



F1000114481B



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 114481 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

29.10.2004

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/65, 1/15, 1/19, 1/21

(21) Patentihakemus - Patentansökning

943485

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

22.07.1994

(24) Alkupäivä - Löpdag

22.07.1994

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

24.01.1995

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

23.07.1993 EP 93202195 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •DSM IP Assets B.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Selten, Gerardus Cornelis Maria, Sterrenweg 81, 2651 HZ Berkel en Rodenrijs, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Swinkels, Bart Willem, Schutterstraat 5, 2611 MX Delft, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Van Gorcom, Robertus Franciscus Maria, Liberiastraat 76, 2622 DE Delft, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Valintamerkkigeenittömät rihmasienikannat, menetelmä niiden valmistamiseksi, ja näiden kantojen käyttö
Selektionsmarkörgefnria trådformiga svampstammar, förfarande för deras framställning, och användning av dessa
stammar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO 93/01283 A1.

Yamashiro, C.T. et al., Molecular & General Genetics, 1992, vol. 236, nro 1, p. 121-124, Beri, R.K. et al., Current Genetics, 1987, vol. 11, p. 639-641

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee valintamerkkigeenitöntä systeemiä, jota voidaan käyttää geneettisten modifikaatioiden aikaansaamiseksi bakteereihin, hiivoihin ja sieniin. Systeemiä voidaan käyttää haluttujen geenien tai DNA-fragmenttien viemiseksi esitetyn isäntälajin genomiin tai niiden poistamiseksi siitä, jättämättä jäljelle ei-toivottua DNA:ta, so. valintamerkkieria, jota käytetään transformanttien valikointiin, tai muuta DNA:ta, jota käytetään kloonauksessa. Tällä tavalla on kehitetty kantoja, jotka sisältävät vain haluttuja geenejä vietyinä haluttuihin kromosomaalisiin kohtiin. Vastaavalla tavalla haluttuja DNA-fragmentteja on poistettu tai korvattu halutuissa kohdissa.

Uppfinningen avser ett selektionsmarkörfritt system, som kan användas för att införa genetiska modifikationer i bakterier, jäst och svampar. Systemet kan användas för att införa i genomen av den ifrågavarande värdarten eller avlägsna därur önskvärda gener eller DNA-fragment utan att lämna kvar ej-önskvärt DNA, dvs. selektionsmarkören, som används för selektion av transformanter eller annan DNA, som används vid kloning. På detta sätt har stammar utvecklats, som endast innefattar önskvärda gener införda i önskvärda kromosomala lägen. På motsvarande sätt har DNA-fragment avlägsnats eller ersatts vid önskvärda lägen.

Valintamerkkigeenittömät rihmasienikannat, menetelmä niiden valmistamiseksi ja näiden kantojen käyttö - Selektionsmarkörgefnria trådformiga svampstammar, förfarande för deras framställning och användning av dessa stammar

5

Tämä keksintö koskee valintamerkkigeenistä vapaita rihmasienikantoja, menetelmää näiden kantojen aikaansaamiseksi ja näiden kantojen käyttöä. Tämän keksinnön mukaista 10 menetelmää käytetään myös rihmasienikantojen paranteluun.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttöä koskeva yhteiskunnallinen kiinnostus on kasvamassa. Yksi lupaavista yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttösovellutuksista koskee kantojen 15 parantelua. Fermentatiivisten tuotantoprosessien varhaisajoista lähtien tuotantoon käytettävien kantojen tuottavuuden parantamiseen on ollut tarvetta.

20 Klassiset kantojen parannusohjelmat teollisuuden käytössä olevien mikro-organismien osalta ovat perustuneet pääasiallisesti sattumanvaraisiin mutatointeihin, joita on seurannut valikointi. Mutatointimenetelmiä on kuvailtu laajasti; niitä ovat UV-valon, NTG:n tai EMS:n käyttö 25 mutageeneina. Näitä menetelmiä on kuvailtu laajasti esimerkiksi julkaisussa: "Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vol." Volyymi I, Microbial fundamentals, Luku 5b, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Saksa.

30 Valintamenetelmät on kehitetty yleensä sopivan määrityksen ympärille ja niiden tärkein merkitys koskee villityypin kantojen ja mutanttikantojen välistä erottamista.

On käynyt ilmi, että näiden perinteisten menetelmien 35 käyttömahdollisuudet ovat rajoitetut kantojen parantamista varten. Kantojen parantelun perättäiset jaksot vähentävät haluttujen tuotteiden saantoja. Tämä johtuu ainakin osaksi käytettyjen mutatoointimenetelmien sattumanvaraisesta luonteesta. Paitsi haluttuja mutaatioita, nämä me-

netelmät synnyttävät myös mutaatioita, jotka ovat epäedullisia, ja jotka voivat vaikuttaa negatiivisesti kantojen muihin ominaisuuksiin.

5 Näiden haittojen valossa voidaan ymmärtää, että yhdistelmä-DNA-menetelmien käyttämistä tervehdittiin huomattavana parannuksena. Kantojenparannusohjelmissa käytetyt yhdistelmä-DNA-menetelmät tähtäävät yleensä haluttujen geenituotteiden lisääntyneeseen ilmentymiseen.

10

Geenituotteet voivat olla proteiineja, jotka itsessään ovat kiinnostuksen kohteina, mutta toisaalta on myös mahdollista, että kooditetut geenituotteet toimivat säätelyproteiineina muiden tuotteiden synteessä.

15

Kantoja voidaan parantaa toimittamalla moninkertainen määrä kopioita haluttua proteiinia koodittavista geneistä määrättyihin isäntäorganismeihin. On kuitenkin myös mahdollista lisätä ilmentymistasoja toimittamalla säätelygeenejä.

20

Geenit viedään soluun käyttäen vektoreita, jotka toimivat kuljettimina geenien toimittamiseksi. Sellaisia vektoreita voivat olla plasmidit, kosmidit tai faagit. Vektorin avulla voi olla mahdollista ilmentää geenejä, jossa tapauksessa vektori on yleensä itsenäisesti replikoituva. Vektori voi kuitenkin myös ainoastaan kyetä integraatioon. Toinen vektorille tunnuomainen ominaisuus on se, että kun ekspressiotuotetta ei voida valikoida helposti, perustuen muuttuneisiin fenotyypisiin ominaisuuksiin, vektori on varustettu markkerilla, joka voidaan helposti seuloa.

30

Vektoreita ei ole eristetty kaikista tunnetuista mikroorganismeista joko siksi, että organismeissa ei ole voitu havaita yhtään vektoria, tai koska muista organismeista

35

saatavia vektoreita on voitu käyttää muutoksitta tai vähäisin muutoksin. Sama pätee valintamerkkigeeneihin.

5 Erityisten merkkigeenien laajalle levinnyt käyttö ja myöhempi leviäminen on viime aikoina muodostunut kiistanalaiseksi. Tämä johtuu erityisesti siitä havainnosta, että antibioottien ja antibioottivalintamarkkereiden käyttö saa aikaan antibiooteille vastustuskykyisiksi tul-
10 leiden kantojen ei-toivotun leviämisen. Tämän takia on välttämätöntä kehittää jatkuvasti uusia yhä tehokkaampia antibiootteja.

Ei sen vuoksi ole yllättävää, että suurimittaisessa tuotannossa pyritään yleisesti käyttämään yhdistelmämicro-
15 organismeja, jotka eivät sisällä antibioottiresistenssi-geenejä, ja vielä yleisemmin sisältävät niin vähän kuin mahdollista vierasta DNA:ta.

Transformoitu mikro-organismi sisältäisi edullisesti vain
20 halutun geenin (geenit), sen fragmentin (fragmentteja) tai modifikaatioita geenissä ja niin vähän kuin mahdollista tai ei lainkaan jäänteitä kloonaukseen käytetystä DNA:sta.

25 Tässä keksinnössä tuodaan esille valintamerkkigeeni, joka voidaan edelleen helposti poistaa yhdistelmärihmasienestä. Mainitun merkkigeenin deletio perustuu valitsevaan valikointiin.

30 Markkeria käytetään niinkin vaihtelevissa ryhmissä kuin bakteereissa, rihmasienissä ja hiivoissa.

Tässä yhteydessä käytettyjen valintamarkkereiden edullinen aktiivisuus perustuu seuraavaan kaksivaiheeseen toimintamalliin:
35

a) geeni integroidaan isäntäorganismien genomiin ja yhdistelmäsolut valikoidaan,

5 b) transformoituja soluja kasvatetaan substraatilla, jonka merkigeenin koodittama aktiivisuus muuttaa tuotteeksi, joka on solulle letaali.

Valikoidut solut ovat yhdistelmäsoluja ja niistä puuttuu valintamerkkigeeni.

10

Yleisesti ottaen tässä keksinnössä tuodaan esiin rihmasienisoluja, joiden genomissa on modifikaatio, jolle on tunnusomaista se, että muutos toimitetaan käyttäen amdS-geeniä tai siitä saatua cDNA:ta.

15

Esimerkki valintamerkkigeenistä, jota voidaan käyttää tällä tavalla, on asetamidaasigeeni. Tämä geeni on edullisesti saatavissa rihmasienistä, edullisemmin Aspergillus luksista, edullisimmin Aspergillus nidulansista.

20

Keksinnössä esitetään lisäksi haluttujen heterologisten tai homologisten geenien tai DNA-osien toimittaminen, poistaminen tai modifiointi valituissa rihmasienisännissä käyttäen asetamidaasi (amdS)-geeniä markkerina.

25 amdS-geeni poistetaan myöhemmin. amdS-geeni ja halutut geenit toimitetaan edullisesti paikkaspesifisesti.

Keksinnön mukaisesti esitetään vektori, joka sisältää:

30 a) halutun DNA-fragmentin, joka on määrää toimittaa rihmasienen genomiin,

b) valinnaisesti DNA-sekvenssin, joka mahdollistaa vektorin integroitumisen (paikkaspesifisesti) isäntäkannan
35 genomiin,

c) asetamidaasia koodittavan geenin (esim. amdS-geenin A. nidulansista) DNA-toistojaksojen välissä.

5 Keksinnössä esitetään lisäksi mainitulla vektorilla transformoituja rihmasieniä.

Keksinnössä esitetään lisäksi valintamerkkigeenivapaita yhdistelmärihmasieniä.

10 Keksinnössä esitetään erityisesti rihmasieniä, jotka sisältävät paikkaspesifisesti toimitettuja geenejä, joissa ei enää ole läsnä vierasta lisä-DNA:ta. Menetelmä sopii sen vuoksi myös isäntägenomin toistuville modifikaatiolle, esim. moninkertaisten geenikopioiden perättäiseen
15 toimittamiseen ennalta määrättyihin lokuksiin.

Keksintö koskee menetelmää valintamerkkigeenivapaiden rihmasienikantojen aikaansaamiseksi, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

20

a) halutun DNA-fragmentin ja valintamarkkerin integrointi kannan genomiin,

b) rekombinanttien valikointi,

25

c) valintamarkkerin poistaminen käyttäen edullisesti sisäistä rekombinaatiota valintamarkkeria vierustavien toistojaksojen välillä,

30

d) vasta-valinta, joka perustuu valintamarkkerin puuttumiseen.

Vaikka tämä on edullinen menetelmä valintamerkkigeenivapaan rihmasienikannan aikaansaamiseksi, keksintö koskee
35 myös tämän menetelmän modifikaatioita, esimerkiksi: Haluttu DNA-fragmentti ja valintamarkkeri voivat olla läsnä kahdessa eri DNA-molekyylissä, jotka yhteistransformoi-

daan. Valintamarkkeri ei välttämättä integroidu kannan genomiin vaan se voi olla läsnä episomaalisessa DNA-molekyylissä, joka voidaan parantaa (poistaa).

- 5 Tämän keksinnön mukaisesti kuvaillaan edelleen, että tämä merkkigeeni voidaan poistaa transformoitujen rihmasienien genomista jättämättä jäänteitä, so. kloonaukseen käytettyä DNA:ta.
- 10 Tässä keksinnössä tuodaan esille Aspergilluksen amdS-geenin käyttäminen merkkigeeninä.

Keksinnössä esitetään myös amdS-geenin käyttö halutun geenin poistamiseksi rihmasienen kromosomista.

- 15 Erityissuoritusmuodoissa käytetään seuraavien ryhmien kantoja: Aspergillus, Trichoderma ja Penicillium.

- Tämän keksinnön mukainen menetelmä koskee rihmasienikantoja, jotka sisältävät genomisia modifikaatioita, jotka on saatu aikaan toistamalla menettely samalla vektorilla tai muilla vektoreilla.
- 20

Kuvioissa käytetyt lyhenteet:

Restriktioentsyymit ja restriktiokohdat:

- 25 A = ApaI; Ba = BamHI; B = BglII; Bs = BssHII; E = EcoRI; H = HindIII; K = KpnI; Nd = NdeI; N = NotI; Ps = PstI; P = PvuII; Sa = SalI; Sc = ScaI; S = SmaI; Sn = SnaBI; Spe = SpeI; Sp = SphI; Ss = SstII; Xb = XbaI; X = XhoI.

- 30 Muita:

T. = LAC4-terminaattorisekvenssi

Kuvio 1: esittää plasmidin pamdS-1 restriktiokarttaa.

Tämä plasmidi sisältää A. nidulansin amdS-geenin cDNA:n.

Kuvio 2: esittää kaavamaisesti glaA-lokuksen merkki-
geenivapaan deleetion A. nigeristä käytettäessä geenin
vaihtovektoria pGBDEL4L. Olennainen osa geenin vaihtovek-
torista pGBDEL4L sisältää amdS-geenin gpdA-promoottorin
5 ohjauksessa, kloonattuna toistojaksojen väliin (glaA-gee-
nin 3'-ei-koodittava alue).

Kuviot 3-9: esittävät kaavamaisesti pGBDEL4L:n konstru-
ointireittiä, jota esitellään edelleen esimerkissä 1.
10

Kuvio 10:

- A. KpnI-pilkontatuotteet pGBDEL4L-transformanteista #41
(kaista 1), #24 (kaista 2), #23 (kaista 3) ja #19 (kaista
4) ja isäntäkannasta A. niger CBS 513.88 (kaista 5), ja
15 BamHI-pilkontatuotteet pGBDEL4L-transformanteista #41
(kaista 6), #24 (kaista 7), #23 (kaista 8), #19 (kaista
9) ja isäntäkannasta A. niger CBS 513.88 (kaista 10),
tutkittuina ³²P-leimatun glaA-promoottorifragmentin ja
ksylanaasikoettimen kanssa.
- 20 B. KpnI-pilkontatuotteet GBA-102:sta (kaista 1) ja GBA-
102-kannoista fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen: GBA-107
(kaista 2) ja GBA-108 (kaista 3), ja BamHI-pilkontatuot-
teet GBA-102:sta (kaista 4) ja GBA-102-kannoista fluo-
riasetamidivalikoinnin jälkeen: GBA-107 (kaista 5) ja
25 GBA-108 (kaista 6), tutkittuina ³²P-leimatun glaA-promoot-
torifragmentin ja ksylanaasikoettimen kanssa.

Kuvio 11:

- A. Kaavamainen esitys villityypin glaA-lokuksen BamHI- ja
30 KpnI-fragmenttien pituuksista Aspergillus nigerissä CBS
513.88.
- B. Kaavamainen esitys typistetyn glaA-lokuksen BamHI- ja
KpnI-fragmenttien pituuksista transformantissa #19 (= GBA-102).
- 35 C. Kaaviomainen esitys typistetyn glaA-lokuksen BamHI- ja
KpnI-fragmenttien pituuksista GBA-102-transformanteissa
amdS-geenin poistamisen jälkeen (=GBA-107 ja GBA-108).

Kuvio 12:

A. esittää kaavamaisesti glaA-geenin integroitumisen A. niger GBA-107:n typistetyyn glaA-lokukseen 3'-ei-koodittavaan alueeseen.

- 5 B. esittää sisäisen rekombinaation tuloksen 3'glaA-tois-
tojaksojen välillä, jotka ovat amdS-geenin vieressä.

Kuviot 13-24: esittävät kaavamaisesti integraatiovektorin pGBGLA30 konstruointireittiä, jota esitellään edelleen
10 esimerkissä 2.

Kuvio 25: BglII-pilkontatuotteet pGBGLA30-transformanteista #107-9 (kaista 1), #107-7 (kaista 2) ja #107-5 (kaista 3), isäntäkannasta A. niger GBA-107 (kaista 4) ja
15 parentaalikannasta A. niger CBS 513.88 (kaista 5), ja
KpnI-pilkontatuotteet pGBGLA30-transformanteista #107-9 (kaista 6), #107-7 (kaista 7) ja #107-5 (kaista 8), isäntäkannasta A. niger GBA-107 (kaista 9) ja parentaalikannasta A. niger CBS 513.88 (kaista 10), tutkittuina ³²P-leimatun glaA-fragmentin kanssa.
20

Kuvio 26:

A: Kaavamainen esitys Aspergillus niger CBS 513.88:n vil-
lityypin glaA-lokukseen KpnI- ja BglII-fragmenttien pi-
25 tuuksista.

B. Kaavamainen esitys Aspergillus niger GBA-107:n typis-
tetyyn glaA-lokukseen KpnI- ja BglII-fragmenttien pi-
tuuksista.

C: Kaavamainen esitys typistetyyn glaA-lokukseen KpnI- ja
30 BglII-fragmenttien pituuksista, yhden pGBGLA30-kopion ol-
lessa integroitunut glaA:n 3'-ei-koodittavaan alueeseen
kuten transformanteissa #107-5 (= GBA-119) ja #107-9 (= GBA-122).

D: Kaavamainen esitys typistetyyn glaA-lokukseen KpnI- ja
35 BglII-fragmenttien pituuksista GBA-119-transformantissa
ja GBA-122-transformantissa amdS-geenin poistamisen jäl-
keen (= GBA-120, GBA-121, GBA-123 ja GBA-124).

Kuvio 27:

A: BglIII-pilkontatuotteet A. niger CBS 513.88 -kannasta (kaista 10), GBA-107-kannasta (kaista 9), GBA-119-kannasta (kaista 8) ja GBA-119-kannoista fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen: #AG5-7 (= GBA-120) (kaista 5), #AG5-5 (= GBA-121) (kaista 6) ja #AG5-6 (kaista 7); GBA-122-kannasta (kaista 4) ja GBA-122-kannasta fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen: #AG-9-1 (= GBA-123) (kaista 3), #AG-9-2 (kaista 2) ja #AG9-4 (= GBA-124) (kaista 1), tutkittuina ³²P-leimatun ei-koodittavan 3' glaA-fragmentin kanssa.

B: KpnI-pilkontatuotteet A. niger CBS 513.88 -kannasta (kaista 10), GBA-107-kannasta (kaista 9), GBA-119-kannasta (kaista 8) ja GBA-119-kannasta fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen: #AG5-7 (= GBA-120) (kaista 5), #AG5-5 (= GBA-121) (kaista 6) ja #AG5-6 (kaista 7); GBA-122-kannasta (kaista 4) ja GBA-122-kannasta fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen: #AG9-1 (= GBA-123) (kaista 3), #AG9-2 (kaista 2) ja #AG9-4 (= GBA-124) (kaista 1), tutkittuina ³²P-leimatun ei-koodittavan 3' glaA-fragmentin kanssa.

20

Kuvio 28: esittää kaavamaisesti pGBGLA50:n konstruointireitin.

Kuviot 29-33: esittävät kaavamaisesti pGBGLA53:n konstruointireitin.

25

Kuvio 34: esittää kaavamaisesti pGBamdS1:n konstruoinnin.

Kuvio 35: esittää kaavamaisesti pGBamdS2:n konstruoinnin.

30

Kuvio 36: esittää kaavamaisesti pGBamdS3:n konstruoinnin.

Kuvio 37: esittää kaavamaisesti pGBamdS5:n konstruoinnin.

Kuvio 38: esittää kaavamaisesti pGBamdS6:n konstruoinnin.

35

Kuvio 39: esittää kaavamaisesti pPTLAC4:n konstruoinnin, jota käytettiin pGBamdS6:n konstruoinnissa.

Kuvio 40: esittää kaavamaisesti pGBamdS7:n konstruoinnin.

5

Kuvio 41: HindIII-pilkontatuotteet K. lactis CBS 683:sta (kaista 1), K. lactis CBS 2360:stä (kaista 2), K. lactis CBS 683/pGBamdS1 -transformantista KAM-1 (kaista 3), K. lactis CBS 2360/pGBamdS1 -transformantista KAM-2 (kaista 4) ja KAM-1-kannoista fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen (kaista 5,6), tutkittuina ³²P-leimatun LAC4-promoottorifragmentin kanssa.

10

Kuvio 42: A: BamHI-pilkontatuotteet K. lactis CBS 683/pGBamdS3 -transformanteista (kaistat 1-3), tutkittuina ³²P-leimatun LAC4-terminaattorifragmentin kanssa.

15

B: BamHI-pilkontatuotteet K. lactis CBS 683/pGBamdS5 -transformanteista (kaistat 1-5) ja isäntäkannasta K. lactis CBS 683 (kaista 6), tutkittuina ³²P-leimatun LAC4-terminaattorifragmentin kanssa.

20

Kuvio 43: BamHI-pilkontatuotteet S. cerevisiae D273-10B:stä (kaista 1) ja S. cerevisiae D273-10B/pGBamdS5 -transformanteista (kaistat 2-8), tutkittuina ³²P-leimatun amdS-fragmentin kanssa.

25

Kuvio 44: HindIII-pilkontatuotteet K. lactis CBS 2360:stä (kaista 1), K. lactis CBS 2360/pGBamdS6 -transformanteista (kaista 6) ja K. lactis CBS 2360/pGBamdS6 -transformantin kannoista fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen (kaistat 2-5), tutkittuina ³²P-leimatun LAC4-terminaattorifragmentin kanssa.

30

Kuvio 45: Bacillus-plasmidin pBHA1 restriktiokartta.

35

Kuvio 46: Bacillus-plasmidin pLNF restriktiokartta.

Kuvio 47: esittää kaavamaisesti pGBamds21:n konstruoinnin.

5 Kuvio 48: esittää kaavamaisesti pGBamds22:n konstruoinnin.

Kuvio 49: esittää kaavamaisesti pGBamds23:n konstruoinnin.

10 Kuvio 50: esittää kaavamaisesti pGBamds25:n konstruoinnin.

15 Kuvio 51: esittää kaavamaisesti pGBamds41:n konstruoinnin.

Tässä keksinnössä esitellään markkerin käyttö transformoitujen rihmasienikantojen valikoinnissa. Valintamerkkigeeniä voidaan käyttää episomaalisen DNA-vektorin yhteydessä. Tämän keksinnön mukaisesti merkkigeeni on kuitenkin edullisesti integroitunut rihmasienikannan genomiin. Hyöty tämän keksinnön mukaisesta valintamarkkerista on siinä, että se on ei-antibioottinen dominoiva valintamarkkeri. Toinen hyöty tämän keksinnön mukaisesta valintamarkkerista on siinä, että se voidaan helposti poistaa transformoidusta rihmasienestä. Markkerin deletio perustuu dominoivaan valikointiin. Sellaisenaan tämän keksinnön mukainen valintamarkkeri on dominoiva ja kaksisuuntainen valintamarkkeri. Tietämän mukaan se on ainoa saatavissa oleva valintamarkkeri, joka on kaksisuuntainen ja dominoiva molempiin suuntiin.

35 Tässä kuvauksessa käytetään ilmausta 'valintamerkkigeeni'. Tällä ilmauksella tarkoitetaan merkkiproteiinia koodittavaa DNA:ta toiminnallisessa muodossa katsomatta siitä, onko se varsinainen geeni vai siitä saatu cDNA. Geeniä tai cDNA:ta käytetään isäntäorganismista ja odote-
tuista silmukointiongelmista riippuen.

- Tämän keksinnön mukaisesti käytetään ilmausta 'vektori'. Tällä tarkoitetaan mitä tahansa DNA-molekyyliä, joka voidaan toimittaa valittuun rihmasieni-isäntään riippumatta
5 siitä, integroituu ko vektori isäntäsolun genomiin vai pysyykö se episomaalisena. Vektori sisältää valikoitavan merkkigeenin, joka on toiminnallinen valitussa isännässä, tai se voidaan yhteistransformoida toisen DNA-molekyylin kanssa, joka sisältää sellaisen valintamerkkigeenin.
- 10 Tämän keksinnön mukaisesti käytetään ilmausta 'halutut heterologiset tai homologiset geenit tai DNA-fragmentit'. Tällä tarkoitetaan DNA-fragmenttia, joka voidaan saada isäntäkannasta tai toisesta lajista tai kannasta. Haluttu
15 DNA-fragmentti voi sisältää minkä tahansa geneettisen tekijän, sen osia tai yhdistelmiä, kuten geenin (kooditusosan tai kokonaisen lokuksen), cDNA:n, promoottorin, terminaattorin, intronin, signaalisekvenssin, minkä tahansa säätelevän DNA-sekvenssin tai DNA:ta sitovien proteiinien tunnistusekvenssin. Fragmentti voi myös käsitellä DNA-sekvenssin, jota on modifioitu, so. se sisältää yhden tai useamman nukleotidimuutoksen (esim. insertioita, deleetioita, substituutioita).
- 20 Tässä kuvauksessa käytetään edelleen ilmausta 'toimittaminen' (geeniä koskeva toimenpide), koskien haluttua geeniä tai DNA-fragmenttia. Tällä tarkoitetaan haluttujen DNA-sekvenssien insertiota, deleetiota tai substituutiota valitussa isäntäsolussa.
- 30 Tämän keksinnön mukaisesti käytetty ilmaus 'geneettinen modifikaatio' tarkoittaa mitä tahansa DNA-sekvenssimodifikaatiota valitussa rihmasienisolussa, joka on seuraus siitä, että toimitetaan jokin edellä mainituista
35 halutuista DNA-fragmenteista isäntäsoluun, edullisesti transformaation tai yhteistransformaation avulla.

