteceller ikke vil vokse. Egnede konsentrasjoner dicamba kan bli bestemt empirisk som kjent innenfor fagområdet.

Fremgangsmåter for selektering av transformerte planter er også velkjent innenfor fagområdet. Dicamba blir påført en populasjon av planter antatt å omfatte en DNA konstruksjon ifølge oppfinnelsen som tilveiebringer dicamba-degradering. Mengden dicamba blir valgt slik at transformerte planter vil vokse og veksten av ikke-transformerte planter vil bli inhibert. Inhibisjonsnivået må være tilstrekkelig slik at transformerte og ikke-transformerte planter lett kan skjelnes fra hverandre (dvs. inhibisjonen må være statistisk signifikant). Slike mengden kan bli bestemt empirisk som kjent innenfor fagområdet.

Videre kan dannelsen av 3,6-DCSA som et resultat av degradering av dicamba bli anvendt for seleksjon og screening. Dannelse av 3,6-DCSA kan lett bli bekreftet ved observering av fluorescensen til denne forbindelsen, muliggjøre seleksjon og screening av transformerte vertceller, intakte organismer og deler av organismene (for eksempel mikroorganismer, planter, plantedeler og planteceller). I dette henseende muliggjør oppfinnelsen for seleksjon og screening av transformerte vertceller, intakte organismer og deler av organismer på samme måte for grønt fluorescensprotein (GFP). Se US patent nr. 5.162.227 og 5.419.084 og PCT søknad WO 96/27675, WO 97/11094, WO 97/41228 og WO 97/42320, alle er inkorporert heri som referanse. Spesielt kan 3,6-DCSA bli detektert i transformerte vertceller, intakte organismer og deler av organismer

ved anvendelse av konvensjonell spektrofotometriske metoder. Blant annet kan mikroskop
skoper bli utstyrt med hensiktsmessige filterkombinasjoner for fluorescens-eksitasjon og
deteksjon. En håndholdt lampe kan bli anvendt for arbeid på benk eller arbeid i felten
(se eksempel 1). Fluorescens-aktivert celledatering kan også bli anvendt. 3,6-DCSA blir
eksitert ved en bølgelengde på 312-313 nm, men en maksimal emisjonsbølgelengde på
424 nm.

"Deler" av organismer innbefatter organer, vev eller hvilke som helst andre deler.
"Plantedeler" innbefatter frø, pollen, embryoer, blomster, frukter, skudd, blader, røtter,
stammer, eksplantater osv.

Seleksjon basert på dicamba-toleranse eller dicamba-degradering kan bli
anvendt ved produksjon av dicamba-tolerante planter eller dicamba-degraderende
mikroorganismer, i hvilke tilfeller anvendelse av en annen seleksjonsmarkør ikke
behøver å være nødvendig. Seleksjon basert på dicamba-toleranse eller dicamba-
degradering kan også bli anvendt ved produksjon av transgene celler eller organismer
som uttrykker andre gener av interesse. Mange slike gener er kjent og innbefatter gener
kodende for proteiner av kommersiell verdi og gener som utviser forbedrede
agronomiske trekk på plantene (se for eksempel PCT WO 97/41228, den fullstendige
beskrivelsen er inkorporert heri som referanse).

DNA konstruksjoner ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt for å transformere
forskjellige vertceller, inkludert prokaryoter og eukaryoter. DNA sekvenser kodende for
dicamba-degraderende enzym(er) og seleksjonsmarkøren, dersom en separat
seleksjonsmarkør blir anvendt, kan være på samme eller forskjellige DNA konstruk-
sjoner. Det er foretrukket at de er arrangert på en enkelt DNA konstruksjon som en
transkripsjons-enhet slik at alle kodende sekvenser blir uttrykt sammen. Genet(ene) av
interesse og DNA sekvenser kodende for dicamba-degraderende enzym(er), når
dicamba-toleranse eller dicamba-degradering blir anvendt som en seleksjonsmarkør,
kan være på samme eller andre DNA konstruksjoner. Slike konstruksjoner blir fremstilt
på samme måte som beskrevet ovenfor.

Egnde vertceller innbefatter prokaryotiske og eukaryotiske mikroorganismer (for
eksempel bakterier) inkludert *Agrobacterium tumefaciens* og *Escherichia coli*), gjær
(inkludert *Saccharomyces cerevisiae*) og annen sopp (inkludert *Aspergillus* sp),

planteceller, insektsceller og pattedyrceller. Det er foretrukket at vertcellen normalt ikke degraderer dicamba. Foreliggende oppfinnelse kan derimot bli anvendt for å øke nivået av dicamba-degradering i vertcellene som normalt degraderer dicamba.

"Transgene celler" og organismer ifølge oppfinnelsen innbefatter følgelig celler og organismer som ikke normalt degraderer dicamba, men som er blitt transformert ifølge oppfinnelsen slik at de har evne til å degradere dette herbicidet. "Transgene" celler og organismer ifølge oppfinnelsen innbefatter også celler og organismer som normalt degraderer dicamba, men som er blitt transformert ifølge oppfinnelsen slik at de har evne til å degradere av dette herbicidet eller degradere herbicidet mer effektivt.

Fremgangsmåte for transformering av prokaryote og eukaryote vertceller er velkjent innenfor fagområdet. Se for eksempel Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); PCT WO 96/23898 og PCT WO 87/42320.

Blant annet er en mengde fremgangsmåter for plantetransformasjon blitt utviklet, inkludert biologiske og fysiologiske transformasjonsprotokoller. Se for eksempel Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" i *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. og Thompson, J. E. red. (CRC Press, Inc. Boca Raton, 1993) s. 67-88. I tillegg er vektorer og in vitro dyrkningsmetoder for plantecelle eller vevstransformasjon og regenerering av planter tilgjengelige. Se for eksempel Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" i *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. red. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) s. 89-119.

Den mest anvendte fremgangsmåte for innføring av en ekspressjonsvektor inn i planter er basert på det naturlig transformasjonssystemet til *Agrobacterium*. Se for eksempel Horsch et al., *Science* 227:1229 (1985). *A. tumefaciens* og *A. rhizogenes* er plantepatogene jordbakterier som transformerer plantecellene genetisk. Ti og Ri plasmidene til henholdsvis *A. tumefaciens* og *A. rhizogenes* bærer gener som er ansvarlig for genetisk transformasjon av planten. Se for eksempel Kado, C.I. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 10:1 (1991). Beskrivelse av *Agrobacterium*vektorsystemer og fremgangsmåter for *Agrobacterium*-mediert genoverføring er tilveiebrakt i en mengde referanser,

inkludert Gruber et al., supra, Miki et al., supra, Moloney et al., Plant Cell Reports 8:238 (1989) og US patent Nr. 4,940,838 og 5,464,763.

En generelt anvendbar fremgangsmåte for plantetransformasjon er mikroprosjekttil-mediert transformasjon hvori DNA er båret på overflaten er mikroprosjektiler. Ekspressjonsvektoren blir ført inn i plantevev med en biolistisk innretning som aksellerer mikroprosjektiler til hastigheter som er tilstrekkelige for å penetrere plantecellevegger og membraner. Sanford et al., Part. Sci. Technol. 5:27 (1987), Sanford, J. C., Trends Biotech. 6:299 (1988), Sanford, J. C. Physiol. Plant 79:206 (1990), Klein et al., Biotechnology 10:268 (1992).

En annen fremgangsmåte for fysisk levering av DNA til planter er sonikering av målceller. Zhang et al., Bio/Technology 9:996 (1991). Alternativt er liposom eller sferoplastfusjon blitt anvendt for å innføre ekspressjonsvektorer i planter. deshayes et al., EMBO J. 4:2731 (1985), Christou et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 84:3962 (1987). Direkte opptak av DNA inn i protoplaster ved anvendelse av CaCl_2 presipitasjon, polyvinylalkohol eller poly-L-ornitin er også blitt rapportert. Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199:161 (1985) og Draper et al., Plant Cell Physiol. 23:451 (1982). Elektroporasjon av protoplaster og hele celler og vev er også blitt beskrevet. Donn et al., In Abstract of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p. 53 (1990); D'Halluin et al., Plant Cell 4:1495-1505 (1992) og Spencer et al., Plant Mol. Biol 24:51-61 (1994).

Transgene dicamba-tolerante planter av en hvilken som helst type kan bli fremstilt ifølge oppfinnelsen. Spesielt kan bredbladede planter (inkludert bønner, soyabønner, bomull, erter, poteter, solsikker, tomater, tobakk, frukttrær og ornamentale planter og trær) som for tiden er kjent for å bli skadet av dicamba, blir transformert slik at de blir tolerante overfor herbicider. Andre planter (så som mais, sorgum, småkorn, sukkerroer, asparges og gress) som for tiden er betraktet å være tolerante overfor dicamba kan bli transformert for å øke deres toleranse overfor herbicider. "Tolerant" betyr at transformerte planter kan vokse i nærvær av en mende dicamba som inhiberer veksten av ikke-transformerte planter.

Det er betraktet at dicamba-degraderingsoksygenase ifølge oppfinnelsen kan virke med endogene reduktaser og ferredoksiner tilstede i transgene vertceller og

organismer for å degradere dicamba. Plantekloroplaster er spesielt rike i reduktaser og ferredoksiner. En foretrukket utførelsesform for produksjon av transgene dicamba-tolerante planter er anvendelse av en sekvens kodende for peptidet som vil lede dicamba-degraderingsoksygenase inn i kloroplaster ("en kloroplastmålsøkende sekvens"). DNA kodende for kloroplastmålsøkende sekvens bli fortrinnsvis plassert oppstrøms (5') for sekvensen kodende for dicamba-degraderingsoksygenase, men kan også bli plassert nedstrøms (3') for den kodende sekvensen, eller både oppstrøms og nedstrøms for den kodede sekvensen. Eksempler på kloroplastmålsøkende sekvenser omfatter mais cab-m7 signalsekvensen (se Becker et al., Plant Mol. Biol. 20:49 (1992) og PCT WO 97/41228) og ertglutationreduktasesignalsekvensen (Creissen et al., Plant J. 2:129 (1991) og PCT WO 97/41228). En alternativ foretrukket utførelsesform er direkte transformasjon av kloroplaster ved anvendelse av en konstruksjon omfattende en promoter som er funksjonell i kloroplaster for å oppnå ekspressjon av oksygenasen i kloroplaster. Se for eksempel PCT søknad WO 95/24492 og US patent nr. 5,545,818.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for kontrollering av ugress i en mark hvor transgene dicamba-tolerante planter vokser. Fremgangsmåten omfatter påføring av en effektiv mengde dicamba på marken for å kontrollere ugresset. Fremgangsmåte for påføring av dicamba og mengder av dicamba som effektivt kontrollerer forskjellige ugressstyper er kjent. Se Crop Protection Reference, s. 1803-1821 (Chemical & Pharmaceutical Press, Inc. New York, NY, 11. utg., 1995).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for degradering av dicamba tilstede i et materiale, så som jord, vann eller avfallsprodukter fra en dicamba-fremstillende innretning. Slik degradering kan bli oppnådd ved anvendelse av dicamba-degraderingsenzymene. Enzymene kan bli rensset fra mikroorganismer som naturlig uttrykker disse (se eksempel 1) eller kan bli rensset fra transgene vertceller som produserer disse. Dersom enzymene blir anvendt i slike fremgangsmåter må hensiktsmessige kofaktorer også bli tilveiebrakt (se eksempel 1). Effektive mengder kan bli bestemt empirisk som kjent på fagområdet (se eksempel 1). Alternativt kan transgene prokaryotiske og eukaryotiske mikroorganismer bli anvendt for å degradere dicamba i slike materialer. Transgene prokaryote og eukaryote mikro-

organismer kan bli fremstilt som beskrevet ovenfor, og effektive mengder kan bli bestemt empirisk som kjent innenfor fagområdet.