Kaikki nämä geneettiset modifikaatiot voidaan yleisesti suorittaa käyttäen tämän keksinnön mukaista menetelmää, johon liittyy valintamerkkigeenin poistaminen myöhemmin. Sen seikan ansiosta, että rihmasienikanta, joka sisältää sellaisen geneettisen modifikaation, ei sisällä valintamerkkigeeniä, tämän keksinnön mukainen menettely voidaan toistaa niin, että edellä esitetyt modifikaatiot voidaan yhdistää rihmasienikannassa. Lopuksi, tämän keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää toistuvasti siihen pisteeseen saakka kunnes saavutetaan rihmasienikanta, josta kaikki ei-toivotut aktiivisuudet on poistettu vastaavien geneettisten tekijöiden deleetion tai inaktivointion kautta, ja joka sisältää halutut aktiivisuudet halutuissa tasoissa, vastaavien haluttujen DNA-fragmenttien perättäisen toimittamisen kautta haluttuina kopiomäärinä ja edullisesti halutuissa ja määrättyissä lokuksissa.

A. nidulansin asetamidaasigeeni (amdS) mahdollistaa A. nidulansin kasvun asetamidi ainoana N-lähteenä. Mikroorganismeilla, joilta puuttuu mahdollisuus, tai joilla on vain hyvin rajallinen kyky käyttää asetamidia ainoana N-lähteenä, asetamidaasigeeniä voidaan käyttää periaatteessa valintamarkkerina edellyttäen, että solut ottavat asetamidia vastaan. amdS-geeniä on onnistuneesti käytetty merkkigeeninä Aspergilluksissa (Kelly ja Hynes (1985) EMBO J. 4, 475-479; Christensen et al., (1988) Bio/Technology 6, 1419-1422), Penicilliumeissa (Beri ja Turner (1987) Curr. Genet. 11, 639-641) ja Trichodermissa (Penttilä et al., (1987) Gene 61, 155-164).

Tässä tuodaan ensimmäistä kertaa esille A. nidulansin amdS-geenin käyttö valintamarkkerina muissa organismeissa kuin rihmasienissä. Tämän valintamarkkerin käyttö esitetään bakteereissa ja hiivoissa. Käyttö osoitetaan erityisesti S. cerevisiaessa, K. lactiksessa, B. subtiliksessa, B. licheniformiksessa ja E. colissa. Ottamalla huomioon valintamarkkerin esiintuotu käyttökelpoi-

suus lajeissa, jotka ovat niinkin erilaisia kuin sienet, hiivat ja bakteerit, on odotettavissa, että markkeri voi olla käyttökelpoinen myös muissa näihin ryhmiin kuuluvissa lajeissa. Tämän markkerin käyttö ei sen vuoksi ole rajoittunut esille tuotuihin lajeihin.

A. nidulansin amdS-geeni pystyy muuttamaan asetamidin ammoniakiksi ja etikkahapoksi. Tämä ominaisuus mahdollistaa A. nidulansin kasvun alustalla, joka sisältää asetamidia ainoana N-lähteenä tai C-lähteenä.

Toinen amdS-geenin ominaisuus on se, että se kykenee myös muuttamaan fluoriasetamidin ammoniakiksi ja fluorietikkahapoksi. Fluorietikkahappo on kuitenkin myrkyllinen soluille. Tämä ominaisuus muodostaa perustan tämän keksinnön mukaiselle näkökohdalle, so. merkkigeenivapaiden rihmasienikantojen muodostamiselle. Fluoriasetamidin muuntava ominaisuus mahdollistaa transformoitujen solujen vastavalikoimisen. amdS-geeni toimitetaan isäntäkantaan ja integroidaan genomiin homologisen rekombinaation avulla. Transformoidut kannat valikoidaan alustalla, joka sisältää asetamidia ainoana N-lähteenä. Valikoituja kantoja kasvatetaan sen jälkeen alustalla, joka sisältää fluoriasetamidia ja ureaa (tai muita, edullisesti määrättyjä N-lähteitä) ainoana N-lähteenä. Eloonjääneet kannat sisältävät amdS-geeni-deletion.

Tämän keksinnön mukaisesti käytetään A. nidulansin amdS-geeniä asetamidaasimerkkigeeninä. Asiaankuuluvat ominaisuudet, jotka A. nidulansin amdS-geenin koodittama asetamidaasi saa aikaan, so. kyky hydrolysoida asetamidi ammoniakiksi ja asetaatiksi samoin kuin kyky vapauttaa fluorietikkahappoa fluoriasetamidista, voidaan saada aikaan myös muiden lähteiden asetamidaasien avulla. Asetamidaasimerkkigeenin käyttö ei sen vuoksi ole rajoittunut A. nidulansin amdS-geeniin vaan käsittää minkä tahansa

DNA-sekvenssin, joka koodittaa toiminnallista asetamidaasia.

5 Markkerideleetion esiintymistiheys lisääntyy huomattavas-
ti, kun lisätään geenin kapasiteettia kromosominsisäiseen
homologiseen rekombinaatioon. Tämän saavuttamiseksi amdS-
geeni sijoitetaan edullisesti DNA-toistojaksojen väliin.
Nämä toistojaksot eivät välttämättä ole kumpikin läsnä
vektorissa vaan ne voidaan myös saada aikaan yksinkertai-
10 sen tekijäinvaihduntaintegraation avulla. Vaihtoehtoisesti
voidaan jättää pois vierustavat toistojaksot ja nojautua
muihin mekanismeihin merkkigeenin poistamiseksi tai
inaktivoimiseksi. Siinä tapauksessa tulokset voivat kui-
tenkin olla vähemmän ennustettavissa eivätkä ehkä johda
15 merkkigeenin poistumiseen vaan pelkästään sen inaktivoi-
tumiseen.

Vektori voidaan konstruoida sillä tavalla, että merkki-
geenin poistamisen jälkeen isäntäkannan kromosomiin ei
20 jää ylimääräistä vierasta DNA:ta (kiinnostuksen kohteena
olevaa DNA:ta lukuunottamatta). Keksinnön mukaisesti tuo-
daan esille vektori, joka sisältää:

- a) halutun DNA-fragmentin toimitettavaksi rihmasienen
genomiin,
25
- b) valinnaisesti DNA-sekvenssin, joka mahdollistaa vekto-
rin integroitumisen (paikkaspesifisesti) rihmasienikannan
genomiin,
- 30 c) geenin, joka koodittaa asetamidaasia (esim. A. nidu-
lansin amdS-geenin), DNA-toistojaksojen välissä.

Samanlaisia tuloksia voidaan saavuttaa, kun isäntä-
genomiin toimitettavaksi tarkoitettu DNA-fragmentti ja
35 valikoitava merkkigeeni (esim. asetamidaasigeeni) ovat
läsnä kahdessa eri DNA-molekyylissä, jotka yhteistrans-
formoidaan, jossa tapauksessa valikoitavan markkerin si-

sältävä DNA-molekyyli ei välttämättä integroidu isäntä-genomiin vaan se voi olla läsnä episomaalisessa DNA-molekyyliissä, joka voidaan parantaa (poistaa).

- 5 Sekvenssejä, joita käytetään kohdassa b) mainittuun integraatioon, käytetään, jos halutaan paikkaspesifinen (tai paremminkin lokusspesifinen) integroituminen. Jos sellaista sekvenssiä ei ole läsnä, vektori voi siitä huolimatta integroitua genomiin. Tämä ei vaikuta kykyyn
10 poistaa valintamerkkigeeni.

Edellä kuvailtua dominoivaa vastavalikointia voidaan käyttää kehitettäessä teollisia tuotantokantoja eri tavoin. Dominoivan valintamarkkerin käyttö on erityisen
15 edullista kehitettäessä parannettuja tuotantokantoja, johtuen siitä, että nämä kannat ovat usein diploidisia tai polyploidisia.

amdS-geenin integrointiin käytetty vektori sisältää edullisesti toisen kiinnostavan geenin. Keksinnön mukaisesti on edelleen mahdollista toimittaa haluttuja vieraita tai homologisia genejä tai DNA-paloja valittuihin rihmasieniin käyttäen amdS-geeniä markkerina. amdS-geeni
20 poistetaan myöhemmin. amdS-geeni ja halutut geenit tai DNA-palat toimitetaan edullisesti paikkaspesifisesti, minkä jälkeen amdS-geeni poistetaan.

Keksinnön mukaisesti esitetään erityisesti rihmasieniä, jotka sisältävät paikkaspesifisesti toimitettuja genejä
30 ilman, että läsnä on lisäksi vierasta DNA:ta. Keksintöä sovelletaan halutun geenin tai DNA-palan moninkertaisten kopioiden integrointiin ennaltamäärättyihin genomisiin lokuksiin.

- 35 Keksintö koskee menetelmää merkkigeenivapaiden rihmasienikantojen valikoimiseksi, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- halutun geenin tai DNA-palan ja valintamarkkerin integroinnin homologisen rekombinaation avulla ekspres-
- siokasettiin liitettyjen sekvenssien ja isäntäkromosomis-
- 5 sa olevien sekvenssien välillä,
- valikoinnin, käyttäen dominoivaa valinta merkkigeeniä,
- valintamerkkigeenin poistamisen käyttäen valintamerkki-
- geenin viereisiä alueita,
- valikoinnin, joka perustuu valintamerkkigeenin puuttu-
- 10 miseen (vastavalikointi).

Tämän keksinnön mukaisesti osoitetaan lisäksi, että tämä merkkigeeni voidaan poistaa transformoitujen rihmasienien kromosomeista jäännöksiä jättämättä, so. kloonaukseen

15 käytettyä DNA:ta. Keksinnön mukaisesti osoitetaan lisäksi, että samankaltaisia ellei identtisiä tuloksia voidaan saada aikaan, kun haluttu geeni tai geenipala ja valintamarkkeri sijaitsevat kahdessa eri DNA-molekyylissä, jotka yhteistransformoidaan.

20

Keksinnön mukaisesti esitetään lisäksi amdS-geenin käyttö halutun geenin poistamiseksi rihmasienen kromosomista.

Edellä olevan valossa tämän keksinnön mukainen menetelmä

25 sopii ihanteellisesti mutta ei rajoitu geenien kloonaukseen ja ilmentämiseen, jotka koodittavat proteiineja, joita käytetään elintarvikesovelluksissa, rehusovelluksissa ja farmaseuttisten aineiden alalla, tai geenien, joita käytetään antibioottien ja muiden bioaktiivisten

30 aineiden biosynteesissä, so. yhdistelmäproteiineja ja/tai isäntäorganismeja, joihin sovelletaan tiukkoja rekisteröintivaatimuksia.

Alalla tunnetaan hyvin esimerkkejä sellaisista proteiineista ja niitä ovat kymosiini, fytaasi, ksylanaasit,

35 amylaasit, sellulaasit ja hemisellulaasit, sytokiinit ja muut farmaseuttiset proteiinit jne.

Samaa menetelmää käytetään geenien poistamiseksi, jotka koodittavat proteiineja, jotka vaikuttavat haluttujen proteiinien tuotantotasoihin, jälleen jättämättä merkkigeeniä genomiin. Sellaisia proteiineja ovat proteaasit, jotka hydrolysoivat aktiivisesti haluttuja tuotteita, jotka ilmentyvät runsaasti isäntäkannassa, ja joilla sen vuoksi on alentunut kyky tuottaa ja/tai erittää haluttuja proteiineja. Edullisessa menetelmässä tietyn geenin poistamiseksi käytettäisiin DNA-rakennetta, joka sisältää seuraavat osat 5'-suunnasta 3'-suuntaan mukaisessa järjestyksessä: sekvenssit poistettavan geenin 5'-puolella, liitettyinä suoraan sekvensseihin poistettavan geenin 3'-puolella, joiden alapuolella on toiminnallinen valintamerkkigeeni (edullisesti asetamidaasigeeni), jonka alapuolella on jälleen poistettavan geenin 3'-puoleisia sekvenssejä. Tässä tapauksessa molemmat poistettavan geenin 3'-puoleiset sekvenssit valitaan siten, että ne muodostavat toistojaksoja, jotka vierustavat valintamerkkigeeniä. Tämän DNA-rakenteen transformointi, ja sen jälkeen poistettavan geenin kromosomikopion vaihtaminen DNA-rakenteeseen, jossa on tekijäinvaihtokohdat poistettavan geenin 5'- ja 3'-puoleisissa sekvensseissä, johtaa kyseisen geenin deletioon. Sen jälkeen kromosominsisäinen rekombinaatio toistojaksojen välillä, jotka vierustavat valintamerkkigeeniä, ja näiden rekombinanttien vastavalikointi, johtavat lopulta valintamerkkigeenivapaaseen kantaan, josta tietty geeni puuttuu. Tällaiseen deletioon käytetty DNA-rakenne voidaan konstruoida siten, että yhtään vierasta DNA:ta tai muita jäänteitä geneettisestä modifi-

5
10
15
20
25
30

sa.

Keksinnön mukaisesti tuodaan esille valintamerkkigeenivapaita yhdistelmärihmasieniä. Sellaiset rihmasienet voivat olla organismeja, jotka esille tuodun tekniikan käyttämisen jälkeen sisältävät ylimääräisen kopion halutusta geenistä (joko homologisen tai heterolo-

35

gisen). Sellaiset rihmasienet voidaan transformoida yhä uudelleen käyttäen perättäisesti samaa tekniikkaa, jolla lisätään tai poistetaan lisäkopioita samasta tai muusta kiinnostavasta geenistä.

5

Rihmasienelle voi olla tunnusomaista myös se, että ne sisältävät (a) ennaltamäärätyn geenin poistettuna tai muutettuna jollain tavalla.

- 10 Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä on mahdollista hienosäätää haluttujen proteiinien tuotantoa. Tämä mahdollisuus perustuu helppouteen, jolla liittämisen- ja poistojaksoja voidaan toistuvasti suorittaa. Menetelmän avulla on mahdollista halutun geenikopiomäärän liittäminen
15 tai poistaminen. Proteiineja tuotetaan siten haluttuja määriä ja halutuissa suhteissa. Tämä on erityisen käyttökelpoista tuotettaessa proteiini- tai entsyymiseoksia.

- Koska on tunnettua, että asetamidaasigeeni kykenee asetamidin konversioon ainoana N-lähteenä Aspergilluksessa,
20 tässä osoitetaan, että asetamidaasigeeni on helposti poistettavissa transformoitujen Aspergillusten genomista. Tämän aikaansaamiseksi amdS-geeni kloonataan identtisten (tai läheisesti toisiaan muistuttavien) toistojaksojen
25 väliin. Periaatteessa voidaan käyttää mitä tahansa identtistä toistojaksoa, joka mahdollistaa sisäisen rekombinaation. Keksinnön mukaisissa esimerkeissä tämä osoitetaan kloonamalla amdS-geeni amyloglukosidaasin (glaA) ei-koodittavien 3'-sekvenssien väliin.

30

On osoitettu, että amdS-geeni voidaan integroida ja poistaa maljaamalla alustalle, joka sisältää fluoriasetamidia ja ureaa N-lähteinä.

- 35 On lisäksi osoitettu, että amyloglukosidaasigeeni voidaan poistaa Aspergilluksen genomista. Vaihtovektori konstruoidaan, joka sisältää osan glaA-promoottorista, synteet-

tisen DNA-sekvenssin, joka sisältää lopetuskodonit jokaisessa kolmessa lukukehyksessä, amdS-geenin A. nidulansista A. nidulansin glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasipromoottorin ohjauksessa, ja jossa amdS-geenin
5 vieressä on glaA:n ei-koodittavia 3'-sekvenssejä. A. nigerin transformoinnin jälkeen vektori integroidaan kaksinkertaisen tekijäinvaihdon avulla, korvaten siten tehokkaasti amyloglukosidaasigeeni. amdS-aktiivisuuden suhteen valikoinnin jälkeen transformoidut kannat maljataan
10 fluoriasetamidia ja ureaa sisältävälle maljalle. Valikointi johti kantoihin, joista puuttui amdS-geeni.

Tämä esimerkki kuvaa mahdollisuutta käyttää amdS-geeniä halutun geenin poistamiseksi Aspergillus-kannan genomista. Muita geenejä voidaan eliminoida tai modifioida vastaavalla tavalla.
15

Lisäesimerkissä on osoitettu, että geeni voidaan liittää ilman markkeria ennalta määrättyyn kohtaan genomissa.
20 Integroitiv vektori konstruoidaan, joka sisältää A. nigerin glaA-lokukseen ja amdS-geenin, jonka vieressä on kaksi glaA:n ei koodittavaa 3'-toistojaksoa.

Rakenteen on osoitettu integroituvan amyloglukosidaasilokukseen. Fluoriasetamidivalikoinnin jälkeen amdS-geeni
25 poistetaan. Tällä tavalla geenikopio integroidaan spesifiseen lokukseen jättämättä markkeri-DNA:ta jäljelle.

Edellä olevasta käy ilmi, että tässä yhteydessä kuvaillut
30 menetelmät mahdollistavat alaa tuntevien integroida tai poistaa haluttuja geenejä ennalta määrättyjen lokusten kohdalla jättämättä jäljelle valintamarkkeri-DNA:ta.

Tätä menetelmää voidaan käyttää geenin monistamiseen ja
35 korvaamiseen.

Erityisen tärkeä käyttösovellutus olisi haluttujen geenien integroiminen. Perinteisen kantojen parantamisen jälkeen, geenit, joihin voidaan haitallisesti vaikuttaa perinteisten kantojen parannusmenetelmien avulla, korvataan
5 kiinnostavan geenin tuoreilla luonnollisilla kopioilla menettämättä ilmentymistasoa.

Systeemin, jota on kuvailtu Aspergilluksen kohdalla edellä, odotetaan antavan samoja tuloksia, jos käytetään
10 muita sienikantoja, joiden tiedetään olevan kykenemättömiä kasvamaan asetamidi ainoana N-lähteenä. amdS-geenin käyttöä valintamarkkerina on kuvailtu muiden muassa Penicilliumin ja Trichoderman osalta. amdS-geeniä voidaan sen lisäksi käyttää myös rihmasienissä, jotka kykenevät käyttämään asetamidia ainoana N-lähteenä joskin heikosti.
15 Tässä tapauksessa heikosti kasvavien transformoimattomien solujen edellytykset voidaan repressoida lisäämällä CsCl:a valikointialustoihin (Tilburn, J. et al. (1983) Gene, 26, 205-221). Tästä johtuen systeemin odotetaan
20 olevan yleisesti käyttökelpoinen rihmasienille.

Yhdessä tämän patenttihakemuksen esimerkissä osoitetaan odottamatta, että A. nidulansin amdS-geeniä voidaan
käyttää valintamarkkerina K. lactiksessa. Tässä
25 esimerkissä on osoitettu, että kaksi eri K. lactis -kantaa ei pysty kasvamaan asetamidi ainoana N-lähteenä. Kyseiset kaksi K. lactis -kantaa maljataan YCB-alustaan, joka on a) täydellinen mutta ilman N-lähdettä, b) kuten kohdassa a) mutta asetamidin kanssa, c) kuten kohdassa a)
30 mutta ammoniumsulfaatin kanssa.

Osoitetaan, että kannat eivät kasva b)-kohdan mukaisessa alustassa mutta kasvavat c)-kohdan mukaisessa alustassa. Näin ollen, edellyttäen, että hiivasolut käyttävät asetamidia, ja että amdS-geeni voidaan ilmentää K. lactiksessa,
35 sa, systeemi on käyttökelpoinen hiivoilla myös ainakin valintamarkkerina. Ottamalla huomioon vastavalikointi

fluoriasetamidia käyttäen, joitakin lisäedellytyksiä on huomioitava. Fluoriasetamidi on toksinen asetyyli-CoA-syntetaasientsyymin aktivoimana. Edellytykset fluoriasetamidivastavalikoinnin toiminnalle myös amdS⁺-hiivoissa ovat sen vuoksi

- 1) fluoriasetamidin ei tulisi olla toksinen amdS⁻-hiivoille,
- 2) hiivan soluseinän ja solumembraanin tulisi olla fluoriasetamidia läpäiseviä ja
- 10 3) asetyyli-CoA-syntetaasientsyymin tulisi olla aktiivinen.

Tämän testaamiseksi amdS-geeni kloonattiin K. lactikseen.

15 A. nidulansin amdS-geenin mahdollisten silmukointiongelmien välttämiseksi K. lactiksessa, amdS cDNA A. nidulansista kloonattiin kuten kokeellisessa jaksossa on esitetty.

20 Sen jälkeen amdS kloonattiin hiivapromoottorin (LAC4, ADH1, KLEF) alapuolelle vektoriin, joka sisälsi toisen markkerin (fosfotransferaasi-G418). Tätä kloonausta kuvaillaan esimerkissä 8. Sekä G418-markkerin että amdS-geenin sisältävät vektorit seulottiin käyttäen G418-markkeria ja käytettiin sen jälkeen valikointiolosuhteiden
25 optimoimiseksi amdS⁺-fenotyypin suhteen.

K. lactiksen suora valikointi on myös esitetty ja S. cerevisiaen osalta suora valikointi on esitetty
30 esimerkissä 11.

Myöhemmin osoitetaan, että vastavalikointia voidaan käyttää transformoituihin hiivakantoihin amdS-geenin poistamiseksi.

35

amdS-geenisysteemiä käytetään geenin sekä merkkigeenivapaaseen insertioon että merkkigeenivapaaseen deleetioon hiivassa.

- 5 Lisäsuoritusmuodossa laktaasigeeni poistetaan K. lactiksesta, kun taas esimerkissä 14 kymosiinigeenin kopio liitetään K. lactiksen genomiin.

Tässä insertioon ja deleetioon käytettyjä geenejä käytetään vain esimerkkeinä. Samaa tekniikkaa voidaan soveltaa käyttäen muita geenejä tai DNA-paloja. Edellä mainitun mukaisesti insertioon tai deleetioon käytetyt DNA-fragmentit voivat olla mutatoituja geenejä, promoottorisekvenssejä, säätelysekvenssejä tms. Kaikissa tapauksissa on mahdollista liittää tai poistaa näitä sekvenssejä haluttuihin genomisiin kohtiin ja haluttuina määrinä, jättämättä jäljelle merkkigeeniä.

Tämän systeemin käytön soveltuvuus muissa hiivakannoissa on ilmeinen.

Tämän systeemin käytön ensimmäisenä vaiheena bakteereissa osoitetaan esimerkissä 15, että Bacillus subtilis ja E. coli eivät pysty kasvamaan asetamidi ainoana N-lähteenä.

25 Esimerkissä 16 kuvaillaan vektoreita, jotka on konstruoitu käytettäväksi Bacilluksessa ja E. colissa.

Esimerkeissä 17 ja 18 osoitetaan, että amdS-geeniä voidaan käyttää tehokkaasti Bacilluksessa ja E. colissa valintamarkkerina, kun taas esimerkissä 19 osoitetaan bakteeristen amdS⁺-transformanttien fluoriaasetamidivastavalkointi.

35 Tämän systeemin edut ovat moninaiset. Merkittävimmät edut esitetään jäljempänä:

- On osoitettu, että amdS-systeemi on yleisesti käyttökelpoinen (kasvisoluihin, eläinsoluihin, hiivoihin, bakteereihin ja rihmasieniin jne.), edellyttäen ainoastaan, että kysymyksessä oleva isäntä ei pysty kasvamaan tai kasvaa vain heikosti asetamidi ainoana C-lähteenä tai N-lähteenä, mutta voi käyttää hyväksi joko asetaattia tai ammoniakkaa ainoana C- tai vastaavasti N-lähteenä.
- amdS-systeemi on ainoa kaksisuuntainen ja dominoiva valikointisysteemi. Tämä ominaisuus on äärimmäisen käyttökelpoinen käytettäväksi poly- tai aneuploidisissa kannoissa kuten usein on laita, kun kysymyksessä ovat luonnolliset isolaatit ja/tai teolliset kannat.
- Perinteisen kantojen parantamisen jälkeen halutun geenin mutatoituja kopioita voidaan helposti vaihtaa muta-toimattomiin kopioihin geeninvaihdon avulla, johtuen siitä, että halutut geenit on integroitu hyvin määriteltyihin lokuksiin. Geenit vaihdetaan siten mutatoimattomiin geeneihin vaikuttamatta ilmentymistasoon.
- Johtuen mahdollisuudesta toimittaa multippeleita integraatioita hyvin määriteltyihin ja sen vuoksi ei-sattumanvaraisiin lokuksiin, voidaan olla varmoja, että ei-toivotuja ominaisuuksia ei synny kantaan geenimonistamisen yhteydessä.
- Kasvava huoli, koskien erilaisten valintamarkkereiden vapautumista ympäristöön voitetaan esillä olevan systeemin avulla. Yhdenkään valintamerkkigeenin tai muun tarpeettoman tai ei-toivotun DNA-sekvenssin ei tarvitse olla läsnä tuotantokannoissa haluttujen geenien tai geneettisten modifikaatioiden toimittamisen jälkeen.

30

Yleiset molekulaariset kloonaustekniikat

Tässä yhteydessä kuvailluissa esimerkeissä tavanomaiset molekulariset kloonaustekniikat, kuten nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen, nukleiinihappojen elektroforesointi, entsymaattinen modifiointi, nukleiinihappojen pilkkominen ja/tai monistaminen, E. colin transformointi

35

jne, suoritettiin kuten kirjallisuudessa on kuvailtu (Sambrook et al., (1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratories, Cold Spring Harbour, New York; Innis et al., (edit.) (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego). Oligodeoksinukleotidien synteesi ja DNA-sekvenssianalyysi suoritettiin Applied Biosystems'in 380B DNA-synteesilaitteessa ja vastaavasti 373A DNA-sekvenssointilaitteessa, valmistajan toimittamien käyttömanuaalien mukaisesti.

A. nigerin transformointi

A. nigerin transformointi suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota ovat kuvailleet Tilburn, J. et al., (1983) Gene 26, 205-221 ja Kelly, J. & Hynes, M. (1985) EMBO J., 4, 475-479, seuraavin muutoksin:

- itiöitä kasvatettiin 16 tuntia 30°C:ssa pyöriiväliikkeisessä ravistelijassa nopeudessa 300 kierrosta minuutissa (rpm) Aspergilluksen minimaalialustassa. Aspergilluksen minimaalialusta sisältää seuraavat aineosat: litraa kohti: 6 g NaNO₃:a; 0,52 g KCl:a; 1,52 g KH₂PO₄:a; 1,12 ml 4 M KOH:a; 0,52 g MgSO₄.7H₂O:a; 10 g glukoosia; 1 g kaseiiniaminohappoja; 22 mg ZnSO₄.7H₂O:a; 11 mg H₃BO₃:a; 5 mg FeSO₄.7H₂O:a; 1,7 mg CoCl₂.6H₂O:a; 1,6 mg CuSO₄.5H₂O:a; 5 mg MnCl₂.4H₂O:a; 1,5 mg Na₂MoO₄.2H₂O:a; 50 mg EDTA:a; 2 mg riboflaviinia; 2 mg tiamiini.HCl:a; 2 mg nikotiiniamidia; 1 mg pyridoksiini.HCl:a; 0,2 mg pantoteenihappoa; 4 µg biotiinia; 10 ml penisilliini (5000 IU/ml)/streptomysiini (5000 UG/ml) -liuosta (Gibco).

- protoplastien muodostamiseen käytettiin vain Novozym 234:ää (Novo Industri) eikä yhtään helikaasia;
 - protoplastien muodostamisen jälkeen (60-90 minuuttia) KC-puskuria (0,8 M KCl:a, 9,5 mM sitruunahappoa, pH 6,2) lisättiin 45 ml:n tilavuuteen ja protoplastisuspensiota sentrifugoitiin nopeudessa 2500 g 4°C:ssa 10 minuuttia keinukuppiroottorissa. Protoplastit suspendoitiin uudel-

leen 20 ml:aan KC-puskuria. Sen jälkeen lisättiin 25 ml
STC-puskuria (1,2 M sorbitolia, 10 mM Tris-HCl:a pH 7,5,
50 mM CaCl₂:a), ja sen jälkeen protoplastisuspensiota
5 sentrifugoitiin 2500 g 4°C:ssa 10 minuuttia keinukuppi-
roottorissa, pestiin STC-puskurissa ja suspendoitiin uu-
delleen STC-puskuriin pitoisuudessa 10⁸ protoplastia/ml;
- 200 µl:aan protoplastisuspensiota lisättiin DNA-frag-
mentti 10 µl:n tilavuudessa TE-puskuria (10 mM Tris-HCl:a
pH 7,5, 0,1 mM EDTA:a) ja sen jälkeen 100 µl PEG-liuosta
10 (20 % PEG 4000 (Merck), 0,8 M sorbitolia, 10 mM Tris-
HCl:a pH 7,5, 50 mM CaCl₂:a);
- DNA-protoplastisuspension inkuboinnin jälkeen huoneen
lämpötilassa 10 minuutin ajan lisättiin hitaasti 1,5 ml
PEG-liuosta (60 % PEG 4000 (Merck), 10 mM Tris-HCl:a pH
15 7,5, 50 mM CaCl₂:a) sekoittaen putkia toistuvasti. 20 mi-
nuutin inkuboinnin jälkeen huoneen lämpötilassa suspensio-
ot laimennettiin 5 ml:lla STC-puskuria, sekoitettiin
kääntämällä ja sentrifugoitiin 2000 g huoneen lämpötilas-
sa 10 minuutin ajan. Protoplastit suspendoitiin uudelleen
20 varovasti 1 ml:aan 1,2 M sorbitolia ja maljattiin vali-
koivalle regeneraatioalustalle, joka sisälsi Aspergilluk-
sen minimaalialustaa ilman riboflaviinia, tiamiini.HCl:a,
nikotiiniamidia, pyridoksiini.HCl:a, pantoteenihappoa,
biotiinia, kaseiiniaminohappoja ja glukoosia, mutta li-
25 sänä 10 mM asetamidia ainoana typenlähteenä, 1 M sakka-
roosia, jähmetettynä 2 %:isella bakteriologisella agaril-
la #1 (Oxoid, Englanti). 6-10 päivän kasvatuksen jälkeen
30°C:ssa maljat toistomaljattiin valikoiville asetamidi-
maljoille, jotka sisälsivät Aspergilluksen valikoivaa re-
30 generointialustaa 2 %:nen glukoosi sakkaroosin asemesta
ja 1,5 % agarosia agarin asemesta. Yksittäisiä transfor-
mantteja eristettiin 5-10 päivän kasvatuksen jälkeen
30°C:ssa.

A. oryzaen transformointi

A. oryzaen transformointi suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota on kuvailnut Christensen, T. et al. EP-hakemuksessa 0 238 023 A2.

T. reesein transformointi

T. reesein transformointi suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota ovat kuvailleet Penttilä, M., Knowles, J. (1987) Gene 61 155-164.

P. chrysogenumin transformointi

Ca-PEG-välitteistä protoplastien transformointimenetelmää käytetään. Protoplastien valmistaminen ja P. chrysogenumin transformointi suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota on kuvailnut Gouka et al., Journal of Biotechnology 20 (1991), 189-200 seuraavin muunnoksien:

20

- Transformoinnin jälkeen protoplastit maljattiin valikoiville regenerointialustamaljoille, jotka sisälsivät Aspergilluksen minimaalialustaa, osmoottisesti stabiloituna 1,2 M sakkaroosilla, joka alusta sisälsi 0,1 % asetamidia ainoana typenlähteenä, ja joka oli jähmetetty 1,5 %:isella bakteriologisella agarilla #1 (Oxoid, Englanti).
- Inkuboinnin kestätyä 5-8 päivää 25°C:ssa transformantit tulivat näkyviin.

K. lactiksen transformointi

K. lactis -hiiva transformoitiin käyttäen litiumasetatimenetelmää, jota on kuvailnut Ito, H. et al., (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168 seuraavin muunnoksien:

35

- Transformaatiota varten K. lactis -viljelmä kerättiin tiheyden ollessa OD₆₁₀ 0,5-1,0.

- Transformoitujen solususpensioiden 5 minuutin lämpöshokin jälkeen lisättiin 1 ml YEPD/YNB:tä (1 % hiivauutetta, 2 % Bacto-peptonia, 2 % glukoosia ja 0,17 % hiivan typpi-perusalustaa (Yeast Nitrogen Base) ilman aminohappoja
5 (YNB; Difco) ja solususpensioita inkuboitiin 30°C:ssa inkubointiravistelijassa 150-180 minuuttia.
- Edellä mainitun inkuboinnin jälkeen (30°C:ssa 150-180 minuuttia) solususpensiot sentrifugoitiin 2000 g huoneen lämpötilassa 5 minuutin kuluessa ja maljattiin YEPD/G418-
10 kaksikerrosalustalle, joka oli jähmetetty 2 %:isella Bacto-agarilla (Difco). YEPD/G418-kaksikerrosmaljat valmistettiin seuraavasti: 10 minuuttia ennen solususpensioiden siirrostamista 15 ml YEPD-agariala (1 % hiivauutetta, 2 % Bacto-peptonia, 2 % glukoosia, jähmetettynä 2 %:isella
15 Bacto-agarilla (Difco)) ilman G418:aa valettiin 15 ml:n päälle YEPD-agariala, joka sisälsi 50 µg G418/ml. Tästä muodostuu YEPD/G418-kaksikerrosmaljoja, jotka sisältävät 25 µg G418/ml, antibiootin diffundoitumisen jälkeen. YEPD/G418-kaksikerrosmaljat sisälsivät 25 µg G418/ml K. lactis CBS 683:n tapauksessa tai 100 µg G418/ml vastaa-
20 vasti K. lactis CBS 2360:n tapauksessa.

DNA:n eristäminen Aspergilluksesta, Trichodermasta, Penicilliumista ja hiivasta

25

DNA:n eristäminen Aspergilluksesta ja Trichodermasta suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota on kuvaillut Yelton, et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 1470-1474.

30

DNA:n eristäminen Penicilliumista suoritettiin menetelmän mukaisesti, jota on kuvaillut Kolar et al., Gene 62 (1988), 127-134.

35

DNA:n eristäminen K. lactiksesta tai S. cerevisiaesta suoritettiin menetelmien mukaisesti, joita ovat kuvaillleet Fujimura ja Sakuma (1993), Biotechniques 14, 538.

Bacilluksen transformointi ja DNA:n eristäminen

- Eri Bacillus-lajien transformointi sekä plasmidi-DNA:n tai kromosomaalisen DNA:n eristäminen näistä lajeista
- 5 suoritettiin kuten Bron (1990) on kuvaillut, "Plasmids": Molecular Biological Methods for Bacillus, Harwood, CR ja Cutting, SM, edit., sarjassa Modern Microbiological Methods, John Wiley & Sons, Chichester, UK).
- 10 B. subtilis BS-154:n (CBS 363.94) transformaatiota varten käytettiin kompetentteja soluja ja B. licheniformis T5:n (CBS 470.83) transformaatiota varten käytettiin protoplastitransformaatiota. Neomysiinivalikoinnissa käytettiin pitoisuutta 20 µg/ml. B. subtiliksen transformanttien asetamidivalikoinnissa käytettiin minimaalialusta-
- 15 agaria, jossa kaseiiniaminohapot ja hiivauute korvattiin 20 mM asetamidilla. B. licheniformiksen transformanttien asetamidivalikoinnissa käytettiin protoplastien regenerointialustaa, jossa ammoniumsulfaatti korvattiin 20
- 20 mM asetamidilla.

amdS-valintamarkkerin poistaminen

- Aspergillusta, Trichodermaa ja Penicilliumia koskevissa
- 25 useimmissa esimerkeissä amdS-merkkigeeni kloonataan identtisten toistojaksojen väliin, jotka koostuvat osasta amyloglukosidaasigeenin ei-koodittavaa 3'-aluetta. amdS-valintamarkkerin poistaminen saadaan aikaan joko sisäisen rekombinaation avulla glaA:n 3'-pään ei-koodittavien
- 30 toistojaksojen välillä, jotka vierustavat amdS-valintamarkkeria, tai homologisen rekombinaation avulla toistojaksojen välillä, jotka muodostuvat integraation avulla yksinkertaisen tekijäinvaihtotapahtuman kautta. Solujen seulonta, jotka ovat menettäneet amdS-valintamarkkerin,
- 35 saadaan aikaan kasvattamalla maljoilla, jotka sisältävät fluoriasetamidia. Solut, jotka sisältävät amdS-geenin, metaboloivat fluoriasetamidin ammoniakiksi ja fluo-

riasetatiksi, joka on solulle myrkyllinen. Siten vain solut, jotka ovat menettäneet amdS-geenin, pystyvät kasvamaan fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla.

- 5 Poistettaessa amdS-markkeri Aspergillus-transformanteista, näiden transformanttien itiöitä siirrostettiin valikoivalle regenerointialustalle (kuvailtu edellä), joka sisälsi 32 mM fluoriasetamidia ja 5 mM ureaa 10 mM aseta-
- 10 midin sijasta, 1,1 % glukoosia 1 M sakkaroosin sijasta ja 1,1 % vaan ei 2 % bakteriologista agaria #1 (Oxoid, Englanti). 7-10 kasvatuspäivän jälkeen 35°C:ssa yksittäisiä pesäkkeitä otettiin talteen ja siirrostettiin 0,4 %:isille perunadekstroosiagarmaljoille (Oxoid, Englanti). Poistettaessa amdS-markkeri Trichoderma-transformanteista,
- 15 näiden transformanttien itiöitä siirrostettiin ei-valikoiville minimaalialustamaljoille (litraa kohti: 20 g glukoosia, 5 g (NH₄)₂SO₄:a, 15 g KH₂PO₄:a, 0,6 g MgSO₄:a, 0,6 g CaCl₂:a, 0,005 g FeSO₄·7H₂O:a, 0,016 g MnSO₄·H₂O:a, 0,0014 g ZnSO₄·7H₂O:a, 0,002 g CoCl₂:a; pH 5,5), joihin oli
- 20 lisätty 10 mM fluoriasetamidia. 5-10 päivän kuluttua 30°C:ssa pesäkkeet kerättiin talteen ja maljattiin 0,4 %:iselle perunadekstroosiagarille (Oxoid, Englanti).

- 25 Poistettaessa amdS-markkeri Penicillium-transformanteista, näiden transformanttien itiöitä maljattiin valikoivalle alustalle, joka sisälsi Aspergillus-minimaalialustaa, jossa oli 10 mM fluoriasetamidia ja 5 % glukoosia ja jähmetetty 1,5 %:isellä bakteriologisella agarilla #1 (Oxoid, Englanti). 5-10 kasvatuspäivän kuluttua
- 30 25°C:ssa resistentit pesäkkeet tulivat näkyviin.

Glukoamylaasituotannon määrittäminen *A. nigerin* transformanteilla

- 35 *A. nigerin* yhdistelmä- ja kontrollikantojen itiöitä kerättiin talteen siirrostamalla itiöitä tai rihmastoja PDA-maljoille (Potato Dextrose Agar, Oxoid), jotka oli val-

mistettu valmistajan ohjeiden mukaisesti. 3-7 kasvatuspäivän jälkeen 30°C:ssa itiöt kerättiin talteen sen jälkeen kun maljoille oli lisätty 0,01 % Triton X-100:aa. Steriilillä vedellä pesun jälkeen suunnilleen 10^7 itiötä

5 valikoiduista transformanteista ja kontrollikannoista siirrostettiin ravistelupulloihin, jotka sisälsivät 20 ml nestemäistä esiviljelyalustaa, joka sisälsi litraa kohti: 30 g maltoosi.H₂O:a; 5 g hiivauutetta; 10 g hydrolysoitua kaseiinia; 1 g KH₂PO₄:a; 0,5 g MgSO₄.7H₂O:a; 3 g Tween

10 80:tä; 10 ml penisilliiniä (5000 IU/ml)/streptomysiiniä (5000 UG/ml); pH 5,5. Näitä viljelmiä kasvatettiin 34°C:ssa 20-24 tuntia. 5-10 ml tätä viljelmää siirrostettiin 100 ml:aan fermentointialustaa, joka sisälsi litraa kohti: 70 g maltodekstriinejä; 25 g hydrolysoitua kaseiinia;

15 12,5 g hiivauutetta; 1 g KH₂PO₄:a; 2 g K₂SO₄:a; 0,5 g MgSO₄.7H₂O:a; 0,03 g ZnCl₂:a; 0,02 g CaCl₂:a; 0,01 g MnSO₄.4H₂O:a; 0,3 g FeSO₄.7H₂O:a; 10 ml penisilliiniä (5000 IU/ml)/streptomysiiniä (5000 UG/ml); säädettynä pH-arvoon

20 5,6 4 N H₂SO₄:lla. Näitä viljelmiä kasvatettiin 34°C:ssa 5-10 päivää. Näytteitä otettiin glukoamylaasituotantoanalyysiä varten eri ajankohtina fermentoinnin aikana. Fermentaatiolieminäytteet sentrifugoitiin (10 minuuttia; 10000xg) ja supernatantit otettiin talteen.

25 Glukoamylaasiaktiivisuus määritettiin inkuboimalla 10 µl kuusi kertaa laimennettua viljelmän supernatanttinäytettä 0,032 M NaAc/HAc:ssä pH 4,05, mukana 115 µl 0,2 %:ista (paino/tilavuus) p-nitrofenyyli- α -D-glukopyranosidia (Sigma) 0,032 M NaAc/HAc:ssä pH 4,05. 30 minuutin inkuboinnin jälkeen huoneenlämpötilassa 50 µl 0,3 M Na₂CO₃:a lisättiin ja absorptio aallonpituudessa 405 nm mitattiin. $A_{405\text{nm}}$ on AG-tuotannon mitta.

amdS cDNA:n kloonaminen

35

A. nidulansin amdS-geeni sisältää kolme pientä intronia (Corrick et al., (1987) Gene 53, 63-71). Ongelmien vält-

tämiseksi, jotka näiden introneiden väärä silmukoituminen aiheuttaa hiivoissa tai silmukoitumisen puuttuminen bakteereissa, amdS cDNA:ta on käytetty ilmentämiseen hiivoissa ja bakteereissa. Corrick *et al.*, ((1987), *Gene* 53, 63-71) ovat kuvailleet A. nidulansin polyA⁺ RNA -valmisteen amdS cDNA:n kloonausta. Tässä esimerkissä on käytetty A. niger NRRL 3135 -transformanttia #4, joka on transformoitu A. nidulansin amdS-geenin sisältämän plasmidin pAF2-2S moninkertaisilla kopioilla (van Hartingsveld *et al.*, (1993), *Gene* 127, 87-94). Kokonais-RNA eristettiin suoralla LiCl-saostuksella menetelmän mukaisesti, joka on modifioitu Auffrayn *et al.* menetelmästä, ((1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314). A. niger -itiöiden annettiin itää ja niitä kasvatettiin yli yön 37°C:ssa minimaalialustassa (Cove (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 113, 51-56) täydennettynä glukoosilla hiilenlähteenä ja asetamidi ainoana typenlähteenä. Rihmasto otettiin talteen ja kuivattiin suodattamalla ja jäädytettiin sen jälkeen nestetyypellä, jauhamista varten. Jauhe dispergoitiin 3 M LiCl, 6 M ureaan 0°C:ssa ja säilytettiin yli yön 4°C:ssa. Solun kokonais-RNA saatiin sentrifugoinnin jälkeen 16000 g 30 minuutin ajan ja kahdella peräkkäisellä uutolla fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholia (50:48:2). RNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 1 ml:aan 10 mM Tris-HCl:a (pH 7,4), 0,5 % SDS:a. polyA⁺-valikointia varten kokonais-RNA-näytettä kuumennettiin 5 minuutin ajan 65°C:ssa ja sijoitettiin sen jälkeen oligo(dT)-selluloosakolonniin. Useiden pesujen jälkeen liuoksella, joka sisälsi 10 mM Tris-HCl:a pH 7,4, 0,5 % SDS:a ja 0,5 M NaCl:a, polyA⁺ RNA otettiin talteen eluimalla 10 mM Tris-HCl:llä pH 7,4 ja 0,5 %:isella SDS:llä ja saostettiin etanolilla. Suunnilleen 5 µg polyA⁺ mRNA:ta käytettiin templaattina käänteiskopioinnissa käyttäen alukkeina oligo(dT)-alukkeita. Reaktioseosta (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM DTT, 6 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0,2 mM kutakin dNTP:tä ja 0,1 mg BSA/ml) inkuboitiin 30 minuutin ajan 37°C:ssa mukana 500 yksikköä Murine MLV -käänteistranskriptaasia (BRL) ja 75 yksikköä

RNAasin inhibiittoria (Promega) 100 μ l:n tilavuudessa. Käänteistranskriptaasia lisättiin vielä 200 yksikköä ja reaktiota jatkettiin 30 minuuttia. Seos uutettiin kloroformilla ja saostettiin etanolilla 0,25 M ammoniumasetaat-

5 tin läsnäollessa. Tätä ensimmäisen juosteen cDNA-seosta käytettiin templaattina seuraavassa polymeraasiketjureaktiossa (PCR) amdS cDNA:n monistamiseksi. Genomista amdS-sekvenssiä käytettiin kahden synteettisen oligonukleotidin konstruomiseksi, joita käytettiin alukkeina tässä

10 PCR:ssä:

AB3100 (SEKVENSSI ID NO: 1):

5'-CTAATCTAGAAATGCCTCAATCCTGAA-3' (amdS-spesifinen sekvenssi nukleotidistä -3 nukleotidiin +16, jota edeltää

15 XbaI-kohta ja 4 lisänukleotidiä).

AB3101 (SEKVENSSI ID NO: 2):

5'-GACAGTCGACAGCTATGGAGTCACCACA-3' (amdS-spesifinen sekvenssi, sijoittuen amdS-lopetuskodonin alapuolelle nukleotidivälillä 1911-1884, jota vierustaa SalI-lisäkohta).

20

PCR-reaktio suoritettiin käyttäen 10 % cDNA-seoksesta templaattina ja 0,1 μ g kumpaakin oligoista AB3100 (SEKVENSSI ID NO:1) ja AB3101 (SEKVENSSI ID NO:2) alukkeina.

25 Denaturoinnin (7 minuuttia 100°C:ssa) jälkeen, ja kun oli lisätty 1,3 yksikköä Taq-polymeraasia, reaktioseokselle suoritettiin 25 monistusjaksoa (kukin jakso: 2 minuuttia 94°C:ssa, 2 minuuttia 55°C:ssa ja 3 minuuttia 72°C:ssa). Viimeisessä jaksossa ketjunpidennysvaihe kesti kauemmin

30 (7 min.) täyspitkien fragmenttien synteessin mahdollistamiseksi. Saatu DNA-fragmentti pilkottiin XbaI:llä ja SalI:llä ja subkloonattiin plasmidin pUC18 XbaI/SalI-kohtiin. tuloksena olevaa plasmidia merkittiin tunnuksella pamdS-1 (kuvio 1). Plasmidin pamdS-1 restriktioanalyysi

35 varmisti intronien puuttumisen ja eksonien oikean fuusion amdS cDNA:ssa.

Esimerkki 1A. niger -geenin merkkigeenivapaa deletio käyttäen amdS-geeniä

5 Tässä esimerkissä genomisen kohdegeeni A. nigerissä vaihdetaan transformoimalla A. niger vaihtovektorilla, joka integroituu A. nigerin genomiin kaksoistekijäinvaihtoisen homologisen rekombinaation kautta. Vaihtovektori sisältää DNA-alueen, joka on homologinen kohdelokuksen suhteen,
 10 jonka alueen DNA-toistojaksojen vierustama valikoitava merkkigeeni keskeyttää.

Tässä esimerkissä käytetään pGBDEL4L-plasmidia glaA-kooditusalueen ja glaA-promoottorialueen (proksimaalisen)
 15 osan poistamiseksi. Tämä vektori sisältää osan A. nigerin genomisesta glaA-lokuksesta, jossa glaA-kooditussekvenssit sekä osa glaA-promoottorisekvensseistä on korvattu A. nidulansin amdS-geenillä, joka on A. nidulansin gpdA-promoottorin ohjauksessa valintamarkkerina, jota vierustavat
 20 3'-pään ei-luetut glaA-sekvenssit suorina toistojaksoina. A. nigerin transformointi tällä vektorilla ohjaa glaA-geenin vaihtamista amdS-merkkigeeniin. Suorittamalla fluoriasetamidivastavalikointi näillä transformanteilla, kuten kokeellisessa menetelmäjaksossa on kuvailtu, amdS-merkkigeeni tulee poistetuksi oikein sisäisen rekombinaatiotapahtuman avulla 3' glaA -DNA-toistojaksojen välillä, mikä johtaa merkkigeenivapaaseen Δ glaA-yhdistelmäkantaaan, joka ei lopulta sisällä yhtään vierasta DNA-sekvenssiä (kaaviokuvana lähemmin kuviossa 2).

30

Lyhyt kuvaus glaA geeninvaihtovektorista pGBDEL4L

Geeninvaihtovektori pGBDEL4L sisältää 5'-osan A. nigerin amyloglukosidaasin (glaA) promoottorialueesta, synteettisen 16 bp DNA-sekvenssin, joka toimittaa lopetuskodonit
 35 kaikissa kolmessa lukukehyksessä, A. nidulansin asetamiidaasi (amdS) -geenin A. nidulansin glyseraldehydi-3-fos-

faattidehydrogenaasin (gpdA) promoottorin ohjauksessa, jota vierustavat molemmilla puolilla 3'ei-koodittavat glaA-sekvenssit.

5 pGBDEL4L:n konstruointireitti

Lopullisen deleetiovektorin pGBDEL4L saamiseksi, useita glaA-lokuksen subklooneja tehtiin ensin. Kaaviokuva on esitetty kuviossa 3. A. nigerin glaA-lokus on molekulaarisesti kloonattu ja aikaisemmin kuvailtu (EP 0 463 706 A1). Plasmidi pAB6-1 sisältää kokonaisen glaA-lokuksen A. nigeristä 15,5 kb HindIII-fragmentissa, kloonattuna plasmidin pUC19 HindIII-kohtaan (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985) 103-119, ja se on saatavissa esim. Boehringer Mannheim'ltä, Saksa). pAB6-1 pilkottiin EcoRI:llä ja 1,8 kb EcoRI DNA-fragmentti, juuri glaA-geenin yläpuolella, eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja liitettiin EcoRI:llä pilkottuun plasmidiin pUC19 ja siirrettiin sitten E. coliin ja kloonattiin molekulaarisesti.

20 Tuloksena saatua plasmidia merkittiin tunnuksella pAB6-3 (kuvio 3A). Plasmidin pAB6-4 konstruointiseksi, joka on pAB6-1:n toinen subkloni, pAB6-1 pilkottiin HindIII:lla ja BglII:lla. 4,6 kb kokoinen DNA-fragmentti, joka sisälsi glaA-promoottorin ja osan glaA kooditussekvenssistä, eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja liitettiin plasmidiin pUC19, joka pilkottiin ennalta HindII-I:lla ja BamHI:llä (kuvio 3B). Sen seurauksena BamHI-sekä BglII-kohdat pAB6-4:ssä tuhoutuivat sopivasti tämän kloonausmenetelmän avulla.