Dicamba blir ført inn i miljøet i store mengder på et kontinuerlig grunnlag. Eliminering av dicamba er stort sett avhengig av virkningen av enzymsystemene som finnes i mikroorganismene som er tilstede i jorden og vannet på planeten. En forståelse av disse enzymsystemene, inkludert dicamba-degraderende O-demetylaser og deres tre komponenter er viktige i forsøk på å undersøke naturlige og genetiske modifiserte mikrober for bioremediering og gjenoppretning av kontaminert jord, vann og andre materialer. Dicamba-degraderende enzymer, DNA molekyler, DNA konstruksjoner osv. ifølge oppfinnelsen kan følgelig bli anvendt som forskningsredskaper for studering av dicamba-degradering og bioremediering.

Til slutt kan dicamba-degraderende enzymer bli anvendt i en analyse for dicamba. En prøve antatt å inneholde dicamba blir blandet med en dicamba-degraderende O-demetylease eller en kombinasjon av en dicamba-degraderende oksygenase, et dicamba-degraderende ferredoksin og en dicamba-degraderende reduktase. Egende analyser er beskrevet i eksempel 1. Spesielt utgjør deteksjon og/eller kvantifisering av fluorescensen forårsaket av dannelse av 3,6-DCSA en hensiktsmessig analyse.

20 EKSEMPLER

20 EKSEMPEL 1: Rensing og karakterisering av komponenter av dicamba O-demetylase til *Pseudomonas maltophilia* DI-6

25 FREMGANGSMÅTER OG MATERIALER:

Bakterie og vekstbetingelser.

Pseudomonas maltophilia, stamme DI-6 (Kreuger et al., 1989) J. Agric. Food Chem., 37:534-538) ble isolert fra et jordområde som vedvarende var kontaminert med dicamba. Bakterien ble gitt av Dr. Douglas Cork fra Illinois Institute of Technology (Chicago, IL) og ble oppbevart på redusert kloridmedium (Kreuger, J. P. (1989) Ph.D. thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL), supplementert med enten dicamba

(2mg/ml) eller en blanding av glukose (2 mg/ml) og Casaminosyrer (2 mg/ml). Karbonkilden ble filter-sterilisert og tilsatt til mediet etter at den var blitt autoklavert. Fast medium ble dannet ved tilsetning av 1% (wt/vol) Gelrite (Scott Laboratories, West Warwick, R.I.)

5 Kjemikalier og reagens.

Dicamba, 3,6-DCSA og [^{14}C] dicamba (U-fenyl- ^{14}C , 42,4 mCi/mmol, radiokjemisk renhet høyere enn 98%) ble tilført av Sandoz Agro, Inc. (Des Plaines, IL). For å øke oppløseligheten ble dicamba og 3,6-DCSA stammeoppløsninger dannet ved titrering med KOH til pH 7,0. Alle kjemikaliene ble oppnådd fra Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), dersom ikke annet er angitt. Superose 12, Mono Q, Q-Sepharose (Fast Flow) og Fenyl-Sepharose (CL-4B) kolonnepakninger for FPLC (hurtig ytelse væskechromatografi) apparatur ble oppnådd fra Pharmacia (Milwaukee, WI). Amfolyt pH 4-6 og amfolyt pH 4-9 ble oppnådd fra Serva (Heidelberg, FRG). Akrylamid, β -merkaptotanol, N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED) og ammoniumpersulfat (APS) kom fra Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Tynnsjiktchromatografi (TLC) plater var silikagel (250 μm tykkelse) med UV 254 indikator og ble oppnådd fra J. T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ).

Enzymanalyser.

Dicamba O-demetylaseaktiviteten ble analysert ved en måling av dannelsen av [^{14}C] 3,6-DCSA fra [^{14}C] dicamba. Aktiviteten i blandinger av enzymkomponenter ble målt ved 30°C i en standard 300 μl reaksjonsblanding inneholdende 25 mM kaliumfosfatbuffer (pH 7,0); 10 mM MgCl_2 , 0,5 mM NADH (beta-nikotinamidadenindinukleotid, redusert form), 0,5 mM jernsulfat, 50 μM kald dicamba, 2,5 μM [^{14}C] dicamba (sluttspesifikk aktivitet til radioaktiv dicamba var 1,9 mCi/mmol), og forskjellige mengder cellysat eller delvis rensset enzym. Alle enzymanalysene i løpet av de endelige rensnings-

25 trinnene ble utført i fosfatbuffer på grunn av pH optimum til dicamba O-demetylaseaktiviteten ble funnet å være i det midtre området for fosfatbufferene, og høyere enzymaktivitet ble observert med fosfatbuffer sammenlignet med Tris-HCl [tris(hydroksymetyl)-aminometanhydroklorid] buffer ved pH 7,0. Reaksjonene ble initiert ved tilsetning av substratet, dicamba. Ved spesifikke tidspunkter ble reaksjonene stoppet ved tilsetning

30 av 50 μl 5% (vol/vol) H_2SO_4 . Dicamba og dicambametabolitter ble deretter ekstrahert to ganger med ett volum eter, og ekstraktene ble avdampet til tørrhet. Isolerings-

effektivitetene (gjennomsnittlig $\pm$ standardavvik) for ekstraheringsprosedyren var $87\% \pm 2\%$ for dicamba og $85\% \pm 3\%$ for 3,6-DCSA (Yang et al., Anal. Biochem. 219:37-42 (1994)).

[^{14}C] dicamba og ^{14}C -merkede metabolitter ble separert ved tynnsjikt-kromatografi (TLC). Eter-ekstrahert dicamba og dets metabolitter ble på ny oppløst i 50 μl eter før applisert på en TLC plate. Oppløsningsmiddelsystemet for kjøring av TLC var kloroform-etanol-eddiksyre (85:10:5 [vol/vol/vol]). Oppløste reaksjonsprodukter ble visualisert og kvantifisert ved eksponering av TLC platen for en fosforsikt i 24 timer og deretter scanning av sikten i et PhosphorImager SF (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Estimer av mengden radioaktivitet i en bestemt flekk på TLC platen ble bestemt ved sammenligning av total pikseltelling i den flekken i forhold til en flekk på samme plate inneholdende en kjent mengde [^{14}C] dicamba. En aktivitetseenhet ble definert som mengden enzym som katalyserer dannelsen av 1 nmol 3,6-DCSA fra dicamba pr. minutt ved 30°C . Spesifikke aktiviteter var basert på total proteinkonsentrasjon av analyseblandingen.

Aktiviteten til reduktasekomponenten av dicambademetylase ble analysert ved måling av reduksjon av 2,6-diklorfenolindofenol (DCIP) med et Hitachi U-2000 spektrofotometer. Reaksjonen inneholdt 0,5 mM NADH, 0,2 mM FAD (flavinadenindinukleotid), 50 μM DCIP, 20 mM Trisbuffer (pH 8,0) og 10-100 μl enzymprøve i et totalvolum på 1 ml. Forandring i absorbansen ved 600 nm med tiden ble målt ved romtemperatur. Spesifikk aktivitet ble beregnet ved anvendelse av en ekstinksjonskoeffisient ved 600 nm på $21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for redusert DCIP. Spesifikk aktivitet ble uttrykt som nmol DCIP redusert $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

I tillegg ble en in situ DCIP analyse anvendt for å detektere og lokalisere reduktaseaktiviteten i proteinpreparater separert på isoelektrisk fokuserende (IEF) geler. Etter elektroforese av proteinene på IEF gel ble kolonnene tatt ut av gelen og vasket med 20 ml kald 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8,0). Lavtsmeltende agarose ble oppløst ved oppvarming i 10 ml 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8,0) ved en sluttkonsentrasjon på 1,5% (w/v). Når agarosen ble avkjølt til nær romtemperatur, ble den supplementert med 0,2 mM FAD, 50 μM DCIP, og 0,5 mM NADH. Analyseblandingen ble helt på en glassplate og latt stivne. Gelstykket ble plassert på toppen av den stivnede reaksjonsblandingen og

stivnet ved romtemperatur i 15 minutter. Dersom gelbiten inneholdt et protein med redusert aktivitet, ble et fargeløst bånd med redusert DCIP dannet i den blå bakgrunn av DCIP.

Cellelysater.

5 Cellene ble dyrket til en optisk tetthet ved 550 nm 1,3-1,5 i flytende redusert kloridmedium inneholdende en blanding av glukose og Casaminosyrer på en roterende ristinnretning (250 rpm ved 30°C). Cellene ble høstet ved sentrifugering, vasket to ganger med kald 100 mM MgCl₂ og på ny sentrifugert. Cellepastaer ble enten anvendt øyeblikkelig eller hurtig frosset i flytende nitrogen og lagret ved -80°C. Ved tidspunkt for
10 enzymrensning ble 25 g frosne celler tint og resuspendert i 50 ml av isolert buffer inneholdende 25 mM Trisbuffer (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, og 0,5 mM EDTA. Fenylmetylsulfonylfluorid og ditiotreitol ble tilsatt til sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 0,5 mM og 1 mM. Etter tilsetning av 10 mg lysozym og 1 mg Dnase ble cellene omrørt i 10 min. på is og brutt opp ved sonikering (modell XL2020 sonikator; Heat Systems) på is ved
15 middels innstilling (innstilling 5) med 12-20 sekunder lange utbrudd og 40-sekundlange hvileintervaller. Resulterende cellelysater ble fortynnet med 90 ml med isoleringsbuffer og sentrifugert ved 76000 x g i 1 time ved 4°C. Supernatanten ble anvendt som kilde for fjernet cellelysate.