30 Seuraavaksi, sen jälkeen kun plasmidi pAB6-4 oli pilkottu HindIII:lla ja EcoRI:llä ja tarttuvat 5'-päät täytetty käyttäen E. colin DNA-polymeraasia, 1,8 kb glaA:n promoottori-DNA-fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, liitettiin pAB6-3:een, joka oli osittain pilkottu EcoRI:llä ja käsitelty E. colin DNA-polymeraasilla tasapäiden muodostamiseksi, ligaatioseos siirret-

tiin E. coliin molekulaarista kloonausta varten. Saatu plasmidi (tunnuksella pAB6-31) sisältää glaA:n 3,6 kb promoottorifragmentin, jonka keskeltä on tuhottu EcoRI-kohta, mutta joka yhä sisältää EcoRI-kohdan (tämän jälkeen ainoan tässä DNA-fragmentissa) juuri glaA:n ATG-aloituskohdan yläpuolella (kuvio 4).

Tässä käytetty A. nidulansin amdS-geeni sijaitsee suunnilleen 4 kb kokoisessa EcoRI-KpnI-fragmentissa plasmidissa pGW325 (Wernars et al., tutkielma (1986) Agricultural University, Wageningen, Hollanti). Tämä EcoRI-KpnI DNA-fragmentti, joka sisältää amdS-geenin, jota vierustavat sen omat säätelysekvenssit, kloonattiin molekulaarisesti pUC19:n sopiviin kohtiin kuten Verdoes et al. ovat kuvailleet (Transgenic Res. 2 ss. 84-92, 1993), josta oli tuloksena pAN4-1. pAN4-1 pilkottiin EcoRI:llä ja KpnI:llä, amdS-geenin sisältävä 4 kb kokoinen DNA-fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, liitettiin EcoRI:llä ja KpnI:llä pilkottuun pAB6-31:een ja liigaatioseos siirrettiin E. coliin molekulaarista kloonausta varten. Saatu plasmidi sai tunnuksen pAB6S (kuvio 5) ja sisältää glaA:n 3,8 kb promoottori-DNA-fragmentin ja 4 kb amdS-fragmentin.

Plasmidi pAB6S pilkottiin ensin osittain SalI:llä ja liitettiin synteettisesti saatuun oligonukleotidiin TN0001 (SEKVENSSI ID NO: 3), jolla on seuraava sekvenssi:

TN0001 (SEKVENSSI ID NO:3): 5'TCGATTAAGTTAA 3'

ja pilkottiin seuraavaksi EcoRI:llä. pUC19:n sisältävä DNA-fragmentti, glaA-promoottori ja amdS-geenisekvenssit puhdistettiin ja eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla. SalI:llä pilkotusta plasmidista pAB6-1 eristettiin 2,2 kb 3'-pään viereinen glaA-DNA-fragmentti samaten agarosigeelielektroforeesin avulla ja liitettiin edellä mainittuun syntettiseen oligonukleotidiin, käsiteltiin

T4-polynukleotidikinaasilla, pilkottiin sitten EcoRI:llä ja liitettiin edellä mainittuun pAB6S:stä eristettyyn DNA-fragmenttiin. DNA-ligaatioseos siirrettiin E. coliin ja kloonattiin molekulaarisesti. Saatu plasmidi sai tunnuksen pGBDEL1 ja se esitetään kuviossa 6. Tämän menetelmän avulla yhtäaikaaisesti SalI-restriktiokohta tuhottiin, ja lopetuskodonit kaikissa lukukehyksissä toimitettiin.

Suunnilleen 1 kb suuren DNA-fragmentin saamiseksi, joka sisältää glaA:n 3'-pään ei-koodittavia DNA-sekvenssejä, jotka sijaitsevat juuri glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella, ja jota vierustavat sopivat restriktiokohdat, suoritettiin PCR-monistaminen. Tässä PCR-monistuksessa plasmidia pAB6-1 käytettiin templaattina, ja alukkeina kahta syntettisesti tehtyä oligonukleotidiä:

Oligo AB2154 (SEKVENSSI ID NO: 4):

5' AACCATAGGGTCGACTAGACAATCAATCCATTTTCG 3' (glaA:n 3'-pään ei-koodittava sekvenssi juuri lopetuskodonin alapuolella) ja

Oligo AB2155 (SEKVENSSI ID NO: 5):

5' GCTATTCGAAAGCTTATTCATCCGGAGATCCTGAT 3' (glaA:n 3'-pään ei-koodittava sekvenssi EcoRI-kohdan ympärillä suunnilleen 1 kb lopetuskodonin alapuolella).

PCR suoritettiin kuten Saiki *et al.* ovat kuvailleet (Science 239, 487-491, 1988), ja TAQ-polymeraasin toimitajan (Cetus) mukaisesti. Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa (jokainen 2 minuuttia 55°C:ssa; 3 minuuttia 72°C:ssa ja 2 minuuttia 94°C:ssa) suoritettiin DNA-monistuslaitteessa (Perkin-Elmer/Cetus). Monistettu 1 kb DNA-fragmentti pilkottiin HindIII:lla ja SalI:llä, puhdistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, saostettiin etanolilla ja kloonattiin sen jälkeen pGBDEL1:n HindIII- ja SalI-restriktiokohtiin. Siten saatu plasmidi sai tunnuksen pGBDEL2 (kuvio 7A,B).

Lopullisen glaA-geeninvaihtovektorin pGBDEL4L aikaansaamiseksi amdS-promoottorialue pGBDEL2:ssa vaihdettiin voimakkaampaan A. nidulansin gpdA-promoottoriin. gpdA-promoottorisekvenssin liittäminen amdS-geenin kooditusse-

5 kvenssiin suoritettiin polymeraasiketjureaktiomenetelmän (PCR) avulla. Tätä PCR-liitääntää varten käytettiin kahta eri templaattia: plasmidia pAN7-1 (Punt *et al.*, Gene 56, 117-124, 1987), joka sisältää E. colin hph-geenin A. nidulansin gpdA-promoottorin ja A. nidulansin trpC-ter-

10 minaattorin ohjauksessa, ja plasmidia pAN4-1, joka sisältää A. nidulansin amdS-geenin sen omien säätelysekvenssi-

en ohjauksessa. Alukkeina käytettiin neljää synteettistä oligonukleotidiä, joilla oli seuraavat sekvenssit:

15 Oligo AB 2977 (SEKVENSSI ID NO:6):

5' TATCAGGAATTCGAGCTCTGTACAGTGACC 3'

(gpdA:n 5'-pään promoottorispesifinen oligonukleotidi, joka sijaitsee suunnilleen 880 bp E. colin hph-geenin ATG-aloituskodonin yläpuolella)

20

Oligo AB2992 (SEKVENSSI ID NO:7):

5' GCTTGAGCAGACATCACCATGCCTCAATCCTGGGAA 3'

Oligo AB2993 (SEKVENSSI ID NO:8):

25 5' TTCCCAGGATTGAGGCATGGTGATGTCTGCTCAAGC 3'

(kumpikin sekvenssi on komplementaarinen toistensa suhteen ja sisältävät 18 bp gpdA-promoottorin 3'-päästä ja 18 bp amdS-kooditusalueen 5'-osasta)

30 Oligo AB2994 (SEKVENSSI ID NO:9):

5' CTGATAGAATTCAGATCTGCAGCGGAGGCCTCTGTG 3'

(amdS-spesifinen sekvenssi BglII-kohdan ympärillä suunnilleen 175 bp ATG-aloituskodonin alapuolella)

35 880 bp gpdA-promoottorialueen yhdistämiseksi amdS-kooditussekvenssiin, kaksi erillistä PCR:ää suoritettiin: ensimmäinen monistaminen pAN7-1 templaattina ja oligonukle-

otidit AB 2977 (SEKVENSSI ID NO:6) ja AB2993 (SEKVENSSI ID NO:8) alukkeina, 880 bp DNA-fragmentin monistamiseksi, joka sisältää gpdA-promoottorin, jonka vieressä on 3'-rajalla 18 nukleotidiä, jotka ovat komplementaariset

5 amdS-geenin 5'-pään suhteen, ja toinen PCR-reaktio pAN4-1 templaattina ja oligonukleotidit AB2992 (SEKVENSSI ID NO:7) ja AB2994 (SEKVENSSI ID NO:9) alukkeina, 200 bp kokaisen DNA-fragmentin monistamiseksi, joka sisältää amdS-geenin 5'-osan, jonka vieressä on 5'-rajalla 18 nukleotidiä, jotka ovat komplementaariset gpdA-promoottorin 3'-pään suhteen. Kaaviokuva näistä monistamisista esitetään kuviossa 8A. Muodostetut kaksi fragmenttia puhdistettiin sen jälkeen agarosigeelielektroforeesin avulla, saostettiin etanolilla ja käytettiin templaatteina kolmannessa

15 PCR-reaktiossa oligonukleotidit AB 2977 (SEKVENSSI ID NO:6) ja AB2994 (SEKVENSSI ID NO:9) alukkeina. Tuloksena saatu DNA-fragmentti pilkottiin EcoRI:llä, puhdistettiin agarosigeelielektroforeesin ja etanolisaostuksen avulla ja kloonattiin pTZ18R:n (United States Biochemicals) EcoRI-kohtaan. Tuloksena saatu plasmidi sai tunnuksen

20 pGBGLA24 (kuvio 8B).

amdS-promoottorisekvenssin pGBDEL2:ssa vaihtamiseksi gpdA-promoottorisekvenssiin, suunnilleen 1 kb kokoinen

25 pGBGLA24:n EcoRI/BglII-fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla pilkkomisen jälkeen sopivilla restriktioentsyymeillä ja liitettiin pGBDEL2:n EcoRI- ja BglII-kohtiin. Tuloksena saatua glaA geenin-vaihtovektoria nimitettiin tunnuksella pGBDEL4L (kuvio

30 9).

glaA:n promoottori- ja kooditussekvenssien deletio A. nigerissä

35 Ennen A. nigerin transformointia pGBDEL4L:llä E. coli -sekvenssit poistettiin HindIII- ja XhoI-pilkonnalla ja agarosigeelielektroforeesimalla. A. niger -kanta CBS

513.88 (talletettu 10. lokakuuta, 1988) transformoitiin joko 2,5, 5 tai 10 μg :n DNA-fragmentilla kokeelliset menetelmät -jaksossa kuvailuilla menetelmillä, käyttäen asetamia ainoana N-lähteenä valikoivilla maljoilla.

5 Yksittäisiä A. niger -transformantteja puhdistettiin useita kertoja valikoiville, asetamia sisältäville minimaalimaljoille. Yksittäisten transformanttien itiöitä kerättiin talteen kasvattamalla noin 5 päivää 30°C:ssa 0,4 %:isilla peruna-dekstroosiagarmaljoilla (Oxoid, Englanti).

10 Southern-analyysit suoritettiin typistetyn glaA-lokukseen läsnäolon varmistamiseksi. Useiden transformanttien suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin, pilkottiin BamHI:llä ja KpnI:llä ja fraktioitiin sen jälkeen elektroforesoimalla 0,7 %:isella agarosigeelillä. Nitroselluloosakalvoille siirtämisen jälkeen hybridisaatio suoritettiin vakio menetelmien mukaisesti käyttäen kahta ^{32}P -leimattua koetinta: XhoI/SalI glaA -promoottorifragmenttia, eristettynä plasmidista pAB6-4 (kuvailtu edellä, kuvio 3A) ja koetinta, joka tunnistaa endogeeniset ksy-

15 lanaasisekvenssit (EP-patenttihakemus 0 463 706 A). Tulokset ainoastaan neljästä transformantista (#19, #23, #24, #41) ja kontrollikannasta A. niger CBS 531.88 on esitetty esimerkkeinä kuviossa 10A. Tämän autoradiogrammin paremmin ymmärtämiseksi, kuviossa 11 esitetään hybridisoituvien fragmenttien koko käsittelemättömissä ja typistetyissä glaA-lokuksissa.

20

25

Tunnusomaista käsittelemättömälle glaA-lokukseen on 3,5 kb hybridisoituva fragmentti BamHI-hydrolysaatissa ja 4,5 kb hybridisoituva fragmentti KpnI-hydrolysaatissa (kuvio 11A). Typistetyistä glaA-lokuksesta 3,5 kb BamHI hybridisoituva fragmentti ja 4,5 kb KpnI hybridisoituva fragmentti puuttuvat, ja ne on korvattu 5,5 kb BamHI hybridisoituvalla fragmentilla ja 6,3 kb KpnI hybridisoituvalla fragmentilla. Tässä esimerkissä, kuten kuvasta 10A

30

35 voidaan havaita, transformantilla #19 esiintyy odotettu

kuvio typistetyistä glaA-lokuksesta (kuvio 11B). Tälle transformantille annettiin tunnus GBA-102.

Muissa transformanteissa ei ollut tapahtunut glaA-geenin korvautumista. Heikosti hybridisoituvat vyöhykkeet: 4, 8 ja 15 kb KpnI-hydrolysaatissa, ja 7 ja 12 kb BamHI-hydrolysaatissa viittaavat ksylanaasisekvensseihin sisäisinä kontrolleina.

10 amdS-geenin poistaminen A. niger GBA-102:sta vastavalkoinnin avulla fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla

amdS-geeni transformantissa A. niger GBA-102 poistettiin jälleen kuten kokeellisessa on kuvailtu. amdS-valintamerkkigeenin poistuminen vain kahdesta elinkykyisestä yhdistelmäkannasta varmistettiin kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysin avulla. Suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin, pilkottiin BamHI:llä ja KpnI:llä ja erotettiin sen jälkeen elektroforesoinnin avulla 0,7 %:isella agarosigeelillä. Nitroselluloosalle siirtämisen jälkeen suoritettiin hybridisaatio vakiomenetelmien mukaisesti, käyttäen aikaisemmassa jaksossa kuvailtuja koettimia. Kaaviomainen esitys hybridisoituvista fragmenteista on esitetty kuviossa 11C. Southern-analyysien tulokset esitetään kuviossa 10B. Hybridisoituvan 5,2 kb BamHI-fragmentin ja 3,4 kb hybridisoituvan KpnI-fragmentin läsnäolo, ja siihen liittyvä hybridisoituvan 5,5 kb BamHI-fragmentin ja hybridisoituvan 6,3 kb KpnI-fragmentin menetykset on ominaista amdS-valintamerkin puuttumiselle.

25 Heikommalla hybridisoituvat 7 ja 12 kb fragmentit BamHI-hydrolysaatissa, ja 4, 8 ja 15 kb KpnI-fragmentit viittaavat jälleen endogeeniseen ksylanaasilokukseen. Kummallakin kannalla esiintyy odotettu kuvio. Näissä yhdistelmäkannoissa, joiden tunnuksia olivat GBA-107 ja GBA-108, edulliset glaA-sekvenssit poistetaan oikein eikä sillä lopulta ole valintamerkkigeeniä lainkaan. Molempia kantoja voidaan käyttää uudelleen muiden geenien tai DNA-osien

35

poistamiseksi tai liittämiseksi käyttäen samantyyppistä vektoria.

Esimerkki 2

- 5 glaA-geenin merkkigeenivapaa toimittaminen kohdistettuna
typistetyn glaA-lokuksen glaA:n 3'-pään ei-koodittavaan
alueeseen *A. niger* GBA-107:ssä

Tässä esimerkissä kuvaillaan geenin toimittamista *A. ni-*
 10 gerin genomiin käyttäen suunnilleen samaa lähestymistapaa
 ja menetelmiä kuin edellisessä esimerkissä on kuvailtu.
 Halutun geenin tai DNA-palan lisäksi vektori sisältää
 isäntägeenille homologisia DNA-sekvenssejä vektorin koh-
 dentamiseksi isännän ennaltamäärättyyn genomiseen lokuk-
 15 seen yksinkertaisen tekijäinvaihdon avulla. Tämäntyyppi-
 nen vektori sisältää valintamerkkigeenin, jonka vieressä
 on lisäksi DNA-toistojaksoja. Valintamerkkigeeni tällä
 vektorilla saaduissa transformanteissa voidaan poistaa
 jälleen sopivasti käyttäen vastavalikointimenetelmää.
 20 Esimerkki glaA-geenikopion toimittamisesta kuvataan, joka
 integroituu typistettyyn glaA-lokukseen Δ glaA *A. niger*
GBA-107 yhdistelmäkantaaan, joka saatiin esimerkissä I
 (kaaviokuva kuviossa 12).

- 25 glaA-integroitivektorin kuvaus: pGBGLA30

Integroitivektori pGBGLA30 sisältää *A. nigerin* amyloglu-
 kosidaasigeenin (glaA) natiivin promoottorin ohjauksessa,
 ja *A. nidulansin* amdS-geenin *A. nidulansin* gpdA-promoot-
 30 torin ohjauksessa, jota vierustavat glaA:n 3'-pään ei-
 koodittavat sekvenssit, integroitumisen ohjaamiseksi
glaA:n 3'-pään ei-koodittavaan alueeseen ja amdS-valinta-
 merkkigeenin poistamiseksi vastavalikoinnin kautta.

Integroitivvektorin konstruointi

1,8 kb XhoI/EcoRI glaA -promoottorifragmentti pAB6-1:stä
(kuvio 13) subkloonattiin SmaI- ja EcoRI-kohtiin
5 pTZ19R:ssä (United States Biochemicals). glaA-promootto-
rifragmentin XhoI-kohdan esiintyöntyvä 5'-pää täytettiin
käyttäen E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmenttia
ennen kloonauksista pTZ19R:ään. SmaI-kohta tuhoutuu ja
XhoI-kohta säilyy tässä kloonausmenetelmässä. Siten saatu
10 plasmidi merkittiin tunnuksella pGBGLA5 (kuvio 13).

Sopivien restriktiokohtien (AatII, SnaBI, AsnI ja NotI)
toimittamiseksi ja XhoI-kohdan tuhoamiseksi glaA-promoot-
torissa, synteettinen fragmentti, joka sisälsi kaksi oli-
gonukleotidiä AB3657:n (SEKVENSSI ID NO:10) ja AB3658:n
15 (SEKVENSSI ID NO:11):

```

5' AGCTTGACGTCTACGTATTAATGCGGCCGCT      3' AB3657
   |||||
20 3'      ACTGCAGATGCATAATTACGCCGGCGAAGCT 5' AB3658

```

liitettiin pGBGLA5:n HindIII- ja XhoI-kohtiin. Siten saa-
tu plasmidi sai tunnuksen pGBGLA26 (kuvio 14).

25 Seuraavaksi 3,4 kb EcoRI-fragmentti pAB6-1:stä, joka si-
sälsi jäljelle jääneen 3'-osan glaA-promoottorista, glaA-
kooditussekvenssin ja osan glaA:n 3'-pään ei-koodittavas-
ta sekvenssistä, kloonattiin pGBGLA26:n EcoRI-kohtaan.
Tämän uuden plasmidin tunnukseksi tuli pGBGLA27 (kuvio
30 15). Tämä plasmidi pilkottiin osittain EcoRI:llä ja syn-
teettinen fragmentti, joka sisälsi oligonukleotidit
AB3779 (SEKVENSSI ID NO:12) ja AB3780 (SEKVENSSI ID
NO:13):

```

35 5' AATTGGGGCCCATTA ACTCGAGC      3' AB3779
   |||||
   3'      CCCC GGTAATTGAGCTCGTTAA 5' AB3780

```

liitettiin EcoRI-kohtaan glaA-geenin 3' glaA ei-koodittavan sekvenssin päähän. Tässä kloonausvaiheessa EcoRI-koh-
ta tuhoutui ja ApaI- ja XhoI-restriktiokohdat toimitet-
tiin. Tuloksena oleva plasmidi sai tunnuksen pGBGLA42
5 (kuvio 16).

2,2 kb glaA:n 3'-pään ei-koodittavien sekvenssien monis-
taminen ja yhtäaikainen sopivien restriktiokohtien säätö
suoritettiin polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla.

10

Näissä PCR-reaktioissa plasmidia pAB6-1, joka sisälsi
koko glaA-lokuksen, käytettiin templaattina ja alukkeiksi
konstruoitiin neljä synteettistä oligonukleotidiä, joilla
oli seuraavat sekvenssit:

15

Oligo AB3448 (SEKVENSSI ID NO:14):

5' GTGCGAGGTACCACAATCAATCCATTTTCGC 3'

(glaA:n 3'-pään ei-koodittava spesifinen sekvenssi juuri
glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella)

20

Oligo AB3449 (SEKVENSSI ID NO:15):

5' ATGGTTCAAGAACTCGGTAGCCTTTTCCTTGATTCT 3'

(glaA:n 3'-pään ei-koodittava spesifinen sekvenssi KpnI-
kohdan ympärillä suunnilleen 1 kb lopetuskodonin alapuo-
lella)

25

Oligo AB3450 (SEKVENSSI ID NO:16):

5'AGAATCAAGGAAAAGGCTACCGAGTTCTTGAACCAT 3'

(glaA:n 3'-pään ei-koodittava spesifinen sekvenssi KpnI-
kohdan ympärillä suunnilleen 1 kb lopetuskodonin alapuo-
lella)

30

Oligo AB3520 (SEKVENSSI ID NO:17):

5' ATCAATCAGAAGCTTCTCTCGAGACGGGCATCGGAGTCCCG 3'

(glaA:n 3'-pään ei-koodittava spesifinen sekvenssi suun-
nilleen 2,2 kb lopetuskodonin alapuolella)

35

KpnI-kohdan tuhoamiseksi suunnilleen 1 kb glaA-geenin
lopetuskodonin alapuolella ja SalI-kohdan muuttamiseksi
suunnilleen 2,2 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella

XhoI-kohdaksi, kaksi erillistä polymeraasiketjureaktiota suoritettiin: ensimmäinen reaktio oligonukleotidit AB3448 (SEKVENSSI ID NO:14) ja AB3449 (SEKVENSSI ID NO: 15) alukkeina, suunnilleen 1 kb DNA-fragmentin monistamiseksi juuri glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella, ja toinen reaktio oligonukleotidit AB3450 (SEKVENSSI ID NO:16) ja AB3520 (SEKVENSSI ID NO:17) alukkeina, suunnilleen 1,2 kb DNA-fragmentin monistamiseksi, joka sijaitsee juuri KpnI-kohdan alapuolella glaA:n 3'-pään ei-koodittavalla alueella, kumpikin pAB6-1 templaattina. Kaaviokuva näistä monistuksista on esitetty kuviossa 17A. PCR suoritettiin kuten esimerkissä 1 on kuvailtu. Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa suoritettiin (kukin 1 minuutti 55°C:ssa; 1,5 minuuttia 72°C:ssa ja 1 minuutti 94°C:ssa).

15

Kaksi muodostettua PCR DNA -fragmenttia puhdistettiin agarosigeelielektroforesoinnin ja etanolisaostuksen avulla ja käytettiin sen jälkeen templaatteina kolmannessa PCR:ssä, oligonukleotidit AB3448 (SEKVENSSI ID NO:14) ja AB3520 (SEKVENSSI ID NO:17) alukkeina, fuusiofragmentin muodostamiseksi. Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa suoritettiin (kukin 2 minuutti 55°C:ssa; 3 minuuttia 72°C:ssa ja 2 minuutti 94°C:ssa) DNA:n monistuslaitteessa (Perkin-Elmer/Cetus). Monistettu DNA-fragmentti puhdistettiin agarosigeelielektroforesoinnin ja etanolisaostuksen jälkeen ja subkloonattiin sen jälkeen pTZ18R:n SmaI-kohtaan. Saatua plasmidia nimitettiin tunnuksella pGBGLA17 (kuvio 17B).

Tämän glaA:n 3'-pään ei-koodittavan alueen yhdistämiseksi amdS-geeniin, osa amdS-geenistä subkloonattiin pGBDEL4L:stä pSP73:een (Promega). Tätä konstruointia varten pGBDEL4L pilkottiin BglII:lla ja HindIII:lla, 3,4 kb amdS/glaA:n 3' ei-koodittava fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja subkloonattiin pSP73:n (Promega) sopiviin kohtiin. Tuloksena saatu plasmidi sai tunnuksen pGBGLA21 (kuvio 18).

Suunnilleen 1 kb kokoinen glaA:n 3'-pään ei-koodittava alue tässä plasmidissa vaihdettiin pGBGLA17:n 2,2 kb glaA:n 3'-pään ei-koodittavaan alueeseen. pGBGLA17 ja pGBGLA21 pilkottiin KpnI:llä ja HindIII:lla. pGBGLA17:n
 5 glaA:n 2,2 kb 3'-pään ei-koodittavan alueen DNA-fragmentti pGBGLA17:sta ja 4,9 kb DNA-fragmentti pGBGLA21:stä eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, liitettiin ja seuraavaksi kloonattiin molekulaarisesti siirtämällä ligaatioseos E. coliin. Siten saatu plasmidi sai
 10 tunnuksen pGBGLA22 (kuvio 19).

amdS-geeni pidennetyllä 3'glaA ei-koodittavalla alueella tehtiin valmiiksi gpdA-promoottorin kanssa ja yhdistettiin amdS-geenin jäljellä olevaan osaan. pGBGLA22 pilkottiin BglII:lla ja HindIII:lla, 4,4 kb amdS/3'gla ei-koodittavan alueen DNA-fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesoinnin avulla, liitettiin sen jälkeen BglII:lla ja HindIII:lla pilkottuun pGBGLA24:ään ja siirrettiin E. coliin. Siten saatua plasmidia merkittiin
 20 pGBGLA25 (kuvio 20).

pGBGLA25 pilkottiin osittain EcoRI:llä ja gpdA-promoottorin EcoRI-kohtaan liitettiin synteettinen fragmentti, joka sisälsi kaksi oligonukleotidiä AB3781 (SEKVENSSI ID
 25 NO:18) ja AB3782 (SEKVENSSI ID NO:19):

```

5' AATTGGGGCCCAGCGTCC      3' AB3781
      |||||
3'      CCCCGGGTCGCAGGTAA  5' AB3782
  
```

30 Tämän uuden plasmidin nimeksi tuli pGBGLA43 (kuvio 21). Tästä kloonausvaiheesta johtuen, EcoRI restriktiokohta juuri ennen gpdA-promoottoria tuhoutui toimittamalla ApaI-restriktiokohta.