Enzymrensning.

20 Alle prosedyrene ble utført ved 4°C dersom ikke annet er angitt. Fast ammoniumsulfat ble sakte tilsatt til et 90-ml volum av klaret cellelysate til 40% (wt/vol) metning, med konstant røring. Etter 15 minutters omrøring ble blandingene sentrifugert ved 15400 x g i 15 minutter og presipitatet ble kastet. Ytterligere fast ammoniumsulfat ble tilsatt til 70% (wt/vol) metning, med konstant omrøring av supernatanten. Etter 15 minutter omrøring
25 ble blandingen sentrifugert under betingelsene som er beskrevet ovenfor. Supernatanten ble fjernet og presipitatet ble resuspendert i et minimalt volum buffer A (20 mM Tris [pH 8,0], 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 5% (vol/vol) glycerol, og 1 mM ditiotreitol.

40-70% ammoniumsulfat ble deretter applisert på en fenyl-sefarose kolonne (2,5 x 10 cm) koblet til en FPLC apparatur (Pharmacia) og eluert med en reduserende
30 lineær gradient (NH₄)₂SO₄ fra 10% (w/v) til 0% (w/v). Kolonnen ble preekvilibrert med buffer A inneholdende 10% (w/vol) ammoniumsulfat. Strømningsraten var 1 ml/min.

Proteinkonsentrasjoenen ble kontinuerlig registrert ved A_{280} i løpet av kolonne-elueringen. Kolonnen ble vasket med 120 ml buffer A inneholdende 10% (wt/vol) ammoniumsulfat til grunnlinje A_{280} avlesningene ble oppnådd. Bundede proteiner ble levert med en reduserende gradient $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i buffer A [10 til 0% (wt/vol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i et totalvolum på 210 ml). Alikvoter på 10 μl ble tatt fra hver fraksjon og satt til standard dicamba O-metylaseanalyseblandingen (se ovenfor), men unntakelse av at ikke-radioaktiv dicamba ble anvendt som substrat. Dicamba O-demetylaseaktiviteten ble detektert ved registrering av omdanning av dicamba til høyt fluorescensreaksjonsprodukt 3,6-DCSA med en hånd-holdt UV lampe (312 nm, Fotodyne) i et formørket rom.

Denne prosedyren muliggjorde oppløsning av dicamba O-demetylase til tre blandinger inneholdende separate komponenter (betegnet komponentene I, II og III). Hver komponent var essensiell for dicamba O-demetylaseaktiviteten (se nedenfor). Når en enkeltkomponent ble analysert ble de andre to komponentene tilveiebrakt i overskudd. Fraksjoner inneholdende en enkelt aktivitetstype ble slått sammen (komponent I, fraksjonene 128-145; komponent II, ubundede fraksjoner 12-33; komponent III, fraksjonene 62-92).

(i) Rensing av komponent I

Fraksjoner inneholdende komponent I aktivitet (eluering fra en fenyl-sefaroze kolonne ved 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fraksjonene 128-145) ble slått sammen for å tilveiebringe et totalvolum på 34 ml. Sammenslåtte prøver ble konsentrert til 10 ml ved sentrifugering i en Centriprep-10 retning (Amicon) og deretter applisert på en Q-sefaroze (Fast Flow) FPLC kolonne (Pharmacia) (2,5 x 6 cm) ekvilibrert med buffer A og vasket med 80 ml buffer A. Proteiner bundet til kolonnen ble eluert med 100 ml lineær gradient på 0 til 0,6 M KCl i buffer A ved en strømningsrate på 1 ml/min. Fraksjoner ble samlet ved 1,5 minutt intervaller. Fraksjoner som utviser komponent I aktivitet (fraksjonene 29-37) ble slått sammen, dialysert mot buffer A over natt ved 4°C og applisert på en Mono Q HR 5/5 FOLC anion-utvekslingskolonne i buffer A. Proteinene ble eluert ved 1 ml/min ved anvendelse av en 50 ml gradient med økende KCl konsentrasjon (0 til 0,5 M). Fraksjoner som utviser komponent I aktivitet (fraksjonene 19-25) ble slått sammen og konsentrert til 0,4 ml ved sentrifugering i en Centricon-10 innretning. Den konsentrerte prøven ble deretter utsatt for kromatografi på en superose 12 FPLC kolonne (1,6 x 50

cm) ved en strømningsrate på 2 ml/min med buffer A inneholdende 100 mM KCl.

Fraksjonene 7-10 som utviser komponent I aktivitet ble slått sammen og konsentrert ved sentrifugering i en Centricon-10 innretning.

Delvis rensset komponent I ble fortynnet med kald 1% (w/v) glycin og konsentrert ved sentrifugering i en Centricon-10 innretning ytterligere tre ganger for å avsalte denne for preparering for IEF elektroforese. Avsaltet og konsentrert prøve ble deretter applisert på en 6% (w/v) IEF (pH 4-6) gel og utsatt for elektroforese i 1,5 timer ved 4°C (se nedenfor). Etter elektroforese ble gelen vasket med 25 mM kald fosfatbuffer (pH 7,0) i fem minutter og deretter ble hver bit av gelkolonnen kuttet i små (6 mm x 4 mm) biter.

Protein ble eluert fra oppkuttete gelfragmenter ved maling av disse med en pipettetupp i nærvær av 10 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 7,0). Protein fra hvert segment ble blandet med et overskudd av komponentene II og III og analysert for dicamba O-demetylaseaktivitet. Gelsegmentet som viste komponent I aktivitet (som også var rød-brun i farge) ble applisert på en 12,5% (w/v) natriumdodecylsulfatpolyakrylamidgel (SDS-PAGE) for å undersøke renheten til prøven.

(ii) Rensing av komponent II.

Komponent II oppnådd ved fenyl-sefarose kolonnekromatografi ble dialysert mot buffer A over natt ved 4°C og applisert på en FPLC Q-sefarosekolonne (2,5 x 6 cm).

Prøveeleueringsbetingelsene var identiske med de som er beskrevet ovenfor for komponent I med unntakelse av at elueringsgradienten var 0-1 M KCl i buffer A.

Fraksjoner som utviser komponent II aktivitet (fraksjonene 30-37) ble slått sammen, dialysert mot buffer A, konsentrert til 0,4 ml og applisert på en FPLC superose 12 kolonne (1,6 x 50 cm). Fremgangsmåtene for prøveapplikasjon og eluering var identiske med de som er beskrevet ovenfor for komponent I. Fraksjoner som utviser komponent II aktivitet (fraksjonene 3-6) ble slått sammen, fortynnet med et likt volum buffer A og applisert på en FPLC Mono Q kolonne. Proteinene ble eluert fra kolonnen ved anvendelse av samme KCl gradient som for komponent I. Fraksjonene 20-25 viser komponent II aktivitet. Delvis rensset komponent II ble ytterligere rensset ved IEF (pH 4-6) elektroforese ved anvendelse av samme betingelser som beskrevet for komponent I.

Gelsegmentet som viste komponent II aktivitet ble belastet på en 12,5% (w/v) SDS-PAGE for ytterligere analysing.

(iii) Rensing av komponent III.

Komponent III oppnådd ved fenyl-sefarose kolonnekromatografi ble dialysert mot buffer A over natt ved 4°C og applisert på en FPLC Q-sefarosekolonne (2,5 x 6 cm).

Betingelsene var identiske som de som er beskrevet ovenfor for komponent I.

Fraksjoner som utviser komponent III aktivitet (fraksjonene 26-38) ble dialysert mot buffer B [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM $MgCl_2$, 5% (v/v) glycerol; 1 mM ditiotretitol] og konsentrert til 5 ml. Blå fargestoffaffinitetsmatrise [Cibacron Blue 3GA type 3000 (Sigma)] ble pakket inn i en FPLC kolonne (1 x 5 cm) og pre-ekvilibrert med 20 ml buffer B. Konsentrert komponent III ble belastet på blå fargekolonne og vasket med 20 ml buffer B ved en strømningsrate på 0,2 ml/min helt til A_{280} til kolonneavløpet nådde grunnlinjenivåer. Bundet protein ble deretter eluert med 5 mM NADH i buffer B.

Fraksjoner inneholdende reduktaseaktivitet ble detektert ved analysing for dicamba O-demetylaseaktivitet i nærvær av et overskudd av komponentene I og II og også ved evnen som hver fraksjon har til å redusere DCIP i nærvær av NADH. Fraksjoner som utviser sterk reduktaseaktivitet i begge analyser ble slått sammen, dialysert mot buffer A inneholdende 100 mM KCl, konsentrert til 0,2 ml og applisert på en FPLC superose 12 kolonne. De samme betingelsene ble anvendt for kjøring av superosekolonnen som beskrevet for komponent I. Fraksjoner inneholdende proteiner som katalyserte DCIP reduksjonen ble slått sammen, dialysert mot buffer A og applisert på en FPLC Mono Q kolonne. Proteinene ble eluert ved anvendelse av samme betingelse som for komponent I. Delvis rensede komponent III ble ytterligere rensed ved IEF (pH 4-6) gel-elktroforese. Reduktaseaktiviteten til proteinene innenfor IEF gelen ble detektert ved analysing for DCIP reduksjon i en agarosegelbelegning som beskrevet ovenfor. Gelsegmentet som viste komponent II aktivitet ble belastet på en 12,5% (w/v) SDS-PAGE for ytterligere analysing.

Bestemmelse av NH_2 -terminal aminosyresekvenser.

Proteinbånd identifisert på IEF geler og inneholder komponent I, komponent II eller komponent III aktiviteter ble tatt ut og plassert i brønner til en 12,5% (w/v) SDS polyakrylamidgel. Etter elektroforese ble gelbitene inneholdende rensede proteiner transblottet på en PVDF (polyvinylidendifluorid) membran (Millipore) i en trans-blot celle (Bio-Rad, Richmond, CA) ved 25 volt i 16 timer. Blottebufferen var en løsning bestående

av 20% (v/v) metanol med 10 mM CAPS [3-(cykloheksylamino)-1-propansulfonsyre], pH 10,0. Sekvensering ble utført ved anvendelse av Applied Biosystems Inc. 420 H maskin ved Edman degradering (Edman og Henschen (1975) s. 232.279 i S.B. Needleman (red.), Protein sequence determination, 2. utg. red., Springer-Verlage, New York).