35 Plasmidi pGBGLA43 pilkottiin ApaI:llä ja XhoI:llä ja 5,3 kb DNA-fragmentti, joka sisälsi gpdA-promoottorin/amdS-geenin/3'glaA:n ei-koodittavan alueen, eristettiin aga-

roosigeelielektroforeesin avulla, ligoitiin sen jälkeen ApaI:llä ja XhoI:llä pilkotun pGBGLA42:n kanssa ja siirrettiin E. coliin. Saadulle plasmidille tuli tunnus pGBGLA28 (kuvio 22).

5

Ennen kloonausta 3'glaA ei-koodittavan alueen DNA-fragmentti (sijaiten suunnilleen 2,2 kb glaA-geenin lopetus-kodonin alapuolella, tunnuksella 3''glaA ei-koodittava alue) monistettiin ja varustettiin sopivilla restriktiokohdilla käyttäen PCR-menetelmää.

10

Tätä PCR-reaktiota varten plasmidia pAB6-1 käytettiin templaattina ja alukkeiksi konstruointiin kaksi synteetistä oligonukleotidiä, joilla oli seuraavat sekvenssit:

15

Oligo AB3746 (SEKVENSSI ID NO:20):

5' TGACCAATAAAGCTTCTCGAGTAGCAAGAAGACCCAGTCAATC 3'

(osaksi 3'glaA ei-koodittava spesifinen sekvenssi SalI-kohdan ympärillä, sijaiten noin 2,2 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella)

20

Oligo AB3747 (SEKVENSSI ID NO:21):

5' CTACAAACGGCCACGCTGGAGATCCGCCGGCGTTCGAAATAACCAGT 3'

(osaksi 3''glaA ei-koodittava spesifinen sekvenssi XhoI-kohdan ympärillä, sijaiten noin 4,4 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella)

25

Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa suoritettiin (kukin 1 minuutti 55°C:ssa; 1,5 minuuttia 72°C:ssa ja 1 minuutti 94°C:ssa) suoritettiin DNA:n monistusrakenteessa (Perkin-Elmer/Cetus). Kaaviomainen esitys tästä monistamisesta on esitetty kuviossa 23A. Siten saatu DNA-fragmentti pilkottiin HindIII:lla, puhdistettiin agarosigeelielektroforeesin ja etanolisaostuksen avulla ja subkloonattiin molemmilla orientaatioissa pTZ19R:n HindIII-kohtaan. Tuloksena saadut plasmidit saivat tunnukset pGBGLA29A ja pGBGLA29B (kuvio 23).

35

Viimeinen vaihe käsittää 3' glaA ei-koodittavan sekvenssin pGBGLA29A:sta liittämisen plasmidiin pGBGLA28. Tämän aikaansaamiseksi pGBGLA29A pilkottiin HindIII:lla ja NotI:llä. 2,2 kb kokoinen 3' glaA ei-koodittavan alueen fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla, liitettiin sen jälkeen HindIII:lla ja NotI:llä pilkottuun pGBGLA28:aan ja siirrettiin E. coliin. Saatua integraatiovektoria nimitettiin pGBGLA30:ksi (kuvio 24).

10 A. niger GBA-107:n transformointi integraatiovektorilla pGBGLA30

Ennen transformointia E. coli -sekvenssit poistettiin integraatiovektorista pGBGLA30 XhoI-pilkonnalla ja agarosigeelielektroforesoinnilla. A. niger -kanta GBA-107 transformoitiin joko 5 tai 10 μg :lla DNA-fragmenttia koe-menetelmät-jaksossa kuvailluilla menetelmillä. Yksittäisiä A. niger -transformantteja puhdistettiin useita kertoja valikoivilla, asetamidia sisältävillä maljoilla. Yksittäisten transformanttien itiöitä kerättiin noin 5 päivän kasvatuksen jälkeen 30°C:ssa 0,4 %:isella perunadekstroosiagarmaljoilla (Oxoid, Englanti). Southern-analyysit suoritettiin sen varmistamiseksi, oliko integroituminen endogeenisen typistetyn glaA-lokukseen 3' glaA ei-koodittavaan alueeseen tapahtunut. Useiden transformanttien suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin, pilkottiin joko KpnI:llä taai BglII:lla ja fraktioitiin sen jälkeen elektroforesoimalla 0,7 %:isella agarosigeelillä. Hybridisointi suoritettiin nitroselluloosakalvoille siirtämisen jälkeen vakiomenetelmien mukaisesti. Koettimena käytettiin ^{32}P -leimattua, suunnilleen 0,7 kb XhoI/SalI glaA -promoottorifragmenttia, joka oli eristetty plasmidista pAB6-4 (kuvailtu esimerkissä 1). Tulokset vain kolmesta transformantista (#107-5, #107-9 ja #107,7) ja vertailukannasta A. niger GBA107 ja sen kantamuodosta A. niger CBS 531.88 on esitetty esimerkkinä kuviossa 25. Jotta autoradiogrammi tulisi paremmin ymmärretyksi, ku-

viossa 26A,B,C on kaavioesitys, joka osoittaa hybridisoituvien fragmenttien kokoja koskien käsittelemätöntä glaA-lokusta, typistettyä glaA-lokusta ja typistettyä glaA-lokusta, jossa yksi pGBGLA30-kopio on integroitunut ennalta määrättyyn 3'glaA ei-koodittavaan alueeseen.

Tunnusomaista käsittelemättömälle glaA-lokukselle on 4,5 kb hybridisoituva fragmentti KpnI-hydrolysaatissa ja 10 kb hybridisoituva fragmentti BglII-hydrolysaatissa. Tunnusomaista A. niger GBA-107:n typistetylle glaA-lokukselle on 3,4 kb hybridisoituva fragmentti KpnI-hydrolysaatissa ja 13 kb hybridisoituva fragmentti BglII-hydrolysaatissa. Kun kysymyksessä on pGBGLA30-vektorin integroituminen typistetyn glaA-lokuksen 3'-alueeseen, KpnI-hydrolysaatissa on odotettavissa vielä 6,7 kb hybridisoituva fragmentti, 3,4 kb hybridisoituvan fragmentin lisäksi, ja BglII-hydrolysaatissa 13 kb hybridisoituva fragmentti puuttuu ja on korvattu 14,5 kb hybridisoituvalla fragmentilla. Kuten kuviosta 25 voidaan havaita, transformanteilla #107-5 ja #107-9 esiintyy odotettu hybridisaatiokuva yhden pGBGLA30-kopion ollessa integroitunut ennalta määrättyyn typistetyn glaA-lokuksen 3' ei-koodittavaan alueeseen. Transformantin #107-7 hybridisaatiokuva osoittaa pGBGLA30-kopion integroitumisen toisaalle A. niger GBA-107:n genomiin. Transformantit, joilla pGBGLA30-kopio oli integroitunut oikein, nimettiin tunnuksilla GBA-119 ja GBA-122, ja niitä käytettiin amdS-valintamerkkigeenin asianmukaiseen poistamiseen sen jälkeen.

30

amdS-valintamerkkigeenin poistaminen A. niger -kannoista GBA-119 ja GBA-122 vastavalikoinnin avulla fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla

35 A. niger -transformanttien GBA-119 ja GBA-122 amdS-valintamerkkigeeni poistettiin jälleen kuten menetelmät-jaksossa on kuvailtu. amdS-valintamerkkigeenin poistuminen

useista eloonjääneistä yhdistelmäkannoista varmistettiin kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysin avulla. Suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin, pilkottiin joko KpnI:llä tai BglII:lla ja erotettiin sen jälkeen elektroforesoimalla 0,7 %:isella agarosigeelillä. Nitroselloosalle siirtämisen jälkeen hybridisaatio suoritettiin vakiomenetelmien mukaisesti. Koettimena käytettiin plasmidista pGBGLA29A (kuvailtu edellä, kuvio 24) eristettyä, ³²P-leimattua 2,2 kb HindIII/NotI 3''glaA ei-koodittavaa fragmenttia.

Kaaviomainen esitys hybridisoituvista fragmenteista esitetään kuviossa 26. Kuviossa 27A,B on esitetty tulokset vain kolmesta eloonjääneestä yhdistelmäkanasta A. nigeristä GBA-119 (#AG5-5, #AG5-6 ja #AG5-7), samoin kuin kolmesta eloonjääneestä yhdistelmäkanasta A. nigeristä GBA-122 (#AG9-1, #AG9-2 ja #AG9-4) ja vertailukannoista A. niger CBS 531.88 ja A. niger GBA-107.

Kannassa A. niger CBS 531.88, 6,9 kb hybridisoituva fragmentti on läsnä KpnI-hydrolysaatissa ja 6,9 kb hybridisoituva fragmentti BglII-hydrolysaatissa. A. niger -kannassa GBA-107, 6,9 kb hybridisoituva fragmentti on läsnä KpnI-hydrolysaatissa ja 13 kb hybridisoituva fragmentti BglII-hydrolysaatissa. A. niger -kannoissa GBA-119 ja GBA-122, joissa on yksi pGBGLA30-kopio integroituneena 3''glaA ei-koodittavaan alueeseen, 8 kb ja 6,7 kb hybridisoituvat vyöhykkeet ovat läsnä KpnI-hydrolysaatissa, ja 14,5 kb ja 7,6 kb hybridisoituvat vyöhykkeet ovat läsnä BglII-hydrolysaatissa.

Ominaista amdS-valintamerkkigeenin oikealle poistamiselle on 6,7 kb ja 8,5 kb hybridisoituvien fragmenttien läsnäolo KpnI-hydrolysaatissa ja yhtäaikainen 8 kb hybridisoituvan fragmentin menetys. BglII-hydrolysaatissa 14,5 kb ja 6,9 kb hybridisoituvat fragmentit ja yhtäaikainen 7,6 kb hybridisoituvan fragmentin menetys ovat ominaista

amdS-valintamerkkigeenin puuttumiselle. Kuten kuviosta 27 voidaan havaita, kannoilla #AG5-7, #AG5-5, #AG9-1 ja AG9-4 esiintyy oikeanlainen hybridisaatiokuva koskien oikein poistettua amdS-valintamerkkigeeniä. Näitä kantoja merkittiin tunnuksilla GBA-120, GBA-121, GBA-123 ja vastavasti GBA-124. Kantojen #AG5-6 ja #AG9-2 hybridisaatiokuvat osoittavat koko pGBGLA30-kopion menetystä, mistä on seurauksena parentaali A. niger GBA-107 -kanta, joka sisältää vain typistetyt glaA-lokukset.

10

Kannoista A. niger GBA-120, GBA-121, GBA-123 ja GBA-124 testattiin ravistelupullofermentaatioissa kyky tuottaa glukoamylaasia. Vertailukantoina testattiin A. niger CBS 531.88, GBA-107, GBA-119 ja GBA-122. Ravistelupullofermentaatiot ja glukoamylaasimääritys suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. Kannoilla GBA-119 - GBA-124 voitiin mitata tasot vaihteluvälillä 150-200 U/ml. Nämä glukoamylaasitasot olivat odotettavissa ja verrattavissa tasoihin, jotka saatiin parentaalilla, transformoimattomalla kannalla A. niger CBS 531.88.

20

Esimerkki 3

Fytaaasiigeenin markkerivapaa toimittaminen, kohdistuen typistetyn glaA-lokukseen 3'glaA ei-koodittavaan alueeseen
A. niger GBA-107 -kannassa

25

Tässä esimerkissä kuvaillaan geenin toimittamista A. nigerin genomiin käyttäen suunnilleen samaa lähestymistapaa ja menetelmiä kuin edellisessä esimerkissä on kuvailtu. Pääerona on se, että kiinnostava geeni ja valintamerkki-geeni sijaitsevat kahdessa erillisessä vektorissa, ja että nämä vektorit yhteistransformoidaan A. nigeriin. Kiinnostavan geenin ja merkkigeenin lisäksi vektorit sisältävät isäntägenomin suhteen homologisia DNA-sekvenssejä vektorien kohdentamiseksi isännän ennalta määrättyyn genomiseen lokukseen yksinkertaisen tekijäinvaihdon avulla. Suorittamalla fluoriasetamidivastavalkointi näillä

35

(ko)-transformanteilla (kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu), amdS-merkkigeeni poistuu asianmukaisesti sisäisen rekombinaation avulla DNA-toistojaksojen välillä, jotka muodostuvat integraation kautta yksinkertaisella tekijäinvaihdolla.

Yhteistransformointiin käytettyjen vektoreiden kuvailu

Kiinnostavan geenin sisältävä vektori pGBGLA53 sisältää A. ficuumin fytaasigeenin A. nigerin glukoamylaasin (glaA)-promoottorin ohjauksessa, jonka vieressä ovat 3' glaA ei-koodittavat sekvenssit, integroitumisen ohjaamiseksi 3' glaA ei-koodittavaan alueeseen. Valintamerkkigeenin sisältävä vektori pGBGLA50 sisältää A. nidulansin amdS-geenin A. nidulansin gpdA-promoottorin ohjauksessa, jonka vieressä ovat 3' glaA ei-koodittavat sekvenssit integroitumisen ohjaamiseksi 3' glaA ei-koodittavaan alueeseen.

20 pGBGLA50:n konstruointireitti

pGBGLA50:n konstruointi käsittää yhden kloonausvaiheen. Plasmidi pGBGLA29A pilkottiin HindIII:lla ja tarttuvat päät täytettiin käyttäen E. colin DNA-polymeraasin Klenow-fragmenttia. Sen jälkeen 2,2 kb 3' glaA ei-koodittavan alueen fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforesin avulla, liitettiin sen jälkeen ApaI:llä pilkottuun pGBGLA43:een ja käsiteltiin T4 DNA -polymeraasilla tasapäiden muodostamiseksi ja siirrettiin E. coliin. Saatua plasmidia, joka sisälsi 3' glaA ei-koodittavan alueen DNA-fragmentin oikeassa orientaatiossa, merkittiin tunnuksella pGBGLA50 (kuvio 28).

35 pGBGLA53:n konstruointireitti

Ensimmäinen vaihe pGBGLA53:n konstruointireitillä on kahden fragmentin subkloonaus, jotka käsittävät glaA-pro-

moottorin yhdistettynä A. ficuumin fytaasigeenin melkein koko kooditussekvenssiin. Tämän saavuttamiseksi plasmidi pGBGLA42 pilkottiin HindIII:lla ja EcoRI:llä, ja 1,8 kb HindIII/EcoRI 5'glaA -promoottorifragmentti eristettiin

5 agaroosigeelielektroforeesin avulla. Plasmidi pFYT3 (EP-patenttihakemus 0 420 358 A1) pilkottiin EcoRI:llä ja BglII:lla, ja 1,6 kb EcoRI/BglII-fragmentti, joka sisälsi 3'-osan glaA-promoottorista yhdistettynä fytaasigeenin 5'-osaan, eristettiin agaroosigeelielektroforeesin avulla

10 ja ligoitiin yhdessä 1,8 kb HindIII/EcoRI 5'glaA-promoottorifragmentin kanssa, joka oli eristetty pGBGLA42:sta, pSp73:n (Promega) HindIII- ja BglII-kohtiin. Tuloksena olevaa plasmidia merkittiin tunnuksella pGBGLA49 (kuvio 29).

15

Seuraava vaihe on 3'glaA ei-koodittavan alueen DNA-fragmentin kloonaus pGBGLA49:ään. Ennen kloonausta tämä 3'glaA ei-koodittavan alueen DNA-fragmentti (joka sijaitsi suunnilleen 2,2 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella) monistettiin ja varustettiin sopivilla restriktiokohdilla käyttäen PCR-menetelmää.

20

Tätä PCR-reaktiota varten plasmidia pAB6-1 käytettiin templaattina ja alukkeiksi konstruoitiin kaksi syntet-

25 tistä oligonukleotidiä, joilla oli seuraavat sekvenssit:

Oligo AB4234 (SEKVENSSI ID NO:22):

5'GAAGACCCAGTCAAGCTTGCATGAGC 3'

(3'glaA ei-koodittava sekvenssi, joka sijaitsee suunnilleen 2,2 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella)

30

Oligo AB4235 (SEKVENSSI ID NO:23):

5' TGACCAATTAAGCTTGC GGCCGCTCGAGGTCGCACCGGCAAAC 3'

(3'glaA ei-koodittava sekvenssi, joka sijaitsee suunnilleen 4,4 kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella).

35

Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa suoritettiin (kukin 1 minuutti 94°C:ssa; 1 minuutti 55°C:ssa ja 1,5 minuuttia

72°C:ssa) DNA:n monistuslaitteessa (Perkin-Elmer). Kaa-
viesitys tästä monistuksesta on esitetty kuviossa 30A.
Siten saatu fragmentti pilkottiin HindIII:lla, puhdistet-
tiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja subkloonat-
tiin pTZ19R:n HindIII-kohtaan. Tuloksena oleva plasmidi
5 sai tunnuksen pGBGLA47 (kuvio 30).

Plasmidi pGBGLA47 pilkottiin HindIII:lla ja NotI:llä, 2,2
kb 3' glaA ei-koodittava DNA-fragmentti eristettiin aga-
10 roosigeelielektroforeesin avulla ja kloonattiin
pGBGLA49:n HindIII- ja NotI-kohtiin. Tuloksena oleva
plasmidi sai tunnuksen pGBGLA51 (kuvio 31).

Viimeinen vaihe pGBGLA53:n konstruointireitillä on DNA-
15 fragmentin kloonauk, joka sisältää loppuosan fytaasia
koodittavasta sekvenssistä yhdistettynä 3' glaA ei-koodit-
tavaan DNA-fragmenttiin, joka sijaitsee juuri glaA-geenin
lopetuskodonin alapuolella. Ennen kloonauksta loppuosa
fytaasigeenistä ja 3' glaA ei-koodittava DNA-fragmentti,
20 joka sijaitsee juuri glaA-geenin lopetuskodonin alapuo-
lella, yhdistettiin ja varustettiin sopivilla restrikti-
okohdilla käyttäen PCR-menetelmää. PCR:ssä käytettiin
plasmidia pAB6-1 templaattina ja alukkeina käytettiin
kahta synteettistä oligonukleotidiä, joilla oli seuraavat
25 sekvenssit:

Oligo AB4236 (SEKVENSSI ID NO:24):

5' TGACCAATAAAGCTTAGATCTGGGGGTGATTGGGCGGAGTGTTTTGCTTAGA-
CAATCAATCCATTTTCGC 3'

30 (36 bp fytaasia koodittavasta sekvenssistä, alkaen BglII-
kohdasta lopetuskodoniin saakka, yhdistettynä 3' glaA ei-
koodittavaan alueeseen, alkaen juuri glaA-geenin lopetus-
kodonin alapuolella)

Oligo AB4233 (SEKVENSSI ID NO:25):

35 5' TGACCAATAGATCTAAGCTTGACTGGGTCTTCTTGC 3'

(3 glaA ei-koodittava alue, joka sijaitsee suunnilleen 2,2
kb glaA-geenin lopetuskodonin alapuolella)

- Kaksikymmentäviisi monistusjaksoa suoritettiin (kukin 1 minuutti 94°C:ssa; 1 minuutti 55°C:ssa ja 1,5 minuuttia 72°C:ssa) DNA:n monistulaitteessa (Perkin-Elmer). Kaa-
vioesitys tästä monistuksesta on esitetty kuviossa 32A.
- 5 Siten saatu fragmentti pilkottiin HindIII:lla, puhdistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja subkloonattiin pTZ19R:n HindIII-kohtaan. Tuloksena olevat plasmidit saivat tunnukset pGBGLA48 ja pGBGLA52 (kuvio 32B).
- 10 Plasmidi pGBGLA52 pilkottiin BglII:lla ja osittain Bam-
HI:llä, 2,2 kb fytaasi/3'glaA ei-koodittava DNA-fragmentti eristettiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja kloonattiin pGBGLA51:n BglII-kohtaan. Saatua plasmidia,
15 joka sisälsi 2,2 kb fytaasi/3'glaA ei-koodittavan DNA-
fragmentin oikeassa orientaatioissa, merkittiin tunnuksella pGBGLA53 (kuvio 33).

A. niger GBA-107:n transformointi vektoreilla pGBGLA50 ja pGBGLA53

- 20 Ennen transformaatiota E. colin sekvenssit poistettiin pGBGLA50:stä ja pGBGLA53:sta XhoI-pilkonnalla ja vastavasti HindIII-pilkonnalla, jota seurasi agarosigeelielektroforesointi. A. niger GBA-107 -kanta transformoitiin järjestyksessä: 1 µg:lla pGBGLA50-fragmenttia plus 1
25 µg:lla pGBGLA53-fragmenttia, 1µg:lla pGBGLA50-fragmenttia plus 5 µg:lla pGBGLA53:a, tai 1 µg:lla pGBGLA50-fragmenttia plus 10 µg:lla pGBGLA53-fragmenttia käyttäen koemenetelmät-jaksossa kuvailtua transformaatiomenetelmää.
- 30 Yksittäisiä transformantteja eristettiin, puhdistettiin ja Southern-analysoitiin käyttämällä samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 2 on kuvailtu, sekä pGBGLA50:n että pGBGLA53:n integraation varmistamiseksi.
- 35 Noin 10-20 %:ssa analysoituja transformantteja sekä pGBGLA50 että pGBGLA53 oli integroitunut A. niger GBA-107 -isäntäkantaan. Transformanttia, jossa esiintyi oikea

integraatiokuvio koskien yhtä pGBGLA50-kopiota ja yhtä pGBGLA53-kopiota, molemmat integroituneina typistetyn glaA-lokuksen ennalta määrättyyn 3'glaA ei-koodittavaan alueeseen, käytettiin amdS-valintamerkkigeenin poistamiseen myöhemmin.

amdS-merkkigeenin poistaminen vastavalikoinnin avulla
fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla

10 Suoritettaessa fluoriasetamidivastavalikointia (kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu), amdS-merkkigeeni poistettiin sisäisellä rekombinaatiolla DNA-toistojaksojen välillä, jotka muodostuivat integroinnin yhteydessä yksinkertaisen tekijäinvaihdon kautta (so. 3'glaA ei-koodittavat sekvensit). Ainoastaan amdS-merkkigeenin oikea poistuminen varmistettiin Southern-analyysin avulla käyttäen samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 2.

20 Esimerkki 4
glaA-geenin ja fytaasigeenin merkkigeenivapaa toimittaminen A. oryzaehin

Tässä esimerkissä kuvaillaan glaA-geenin tai fytaasigeenin merkkigeenivapaa toimittamista A. oryzaehin NRRL3485. A. oryzae NRRL3485 transformoitiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu käyttäen samoja vektoreita ja lähestymistapaa kuin esimerkeissä 2 ja 3. Yksittäisiä transformanteja eristettiin, puhdistettiin ja Southern-analyysi suoritettiin kromosomaalisella DNA:lla useille transformanteille pGBGLA30-vektorin tai vastaavasti pGBGLA50- ja pGBGLA53-vektoreiden integraatioiden varmistamiseksi. Southern-analyysissä käytettiin samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 2.

35

amdS-geenin poistaminen vastavalikoinnin avulla fluori-asetamidia sisältävillä maljoilla

pGBGLA30-vektorin ollessa kysymyksessä käytettiin transformanttia, jossa oli yksi ainoa pGBGLA30-kopio integroituneena isäntäkannan A. oryzae NRRL3485 -genomiin, amdS-geenin poistamiseksi asianmukaisesti. Vastavalikointi fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. amdS-geenin oikea poistuminen varmistettiin useiden fluoriasetamidiresistenttien kantojen kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysillä. Samoja hydrolysaatteja ja koettimia käytettiin kuin esimerkissä 2 on kuvailtu.

pGBGLA50- ja pGBGLA53-vektoreiden yhteistransformaation ollessa kysymyksessä, käytettiin transformanttia, joka sisälsi yhden kopion sekä pGBGLA50:a että pGBGLA53:a integroituneena isäntägenomiin, amdS-merkkigeenin poistamiseksi asianmukaisesti. Vastavalikointi fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. amdS-merkkigeenin (esim. pGBGLA50-vektori) oikea poistuminen varmistettiin useiden fluoriasetamidiresistenttien kantojen kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysillä käyttäen samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 2 on kuvailtu.

Esimerkki 5

glaA-geenin ja fytaasigeenin merkkigeenivapaa toimittaminen T. reeseihin

Tässä esimerkissä kuvaillaan glaA-geenin tai fytaasigeenin merkkigeenivapaa toimittamista Trichoderma reesei -kantaan QM9414 (ATCC 26921). T. reesei QM9414 transformoitiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu käyttäen samoja vektoreita ja lähestymistapaa kuin esimerkeissä 2 ja 3. Yksittäisiä transformantteja eristettiin, puhdistettiin ja Southern-analyysi suoritettiin kromosomaali-

sella DNA:lla useille transformanteille pGBGLA30-vektorin tai vastaavasti pGBGLA50- ja pGBGLA53-vektoreiden integraatioiden varmistamiseksi. Southern-analyysissä käytettiin samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 5 2.

amdS-geenin poistaminen vastavalikoinnin avulla fluori-asetamidia sisältävillä maljoilla

- 10 pGBGLA30-vektorin ollessa kysymyksessä käytettiin transformanttia, jossa oli yksi ainoa pGBGLA30-kopio integroituneena isäntäkannan T. reesei QM9414 -genomiin, amdS-geenin poistamiseksi asianmukaisesti. Vastavalikointi fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. amdS-geenin oikea poistuminen varmistettiin useiden fluoriasetamidiresistenttien kantojen kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysillä.
- 20 pGBGLA50- ja pGBGLA53-vektoreiden yhteistransformaation ollessa kysymyksessä, käytettiin transformanttia, joka sisälsi yhden kopion sekä pGBGLA50:a että pGBGLA53:a integroituneena isäntägenomiin, amdS-merkkigeenin poistamiseksi asianmukaisesti. Vastavalikointi fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. amdS-merkkigeenin (esim. pGBGLA50-vektori) oikea poistuminen varmistettiin useiden fluoriasetamidiresistenttien kantojen kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysillä käyttäen samoja hydrolysaatteja ja koettimia kuin esimerkissä 2 on kuvailtu.
- 25
- 30

Esimerkki 6P. chrysogenumin geenin merkkigeenivapaa toimittaminen P. chrysogenumiin yhteistransformaation avulla käyttäen amdS-geeniä valintamarkkerina

5

Tässä esimerkissä kuvaillaan geenin merkkigeenivapaa toimittamista P. chrysogenumin genomiin yhteistransformaation avulla.