5 **Bestemmelse av proteinkonsentrasjon.**

Proteinkonsentrasjoner ble bestemt ifølge fremgangsmåten til Bradford (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254, med bovint serumalbumin som standard.

SDS-PAGE.

Natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) ble utført ifølge
 10 de modifiserte metodene til Laemmli (Laemmli (1970) Nature, 227:680-685). 12,5% (w/v) SDS geler på 85 x 65 x 0,75 mm ble dannet som følger: løpegel: 2,5 ml 40% (w/v) akrylamid/bis løsning (37:5:1), 1 ml løpebufferløsning [3M Tris-HCl (pH 8,8), 0,8% (w/v) SDS], 4,5 ml H₂O, 5 µl TEMED, og 40 µl 10% (w/v) APS; separeringsgel: 0,5 ml 40% (w/v) akrylamid/bis, 0,5 ml separeringsgelløsning [1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8% (w/v)
 15 SDS], 3 ml H₂O, 5 µl TEMED og 12,5 µl 10% (w/v) APS. Innholdet i løpebufferen var 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,2 M glycin og 0,1% (w/v) SDS. Prøvebufferen inneholdt 0,25 ml separeringsbuffer, 0,6 ml 20% (w/v) SDS, 0,2 ml β-merkaptøetanol, og 0,95 ml 0,1% bromfenol blå (w/v) i 50% (v/v) glycerol. Elektroforese ble utført ved 80 volt i en Bio-Rad Mini Gel apparatur helt til fargestoffet var 0,5 cm fra anodeenden av gelen. Proteinene
 20 ble farget med 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant blå R-250 i en blanding av isopropanol, vann og eddiksyre i et forhold på 3:6:1 (v/v/v). Avfarging ble utført i en blanding av metnaol, vann og eddiksyre i et forhold på 7:83:10 (v/v/v). Standardproteiner (Gibco BRL) innbefattet: myosin (214,2 kDa), fosforylase B (111,4 kDa), bovint serumalbumin (74,25 kDa), ovalbumin (45,5 kDa), karbonanhydrase (29,5 kDa), β-laktoglobulin (18,3
 25 kDa) og lysozym (15,4 kDa).

Bestemmelse av molekylvekt.

Molekylvekt (M_r) til peptider under denaturerende betingelser ble bestemt ved anvendelse av SDS-PAGE analyse. Molekylvektene til native komponenter I, II og III ble vurdert ved gelfiltrering gjennom en superose 12 HR 10/30 FPLC kolonne (Pharmacia)
 30 ved en strømningsrate på 0,2 ml/min i en buffer A inneholdende 100 mM KCl. Kalibreringsproteinene var gelfiltreringsstandarder fra Bio-Rad. Disse omfattet: bovint

tyroglobulin (670 kDa), bovin gammeglobulin (158 kDa), kyllingovalbumin (44 kDa), hestemyoglobin (17 kDa) og vitamin B-12 (1,35 kDa). Hulromsvolumet til superose 12 kolonnen ble beregnet ved anvendelse av Blue Dextran (M_r 2000000 Sigma).

IEF.

Isoelektrisk fokuserings (IEF) gelelektroforese ble utført i en vertikal mini-gel apparatur (Model #MGV-100) fra C.B.S. Scientific Co. (Del Mar, CA). IEF geler med 6% (w/v) polyakrylamid (70 x 90 x 1 mm) ble dannet ved blanding av det følgende: 1,6 ml 30% (w/v) akrylamid/bis (37:5:1), 0,8 g glycerol, 0,32 ml amfolyt pH 4-6 (serva); og 80 μ l 10% (w/v) APS. Katodebufferen var 100 mM β -alanin og anodebufferen var 100 mM eddiksyre. Proteinprøver i omtrent 1-10 μ l 1% (w/v) glycin ble blandet med et likt volum prøvebuffer [50% (v/v) glycerol, 1,6% (v/v) amfolyt pH 4-9, 2,4% (v/v) amfolyt pH 4-6]. Prøvene ble applisert ved katodeenden av gelen og latt migrere ved 200 volt i 1,5 timer og 400 volt i ytterligere 1,5 timer. Proteinene ble farget med Coomassie Brilliant blå R-250 ved anvendelse av prosedyren beskrevet ovenfor for SDS polyakrylamidgeler. IEF markører (Sigma) var: amyloglukosodase, pI 4,6; β -laktoglobulin A, pI 5,1; karbonisk anhydrase II, pI 5,4; karbonisk anhydrase II, pI 5,9 og karbonisk anhydrase I, pI 6,6.

Kinetisk analyse.

Kinetikken til demetyleringsreaksjon katalysert av dicamba O-demetylase ble studert ved analysing av de opprinnelige ratene til reaksjonen i nærvær av en konstant konsentrasjon enzym og økende konsentrasjoner substrat, dicamba. Reaksjonsblandingene inneholdt 25 mM kaliumfosfatbuffer (pH 7,0), 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM NADH, 0,5 mM $FeSO_4$, 25 μ g delvis rensset O-demetylaseenzym [40%-70% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ fraksjon fra et klaret cellelysat], forskjellige konsentrasjoner (0,5 til 50 μ M) dicamba og forskjellige konsentrasjoner (0,025 til 2,5 μ M) [^{14}C]dicamba ($U-^{14}C$, 42,4 mCi/mmol) i et totalvolum på 300 μ l. For analysing med dicambakonsentrasjoner av 0,5 μ M og 1 μ M, ble reaksjonsvolumet øket til 900 μ l for å forsikre at tilstrekkelige mengder radioaktivt dicamba og metabolittene derav var tilstede for å muliggjøre dekteksjon. I disse reaksjonene ble mengder av alle andre komponenter i reaksjonen ganget opp tre ganger. Omdanning av [^{14}C] dicamba til [^{14}C] 3,6-DCSA ble bestemt for forskjellige tidspunkter ved hver konsentrasjon av dicamba ved anvendelse av en PhosphorImager

SF for å scanne radioaktiviteten på fosforsikter som var blitt eksponert for TLC plater i 24 timer. En enhet aktivitet ble bestemt ettersom mengden av enzym som danner 1 nmol 3,6-DCSA pr. minutt ved 30°C. Opprinnelige rater for hver reaksjon ble bestemt ved plotting av reaksjonsraten mot tiden ved hver substratkonsentrasjon. Data ble tilpasset for Michaelis-Menten kinetikk og verdiene til K_m og V_{max} ble bestemt ved tilpasning til Lineweaver-Burk plott ved anvendelse av SigmaPlot® (Jandel Scientific, Corte Madera, CA).

Oksygenkrav.

Preliminære eksperimenter ved anvendelse av Clark oksygenelektrode som indikerer oksygen for bruk i løpet av en standard dicamba O-demetylaseanalyse med dicamba som et substrat. For å verifisere kravet til oksygen i O-demetylering i dicamba ved dicamba O-demetylase ble reaksjonene utført i et anaerobt rom som inneholdt mindre enn 1 ppm oksygen. Prosedyrer for erstatning av oksygen fra reaksjonsblandingen ble utført ved 4°C. Reaksjonsblandingen som mangler enzym ble plassert i en beholder og forseglet med en gummikork. For fjerning av oksygen ble beholderen evakuert to ganger med vakuum og spylt hver gang med nitrogen. Etter en tredje evakuering ble beholderen spylt med 90% nitrogen pluss 10% hydrogen. Enzym-løsningen ble likeledes spylt for oksygen (uten å boble enzym-løsningen). Både reaksjonsblandingen og enzym-løsningene ble overført til et anaerobt rom (95% N₂-5% H₂ atmosfære). 240 µl av klaret cellelysator ble initiert gjennom gummikorken med en mikrosprøyte og forsiktig blandet med 960 µl oksygen-fri reaksjonsblanding.

Reaksjonene ble utført ved 30°C.

En undersøkelse av reaksjonsproduktene på TLC plater viste at raten av [¹⁴C]3,6-DCSA produksjon fra [¹⁴C]dicamba under anaerobe betingelser var betydelig lavere enn reaksjonsraten med samme mengde enzym under aerobe betingelser. Under anaerobe betingelser var det omtrent ingen omdanning av dicamba til 3,6-DCSA i løpet av en time. Når en parallell reaksjonsblanding ble tatt fra det anaerobe rommet etter 30 minutter og inkubert med luft var en betydelig mengde av en av komponentene av dicamba O-demetylaseenzymkomplekset oksygenase.

Det er å bemerke at ved in vitro omdanning av [¹⁴C]dicamba til [¹⁴C]3,6-DCSA etterligner in vivo omdanningsreaksjonsveien dokumentert tidligere (Cork and Kreuger,

Adv. Appl. Microbiol. 36:1-66 (1991); Yang et al., Anal. Biochem 219:37-42 (1994). I disse studiene ble DCSA identifisert som et reaksjonsprodukt ifølge både TLC og kapillær elektroforese. Stringent identifikasjon av første hovedproduktet til dicamba-degradering som DCSA både in vivo og in vitro er blitt oppnådd ved gasskromatografi-massespektrometrianalyser.

Komponent og kofaktorkrav.

Etter opprinnelig separering av de tre komponentene av dicamba O-demetylase ved fenyl-sefarose kolonnekromatografi, ble de delvis rensede preparatene ført individuelt gjennom en ytterligere rensing på en Q-sefarosekolonne (2,5 x 6 cm).

Prøvene ble applisert på en Q-sefarose (Fast Flow) hurtig proteinvæske-kromatografi-kolonne (Pharmacia) i buffer A og eluert med en 100 ml lineær gradient fra 0 til 0,6 M KCl (for oksygenasekomponenter) eller 0 til 1,0 M KCl (for ferredoksin og reduktasekomponentene) i 1,5 ml fraksjoner. Hensiktsmessige sammenslåtte fraksjoner fra separate kolonner for oksygenaserensing (fraksjonene 29-37), for ferredoksinrensing (fraksjonene 30-37) eller for reduktaserensing (fraksjonene 26-38) ble anvendt for bestemmelse av komponent og kofaktorkrav.

De tre komponentene ble analysert for O-demetylaseaktivitet i forskjellige kombinasjoner for å bestemme komponentkravene.

For å bestemme kofaktorkravene ble O-demetylaseaktiviteten analysert ved anvendelse av en blanding av tre komponenter med [^{14}C]dicamba i 30 minutter ved 30°C. Mengder av delvis rensert protein (tilveiebrakt i et optimalisert forhold) i reaksjonsblandingen var 85 µg oksygenase, 55 µg ferredoksin og 50 µg reduktase.

Konsentrasjonen til kofaktorene anvendt i reaksjonsblandingen var 0,5 mM NADH, 0,2 mM FAD, 0,5 mM FeSO_3 , 10 mM MgCl_2 , 0,5 mM NADPH og 0,2 mM FMN.