10

Yhteistransformaatiomenettelyssä 2 eri DNA-palaa toimitetaan protoplasteille, toisen niistä ollessa amdS-valintamarkkeri, jonka läsnäollessa tapahtuu ensimmäinen transformanttiseulonta kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu, toisen ollessa toinen kiinnostava DNA-pala, esim.

15

tiettyä, kiinnostuksen kohteena olevaa entsyymiä koodittava. Tietyissä transformanttimäärässä molemmat DNA-palat integroituvat kromosomeihin ja säilyvät ja ilmentyvät pysyvästi.

20

amdS-valintamerkkigeeni voidaan sen jälkeen poistaa valikoivasti puhdistetuista transformanteista käyttämällä vastavalikointimenetelmää, jota on kuvailtu koemenetelmät-jaksossa, samalla kun toinen DNA-pala säilyy pysyvästi integroituneena transformantin kromosomeihin. Menetelmän yleisen sovellettavuuden valaisuesimerkkinä, niaD-

25

geenin merkkigeenivapaa toimittaminen kuvaillaan, joka mahdollistaa niaD-isännän kasvun nitraatti ainoana typenlähteenä.

30

Isäntänä tälle yhteistransformaatiolle on P. chrysogenumin niaD-kanta, jolta puuttuu nitratireduktaasi, ja joka sen vuoksi on kykenemätön kasvamaan maljoilla, jotka sisältävät nitraatin ainoana typenlähteenä. Näitä kantoja on helppo saada aikaan hyvin tunnetuilla menetelmillä

35

(Gouka et al., Journal of Biotechnology 20 (1991), 189-200, ja siinä olevat viitejulkaisut).

Yhteistransformaation aikana (menetelmä kuvailtu koemenetelmät-jaksossa) kaksi DNA-palaa toimitetaan samanaikaisesti protoplasteille: 7,6 kb EcoRI-restriktiofragmentti pGBGLA28:sta, joka sisältää amdS-valintamerkkigeenin, ja
5 6,5 kb EcoRI-restriktiofragmentti pPC1-1:stä, joka sisältää P. chrysogenumin niaD-geenin. Ennen transformaatiota kumpikin fragmenteista on erotettu E. colin vektorisensseistä agarosigeelielektroforeesin avulla ja puhdistettu agarosigeelistä elektroelution avulla.

10

Transformanttien ensimmäinen valikointi tapahtui valikoivilla maljoilla, jotka sisälsivät asetamidin ainoana typenlähteenä kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu.

15

Transformanttien joukosta löydetään yhteistransformantit toistomaljaamalla puhdistettujen transformanttien itiöitä maljoille, jotka sisältävät nitraatin ainoana typenlähteenä. Tavallisesti noin 20-60 % toistomaljatuista transformanteista kykeni kasvamaan tällä alustalla, mikä
20 osoitti, että näissä transformanteissa ei ainoastaan amdS-valintamerkkigeeni vaan myös niaD-geeni oli integroitunut genomiin ja ilmentyi.

25

amdS-geenin poistaminen vastavalikoinnin avulla fluoriasetamidia sisältävillä maljoilla

30

amdS-valintamerkkigeeni poistetaan sen jälkeen yhteistransformanteista vastavalikoinnin avulla fluoriasetamidilla. Itiöitä siirrostettiin tiheydessä 10^4 itiötä maljaa kohti. 5-7 päivän inkuboinnin jälkeen 25°C:ssa fluoriasetamidiresistentit pesäkkeet voitiin identifioida tiiviinä pesäkkeinä, jotka erottuivat selvästi heikkoa taustakasvua vasten. Rekombinanttien niaD⁺-fenotyyppi osoitetaan niiden kasvulla fluoriasetamidialustalla, joka
35 sisältää nitraatin ainoana typenlähteenä. Rekombinanttien amdS-fenotyyppi varmistettiin rekombinanttien kasvun puuttumisena maljoilla, jotka sisälsivät asetamidin aino-

ana typenlähteenä. Tyypillisesti 0,1-2 % alunperin maljatuista itiöistä omasi halutun fenotyypin.

5 Useiden fluoriasetamidiresistenttien kantojen kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysi varmisti, että amdS-valintamerkkigeeni oli poistunut P. chrysogenumin genomista.

Esimerkki 7

10 Kluyveromyces lactis -hiivan amdS-miinus-fenotyypin testaus

Edellytys amdS-valintasysteemin käytölle K. lactikselle on se, että tämä hiiva ei sisällä yhtään asetamidaasiaktiivisuutta. Tämän testaamiseksi K. lactis -kannat CBS 15 683 ja CBS 2360 on testattu seuraavilla kolmella eri kiinteällä alustalla:

I Hiivan hiiliperusalusta (Yeast Carbon Base, YCB, Difco), joka sisältää kaikki olennaiset ravinteet ja vitamiinit lukuunottamatta typpilähdettä. 20

II YCB täydennettynä 5 mM asetamidilla.

25 III YCB, joka sisältää 0,1 % (paino/tilavuus) $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$.

Kaikki kolme alustaa sisälsivät 1,2 % (paino/tilavuus) Oxoid-agaria (agar n:o 1) ja 30 mM natriumfosfaattipuskuria pH:ssa 7,0. Difcon YCB:tä käytettiin pitoisuudessa 1,17 % (paino/tilavuus). 30

Täysin kasvaneita K. lactis -pesäkkeitä havaittiin vain alustalla III, joka sisälsi ammoniakkia typenlähteenä. Maljoilla, joista puuttui typenlähde tai asetamidi oli ainoa typenlähde, kasvua ei havaittu tai havaittiin satunnaisesti lievää taustakasvua, joka todennäköisesti johtui agarina kontaminoivasta vähäisestä typpimäärästä tai muista alustakomponenteista. Johtopäätöksenä on se, 35

että kummastakin K. lactis -kannasta puuttuu riittävä asetamidaasiaktiivisuus pitämään yllä kasvua asetamidi ainoana typenlähteenä. Tämän tulisi mahdollistaa A. nidulansin amdS-geenin käytön valintamarkkerina K. lactis -hiivassa.

Esimerkki 8

Plasmidien konstruointi amdS-geenin käyttämiseksi hiivoissa

10 pGBBamdS1:n konstruointi

Plasmidia pGBHSA20 on aikaisemmin käytetty ihmisen seerumin albumiinin (HSA) ilmentämiseksi K. lactiksessa (Swinkels et al., 1993, Antonie van Leeuwenhoek 64, 187-201).

15 pGBHSA20:ssä HSA cDNA:ta ohjaa K. lactiksen LAC4-promoottori (kuvio 34, plasmidin pGBHSA20 fyysinen kartta). HSA cDNA:n 3'-päätä vierustavat LAC4-terminaattorisekvenssit. Transformanttien valikoimiseksi pGBHSA20 sisältää Tn5-fosfotransferaasigeenin, joka antaa resistenssin antibiootille G418 (Geneticin, BRL) (Reiss et al., (1984) EMBO J. 3, 3317-3322), jota ohjaa S. cerevisiaen ADH1-promoottori (Bennetzen ja Hall (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025). LAC4-promoottorin tunnusomaisessa SstII-kohdassa pGBHSA20 sisältää E. coli -vektorin pTZ19R, jota käytetään monistamiseen E. colissa. Ennen transformointia K. lactikseen, pTZ19R-sekvenssit poistetaan pGBHSA20:stä SstII-pilkonnan ja agarosigeelipuhdistuksen avulla. LAC4-promoottorin SstII-kohdassa lineaarisesti tehdyn pGBHSA20:n transformointi K. lactikseen johtaa integroitumiseen genomiseen LAC4-promoottoriin homologisen rekombinaation avulla. pGBamdS1 saadaan pGBHSA20:stä korvaamalla amdS cDNA pamdS1:stä HSA cDNA:lla. SalI-kohdat toimitettiin PCR:ää käyttäen amdS cDNA:n 5'- ja 3'-päihin. Tässä PCR:ssä pamdS1:tä käytettiin templaattina ja oligo-

25

30

35 ja AB3514 (SEKVENSSI ID NO:26) ja AB3515 (SEKVENSSI ID NO:27) käytettiin alukkeina.

Oligo AB3514 (SEKVENSSI ID NO:26):

5'-CTGCGAATTCGTCGACATGCCTCAATCCTGGG-3'

(5'-pään amdS-spesifinen sekvenssi, joka sisältää toimitetun SalI-kohdan)

5

Oligo AB3515 (SEKVENSSI ID NO:27):

5'-GGCAGTCTAGAGTCGACCTATGGAGTCACCACATTTTC-3'

(3'-pään amdS-spesifinen sekvenssi, joka sisältää toimitetun SalI-kohdan).

10

Siten saatu PCR-fragmentti pilkottiin SalI:llä ja kloonattiin pGBHSA20:n SalI/XhoI-kohtiin. Useita klooneja saatiin, jotka sisälsivät jommankumman kahdesta mahdollisesta amdS cDNA:n orientaatiosta restriktioanalyysistä pääteltynä. Yksi klooneista, joka sisältää amdS cDNA:n oikeassa orientaatiossa, on pGBamdS1, jonka fyysinen kartta on esitetty kuviossa 34.

15

pGBamdS3:n konstruointi

20

Heterologisen hybridisaation avulla, käyttäen koetinta, joka on peräisin S. cerevisiaen pidennystekijän 1- α -geenistä (F1- α ; Nagata et al., (1984) EMBO J. 3, 1825-1830), on eristetty genomisen kloonin, joka sisältää EF1- α -geenin K. lactis -homologin, jolla on tunnus KLEF1. Tässä esimerkissä on käytetty 813 bp fragmenttia, joka sisältää KLEF1-promoottorin, amdS-geenin ilmentämiseksi K. lactis-sessä. Käyttämällä oligonukleotidejä AB3701 (SEKVENSSI ID NO:28) ja AB3700 (SEKVENSSI ID NO:29), tämä fragmentti

30 monistettiin PCR:ssä käyttäen templaattina genomista DNA:ta K. lactis -kannasta CBS 683. AB3700 (SEKVENSSI ID NO:29) konstruoidaan siten, että se sisältää 21 nukleotidiä KLEF-promoottorista ja 38 nukleotidiä amdS-geenin ATG-aloituskodonin yläpuolelta.

35

AB3701:n (SEKVENSSI ID NO:28) ja AB3700:n (SEKVENSSI ID NO:29) on kuten on esitetty jäljempänä:

Oligo AB3701 (SEKVENSSI ID NO:28):

5'-CTGCGAATTCGTCGACACTAGTGGTACCATTATAGCCATAGGACAGCAAG 3'
(5' KLEF1-spesifinen promoottorisekvenssi, joka sisältää
lisärestriktiokohdat EcoRI, SalI, SpeI, ja KpnI promoot-
5 torin 5'-päässä)

Oligo AB3700 (SEKVENSSI ID NO:29):

5'-GCTCTAGAGCGCGCTTATCAGCTTCCAGTTCTTCCCAGGATTGAGGCATTTT-
TAATGTTACTTCTCTTGC-3'

10 (3' KLEF1-spesifinen promoottorisekvenssi yhdistettynä
amdS cDNA:n 5'sekvensseihin restriktiokohdilla BssH2 ja
lisäkohdalla XbaI).

PCR suoritettiin käyttäen vakio-olosuhteita ja saatu PCR-
15 fragmentti pilkottiin EcoRI:llä ja XbaI:llä ja subkloo-
nattiin EcoRI/XbaI:llä pilkottuun pTZ19R:ään. Tuloksena
saadun plasmidin pTZKLEF1 fyysinen kartta esitetään ku-
viossa 35. Loppuosa amdS cDNA:sta samoin kuin osa LAC4-
terminaattorisekvensseistä saatiin pGBamdS1:stä pilkko-
20 malla BssH2:lla ja SphI:llä. Tämä BssH2-SphI-fragmentti
kloonattiin BssH2:lla ja SphI:llä pilkottuun pTZKLEF1:een
ja tuloksena saatua plasmidia merkittiin tunnuksella
pGBamdS2 (kuvio 35). Viimeisenä vaiheena pGBamdS2:n
konstruoinnissa, sekä pGBamdS2 että pTY75LAC4 (Das ja
25 Hollenberg (1982) Current Genetics 6, 123-128) pilkottiin
SphI:llä ja HindIII:lla. 5,7 kb DNA-fragmentti
pGBamdS2:sta ja 1,2 kb DNA-fragmentti pTY75LAC4:stä, joka
sisältää loput LAC4-terminaattorisekvenssit, puhdistet-
tiin agarosigeeleiltä fraktioinnin jälkeen ja ligoitiin
30 sen jälkeen ja käytettiin E. colin transformointiin. Tu-
loksena olevaa ekspressiovektoria, jossa amdS cDNA:ta
ohjaa K. lactiksen KLEF1-promoottori, merkittiin tunnuksella
pGBamdS3 (kuvio 36).

pGBamdS5:n konstruointi

S. cerevisiaen alkoholidehydrogenaasi I:n (ADH1) pro-
moottorin yhdistäminen amdS cDNA:han suoritettiin PCR:ssä
5 käyttäen pGBHSA20:a templaattina. Toinen alukkeista
(AB3703; SEKVENSSI ID NO:31) sisältää sekvenssejä, jotka
ovat komplementaarisia ADH1-promoottorisekvenssin 3'-pään
suhteen, jotka on yhdistetty amdS cDNA -sekvensseihin.
Toinen aluke (AB3702; SEKVENSSI ID NO:30) sisältää ADH1-
10 promoottorin 5'-pään:

Oligo AB3702 (SEKVENSSI ID NO:30):

5'-CTGCGAATTCGTCGACACTAGTGGTACCATCCTTTTGTGTTTCCGGGTG-3'
(5' ADH1-spesifinen promoottorisekvenssi, joka sisältää
15 lisärestriktiokohdat EcoRI, SallI, SpeI ja KpnI promootto-
rin 5'-päässä).

Oligo AB3703 (SEKVENSSI ID NO:31):

5'-GCTCTAGAGCGCGCTTATCAGCGGCCAGTTCTTCCCAGGATTGAGGCATTGTA-
20 TATGAGATAGTTGATTG-3'
(3' ADH1-spesifinen promoottorisekvenssi yhdistettynä
amdS-sekvenssin 5'-pään, lisärestriktiokohdilla BssH2
ja XbaI).

25 PCR-reaktio suoritettiin käyttäen "touchdown"-toimintaoh-
jetta (Don et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4008).
Reaktioseokset saatettiin 30 monistusjaksoon, pudottaen
pariuttamislämpötilaa 1°C joka toisessa jaksossa, lähtien
55°C:sta alarajalle ("touchdown") 40°C:ssa, jossa lämpö-
30 tilassa suoritettiin vielä 10 jaksoa (jaksot: 2'
94°C:ssa, 2' pariuttamista, 3' 72°C:ssa). Saatu PCR-frag-
mentti pilkottiin EcoRI:llä ja XbaI:llä ja subkloonattiin
pTZ19R:ään. Tuloksena saatu plasmidi pTZs.c.ADH1 ja
pGBamdS3 pilkottiin KpnI:llä ja BssH2:lla. 6,8 kb frag-
35 mentti pGBamdS3:sta ja 750 bp fragmentti pTZs.c.ADH1:stä
puhdistettiin geelielektroforeesin avulla, ligoitiin ja
käytettiin E. coli JM109:n transformointiin. Tuloksena

saatua ekspressiovektoria merkittiin tunnuksella pGBamdS5 (kuvio 37).

pGBamdS6:n konstruointi

5

Plasmidi pGBamdS3 sisältää amdS cDNA:n KLEF1-promoottorin ohjauksessa ja 1,5 kb LAC4-terminaattorisekvenssien ollessa sen 3'-pään vieressä (kuvio 36). pGBamdS6 konstruoidaan kloonamalla fragmentti, joka sisältää fuusion, joka käsittää LAC4-promoottorin ja terminaattorisekvenssit amdS-ekspressiokasetin yläpuolella pGBamdS3:ssa (kuvio 38). LAC4-promoottorin ja terminaattorisekvenssien yhdistämiseksi on ensin konstruoitu pTLAC4 (kuvio 39). PCR:ää käyttäen toimitetaan lisärestriktiokohtia 600 bp LAC4-terminaattorifragmentin 5'- ja 3'-päihin. PCR:ssä K. lactiksen CBS 683 kromosomaalista DNA:ta käytettiin temp-laattina, ja oligonukleotidejä AB3704 (SEKVENSSI ID NO: 32) ja AB3705 (SEKVENSSI ID NO:33) käytettiin alukkeina:

20 Oligo AB3704 (SEKVENSSI ID NO:32):

5'-GCTCTAGAAAGTCGACACTAGTCTGCTACGTACTCGAGAATTTATACTTAGA-TAAG-3'

25 (LAC4-terminaattorispesifinen sekvenssi, joka alkaa LAC4-lopetuskodonin kohdalta ja sisältää lisärestriktiokohdat XbaI, SalI, SpeI, SnaBI ja XhoI).

Oligo AB3705 (SEKVENSSI ID NO:33):

5'-TGCTCTAGATCTCAAGCCACAATTC-3'

30 (LAC4-terminaattorispesifinen sekvenssi sisältäen lisärestriktiokohdan XbaI).

PCR suoritettiin käyttäen vakio-olosuhteita ja tuloksena saatu DNA-fragmentti pilkottiin XbaI:llä ja subkloonattiin pTZ19R:n XbaI-kohtaan, jolloin saatiin pTLAC4 (kuvio 39). LAC4-promoottorisekvenssi saadaan pilkkomalla pKS105 (van den Berg *et al.*, (1990) *Bio/Technology* 8, 135-139) XbaI:llä ja SnaBI:llä. XbaI-SnaBI LAC4 -promoottorifrag-

mentti kloonattiin pTLAC4:n SpeI/SnaBI-kohtiin ja merkittiin tunnuksella pPTLAC4 (kuvio 39). Viimeisessä vaiheessa pGBamdS6:n konstruoinnissa plasmidi pPTLAC4 pilkottiin XbaI:llä. 4,1 kb DNA-fragmentti pPTLAC4:stä puhdistettiin geelielektroforeesin avulla ja kloonattiin pGBamdS3:n SpeI-kohtaan. Saatua geeninvaihtovektoria merkittiin tunnuksella pGBamdS6 (kuvio 38).

pGBamdS8:n konstruointi

10 pGBamdS7 konstruointiin kloonamalla fragmentti, joka sisältää osan LAC4-promoottorista sekä kymosiinin ekspresioasetin, LAC4-promoottorin ja terminaattorisekvenssien väliin, jotka sijaitsevat pGBamdS6:ssa (kuvio 40). Plasmidi pKS105 sisältää prokymosiinin cDNA:n yhdistyneenä S. cerevisiaen α -tekijän prepro-alueeseen LAC4-promoottorin ohjauksessa (van den Berg *et al.*, (1990) *Bio/Technology* 8, 135-139). PCR:ää käyttäen toimitettiin lisärestriktiokohtia LAC4-promoottorin ja kymosiinin ekspresioasetin välisen fuusion 5'- ja 3'-kohtiin. PCR:ssä pKS105:n DNA :ta käytettiin templaattina ja oligonukleotidejä AB3965 (SEKVENSSI ID NO:34) ja AB3966 (SEKVENSSI ID NO:35) käytettiin alukkeina:

25 Oligo AB3965 (SEKVENSSI ID NO:34):
5'-CTGCTACGTAATGTTTTTCATTGCTGTTTTAC-3'
(LAC4-promoottorispesifinen sekvenssi, joka alkaa restriktiokohdasta SnaBI)

30 Oligo AB3966 (SEKVENSSI ID NO:35):
5'-CCGCCCAGTCTCGAGTCAGATGGCTTTGGCCAGCCCC-3'
(kymosiinispesifinen sekvenssi lisärestriktiokohdalla XhoI).

35 PCR suoritettiin käyttäen vakio-olosuhteita ja saatu PCR-fragmentti pilkottiin SnaBI:llä ja XhoI:llä. Plasmidi pGBamdS6 pilkottiin osittain XhoI:llä ja pilkottiin sen

jälkeen SnaBI:llä, ja 10,9 kb DNA-fragmentti eristettiin ja puhdistettiin geelielektroforeesin avulla. SnaBI-XhoI-fuusiofragmentti, LAC4-promoottori/kymosiinin ekspres-siokasetti, kloonattiin pGBamdS6:n SnaBI/XhoI-kohtiin.
5 Tuloksena saatua plasmidia merkittiin tunnuksella pGBamdS7 (kuvio 40).

HindIII-kohdan tuhoamiseksi suunnilleen 66 bp ky-mosiinigeenin aloituskohdan yläpuolella, pGBamdS7 pilkot-tiin osittain HindIII:lla ja sitä käsiteltiin E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentilla tasapäiden muo-dostamiseksi, ligoitiin sen jälkeen ja siirrettiin E. colin molekulaarista kloonausta varten. Saatua plasmidia merkittiin tunnuksella pGBamdS8 ja se sisälsi LAC4-pro-moottorifragmentin, jonka HindIII-kohta oli tuhoutunut.
10
15

Esimerkki 9

amdS cDNA:n ilmentyminen LAC4-promoottorista K. lactis - hiivassa

20 Ekspressiovektori pGBamdS1 sisältää paitsi amdS cDNA:n, toisen valintamarkkerin, joka antaa resistenssin antibi-ootille G418. Tämä mahdollistaa ensin transformanttien valikoinnin käyttäen G418-resistenssiä, joka on hyvin vakiintunut menetelmä (Sreekrishna et al., (1984) Gene
25 28, 73-81). Tällä tavalla saatuja transformantteja voi-daan käyttää myöhemmin amdS cDNA:n ilmentymisen varmistamiseksi ja olosuhteiden optimoimiseksi amdS⁺-fenotyypin seulomiseksi K. lactissessä. Kun nämä olosuhteet on va-
30 kiinnutettu, amdS⁺-transformanttien suora valikointi voi-daan suorittaa esim. käyttämällä ekspres-siokasetteja ilman lisävalintamarkkereita.

pGBamdS1 (kuvio 34) tehtiin lineaarisiksi LAC4-promootto-rissa SstI-pilkonnalla. pTZ19R-sekvenssit poistettiin
35 fraktioimalla ja puhdistamalla agarosigeeleiltä. 15 µg tätä DNA-fragmenttia käytettiin transformoitaessa K. lac-

tis -kannat CBS 2360 ja CBS 683 kuten Ito, H. et al. ovat kuvailleet, (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168, niillä muunnoksilla, joita koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu. Transformaatiomaljoja inkuboitiin 30°C:ssa 3 päivän ajan.

5 G418-resistenttejä kantoja saatiin molemmilla kannoilla. Useita yksittäisiä transformantteja kummastakin kannasta sekä villityypin kantoja levitettiin sen jälkeen maljoille, jotka sisälsivät erilaisia kiinteitä alustoja (taulukko 1). YEPD ja YEPD/G418 on kuvailtu koemenetelmät-

10 jaksossa. YCB, YCB/NH₄ ja YCB/asetamidi on kuvailtu esimerkissä 7 alustoina I, II ja vastaavasti III. YNB-lac/NH₄ ja YNB-lac/asetamidi sisältävät 0,17 % (paino/tilavuus) Yeast Nitrogen Base'a (hiivan typpiperusalusta) ilman aminohappoja ja ammoniumsulfaattia (Difco), jotka sisäl-

15 tävät lisäksi 1 % (paino/tilavuus) laktoosia, 30 mM natriumfosfaattipuskuria pH:ssa 7,0 ja joko 0,1 % (paino/tilavuus) NH₄(SO₄)₂:a tai vastaavasti 5 mM asetamidia.

amdS⁺fenotyyppi CBS 683/pGBamdS1 -transformantilla oli

20 selvä YCB/asetamidilla (taulukko 1). CBS 2360 -transformanteilla, jotka sisälsivät saman ekspressiovektorin, ei kuitenkaan esiintynyt kasvua YCB/asetamidilla. Tästä pääteltiin, että tämä saattaisi johtua LAC4-promoottorin induktion puuttumisesta, joka ohjaa amdS cDNA:ta, kun

25 läsnä ei ole laktoosia eikä galaktoosia, koska hiilenlähteestä riippuvaisia eroavuuksia LAC4-promoottorin säätelyssä eri K. lactis -kantojen välillä on kuvailtu (Breunig (1989) Mol. Gen. Genet. 216, 422-427). Taulukko 1 esittää, että näin tosiaan on, alustalla, joka sisältää

30 laktoosin ainoana hiilenlähteenä ja asetamidin ainoana typenlähteenä, CBS 2360 -transformantit kykenivät kasvaamaan. Sen vuoksi voidaan päätellä, että käytetystä hiilenlähteestä riippuen, nämä transformantit ilmentävät riittävästi A. nidulansin amdS cDNA:ta ylläpitääkseen

35 hiivan K. lactis kasvua asetamidi ainoana typenlähteenä.