RESULATER

Komponent I. Komponent av dicamba O-demetylase som ble bundet tettest til fenyl-sefarosekolonnen (angitt opprinnelig som komponent I og deretter identifisert som en oksygenase) hadde en bestemt rød-brun farge. Dette indikerte potensielt tilstedeværelse av et protein(er) inneholdende en jern-svovel sammenhopning eller en hemgruppe(er). Fraksjoner med komponent I aktivitet fra fenyl-sefarosekolonnen var

utsatt for ytterligere rensing ved Q-sefarose (Fast Flow) og mono Q kromatografi og deretter for separering på en superose 12 størrelseseksklusjonskolonne. Komponent I protein ble deretter ytterligere rensset på en IEF gel.

Proteiner fra hovedbånde på IEF gelen (med en tilsynelatende pI på omtrent 4,6) ble tatt ut og separert fra eventuelle gjenværende mindre kontaminanter ved SDS-PAGE. Hovedkomponent I proteinet oppnådd etter rensing ved IEF hadde en renhet som var høyere enn 90% vurdert ved densitometriske analyser av denne SDS-polykarylamidgelen farget med Coomassie Blue.

N-terminal aminosyresekvens til det dominante proteinet med en tilsynelatende molekylvekt på omtrent 40000 Dalton ble bestemt. Resultater fra aminosyresekvensiering indikerte at de første 29 aminosyrene til den N-terminale region var tilstede i følgende sekvens (residiene i paranteser er antakelser):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro
Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp
(Asp eller Thr) (Pro)

[SEQ ID NO:1]

Sammenligninger med aminosyresekvenser i forskjellige databaser indikerte liten eller ingen homologi med en NH₂-terminale sekvenser rapportert for andre monoksygenaser eller dioksygenaser.

Komponent II. Proteinfraksjonen som ikke ble bundet til en fenyl-sefarosekolonne ble angitt som komponent II. På grunn av at denne gulfargede fraksjonen kunne bli erstattet med ferredoksin fra *Clostridium pasteurianum* (men med saktere reaksjonsrater) når analyse ble utført i kombinasjon med komponentene II og III, ble det forsøksvis betegnet som en ferredoksin-inneholdende reaksjon. *Clostridium* ferredoksin virket klart i stedet for komponent II, men på grunn av den sterkt urene naturen til komponent II anvendt i disse eksperimentene var effektiviteten til *Clostridium*enzymet betydelig lavere enn den til antatt ferredoksin fra stamme DI-6. 55 µg av delvis rensset komponent II blandet med mengder i overskudd av komponentene I og III katalyserte omdanning av dicamba til 3,6-DCSA i en rate på omtrent 5 nmol min⁻¹ mg⁻¹, mens 100

μg sterkt rensset ferredoksin fra *Clostridium* resulterte i en aktivitet på bare $0,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Rensningstrinnene innbefatter Q-sefarose (Fast Flow) kromatografi, superose 12 gel filtrering og Mono Q kromatografi ga omtrent 1 mg rensset protein fra opprinnelig 25 g cellepasta. Denne fraksjonen ble rensset på en lignende måte til oksygenase-komponenten ved elektroforese på en IEF gel og deretter elektroforese av den aktive IEF fraksjonen på en SDS-polyakrylamidgel.

Analyser av komponent II aktivitet i proteiner eluert fra segmentene til IEF gelen indikerte at den fraksjon med en pI på omtrent $3,0$ inneholdt det aktive proteinet i komponent II. Proteinene fra denne gelbiten ble eluert og utsatt for SDS-PAGE. Farging av gelen med Coomassie blå viste et betydelig proteinbånd sammen med uklare proteiner med lavere molekylvekt. Det vesentlige proteinet med en tilsynelatende proteinvekt på omtrent 28000 Dalton ble blottet på en PVDF membran.

Aminosyresekvensering viste følgende N-terminale sekvens med 20 aminosyrer:

Thr Tyr Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met Asp Xaa Val Glu Xaa Xaa

[SEQ ID NO:2]

Komponent III. Komponent III av dicamba O-demetylase ble tilbakeholdt på en fenyl-farose kolonne i høye konsentrasjoner $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ og eluert ved omtrent 4% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Denne lysegule fraksjonen ble forsøksvis identifisert som en reduktase-inneholdende fraksjon basert på dets evne til å redusere oksydert cytochrom c og DCIP i nærvær av NADH og på grunn av at den kunne bli erstattet av cytochrom c reduktase fra grisehjertet (type 1, Sigma) i analyser med komponentene I og II. I dette reaksjonssettet produserte anvendelse av $50 \mu\text{g}$ delvis rensset komponent III en reaksjonsrate på omtrent $5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ når blandet med et overskudd av komponentene I og II. Sterkt rensset cytochrom c reduktase viste en betydelig aktivitet på omtrent $2,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ i reaksjonen og dette er en aktivitet som er under den som blir tilveiebrakt av komponent III når man betrakter urenheten til råkomponent III anvendt i disse analysene. I tillegg utviste komponent III reduktaseaktivitet når inkubert med cytochrom c eller 2,6-diklor-

fenol-indofenol (DCPIP) i nærvær av NADH. Hverken komponent I eller komponent II viste aktivitet i noen av disse to reduktaseanalysene.

I tillegg til rensing av denne fraksjonen ved kromatografi på kolonner inneholdende Q-sefarose (Fast Flow), blå fargeaffinitetsmatrise, superose 12 og Mono Q pakninge resulterte i små mengder protein i fraksjoner med redusert aktivitet. Komponent III proteinet hadde en renhet på omtrent 70% vurdert ved densitometriske analyser av aktiv proteinfraksjon etter separering ved SDS-PAGE og farging med Coomassie blå.

For ytterligere å undersøke rensing av komponent III ble det oppdaget at to forskjellige proteinfraksjoner fra Mono Q kolonnenettrinn inneholdt reduktaseaktivitet når analysert med ferredoksin og oksygenasekomponenter. Ytterligere rensing av disse to fraksjonene ved elektroforese på en IEF gel viste at reduktaseaktivitetene til de to fraksjonene hadde betydelige forskjellige isoelektriske punkter. Dette ble demonstrert ved å spalte ut kolonner inneholdende hver av de to reduktasefraksjonene fra IEF gelen og ved å legge bitene på toppen av et stykke lavtsmeltende agarose inneholdende en DCIP reaksjonsblanding. Reduktaseaktiviteten i begge gelbitene ble identifisert ved NADH-avhengig reduksjon av DCIP til dets fargeløse, reduserte form. Reduktase i fraksjon 35 hadde en tilsynelatende pI på omtrent 5,6, mens reduktasen i fraksjon 27 hadde en tilsynelatende pI på omtrent 4,8.

Begge reduktaseaktivitetene isolert fra IEF gelbitene var ustabile og tilstede i små mengder. Bare reduktasen fra fraksjon 35 fra Mono Q kolonnefraksjoneringen inneholdt tilstrekkelig proteinkonsentrasjon og aktivitet for å muliggjøre ytterligere rensing og karakterisering. En bit fra en IEF gel inneholdende denne reduktaseaktiviteten ble eluert og separert fra kontaminerende proteiner ved SDS-PAGE. Hovedproteinene i denne gelen var ett med en masse på omtrent 45 000 Dalton. Størrelse eksklusjonskromatografi indikerte en tilsynelatende molekylmasse på 50000 Dalton for komponent III i dets native tilstand.

Biokjemiske karaktertrekk til dicamba O-demetylase.

Dicamba O-demetylaseaktiviteten ble målt i løpet av inkubasjoner in vitro ved temperaturer varierende fra 20°C til 50°C og ved pH verdier fra omtrent 6 til 9. Aktiviteten hadde en skarp topp ved 30°C og bredere ved pH verdier mellom 6,5 og 7,5.

Den enzymatiske aktiviteten var avhengig av type pH buffer som ble anvendt. Ved pH 7 var aktiviteten for eksempel omtrent 40% lavere i tris-inneholdende buffere enn i fosfat-inneholdende buffere.

Verdier for K_m og V_{max} for dicamba O-demetylaser ble vurdert ved anvendelse SimaPlot® for å danne kurver med best tilpasning ut i fra Michaelis-Menten og Lineweaver-Burk plot data fra duplikate eksperimenter. K_m for dicamba ble vurdert å være omtrent $9,9 \pm 3,9 \mu M$ og V_{max} til reaksjonen ble vurdert å være omtrent 108 ± 12 nmol/min/mg.

De tre komponentene ble analysert for dicamba O-demetylaseaktivitet i forskjellige kombinasjoner. Ingen av komponentene viste enzymaktivitet når analysert alene. En betydelig mengde av O-demetylaseaktivitet kunne bli detektert kun når alle tre komponentene var kombinert. En blanding av komponentene I og II utviste små mengder enzymaktivitet som sannsynligvis er forårsaket av spor av komponent III som kontaminerer komponent I fraksjonene.

Både NADH og NADPH understøttet enzymaktiviteten, idet NADH var betydelig mer effektiv enn NADPH. Mg^{2+} var nødvendig for enzymaktivitet. Fe^{2+} , flavinadenin dinukleotid (FAD) og flavin mononukleotid (FMN) dannet liten eller ingen stimulering av enzymatisk aktivitet med delvis rensede proteinpreparater i disse eksperimentene. Høyet aktivitet ble oppnådd ved anvendelse av en kombinasjon av NADH, Fe^{2+} , Mg^{2+} og FAD.

DISKUSJON

Dicamba O-demetylase fra *Pseudomonas Maltophilia*, stamme DI-6, er en trekomponent oksygenase (Wang X-Z (1996) Ph.D. thesis, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE) ansvarlig for omdanning av herbicid, dicamba (2-metoksy-3,6-diklorbenzoesyre), til 3,6-diklorsalicylsyre (3,6-DCSA; 2-hydroksey-3,6-diklorbenzoesyre). Rensningsskjemaene har blitt angitt og muliggjør isolering av hver av de tre komponentene til en homogen eller nær-homogen tilstand.

Innledende separering av de tre komponentene ble oppnådd ved kromatografi på en fenyl-sefarosekolonne. Enzymatiske aktiviteter og andre karaktertrekk til delvis rensede komponenter muliggjorde en tentativ identifikasjon av komponentene som

reduktase, ferredoksin og en oksygenase – en blanding som ligner den som blir funnet i et antall andre tidligere studerte hem-inneholdende og ikke-hem-inneholdende, flerkomponentoksygenaser (Batie, et al., (1992) s. 543-565, In F. Müller (red), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, vol. III, CRC Press, Boca Raton; Haramaya, et al., (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601; Mason and Cammack (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:277-305; Rosche et al. (1995) Biochem. Biophys. Acta 1252:177-179). Komponent III isolert fra fenyyl-sefarošekolonnen katalyserte NADH-avhengig reduksjon av både cytokrom c og fargestoffet DCIP. I tillegg, kunne dets evne til å understøtte om-danning av dicamba til 3,6-DCSA når kombinert med komponentene I og II bli erstattet delvis av cytokrom c reduktase. Komponent II kunne bli erstattet ved tilsetning av ferredoksin fra *Clostridium pasteurianum* til reaksjoner inneholdende komponentene I og III. Det absolutte behovet for molekylært oksygen for å understøtte O-demetyleringsreaksjonen indikerte at den inneværende komponenten var en oksygenase.

Oksygenase_{DIC}. Komponent I av dicamba O-demetylase (betegnet oksygenase_{DIC}) er blitt rensert til homogenisitet og utsatt for N-terminal aminosyresekvensering. Den resulterende sekvensen på 29 aminosyreresidier viste ingen signifikant homologi med andre proteinsekvenser i de forskjellige databankene. Informasjon oppnådd fra denne aminosyresekvensen muliggjorde derimot konstruksjon av degenererte oligonukleotidprober som på en vellykket måte er blitt anvendt for å detektere og klone komponent I genet (se eksempel 2). En sammenligning av aminosyresekvensen avledet fra nukleotidsekvensen til denne klonen med den til proteinsekvenser i databasen viste sterk homologi ved andre oksygenaser (se eksempel 2).

Tilsynelatende molekylmasse oksygenase_{DIC}, beregnet fra dets migrering i SDS-polyakrylamidgeler, er omtrent 40000 Dalton. Rensede preparater av oksygenase utviste bare et hovedbånd på SDS-polyakrylamidgeler farget med Coomassie blå og Edman degradering av proteinet innbefattet idet båndet indikerte tilstedeværelse av bare en N-terminal form. Beregninger oppnådd fra adferden til nativ oksygenase_{DIC} på størrelsesekslusjonskolonner tydet på en molekylvekt på omtrent 90000 Dalton. Alle disse resultatene tyder på at nativ oksygenase eksisterer som en homodimer.

Oksygenase/hydroskylasekomponenten til et antall multikomponentsystemer består av et ($\alpha\beta$)_n-type subenhet arrangement hvor den større α subenheten er omtrent

50000 Dalton i størrelse og den mindre β subenheten er omtrent 20000 Dalton i molekylmasse (Haramaya, et al., (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601).

Oksygenasekomponenten til dicamba O-demetylase innehar derimot en enkelt subenhet på omtrent 40 kDa i molekylmasse som kan eksistere som en dimer i dets native

5 tilstand. Dette $(\alpha)_n$ -type subenhetarrangementet er lik det som finnes i andre godt karakteriserte oksygenaser så som 4-klorfenylacetat 3,4-dioksygenase fra *Pseudonoma* sp. stamme CBS (Markus et al., (1986) J. Biol. Chem. 261:12883-12888), ftalatdioksygenase fra *Pseudomonas cepacia* (Batie, et al., (1987) J. Biol. Chem. 262:1510-1518), 4-sulfobenzoat 3,4-dioksygenase fra *Comamonas testosteroni* (Locher, et al., (1991) Biochem J., 274:833-842), 2-okso-1,2-dihydrokinolin 8-monooksygenase fra *Pseudomonas putida* 86 (Rosche et al., (1995) Biochem. Biophys. Acta 1252:177-179), 4-karboksydifenyleterdioksygenase fra *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Dehmel, et al., (1995) Arch. Microbiol 163:35-41) og 3-klorbenzoat 3,4-dioksygenase fra *Pseudomonas putida*, (Nakatsu, et al., (1995) Microbiology (Reading) 141:485-495).

15 **Ferredoksin_{DIC}.** Komponent II av dicamba O-demetylase (betegnet ferredoksin_{DIC}) ble renset til nær homogenisitet ifølge flere trinn med kolonne-kromatografi og IEF. Sluttrensing ved SDS-PAGE dannet et hovedproteinbånd (M_r ~ 28000) og en mengde mindre proteiner som kan representere delvise nedbrutte produkter av renset ferredoksin.

20 En sammenligning av den N-terminale sekvensen til 20 aminosyreresidiser oppnådd fra hovedproteinbåndet med andre aminosyresekvenser i forskjellige protein-databanker ved anvendelse av Genetics Computing Group (GCG) programvare (University of Wisconsin, Madison, WI) viste sterk homologi med et antall dikluster-bakterielle ferredoksiner. En oppstilling og sammenligning av de første 20 aminosyrene
25 til ferredoksiner fra *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus* og *Azotobacter vinelansii* viste at disse respektive ferredoksinene har 65%, 65%, 65% og 60% identitet med den N-terminale sekvensen til proteinet fra *Pseudomonas maltophilia*, stamme DI-6. Identiteten til de fire residene angitt i antatt ferredoksinsekvens som Xaa var usikre. Basert på posisjonen til de ekstra toppene på
30 kromatografen til Edman degraderingsproduktene er det sannsynlig at disse Xaa residene virkelig er propionyl-cysteinresidier dannet ved alkylering av cysteinresidene

med akrylamid i løpet av SDS-PAGE (Brune (1992) Anal. Biochem. 207:285-290).

Dersom de fire Xaa residene alle er cysteinresidier blir identiteten til bakterielle ferredoksinsekvenser med ferredoksin fra *Pseudomonas maltophilia* henholdsvis 85%, 84%, 85% og 80%.

De fire to-sammenhopningsferredoksinene som viser sterk homologi med ferredoksin_{DIC} har en [3Fe-4S] sammenhopning etterfulgt av en [4F-4S] sammenhopning ved den N-terminale enden av proteinet. Dette tyder på at ferredoksin_{DIC} er spesifikt forskjellig fra ferredoksinkomponenter med [2F-2S] sammenhopninger som vanligvis er assosiert med ikke-hem multikomponentoksygenasene (Harayama, et al., (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601; Mason og Cammack (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:277-305; Rosche, et al., (1995) Biochem. Biophys. Acta 1252:177-179). Analyser av EPR (elektronparamagnetisk resonnans) spektra [beskrevet i detalj andre steder, Qiao, F., X-Z. Wang, P.L. Herman, D.P. Weeks og J.H. Golbek (inngitt for publikasjon)] tyder på at [3Fe-4S] sammenhopningen til den N-terminale enden av ferredoksin_{DIC} er redoks-senteret som er aktivt i elektrontransport.

Ferredoksin_{DIC} er typisk for andre bakterielle ferredoksiner ved at det har et lavt isoelektrisk punkt (dvs. en pI på 3 eller noe høyere). Lav pI fører ofte til avvikende migrering av disse proteinene på SDS-polyakrylamidgeler og i løpet av kromatografi ved størrelsesseparering (O'Keefe, et al. (1991) Biochemistry 30:447-455). Når det gjelder ferredoksin_{DIC} var beregninger av molekylmassen basert på migrering av proteinet iløpet av SDS-PAGE omtrent 28000 Dalton. Størrelsesseksklusjonskromatografi indikerte en tilsynelatende molekylmasse for nativt ferredoksin_{DIC} omtrent 28000 Dalton. Denne molekylmassen er betydelig høyere enn den til andre ferredoksiner tilstede i flerkomponentoksygenaser fra bakterier (dvs. 8-13 kDa) (Batie et al., (1992) s. 543-565 i F. Müller (red), Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes, vol. III, CRC Press, Boca Raton; Harayama, et al., (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601).

Reduktase_{DIC}. Komponent III av dicamba O-demetylase (betegnet reduktase_{DIC}) har vært den mest vanskelige rensbare av de tre komponentene. Dette skyldes delvis den tilsynelatende manglende stabiliteten og lave absorpsjonen i lysater av stamme DI-6. Tilstrekkelig protein er derimot blitt rensset for å tilegne en antatt molekylvekt på 45000 Dalton. Dette er lik molekylvekten til omtrent 50000 Dalton oppnådd fra kromatografi ved

størrelsesseparering og tyder på at reduktase_{DIC} eksisterer i nativ form som en monomer. Rensing av reduktasekomponenten er blitt ytterligere vanskeliggjort ved et faktum at kromatografi på en Mono Q kolonne og IEF oppløser rensede reduktasepreparater til to aktiviteter med tilsynelatende bestemte pI verdier. Begge fraksjonene fra Mono Q kolonnen virket i kombinasjon med rensed ferredoksin og oksygenase for å danne dicamba O-demetylaseaktiviteten. Tilstedeværelse i *Sphingomonas* sp. stamme RWI av to lignende flavoproteiner som virker like godt som reduktasekomponenter i trekomponent dibenzofuran 4,4a-dioksygenase er nylig blitt rapportert av Bünz og Cook (Bünz og Cook (1993) J. Bacteriol. 175:6467-6475). Begge reduktasene hadde 44000 Dalton i molekylmasse som er meget lik den til 45000 Dalton reduktase_{DIC}. Multiple komponenter av leghemoglobinreduktase er også blitt observert i lupinrotknoller ved anvendelse av isoelektriske fokuseringsteknikker (Topunov, et al., (1982) Biokhimiya (engelsk utgave) 162:378-379). I dette tilfellet viste IEF fire separate komponenter med NADH-avhengig reduktaseaktivitet. Løsning på spørsmålet om det bare er ren reduktase_{DIC} som eksisterer i to former eller to bestemte reduktaser i stammen DI-6 er basert på utvikling av forbedrede prosedyrer for isolering av større mengder proteiner og/eller kloning og sekvensering av genet(ene) som er involvert.

Dicamba O-demetylasekaraktertrekk. I tillegg til fysiske og biokjemiske egenskaper til de individuelle komponentene angitt ovenfor har analyser av enzymatisk aktivitet vist at O-demetylasesystemet har en sterk affinitet ($K_m = \sim 10 \mu\text{M}$) for dets substrat og en V_{max} på omtrent 100-110 nmol/min/mg. Som ventet for en jordbakterie samlet i en temperert klimatiske sone ble den maksimale enzymatiske aktiviteten observert ved temperaturer nær 30°C. Idet pH optimum for enzymsystemet var i området fra pH 6,5 til pH 7,5 ble aktiviteten målt med et gitt enzympreparat sterkt påvirket av type pH bufferingssystem. Aktivitet i nærvær av trisbuffer var minst 40% lavere enn med fosfatbuffer ved samme pH.