Southern-analyysit suoritettiin sen varmistamiseksi, oli-
ko integroituminen LAC4-promoottoriin tapahtunut. Suuri-
molekyylipainoista DNA:ta useista CBS 2360 - ja CBS 683 -
transformanteista eristettiin, pilkottiin HindIII:lla ja
5 fraktioitiin sen jälkeen elektroforeesin avulla 0,7
%:isella agarosigeelillä. Nitroselluloosalle siirtämisen
jälkeen hybridisointi suoritettiin tavanomaisten menetel-
mien mukaisesti. Koettimena käytettiin ³²P-leimattua,
suunnilleen 1,5 kb SacII/HindIII LAC4 -promoottorifrag-
10 menttia, joka oli eristetty plasmidista pGBHSA20 (kuvio
34). CBS 683 - ja CBS 2360 -transformantteja identifioi-
ttiin, jotka sisälsivät yhden pGBamdS1-ekspressiokasetin
integroituneena LAC4-lokukseen; yksi esimerkki kummasta-
kin on esitettyinä kuviossa 41 ja tunnuksella KAM-1 ja
15 vastaavasti KAM-2. pGBamdS1:n yksikopiointegraatio LAC4-
promoottoriin tuottaa kaksi uutta HindIII-fragmenttia,
4,2 kb ja 8,6 kb, joista kumpikin on läsnä transforman-
teissa KAM-1 ja KAM-2. Koska CBS 683 sisältää kaksi LAC4-
lokusta ja pGBamdS1 on integroinut vain toisen niistä
20 KAM-1:een, KAM-1:n hydrolysaatissa esiintyy myös 5,6 Hin-
dIII-fragmentti, joka on peräisin toisesta koskemattomas-
ta LAC4-lokuksesta.

Taulukko 1.

K. <u>lactiksen</u> CBS 683 ja CBS 2360 villityyppien ja pGBamdS1-transformanttien kasvu kiinteillä alustoilla, jotka sisältävät erilaisia typpi- ja/tai hiililähteitä.					
5	kanta	CBS683		CBS 2360	
	transformoiva DNA	ei	pGB-amdS1	ei	pGBamdS1
	YEPD	+	+	+	+
	YEPD-G418	-	+	-	+
10	YCB	-	-	-	-
	YCB/NH ₄	+	+	+	+
	YCB/asetamidi	-	+	-	-
	YNB/NH ₄	+	+	+	+
15	YNB-lac/asetamidi	-	+	-	+

Esimerkki 10

20 K. lactiksen CBS 683 - ja CBS 2360 -transformanttien suora valikointi käyttäen asetamidia ainoana typenlähteenä

SstII:lla linearisoitu pGBamdS1 (15 µg) transformoitiin K. lactis -kantoihin CBS 683 ja CBS 2360 käyttäen transformaatiomenettelyä, jota Ito, H. et al. ovat kuvailleet, 25 ((1983) J. Bact. 153, 163-168) seuraavin muunnoksina:

- K. lactis -kasvustot otettiin talteen transformaatiota varten tiheydessä OD₆₁₀ = 0,5 - 1,0.
- DNA-solususpension 5 minuutin lämpöshokin jälkeen suoritettiin fenotyypin ilmentäminen 150-180 minuutin kuluessa 30°C:ssa 1 ml:n tilavuuksissa. Erilaisia alustoja 30 käytettiin kummallakin kannalla. CBS 683:lle käytettiin YEPD/YNB-liuosta (1*YNB (Hiivan typpiperusalusta, Yeast

Nitrogen Base, Difco), 1 % Bacto-peptonia, 1 % hiivauutetta ja 2 % glukoosia) tai YNB-glu-liuosta (1*YNB (Yeast Nitrogen Base ilman aminohappoja ja ammoniumsulfaattia, Difco), joka sisälsi lisäksi 1 % (paino/tilavuus) glukosia ja 30 mM natriumfosfaattipuskuria pH:ssa 7,0). Tämän inkuboinnin jälkeen solut sentrifugoitiin 2000 g huoneenlämpötilassa 5 minuutin ajan ja maljattiin sen jälkeen YCB/asetamidille (esimerkki 7). CBS 2360:lle käytettiin YNB-lac-alustaa (1*YNB (Yeast Nitrogen Base ilman aminohappoja ja ammoniumsulfaattia, Difco), joka sisälsi lisäksi 1 % (paino/tilavuus) laktoosia ja 30 mM natriumfosfaattipuskuria pH:ssa 7,0). Tämän inkuboinnin jälkeen solut sentrifugoitiin 2000 g huoneenlämpötilassa 5 minuutin ajan ja maljattiin sen jälkeen YNB-lac/asetamidille (esimerkki 9).

Kasvua jatkettiin 30°C:ssa 3 päivän ajan. amdS⁺-transformanteja saatiin molemmilla kannoilla. Havaitut transformatiofrekvenssit olivat verrattavissa niihin, jotka todettiin käytettäessä G418-valikointia. Transformanttien oikea identtisyys varmistettiin maljaamalla sen jälkeen YEPD-maljoille, jotka sisälsivät G418:a, ja Southern-analyysin avulla.

pGBamdS3 (kuvio 36), jossa amdS cDNA:ta ohjaa KLEF1-promoottori, tehtiin lineaariseksi LAC4-terminaattorissa pilkkomalla XhoI:llä, ja 15 µg geelistä eristettyä fragmenttia transformoitiin sen jälkeen K. lactis -kantaan CBS 683 käyttämällä suoraa valikointia YCB/asetamidi-maljoilla kuten edellä on kuvailtu koskien pGBamdS1:n transformointia CBS 683:een. Jotkut saaduista transformanteista analysoitiin Southern-blottauksen avulla. Suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin, pilkottiin BamHI:llä ja erotettiin sen jälkeen elektroforeesin avulla 0,7 %:isellä agarosigeelillä. Nitroselluloosalle siirtämisen jälkeen hybridisaatio suoritettiin tavanomaisilla menetelmillä. Koettimena käytettiin ³²P-leimattua, 1,2 kb

SphI/HindIII LAC4 -terminaattorifragmenttia, joka oli eristetty plasmidista pTY75LAC4 (kuvailtu esimerkissä 8). Tulokset useista CBS 683 -transformanteista, jotka sisälsivät pGBamdS3-plasmidin, ja useista transformanteista, jotka sisälsivät pGBamdS5-plasmidin, on esitetty kuvioissa 42A ja vastaavasti 42B. Vertailukanta CBS 683 on esitetty kuviossa 42B. CBS 683 -transformanteissa on läsnä ylimääräinen 6,8 kb hybridisoituva fragmentti käsittelemättömän LAC4-terminaattorin 3,7 kb hybridisoituvan fragmentin lisäksi. Tämä osoittaa plasmidien oikean integroitumisen LAC4-terminaattorialueeseen.

Kaikissa näissä transformanteissa pGBamdS3 integroitui yhtenä tai useampana kopiona LAC4-terminaattoriin (6,8 kb hybridisoituvan fragmentin intensiteetti on osoitus vektorin integroituneiden kopioiden määrästä). On päätelty, että myös konstitutiivinen KLEF1-promoottori voi ohjata amdS cDNA:ta valintamarkkerina käyttöä varten. Samanlaisia tuloksia saatiin pGBamdS5:llä (kuvio 37), jossa amdS cDNA:ta ohjaa S. cerevisiaen ADH1-promoottori.

Esimerkki 11

S. cerevisiaen transformointi pGBamdS5:llä valikoiden suoraan asetamidilla

Tässä esimerkissä on testattu, voidaanko amdS cDNA:ta käyttää myös valintamarkkerina muissa hiivoissa, esim. S. cerevisiaessa. S. cerevisiae -kannan D237-10B amdS-fenotyyppi on ensin varmistettu sekä sen kyky käyttää ammoniakkia ainoana typenlähteenä, käyttämällä samoja alustoja ja typenlähteitä kuin K. lactiksella esimerkissä 7. Kuten K. lactiksen tapauksessa on havaittu, täysin kasvanneita S. cerevisiae -pesäkkeitä havaittiin ainoastaan maljoilla, jotka sisälsivät ammoniakin typenlähteenä. Maljoilla, jotka eivät sisältäneet typenlähdettä tai sisälsivät asetamidin ainoana typenlähteenä, kasvua ei havaittu tai havaittiin satunnaista heikkoa taustakasvua.

Plasmidi pGBamdS5 linearisoitiin ADH1-promoottorissa pilkkomalla osittain SphI:llä. S. cerevisiae -kanta D273-10B (ATCC 25657) transformoitiin 15 µg:lla geelieristettyä, linearisoitua pGBamdS5-fragmenttia, käyttäen transformointimenetelmiä, joita on kuvailtu esimerkissä 10 pGBamdS1:n transformaatiossa K. lactis CBS 683:een. Transformoinnin jälkeen solut maljattiin YCB/asetamidimaljoille (esimerkki 9) ja niiden annettiin kasvaa 30°C:ssa 3 päivän ajan. Useita amdS⁺-transformanteja saatiin tässä transformaatiossa. Joidenkin amdS-transformanttien Southern-analyysi varmisti, että amdS cDNA oli pysyvästi integroitunut S. cerevisiaen genomiin.

Suurimolekyylipainoista DNA:ta eristettiin ja pilkottiin BamHI:lä, erotettiin sen jälkeen elektroforeesin avulla 0,7 %:isella agarosigeelillä ja blotattiin nitroselluloosalle. Koettimena käytettiin ³²P-leimattua 750 bp EcoRV amdS -fragmenttia, joka oli eristetty pGBamdS1:stä. Tulokset useista D273-10B/pGBamdS5-transformanteista samoin kuin vertailukannasta D273-10B (ATCC 25657) on esitetty kuviossa 43. Kaksi hybridisoituvaa fragmenttia on läsnä D273-10B-transformanteissa, toinen 6,6 kb fragmentti, joka edustaa monikopiofragmenttia, ja toinen hybridisoituvaa fragmentti, jonka koko on tuntematon ja joka on geeniviereinen. Vertailukannalla D273-10B (ATCC 25657) ei odotetusti esiinny hybridisoituvaa fragmenttia.

Esimerkki 12

amdS-markkerin poistaminen K. lactis ja S. cerevisiae amdS⁺-transformanteista käyttäen fluoriasetamidivastavaliointia

Edellä kuvailluissa esimerkeissä amdS:n sisältäviä ekspressiokasetteja integroidaan yksinkertaiseen tekijäinvaihtoon perustuvan homologisen rekombinaation avulla K. lactis ja S. cerevisiae -genomeihin. Tämä tarkoittaa sitä, että amdS cDNA:n vieressä on suoria toistojaksoja

näiden amdS-hiivatransformanttien genomissa. amdS cDNA poistuu siis pienestä transformanttipopulaatiofraktiosta intrakromosomaalisten mitoottisten rekombinaatioiden avulla, joiden esiintymistiheys on alhainen, cDNA:ta vierustavien suorien toistojaksojen välillä. Tulisi olla mahdollista valikoida näitä tapahtumia käyttäen fluoriasetamidia sisältäviä alustoja, yhdistettä, joka on toksinen amdS⁺-soluille mutta ei amdS⁻soluille kuten on osoitettu A. nidulansin osalta, Hynes ja Pateman ((1970) 10 Mol. Gen. Genet. 108, 107-116). amdS⁺-soluissa fluoriasetamidi muuntuu ammoniakiksi ja fluoriasetaatiksi, jälkimmäisen ollessa toksinen tullessaan asetyyli-CoA-syntetaasin aktivoimaksi. Edellytykset fluoriasetamidivastavalikoinnin toimimiseksi myös amdS⁺-hiivoissa ovat 15 sen vuoksi 1) fluoriasetamidin ei tulisi olla toksinen amdS⁻hiivoille, 2) hiivan soluseinän ja solukalvon tulisi olla läpäiseviä fluoriasetamidille ja 3) entsyymin asetyyli-CoA-syntetaasi tulisi olla aktiivinen. Tämän testaamiseksi on käytetty K. lactis CBS 683 -transformanttia, joka sisältää yhden pGBamdS1-kopion integroituneena 20 LAC4-promoottoriin, tunnuksella KAM-1, ja S. cerevisiae D273-10B -transformanttia, joka sisältää yhden pGBamdS5-kopion integroituneena ADH1-promoottoriin, tunnuksella SAM-1. Sekä KAM-1 että SAM-1 puhdistettiin vähintään kolmessa kierroksessa valikoivalla alustalla (YCB/asetamidi) 25 parentaalien amdS⁻-kantojen aiheuttaman kontaminaation poissulkemiseksi. KAM-1 ja SAM-1 maljattiin kumpikin tiheydessä suunnilleen 10³ CFU/malja (pesäkkeen muodostavaa yksikköä) YCB/NH₄:lle, joka sisälsi lisäksi 10 mM fluoriasetamidia. Sekä KAM-1:n että SAM-1:n osalta, 5-20 30 fluoriasetamidiresistenttiä pesäkettä tuli näkyviin 3-6 päivän kuluttua 30°C:ssa. Useiden yksittäisten KAM-1 - ja SAM-1 -peräisten amdS⁻-pesäkkeiden kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysi varmisti, että amdS cDNA oli asianmukaisesti poistunut K. lactis - ja S. cerevisiae -genomeista homologisen rekombinaation kautta vierustavien suorien toistojaksojen välillä (kuvio 41). Itse asiassa

yhdessä KAM-1 amdS -rekombinantissa rekombinaation tekijäinvahtokohta sijaitsi polymorfisen HindIII-kohdan ja amdS cDNA:n välissä. Tämä polymorfinen HindIII-kohta sijaitsee 92 bp LAC4-lukukehyksen yläpuolella pGBamdS1:n

5 LAC4-promoottorissa, kuitenkin tämä kohta ei ole läsnä CBS 683:n LAC4-promoottorissa. Rekombinaatiotapahtuma on säilyttänyt HindIII-kohdan tämän erityisen KAM-1 -rekombinantin genomissa, jota muutoin ei voitaisi erottaa parentaalikannasta CBS 683 (ylimääräinen 4,2 kb fragmentti

10 kuviossa 41, kaista 6). Tämä KAM-1-rekombinantti sulkee sen vuoksi pois mahdollisuuden, että olisi eristetty CBS 683 -kontaminantteja KAM-1 amdS -rekombinanttien asemesta. Edellä olevasta voidaan päätellä, että amdS cDNA voidaan poistaa hiivagenomeista niiden ollessa suorien tois-

15 tojaksojen vierustamia, käyttäen fluoriasetamidivastavali-

koointia. Tässä esimerkissä amdS K. lactis - ja S. cerevisiae -rekombinantteja esiintyy tiheydessä noin 0,1 %.

On havaittu, että joillakin hiivakannoilla tehokasta vastavali-

20 koointia fluoriasetamidilla ei voida suorittaa YCB/NH₄-alustalla, johtuen luultavasti asetyyli-CoA-syntetaasin voimakkaasta hiilikataboliittirepressiosta. Noissa tapauksissa on onnistuneesti käytetty YNB-galaktoosi/NH₄-

25 alustaa (tämä alusta on sama kuin esimerkissä 9 kuvailtu YNB-lac/NH₄ mutta sisältää 1 % galaktoosia 1 % laktoosin asemesta), joka sisältää lisäksi 10 mM fluoriasetamidia vastavali-

koointia varten.

Esimerkki 13

30 K. lactis -geenin merkkigeenivapaa deleetio käyttäen amdS-markkeria

Usein käytetty tekniikka hiivageenien manipuloimiseksi on "yksivaiheinen geenin ositus", menetelmä, jonka avulla on

35 mahdollista jakaa geenit useaan osaan (modifioida) yhdessä transformaatiovaiheessa (Rothstein et al. (1983) Methods Enzymol. 101, 202-211). Tässä menetelmässä transfor-

moiva plasmidi, joka sisältää kopion kohdegeenistä hiivan valikoitavan markkerin osiin jakamana, integroituu hiivagenomiin kaksinkertaisen tekijäinvaihdon käsittävän homologisen rekombinaation kautta, mistä on seurauksena vil-
5 lityypin kohdegeenin korvautuminen ositetulla kopiolla. amdS⁺-hiivatransformanttien "yksivaiheisen geeniosituksen" ja fluoriasetamidivastavaikeisuuden yhdistelmän avulla, kuten esimerkissä 12 on kuvailtu, tulisi olla mahdollista poistaa geenejä hiivagenomeista jättämättä
10 jäljelle valikoitavia markkereita. Tässä esimerkissä on käytetty tätä yhdistelmää LAC4-geenin poistamiseksi K. lactis CBS 2360 -genomista. K. lactisin LAC4 geenin yksivaiheista geeninvaihtoa varten konstruointiin plasmidi pGBamdS6 (kuviokuva 38), joka sisältää amdS-ekspressiokasetin
15 LAC4-promoottorin ja terminaattorisekvenssien vieressä. Ylimääräinen LAC4-terminaattorifragmentti on läsnä suoraan amdS-ekspressiokasetin yläpuolella siten, että amdS-ekspressiokasetin vieressä on suoria toistojaksoja, joiden avulla on mahdollista leikata amdS-sekvenssejä K. lactis
20 lactis -genomista näiden suorien toistojaksojen välisen intrakromosomaalisen rekombinaation avulla. Plasmidi pGBamdS6 pilkottiin SpeI:llä ja HindIII:lla, ja 6,6 kb DNA-fragmentti eristettiin geelielektroforesoinnin jälkeen. Tätä SpeI-HindIII-fragmenttia, joka sisälsi geenin
25 vaihtovektorin, käytettiin K. lactis CBS 2360:n transformointiin käyttäen esimerkissä 10 kuvailtuja menetelmiä. amdS⁺-transformantteja siirrostettiin YEPD-maljoille, jotka sisälsivät 0,008 % X-gal:a (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galaktopyranosidiä), korvatus LAC4-geenin
30 sisältävien transformanttien seulomiseksi.

amdS⁺-transformantit analysoitiin Southern-blottauksen avulla. Suurimolekyylipainoista DNA:ta eristettiin, pilkottiin HindIII:lla, erotettiin sen jälkeen elektrofo-
35 resoimalla 0,7 %:isella agarosigeelillä ja blotattiin nitroselluloosakalvolle. Koettimena käytettiin plasmidista pPTLAC4 (kuviokuva 8) eristettyä ³²P-leimat-

tua 600 bp XbaI LAC4 -terminaattorifragmenttia. Tulokset, koskien amdS⁺ CBS 2360 -transformanttia, jonka LAC4-geeni oli poistettu, samoin kuin vertailukantaa CBS 2360, esitetään kuviossa 44. amdS⁺ CBS 2360 -transformantin ollessa kysymyksessä, 7,4 kb hybridisoituva fragmentti on läsnä, mikä osoittaa asianmukaisesti poistetun LAC4-geenin. Vertailukannassa CBS 2360 esiintyy 2,0 kb hybridisoituva fragmentti, joka edustaa käsittelemätöntä LAC4-lokusta.

10

Näiden amdS⁺-transformanttien seuraava fluoriasetamidivastavaliointi, jota esimerkissä 12 on kuvailtu, tuotti rekombinantteja, joilla oli amdS⁻-fenotyyppi. amdS⁻-rekombinanttien kromosomaalisesta DNA:sta tehtiin Southern-analyysi. Suurimolekyylipainoista DNA:ta eristettiin, pilkottiin HindIII:lla, erotettiin sen jälkeen 0,7 %:lla agarosigeelillä ja blotattiin nitroselluloosalle. Samaa edellä kuvailtua ³²P-leimattua koetinta käytettiin. Tulokset amdS⁻ CBS 2360 -rekombinanteista on esitetty kuviossa 44. amdS⁻-rekombinanttien ollessa kysymyksessä, 5,4 kb hybridisoituva fragmentti on läsnä, mikä varmisti sen, että LAC4-geeni puuttui, samoin kuin amdS-markkerin asianmukaisen poistumisen hiivagenomista. amdS-markkerin puuttuminen näistä K. lactis LAC4⁻-kannoista tarjoaa mahdollisuuden käyttää amdS-markkeria uudelleen geenien lisädeleetioita ja/tai modifikaatioita varten.

25

Esimerkki 14

Geenin merkkigeenivapaa liittämisen K- lactiksen genomiin käyttäen amdS-markkeria

30

Geenien merkkigeenivapaassa liittämisessä hiivagenomiin on käytetty kymosiinin cDNA:ta malligeeninä. Tässä esimerkissä kymosiinin cDNA on liitetty K. lactiksen LAC4-lokukseen, samalla kun LAC4-geeni on vaihdettu ja jättämättä valintamarkkeria. Markkerivapaan geeni-insertion periaate on sama kuin geenien merkkivapaassa deleetiossa,

35

jota esimerkissä 13 kuvailtiin, paitsi että tässä tapauksessa vaihtovektori pGBamdS8 sisältää kiinnostuksen kohteena olevan geenin, kymosiinin cDNA:n (kuvio 40). Plasmidi pGBamdS8 pilkottiin SpeI:llä ja HindIII:lla ja 8,0 kb DNA-fragmentti eristettiin geelillä. 10 µg tätä fragmenttia transformoitiin K. lactis CBS 2360:een kuten esimerkissä 10 on kuvailtu. amdS⁺-transformantteja saatiin aikaan, joiden LAC4-geeni oli poistunut ja kymosiiniaktiivisuus saavutettu. Kymosiinin aktiivisuus määritettiin kuten on kuvailtu (van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8, 135-139). Sen jälkeen näitä transformantteja vastavalkoitiin fluoriasetamidilla kuten esimerkissä 12 on kuvailtu, amdS⁻-fenotyyppisiä rekombinantteja eristettiin, mutta jotka yhä tuottivat kymosiinia. amdS⁻, kymosiini⁺ rekombinanttien kromosomaalisen DNA:n Southern-analyysi varmisti LAC4-geenin korvautumisen kymosiinin cDNA:lla samoin kuin amdS-markkerin asianmukaisen poistumisen K. lactisen genomista. Näiden rekombinanttien amdS/kymosiini⁺-fenotyyppi varmistettiin myös kasvun puuttumisella YCB/asetamidimaljoilla ja kymosiiniaktiivisuuden avulla (tarkemmin edellä). Näiden rekombinanttien amdS-fenotyyppi mahdollistaa näiden kantojen jatkokmanipuloinnin käyttäen amdS-markkeria, esim. kymosiinin ekspressiokasetin lisäkopioiden integroinnin ja/tai K. lactis -geenien deleetion kuten esimerkissä 13 on kuvailtu.

Esimerkki 15

Bacillusten ja E. colin amdS-fenotyypin testaus

Edellytys amdS-valintasysteemin käytölle Bacilluksissa on se, että nämä gram-positiiviset bakteerit eivät sisällä asetamidaasiaktiivisuutta. Tämän testaamiseksi B. subtilis BS-154 -kanta (CBS 363.94) maljattiin Bacilluksen minimaalialustalle, joka sisälsi kaikki välttämättömät ravinteet ja vitamiinit paitsi typenlähdettä (28,7 mM K₂HPO₄:a, 22 mM KH₂PO₄:a, 1,7 mM natriumsitraattia, 0,4 mM MgSO₄:a, 0,75 µM MnSO₄:a, 0,5 % (paino/tilavuus) glukoosia

ja 1,5 % agarია. Tällä alustalla ei sellaisenaan havaittu mitään kasvua, tai kun siihen oli lisätty asetamidia tyypenlähteeksi. Kasvua havaittiin vain siinä tapauksessa, että minimaalialusta sisälsi lisäksi joko 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:a tai 20 mM KNO_3 :a tyypenlähteeksi. Johtopäätöksenä on se, että Bacillus BS-154:stä (CBS 363.94) puuttuu riittävä asetamidaasiaktiivisuus kasvun ylläpitämiseksi asetamidi ainoana tyypenlähteenä. Tämän ilmiön tulisi mahdollistaa A. nidulansin amdS-geenin käyttö valintamarkkerina gram-positiivisissa bakteereissa.

Vastaavalla tavalla on testattu asetamidaasiaktiivisuuden puuttuminen gram-negatiivisesta bakteerista, tässä tapauksessa E. colista, sen osoittamiseksi, voidaanko A. nidulansin amdS-geeniä käyttää valintamarkkerina myös näissä mikro-organismeissa. Tässä tapauksessa käytettiin M9-minimaalialustaa (Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratories, Cold Spring Harbour, New York), joka sisälsi lisäksi 0,02 μg (paino/tilavuus) tiamiinia. Täysin kasvanneita E. coli JM109:n pesäkkeitä todettiin siirrostettaessa M9-maljoille. Mitään kasvua ei kuitenkaan havaittu tai vain heikkoa taustakasvua, kun NH_4Cl jätettiin pois M9-maljoilta tai korvattiin 20 mM asetamidilla. Johtopäätöksenä on se, että E. coli JM109 -kannasta puuttuu riittävä asetamidaasiaktiivisuus ylläpitämään kasvua asetamidaasi ainoana tyypenlähteenä. Tämän tulisi mahdollistaa A. nidulansin amdS-geenin käyttö valintamarkkerina myös gram-negatiivisissa bakteereissa.

30

Esimerkki 16

amdS-ekspressiovektoreiden konstruointi bakteereissa käyttöä varten

pGBamdS22:n konstruointi

35

A. nidulansin amdS-geenin ilmentämiseksi eri Bacillus-lajeissa amdS cDNA pamdS-1:stä on kloonattu Bacilluksen

ekspression perusvektoriin pBHA-1 (EP-patenttihakemus 89201173.5; fyysinen kartta kuviossa 45). amdS cDNA -geenin ATG-aloituskodonin kohtaan toimitettiin NdeI-kohta pamdS-1:ssä käyttäen oligonukleotidejä AB3825 (SEKVENSSI ID NO:36) ja AB3826 (SEKVENSSI ID NO:37), joilla on seuraavat sekvenssit:

Oligo AB3825 (SEKVENSSI ID NO:36):

5'-CGCGCTTATCAGCGGCCAGTTCTCCAGGATTGAGGCATATGT-3'

10

Oligo AB3826 (SEKVENSSI ID NO:37):

5'-CTAGACATATGCCTCAATCCTGGGAAGAACTGGCCGCTGATAAG-3'

Näiden oligonukleotidien pariuttaminen suoritettiin käyttäen vakiomenetelmiä. Tuloksena saatu kaksijuosteinen DNA-fragmentti liitettiin BssHII/XbaI:llä pilkottuun pamdS-1:een ja siirrettiin E. coliin. Yhdestä transformantista eristettiin pGBamdS21 ja karakterisoitiin restriktioentsyymianalyysin avulla (kuvio 47). pGBamdS21 pilkottiin KpnI:llä ja HindIII:lla, ja amdS cDNA:n sisältävä fragmentti kloonattiin KpnI:llä ja HindIII:lla pilkottuun pBHA-1:een. Tuloksena saatu plasmidi sai tunnuksen pGBamdS22 (kuvio 48).