Reaksjonsskjemaet for reaksjon katalysert av de tre komponentene til dicamba O-demetylase er presentert i figur 1. Elektroner fra NADH blir sendt gjennom en kort elektronkjede bestående av reduktase og ferredoksin til den terminale oksygenasen som katalyserer oksidasjon av dicamba. Likheter mellom dicamba O-demetylase og flere flerkomponent dioksygenaser tyder på at dicamba O-demetylase kan potensielt

inneha kryptisk dioksygenaseaktivitet. Det er derimot klart at dette enzymet ikke er i samme klasse som dioksygenase som splitter O₂ og som inkorporer et oksygenatom i hovedsubstratet og det andre i et lite organisk substrat så som α -ketoglutarat (Fukumori og Hausinger (1993) J. Biol. Chem. 268:24311.24317). Kombinasjoner av sterkt rensed reduktase_{DIC}, ferredoksin_{DIC} og oksygenase_{DIC} krever bare O₂, NADH, Mg²⁺, Fe²⁺ og dicamba for aktivitet.

EKSEMPEL 2: Identifikasjon og sekvensering av en klon kodende for oksygenase av dicamba O-demetylase av *Pseudomonas maltophilia* DI-6

Som angitt i eksempel 1 er de første 29 aminosyrene til den N-terminale aminosyresekvensen til oksygenase_{DIC} blitt bestemt å være (residier i paranteser utgjør gjetninger):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys
Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp (Asp eller Thr) (Pro)

[SEQ ID NO:1]

Denne sekvensen muliggjorde konstruksjon av degenererte oligonukleotidprober og ble syntetisert av Operon, Alameda, CA. Spesielt er en blanding av 32 prober som hver hadde lengder på 17 nukleotider og inneholdt alle mulige nukleotidsekvenser som kunne kode for aminosyresekvensen skrevet med uthevet skrift ovenfor ble anvendt. Oligonukleotidprobene ble 3'-endemerket med dioksigenin (DIG) ifølge instruksjonene gitt av Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.

DIG-merkede prober ble først hybridisert til *P. maltophilia* DI-6 genomisk DNA som var blitt spaltet med forskjellige kombinasjoner av restriksjonsenzymer, oppløst på en 1% agarosegel og blottet på et nylonfilter. Basert på disse resultatene ble et størrelsesfraksjonert genomisk bibliotek konstruert i pBluescript II KS+ vektoren og transformert inn i *Escherichia coli* DH α kompetente celler. Det genomiske biblioteket

inneholdt 1-2 kb Xho I/Hind III fragmenter. DIG-merkede oligonukleotidprober ble hybridisert til en rekke bakterielle kolonier strøket ut på nylonfiltere. Plasmid DNA ble isolert fra positive kolonier og subklonet. Begge tråder av hver subklon ble sekvensert ved DNA sekvenseringsutstyret ved University of Nebraska-Lincoln. Hybridisering og
 5 deteksjon av DIG-merkede prober ble utført ifølge protokoller fra Boehringer Mannheim.

En genomisk DNA klon kodende for oksygenase_{DIC} ble identifisert.

Nukleotidsekvensen og avledet aminosyresekvens til total oksygenase_{DIC} er gitt i sekvenslisten nedenfor som henholdsvis SEQ ID NO:3 og SEQ ID NO:4.

En sammenligning av aminosyresekvensen avledet fra nukleotidsekvensen til
 10 denne klonen med den til proteinsekvensene i Swiss Protein Database viste homologi med andre oksygenaser. Homologi ble bestemt ved anvendelse av FASTA programmet til GCG programvaren. Sterkest homologi var med oksygenasekomponenten til vanillat-demetylase fra *Pseudomonas* sp., ATCC stamme 19151) som viste 3,8% identitet.

EKSEMPEL 3: Identifikasjon og sekvensering av en klon kodende for ferredoksin til dicamba O-demetylase av *Pseudomonas maltophilia* DI-6

Som angitt i eksempel 1 ble de første 20 aminosyrene til den N-terminale aminosyresekvensen til ferredoksin_{DIC} bestemt å være:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met Asp Xaa Val Glu Val
 Xaa

[SEQ ID NO:2]

25 Denne sekvensen muliggjorde konstruksjon av degenererte oligonukleotidprober. En blanding av 16 prober hver med 17 nukleotider i lengde og inneholdende alle mulige nukleotidsekvenser som kunne kode for aminosyresekvensen angitt ovenfor i uthevet skrift (ved at Xaa er Cys), ble anvendt.

30 DIC-merkede prober ble anvendt for å screene et genomisk bibliotek som beskrevet i eksempel 2 med unntakelse av at det genomiske biblioteket inneholdt 2-3 kb

Xho I/Eco RI fragmenter. Nukleotidsekvensen til ferredoksin_{DIC} klonen og avledet aminosyresekvens til hele ferredoksin_{DIC} er gitt som henholdsvis SEQ ID NO:5 og SEQ ID NO:6 i sekvenslisten nedenfor.

En sammenligning av aminosyresekvensen avledet fra nukleotidsekvensen til denne klonen med en til proteinsekvensene i Swiss Protein Database ble dannet ved anvendelse av FASTA programmet til GCG programvaren. Denne sammenligningen viser der homologi med andre ferredoksiner, inkludert ferredoksiner fra *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azobacter vinelandii* og *Rhodospirillum rubrum* (se diskusjon i eksempel 1 ovenfor).

SEKVENSLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Weeks, Donald P.
Wang, Xiao-Zhuo
Herman, Patricia L.

(ii) TITLE OF INVENTION: "METHODS AND MATERIALS FOR MAKING AND
USING TRANSGENIC DICAMBA-DEGRADING ORGANISMS"

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 6

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Sheridan Ross P.C.
(B) STREET: 1700 Lincoln St., Suite 3500
(C) CITY: Denver
(D) STATE: Colorado
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 80203

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 60/042,666
(B) FILING DATE: 04-APR-1997

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 60/042,941
(B) FILING DATE: 04-APR-1997

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Crook, Wannell M.
(B) REGISTRATION NUMBER: 31,071
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 3553-18-PCT

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (303) 863-9700
(B) TELEFAX: (303) 863-0223

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Region
 (B) LOCATION: 28
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Asp or Thr"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Region
 (B) LOCATION: 29
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Pro"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Xaa Xaa
 20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Region
 (B) LOCATION: 8
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Region

(B) LOCATION: 11

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"

5 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Region

(B) LOCATION: 16

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"

10 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Region

(B) LOCATION: 20

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"

15

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met Asp Xaa
 1 5 10 15

20

Val Glu Val Xaa
 20

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1020 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

30 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

35 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..1020

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

40

ATG ACC TTC GTC CGC AAT GCC TGG TAT GTG GCG GCG CTG CCC GAG GAA 48
 Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu
 1 5 10 15

45

CTG TCC GAA AAG CCG CTC GGC CGG ACG ATT CTC GAC ACA CCG CTC GCG 96
 Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala
 20 25 30

	CTC TAC CGC CAG CCC GAC GGT GTG GTC GCG GCG CTG CTC GAC ATC TGT	144
	Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys	
	35 40 45	
5	CCG CAC CGC TTC GCG CCG CTG AGC GAC GGC ATC CTC GTC AAC GGC CAT	192
	Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His	
	50 55 60	
10	CTC CAA TGC CCC TAT CAC GGG CTG GAA TTC GAT GGC GGC GGG CAG TGC	240
	Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys	
	65 70 75 80	
	GTC CAT AAC CCG CAC GGC AAT GGC GCC CGC CCG GCT TCG CTC AAC GTC	288
15	Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val	
	85 90 95	
	CGC TCC TTC CCG GTG GTG GAG CGC GAC GCG CTG ATC TGG ATC TGG CCC	336
	Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro	
20	100 105 110	
	GGC GAT CCG GCG CTG GCC GAT CCT GGG GCG ATC CCC GAC TTC GGC TGC	384
	Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys	
	115 120 125	
25	CGC GTC GAT CCC GCC TAT CGG ACC GTC GGC GGC TAT GGG CAT GTC GAC	432
	Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp	
	130 135 140	
30	TGC AAC TAC AAG CTG CTG GTC GAC AAC CTG ATG GAC CTC GGC CAC GCC	480
	Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala	
	145 150 155 160	
	CAA TAT GTC CAT CGC GCC AAC GCC CAG ACC GAC GCC TTC GAC CGG CTG	528
35	Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu	
	165 170 175	
	GAG CGC GAG GTG ATC GTC GGC GAC GGT GAG ATA CAG GCG CTG ATG AAG	576
	Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys	
40	180 185 190	
	ATT CCC GGC GGC ACG CCG AGC GTG CTG ATG GCC AAG TTC CTG CGC GGC	624
	Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly	
	195 200 205	
45	GCC AAT ACC CCC GTC GAC GCT TGG AAC GAC ATC CGC TGG AAC AAG GTG	672
	Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val	
	210 215 220	
50	AGC GCG ATG CTC AAC TTC ATC GCG GTG GCG CCG GAA GGC ACC CCG AAG	720
	Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys	
	225 230 235 240	
	GAG CAG AGC ATC CAC TCG CGC GGT ACC CAT ATC CTG ACC CCC GAG ACG	768
55	Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr	
	245 250 255	

GAG GCG AGC TGC CAT TAT TTC TTC GGC TCC TCG CGC AAT TTC GGC ATC 816
 Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile
 260 265 270

GAC GAT CCG GAG ATG GAC GGC GTG CTG CGC AGC TGG CAG GCT CAG GCG 864
 Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala
 275 280 285

CTG GTC AAG GAG GAC AAG GTC GTC GTC GAG GCG ATC GAG CGC CGC CGC 912
 Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg
 290 295 300

GCC TAT GTC GAG GCG AAT GGC ATC CGC CCG GCG ATG CTG TCG TGC GAC 960
 Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp
 305 310 315 320

GAA GCC GCA GTC CGT GTC AGC CGC GAG ATC GAG AAG CTT GAG CAG CTC 1008
 Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu
 325 330 335

GAA GCC GCC TGA 1020
 Glu Ala Ala *
 340

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 340 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala
 20 25 30

Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys
 35 40 45

Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His
 50 55 60

Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys
65 70 75 80

Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val
5 85 90 95

Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro
100 105 110

10 Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys
115 120 125

Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp
130 135 140

15 Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala
145 150 155 160

20 Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu
165 170 175

Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys
180 185 190

25 Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly
195 200 205

Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val
210 215 220

30 Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys
225 230 235 240

35 Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr
245 250 255

Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile
260 265 270

40 Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala
275 280 285

Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg
290 295 300

45 Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp
305 310 315 320

Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu
 325 330 335

Glu Ala Ala *

5 340

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 339 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..339

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

ATG ACC TAT GTC GTC ACC GAC GCC TGC ATC AAG TGC AAG TAC ATG GAC 48

Met Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Cys Ile Lys Cys Lys Tyr Met Asp

1 5 10 15

TGC GTG GAA GTC TGC CCT GTG GAC TGC TTC TAC GAA GGC GAG AAC ATG 96

Cys Val Glu Val Cys Pro Val Asp Cys Phe Tyr Glu Gly Glu Asn Met

20 25 30

CTC GTC ATC AAT CCC AGT GAA TGC ATC GAC TGC GGC GTC TGC GAA CCG 144

Leu Val Ile Asn Pro Ser Glu Cys Ile Asp Cys Gly Val Cys Glu Pro

35 40 45

GAA TGC CCA GCC GAA GCC ATC CTT CCC GAC ACC GAA AGC GGT CTC GAG 192

Glu Cys Pro Ala Glu Ala Ile Leu Pro Asp Thr Glu Ser Gly Leu Glu

50 55 60

CAG TGG ATG GAA CTG AAC ACG AAG TAC TCG GCC GAG TGG CCG AAT CTC 240

Gln Trp Met Glu Leu Asn Thr Lys Tyr Ser Ala Glu Trp Pro Asn Leu

65 70 75 80

ACG TCC AAG AAA GAT TCG CCG GAA GAT GCC GAC GAG TAC AAG GGC GTG 288

Thr Ser Lys Lys Asp Ser Pro Glu Asp Ala Asp Glu Tyr Lys Gly Val

85 90 95

50

GAA GGC AAG TTC GAG AAG TTC TTC TCG CCC GAG CCC GGC GAG GGC GAC 336
 Glu Gly Lys Phe Glu Lys Phe Phe Ser Pro Glu Pro Gly Glu Gly Asp
 100 105 110

5 TGA 339
 *

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 113 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Met Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Cys Ile Lys Cys Lys Tyr Met Asp
 1 5 10 15

Cys Val Glu Val Cys Pro Val Asp Cys Phe Tyr Glu Gly Glu Asn Met
 20 25 30

Leu Val Ile Asn Pro Ser Glu Cys Ile Asp Cys Gly Val Cys Glu Pro
 35 40 45

Glu Cys Pro Ala Glu Ala Ile Leu Pro Asp Thr Glu Ser Gly Leu Glu
 50 55 60

Gln Trp Met Glu Leu Asn Thr Lys Tyr Ser Ala Glu Trp Pro Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Ser Lys Lys Asp Ser Pro Glu Asp Ala Asp Glu Tyr Lys Gly Val
 85 90 95

Glu Gly Lys Phe Glu Lys Phe Phe Ser Pro Glu Pro Gly Glu Gly Asp
 100 105 110

*

Patentkrav

1. Isolert DNA molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter en DNA sekvens kodende for en dicamba-degraderende oksygenase, hvori nevnte dicamba-degraderende oksygenase er valgt fra gruppen bestående av:

- a) en dicamba-degraderende oksygenase med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4;
- b) et fragment av SEKV.ID.NR:4 som har et jern-svovel kluster og katalyserer oksydasjon av dicamba til 3,6-diklorsalisylsyre (DCSA); og
- c) en dicamba-degraderende oksygenase med en aminosyresekvens som er minst 85% identisk med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4, som omfatter et jern-svovel kluster og som katalyserer oksydasjonen av dicamba til 3,6-diklorsalisylsyre (DCSA).

2. Isolert DNA molekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte dicamba-degraderende oksygenase er valgt fra gruppen bestående av:

- a) en dicamba-degraderende oksygenase med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4; og
- b) et fragment av SEKV.ID.NR:4 som har et jern-svovel kluster og katalyserer oksydasjonen av dicamba til 3,6-diklorsalisylsyre (DCSA).

3. DNA molekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter en DNA sekvens kodende en dicamba-degraderende oksygenase med aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4.

4. DNA molekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEKV.ID.NR:3.

5. DNA konstruksjon, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter et DNA molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 operativt koblet til ekspresjonskontroll sekvensene.

5 6. DNA konstruksjon ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er en vektor.

7. Renset dicamba-degraderende oksygenase, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den har aminosyresekvensen ifølge SEKV.ID.NR:4.

10 8. Dicamba-degraderende oksygenase ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den dicamba-degraderende oksygenasen er rekombinant produsert.

9. Transgen veriscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er transformert med DNA kodende en dicamba-degraderende oksygenase ifølge et hvilket som helst av kravene 1
15 til 4 operabelt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser.

10. Transgen vertscelle ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er en plantecelle.

20 11. Transgen vertcelle ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er en mikroorganisme.

12. Transgen plante eller del av en plante, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter enda flere celler omfattende DNA kodende en dicamba-degraderende
25 oksygenase ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 operabelt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser.

13. Transgen plante eller plantedel ifølge krav 12,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t planten er en bredbladet plante som er tolerant overfor
30 dicamba som et resultat av ekspresjonen av dicamba-degraderende oksygenase.

14. Transgen plante eller plantedel ifølge krav 12, karakterisert ved at planten er valgt fra gruppen bestående av bønner, soyabønner, bomull, erter, poteter, solsikker, tomater, tobakk, frukttrær, ornamentale planter, ornamentale trær, mais, sorghum, småkorn, sukkerroe, asparges og gress.

15. Transgen plante eller plantedel ifølge krav 12, karakterisert ved at planten er en soyabønneplante.

16. Fremgangsmåte for kontrollering av ugress på en mark inneholdende en transgen plante ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 15, karakterisert ved at den omfatter påføring av en mengde dicamba på marken inneholdende en transgen plante ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 15 som effektivt kontrollerer ugresset på marken.

17. Fremgangsmåte for dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba, karakterisert ved at den omfatter påføring av en mengde av en transgen mikroorganisme ifølge krav 11 på materialet, idet mengden effektivt degraderer minst noe av dicamba i materialet.

18. Fremgangsmåte for dekontaminering av et materiale inneholdende dicamba, karakterisert ved at det omfatter påføring av en mengde av rekombinant dicamba-degraderende oksygenase kodende for DNA molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, til materialet, idet mengden er effektiv til å degradere minst noe av dicamba i materialet.

19. Fremgangsmåte for selektering av transformerte planteceller, karakterisert ved at den omfatter:

- a) tilveiebringning av en populasjon av planteceller;
- b) transformering av minst noen av plantecellene i populasjonen av plantecellene med en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6; og

c) la den resulterende populasjon av planteceller vokse i et kulturmedium inneholdende dicamba i en konsentrasjon valgt slik at transformerte planteceller vil vokse og at ikke-transformerte planteceller ikke vil vokse.

5 20. Fremgangsmåte for selektering av transformerte planter, karakterisert ved at den omfatter:

a) tilveiebringning av en populasjon av planter antatt å omfatte en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6; og

10 b) påføring av en mengde dicamba til plantene selektert slik at transformerte planter vil vokse, og veksten av uttransformerte planter vil bli hemmet.

21. Fremgangsmåte for selektering, eller screening for, transformerte vertsceller, intakte organismer og deler av organismer, karakterisert ved at den omfatter:

15 a) tilveiebringning av en populasjon av vertsceller, intakte organismer eller deler av organismer antatt å omfatte en DNA konstruksjon ifølge krav 5 eller krav 6;

20 b) kontakting av vertscellene, intakte organismer eller deler av organismene med dicamba; og

c) bestemme tilstedeværelse eller nivå av fluoresens forårsaket av 3,6-diklorsalisylsyre, idet 3,6-diklorsalisylsyren blir dannet i transformerte vertsceller, intakte organismer eller deler av organismer som et resultat av degradering av dicamba.

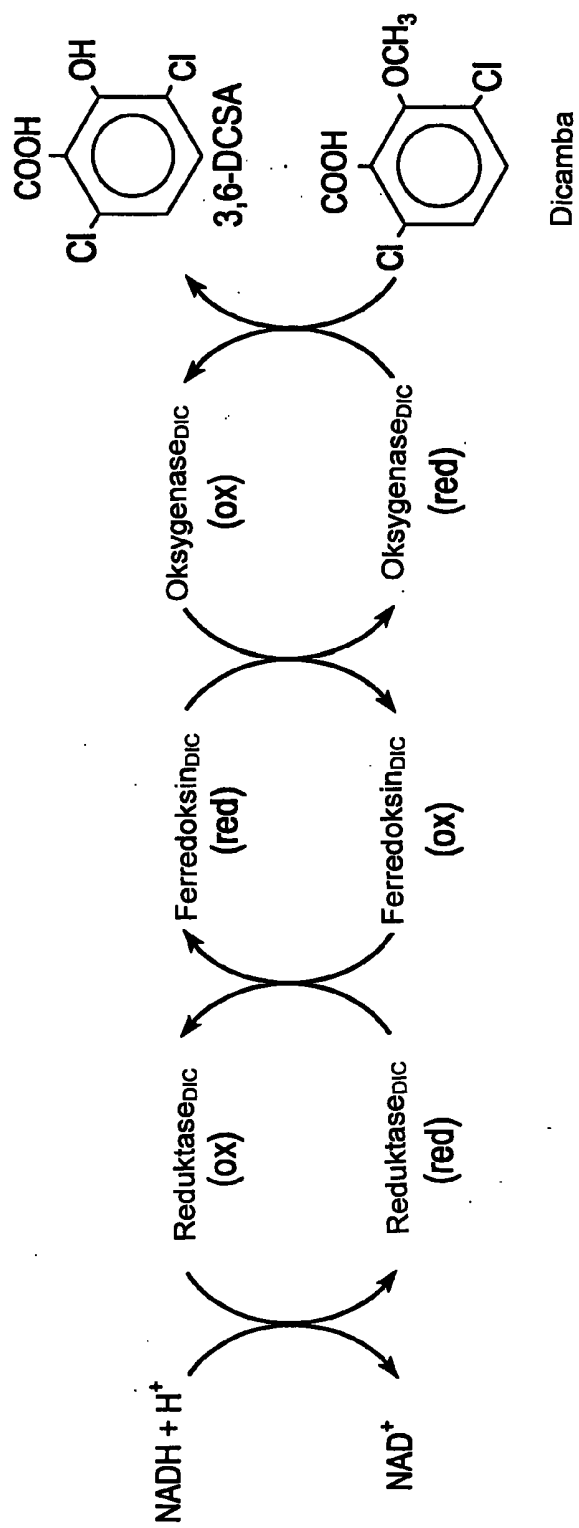


FIGURE 1