25 pGBamdS25:n konstruointi

Halutun DNA-sekvenssin paikkaspesifisen integroitumisen osoittamiseksi B. licheniformiksen genomiin, käyttäen amdS-geeniä valintamarkkerina, amdS cDNA kloonattiin ekspressio/integroitivvektoriin pLNF (kuvio 46). Tämä vektori, joka sisältää B. licheniformiksen amylaasigeenin 5' ja 3' ei-koodittavat sekvenssit, mahdollistaa paikkaspesifisen integraation vastaavaan kromosomaaliseen amylaasilokukseen. pGBamdS21 (kuvailtu edellä, kuvio 47) pilkottiin NdeI:llä ja PvuII:lla ja amdS cDNA:n sisältävä fragmentti ligoitiin NdeI:llä ja ScaI:llä pilkotun pLNF:n kanssa. Ligaatioseos transformoitiin B. subtilis BS-

35

154:ään (CBS 363.94). Transformantit valikoitiin minimaalialustalla, joka sisälsi lisäksi 20 µg/ml neomysiiniä. Yhdestä transformantista, tunnuksella BAA-101, eristettiin plasmidi pGBamdS25 (kuvio 50).

5

pGBamdS41:n konstruointi

A. nidulansin amdS cDNA:n ilmentämiseksi E. colissa käytettiin pTZ18R/N:a, pTZ18R:n johdannaista, jota kuvailaan EP-patenttihakemuksessa 0 340 878 A1. pTZ18R/N eroaa pTZ18R:stä siten, että NdeI-kohta muodostettiin lacZ-lukekehäyksen ATG-aloituskodonin kohdalle pTZ18R:ssä käyttäen in vitro paikkakohdennettua mutatoointia. pGBamdS21 pilkottiin NdeI:llä ja HindIII:lla ja geelillä eristetty, amdS cDNA:n sisältävä fragmentti liitettiin NdeI:llä ja HindIII:lla pilkottuun pTZ18R/N:ään. Tätä ligaatioseosta käytettiin E. coli JM109:n transformointiin ja yhdestä transformantista eristettiin pGBamdS41 (kuvio 51).

20

Esimerkki 17

Bacillusten transformointi käyttäen amdS-geeniä valintamarkkerina

E. coli -sekvenssien poistamiseksi pGBamdS22:sta ja "hpa2"-promoottorin sijoittamiseksi välittömästi amdS cDNA:n yläpuolelle, pGBamdS22 pilkottiin NdeI:llä, tehtiin uudelleen renkaanmuotoiseksi ligoimalla ja käytettiin B. subtilis BS-154:n (CBS 363.94) transformointiin. Transformantteja valikoitiin asetamidiminimaalialjoilla ja neomysiiniresistenssi tarkistettiin. Yhdestä näistä transformanteista eristettiin ekspressiovektori pGBamdS23 (kuvio 49) ja karakterisoitiin restriktioentsyymianalyysin avulla. Nämä tulokset osoittavat, että 1) A. nidulansin amdS cDNA ilmentyy hyvin Bacillus-promoottorisekvenssin ohjauksessa ja 2) että amdS-geeniä voidaan käyttää valintamarkkerina Bacillusten transformaatiassa.

35

B. licheniformis T5 (CBS 470.83) transformoitiin vektorilla pGBamdS25. Transformointi suoritettiin kuten koemenetelmät-jaksossa on kuvailtu ja amdS⁺-transformanteja saatiin suoran valikoinnin avulla modifioituilla protoplastien regenerointimaljoilla, jotka sisälsivät lisäksi 20 mM asetamidia ainoana typenlähteenä (kuvailtu koemenetelmät-jaksossa). pGBamdS25:n läsnäolo transformanteissa varmistettiin niiden neomysiiniresistenssifenotyypin avulla samoin kuin sillä tosiseikalla, että plasmidi voitiin eristää uudelleen transformanteista.

Yhtä näistä transformanteista, tunnuksella BAA-103, käytettiin plasmidin pGBamdS25 integraation aikaansaamiseksi B. licheniformiksen genomiin, kohdistettuna amylaasilokukseen. Plasmidin integrointi suoritettiin kasvattamalla transformanteja 50°C:ssa minimaalialusta-agarilla, joka sisälsi asetamidin ainoana typenlähteenä. Useita pesäkkeitä siirrettiin toistuvasti (2-3 kertaa) tuoreille maljoille ja sitten inkuboitiin 50°C:ssa. Eristetyistä pesäkkeistä testattiin niiden kyky kasvaa asetamidi ainoana typenlähteenä ja neomysiiniresistenssi pitoisuudessa 1 µg/ml. Itsenäisesti replikoituvan plasmidin DNA:n puuttuminen osoitettiin integranteista eristetyn DNA:n uudelleentransformoinnin avulla. Neomysiiniresistenttejä pesäkkeitä ei saatu.

Tämä tulos on selvä osoitus siitä, että amdS-geeni on sopiva markkeri Bacillus-lajien valikointiin, jotka sisältävät yhden amdS-geenikopion.

30

Esimerkki 18

E. coli transformointi käyttäen amdS-geeniä valintamarkkerina

35 E. coli JM109 transformoitiin vektorilla pGBamdS41 käyttäen vakiomenetelmiä. Valikoinnit suoritettiin joko M9-maljoilla, jotka sisälsivät lisäksi 0,02 µg/ml tiamiinia

ja 50 µg/ml ampisilliiniä, tai M9-maljoilla ilman am-
moniakkia mutta lisäyksenä 20 mM asetamidia, 0,02 µg/ml
tiamiinia ja 0,05 mM IPTG:tä. Useita amdS⁺/ampisil-
liiniresistenttejä transformantteja saatiin, joista
5 pGBamdS41 voitiin eristää uudelleen. Transformaatiofre-
kvenssit, käyttäen valikointia ampisilliinillä tai aseta-
midilla, olivat vertailukelpoiset. Tämä osoittaa, että A.
nidulansin amdS-geeni on toiminnallinen markkeri myös
gram-negatiivisten bakteerien transformaatioon.

10

Esimerkki 19

amdS⁺-bakteeritransformanttien fluoriasetamidivastavali- kointi

15 Bakteeristen amdS⁺-transformanttien vastavaliointi käyt-
tären fluoriasetamidia edellyttää asetyyli CoA-synte-
taasientsyymin aktiivisuutta fluoriasetaatin muuntamiseksi
fluoriasetyyli-CoA:ksi. Asetyyli-CoA-syntetaasin katabo-
liittirepression välttämiseksi, jota on havaittu E.
20 colissa (Brown et al., 1977), bakteerisia amdS⁺-transfor-
mantteja tai yksikopioisia integrantteja kasvatettiin
synteettisillä alustoilla, jotka sisältävät NH₄Cl:n typen-
lähteenä ja asetaatin hiilen- ja energianlähteenä.

25 Monelta organismilta, mukaan lukien B. subtilis (Freese,
E. ja Fortnagel, P. (1969) J. Bacteriol. 90, 745-756),
puuttuu toiminnallinen glyoksylaattisivureitti ja sen
vuoksi ne metaboloivat asetaattia vain, kun alustaan on
lisätty TCA-syklin välituotelähde, kuten esim. glutamaat-
30 tia tai sukkiniaattia. Bacillus amdS⁺ -kantoja kasvatet-
tiin TSS-alustalla, joka sisälsi 0,01 % glutamaattia ja
50 mM asetaattia kuten Grundy et al. (1993) ovat kuvail-
leet, Molecular Microbiology 10, 259-271. Tähän agarilla
jähmetettyyn alustaan lisättiin fluoriasetamidia pitoi-
35 suusalueella 1-50 mM. B. subtilis BAA-101 tai B. licheni-
formis BAA-103 (yksikopiointegrantti) siirrostettiin
tiheydessä 10² solua maljaa kohti. Tietyissä fluoriasetami-

dipitoisuudessa vain muutama pesäke tuli näkyviin.
pGBamdS25:n puuttuminen näistä pesäkkeistä osoitettiin
analysoimalla plasmidi-DNA ja kromosomaalinen DNA, neomy-
siiniherkkyydellä ja kyvyttömyydellä kasvaa asetamidi
5 ainoana typenlähteenä. BAA-103:n vastavalikointi joissain
tapauksissa johti amylaasigeenin menetykseen, mikä osoi-
tettiin aktiivisuusmäärityksillä ja Southern-blottauksil-
la. Tämä osoittaa, että fluoriasetamidivastavalikointia
voidaan käyttää amdS-solujen seulontaan populaatiosta,
10 joka käsittää enimmäkseen amdS⁺ Bacillus -soluja, ja
spesifisen kohdegeenin samanaikaiseen poistamiseen.

Vastaavalla tavalla on käytetty minimaalialustaa #132,
jota ovat kuvailleet Vanderwinkel, E. ja De Vlieghere,
15 M., European J. Biochem., 5 (1968) 81-90, joka sisälsi
lisäksi fluoriasetamidia pitoisuusalueella 1-50 mM ja
0,05 mM IPTG:tä amdS⁻ E. coli JM109 -solujen valikoimisek-
si pGBamdS41-transformanttipopulaatiosta. Soluja siirros-
tettiin tiheydessä 10² solua maljaa kohti. Tietyssä fluo-
20 riasetamidipitoisuudessa vain muutama pesäke tuli näky-
viin. pGBamdS41:n puuttuminen fluoriasetamidilla seulo-
tuista pesäkkeistä varmistettiin DNA:n eristämällä,
ampisilliiniherkkyydellä ja kyvyttömyydellä kasvaa asea-
midi ainoana typenlähteenä. Tämä osoittaa, että fluo-
25 riasetamidivastavalikointia voidaan käyttää amdS⁻-solujen
valikoimiseen populaatiosta, joka sisältää enimmäkseen
amdS⁺ E. coli -soluja.

SEKVENSSILISTAUS:

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:

- (A) NIMI: Gist-brocades N.V.
- (B) KATU: Wateringseweg 1
- (C) KAUPUNKI: Delft
- (E) MAA: Alankomaat
- (F) POSTINUMERO (ZIP): 2611 XT

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Valintamerkkigeenittömät rihmasienikannat, menetelmä niiden valmistamiseksi, ja näiden kantojen käyttö

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 37

(iv) KONEKODIMUOTO:

- (A) VÄLINETYYPPI: Levyke
- (B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
- (D) OHJELMISTO: Patentin julkaisulupa #1, versio #1.25 (EPO)

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 26 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

- (B) KLOONI: AB3100

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1
CTAATCTAGA ATGCCTCAAT CCTGAA

26

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 28 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3101
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2
GACAGTCGAC AGCTATGGAG TCACCACA 28
- (2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 16 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: ei
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: TN0001
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3
TGCATTAAGT AGTTAA 16
- (2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB2154
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4
AACCATAGGG TCGACTAGAC AATCAATCCA TTTCG 35
- (2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: KYLLÄ

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB2155

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5

GCTATTTCGAA AGCTTATTCA TCCGGAGATC CTGAT

35

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB2977

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6

TATCAGGAAT TCGAGCTCTG TACAGTGACC

30

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 36 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: KYLLÄ

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB2992

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7

GCTTGAGCAG ACATCACCAT GCCTCAATCC TGGGAA

36

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 36 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: ei
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB2993
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8
TTCCCAGGAT TGAGGCATGG TGATGTCTGC TCAAGC 36
- (2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: kyllä
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB2994
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9
CTGATAGAAT TCAGATCTGC AGCGGAGGCC TCTGTG 36
- (2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: ei
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3657
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:10
AGCTTGACGT CTACGTATTA ATGCGGCCGC T 31
- (2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3658

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:11
TCGAAGCGGC CGCATTATA CGTAGACGTC A

31

(2) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 23 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3779

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:12
AATTGGGGCC CATTAACG AGC

23

(2) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 23 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3780

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:13
AATTGCTCGA GTTAATGGGC CCC 23

(2) SEKVENSSIN ID NO:14 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3448

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:14
GTGCGAGGTA CCACAATCAA TCCATTTCCG 30

(2) SEKVENSSIN ID NO:15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3449

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:15
ATGGTTCAAG AACTCGGTAG CCTTTTCCTT GATTCT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO:16 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3450

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:16
AGAATCAAGG AAAAGGCTAC CGAGTTCTTG AACCAT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO:17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 42 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3520

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:17
ATCAATCAGA AGCTTTCTCT CGAGACGGGC ATCGGAGTCC CG 42

(2) SEKVENSSIN ID NO:18 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 18 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3781

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:18
AATTGGGGCC CAGCGTCC 18

(2) SEKVENSSIN ID NO:19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 18 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: kyllä
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3782
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:19
AATTGGACGC TGGCCCC 18
- (2) SEKVENSSIN ID NO:20 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 43 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: ei
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3746
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:20
TGACCAATAA AGCTTCTCGA GTAGCAAGAA GACCCAGTCA ATC 43
- (2) SEKVENSSIN ID NO:21 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 47 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iii) ANTI-SENSE: kyllä
- (vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3747
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:21
CTACAAACGG CCACGCTGGA GATCCGCCGG CGTTCGAAAT AACCAGT 47
- (2) SEKVENSSIN ID NO:22 TIEDOT:
- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 26 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB4234

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:22
GAAGACCCAG TCAAGCTTGC ATGAGC

26

(2) SEKVENSSIN ID NO:23 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 43 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB4235

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:23
TGACCAATTA AGCTTGCGGC CGCTCGAGGT CGCACCGGCA AAC

43

(2) SEKVENSSIN ID NO:24 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 69 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB4236

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:24
 TGACCAATAA AGCTTAGATC TGGGGGTGAT TGGGCGGAGT GTTTTGCTTA
 GACAATCAAT CCATTTCGC 69

(2) SEKVENSSIN ID NO:25 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 36 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:

- (B) KLOONI: AB4233

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:25
 TGACCAATAG ATCTAAGCTT GACTGGGTCT TCTTGC 36

(2) SEKVENSSIN ID NO:26 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 32 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

- (B) KLOONI: AB3514

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:26
 CTGCGAATTC GTCGACATGC CTCAATCCTG GG 32

(2) SEKVENSSIN ID NO:27 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 37 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3515

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:27
GGCAGTCTAG AGTCGACCTA TGGAGTCACC ACATTTC 37

(2) SEKVENSSIN ID NO:28 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 50 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3701

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:28
CTGCGAATTC GTCGACACTA GTGGTACCAT TATAGCCATA GGACAGCAAG
50

(2) SEKVENSSIN ID NO:29 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 70 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
(B) KLOONI: AB3700

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:29
GCTCTAGAGC GCGCTTATCA GCTTCCAGTT CTTCCCAGGA TTGAGGCATT
TTTAATGTTA CTTCTCTTGC 70

(2) SEKVENSSIN ID NO:30 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 50 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
 (B) KLOONI: AB3702

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:30
 CTGCGAATTC GTCGACACTA GTGGTACCAT CCTTTTGTG TTTCCGGGTG
 50

(2) SEKVENSSIN ID NO:31 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 70 emäsparia
 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:
 (B) KLOONI: AB3703

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:31
 GCTCTAGAGC GCGCTTATCA GCGGCCAGTT CTTCCCAGGA TTGAGGCATT
 GTATATGAGA TAGTTGATTG
 70

(2) SEKVENSSIN ID NO:32 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 55 emäsparia
 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:
 (B) KLOONI: AB3704

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:32
 GCTCTAGAAG TCGACACTAG TCTGCTACGT ACTCGAGAAT TTATACTTAG
 ATAAG 55

(2) SEKVENSSIN ID NO:33 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 25 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:

- (B) KLOONI: AB3705

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:33
 TGCTCTAGAT CTCAAGCCAC AATTC 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:34 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

- (B) KLOONI: AB3965

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:34
 CTGCTACGTA ATGTTTTTCAT TGCTGTTTTTA C 31

(2) SEKVENSSIN ID NO:35 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 37 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: kyllä

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3966

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:35
CCGCCAGTC TCGAGTCAGA TGGCTTTGGC CAGCCCC

37

(2) SEKVENSSIN ID NO:36 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 44 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: ei

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3825

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:36
CGCGCTTATC AGCGGCCAGT TCTTCCCAGG ATTGAGGCAT ATGT

44

(2) SEKVENSSIN ID NO:37 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 44 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iii) ANTI-SENSE: KYLLÄ

(vii) ALKUPERÄ:

(B) KLOONI: AB3826

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:37
CTAGACATAT GCCTCAATCC TGGGAAGAAC TGGCCGCTGA TAAG

44

Patenttivaatimukset

1. Vektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää dominoivan, kaksisuuntaisen ja vastavalikoituvan valintamerkkigeenin, jota vierustavat DNA-toistojaksot, jotka mahdollistavat sisäisen rekombinaation rihmasienen genomissa.
5
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että DNA-toistojaksot valitaan genomista poistettavan DNA-sekvenssin 5'- tai 3'-päästä.
10
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että valintamerkkigeeni on asetamidaasigeeni.
- 15 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että asetamidaasigeeni on sieniperäinen.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että asetamidaasigeeni on *Aspergillus*-lajista.
20
6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että vektori sisältää myös halutun DNA-fragmentin.
- 25 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että haluttu DNA-fragmentti sisältää jonkin seuraavista geneettisistä tekijöistä tai niiden yhdistelmiä: geeni, cDNA, promoottori, terminaattori, säätelytekijä, introni, tunnistussekvenssi DNA:ta sitovalle proteiinille,
30 translaation aloituskohta tai restriktiokohta.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että haluttu DNA-fragmentti sisältää sekvenssin, joka koodaa kymosiinia, fytaasia, ksylanaasia, lipaasia, amylaasia,
35 proteaasia tai β -galaktosidaasia.

9. Rekombinantti rihmasieni, joka on transformoitu jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukaisella vektorilla.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen rihmasieni, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään kaksi eri jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukaista vektoria.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen rihmasieni, **tunnettu** siitä, että vektori on integroitunut mainitun rihmasienen genomiin paikkaspesifisen homologisen rekombinaation kautta.

12. Jonkin patenttivaatimuksista 9 - 11 mukainen rihmasieni **tunnettu** siitä, että rihmasieni on Aspergillus, Trichoderma tai Penicillium.

13. Menetelmä valintamerkkigeenittömän rekombinantin rihmasienen aikaansaamiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

- a) haluttu DNA-fragmentti ja dominoiva ja kaksisuuntainen valintamerkkigeeni integroidaan rihmasienen genomiin,
- b) transformantit valikoidaan
- c) valintamerkkigeeni poistetaan rekombinaatiolla valintamerkkigeenin viereisten toistojaksojen välillä
- d) vastavalikoidaan, mikä perustuu valintamerkkigeenin puuttumiseen.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valintamerkkigeenin 5'- tai 3'-puolelle kloonataan sekvenssi, joka muodostaa toistojakson sekvenssin kanssa, joka on sen sekvenssin 3'- tai 5'-puolella, joka poistetaan genomista.

15. Patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että haluttu DNA-fragmentti käsittää jonkin seuraavista geneettisistä tekijöistä, tai niiden yhdistelmiä: geeni, cDNA, promoottori, terminaattori, säätelytekijä, int-

roni, tunnistussekvenssi DNA:ta sitovalle proteiinille, 114481
translaation aloituskohta tai restriktiokohta.

16. Patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukainen menetelmä,
5 **tunnettu** siitä, että kohdat a)-d) toistetaan saadulla
rekombinantilla rihmasienellä käyttäen joko samaa tai eri
haluttua DNA-fragmenttia.
17. Jonkin patenttivaatimuksista 13 - 16 mukainen menetelmä,
10 **tunnettu** siitä, että valintamerkkigeeni on asetamidaasigeeni.
18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, **tunnettu**
sitä, että valintamerkkigeeni on sieniperäinen asetami-
daasigeeni.
15
19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, **tunnettu**
sitä, että valintamerkkigeeni on *Aspergillus*-lajin asetami-
daasigeeni
20. Menetelmä bioaktiivisen tuotteen valmistamiseksi,
20 **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää jonkin
patenttivaatimuksista 13 - 19 mukaisen menetelmän mukaisesti
valmistetun rihmasienen kasvattamisen.
21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu**
25 siitä, että bioaktiivinen yhdiste on proteiini.
22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **tunnettu**
sitä, että bioaktiivinen yhdiste on antibiootti.
30
23. Rihmasienen, joka on valmistettu jonkin
patenttivaatimuksista 13 - 19 mukaisella menetelmällä, käyttö
bioaktiivisen yhdisteen valmistamiseksi.
24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä,
35 että bioaktiivinen yhdiste on proteiini.

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että bioaktiivinen yhdiste on antibiootti.

Patentkrav

1. Vektor, **kännetecknad** därav, att den innehåller en dominerande, dubbelriktad och kontraselektiv selektionsmarkörgen, som är flankerad av DNA-upprepningssekvenser, som möjliggör inre rekombination i genomet av en trådformig svamp.
5
2. Vektor enligt patentkrav 1, **kännetecknad** därav, att DNA-upprepningssekvenserna väljs från 5'- eller 3'-ändan av DNA-sekvensen som ska avslägnas.
10
3. Vektor enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknad** därav, att selektionsmarkörgenen är en acetamidasgen.
15
4. Vektor enligt patentkrav 3, **kännetecknad** därav, att acetamidasgenen härstammar från en svamp.
5. Vektor enligt patentkrav 4, **kännetecknad** därav, att acetamidasgenen är från arten *Aspergillus*.
20
6. Vektor enligt något av patentkraven 1 - 5, **kännetecknad** därav, att vektorn innehåller också ett önskat DNA-fragment.
7. Vektor enligt patentkrav 6, **kännetecknad** därav, att det önskade DNA-fragmentet innehåller något av följande genetiska element eller deras kombinationer: en gen, en cDNA, en promotor, en terminator, ett regleringselement, en intron, en igenkänningssekvens för ett DNA-bindande protein, ett translationsinitieringsställe eller ett restriktionsställe.
25
30
8. Vektor enligt patentkrav 7, **kännetecknad** därav, att det önskade DNA-fragmentet innehåller en sekvens som kodar för kymosin, fytas, xylanas, lipas, amylas, proteas eller β -galaktosidas.
35
9. Rekombinant trådformig svamp som är transformerad med en vektor enligt något av patentkraven 1 - 8.

10. Trådformig svamp enligt patentkrav 9, **kännetecknad** därav, att den omfattar minst två olika vektorer enligt något av patentkraven 1 - 8.

5

11. Trådformig svamp enligt patentkrav 9 eller 10, **kännetecknad** därav, att vektorn har integrerats i genomet av nämnda trådformiga svamp via positionsspecifik homologisk rekombination.

10

12. Trådformig svamp enligt något av patentkraven 9 - 11, **kännetecknad** därav, att svampen är Aspergillus, Trichoderma eller Penicillium.

15 13. Förfarande för att erhålla en selektionsmarkörgenfri rekombinant trådformig svamp, **kännetecknat** därav, att det omfattar följande steg:

- 20 a) ett önskat DNA-fragment och en dominerande och dubbelriktad selektionsmarkörgen integreras i genomet av en trådformig svamp,
- b) transformanter selekteras,
- c) selektionsmarkörgenen avslägnas med rekombination mellan selektionsmarkörgenens flankerande DNA-upprepningssekvenser,
- 25 d) kontraselekteras, som är baserad på avsaknad av en selektionsmarkörgen.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, **kännetecknat** därav, att en sekvens klonas till 5'- eller 3'-sidan av selektionsmarkörgenen, vilken sekvens bildar en upprepningssekvens med en sekvens, som ligger på 3'- eller 30 5'-sidan av sekvensen, som avslägnas från genomet.

15. Förfarande enligt patentkravet 13 eller 14, **kännetecknat** därav, att det önskade DNA-fragmentet omfattar något av 35 följande genetiska element eller deras kombinationer: en gen, en cDNA, en promotor, en terminator, ett regleringselement, en intron, en igenkänningssekvens för ett DNA-bindande

protein, ett translationsinitieringsställe eller ett restriktionsställe.

16. Förfarande enligt patentkravet 13 eller 14, **kännetecknat** därav, att stegen a)-d) repeteras med den erhållna trådformiga svampen med användning av antingen detsamma eller olika önskade DNA-fragment.
17. Förfarande enligt något av patentkraven 13 - 16, **kännetecknat** därav, att selektionsmarkörgenen är en acetamidasgen.
18. Förfarande enligt patentkravet 17, **kännetecknat** därav, att selektionsmarkörgenen är acetamidasgenen härstammande från en svamp.
19. Förfarande enligt patentkravet 18, **kännetecknat** därav, att selektionsmarkörgenen är acetamidasgenen, som är från arten *Aspergillus*.
20. Förfarande för att framställa en bioaktiv produkt, **kännetecknat** därav, att förfarandet omfattar odling av en trådformig svamp producerads med ett förfarande enligt något av patentkraven 13 - 19.
21. Förfarande enligt patentkravet 20, **kännetecknat** därav, att den bioaktiva föreningen är ett protein.
22. Förfarande enligt patentkravet 20, **kännetecknat** därav, att den bioaktiva föreningen är ett antibiotikum.
23. Användning av en trådformig svamp, som har producerats med ett förfarande enligt något av patentkraven 13 - 19, för produktion av en bioaktiv förening.
24. Användning enligt patentkravet 23, **kännetecknad** därav, att den bioaktiva föreningen är ett protein.

25. Användning enligt patentkravet 23, **kännetecknad** ¹¹⁴⁴⁸¹ därav,
att den bioaktiva föreningen är ett antibiotikum.

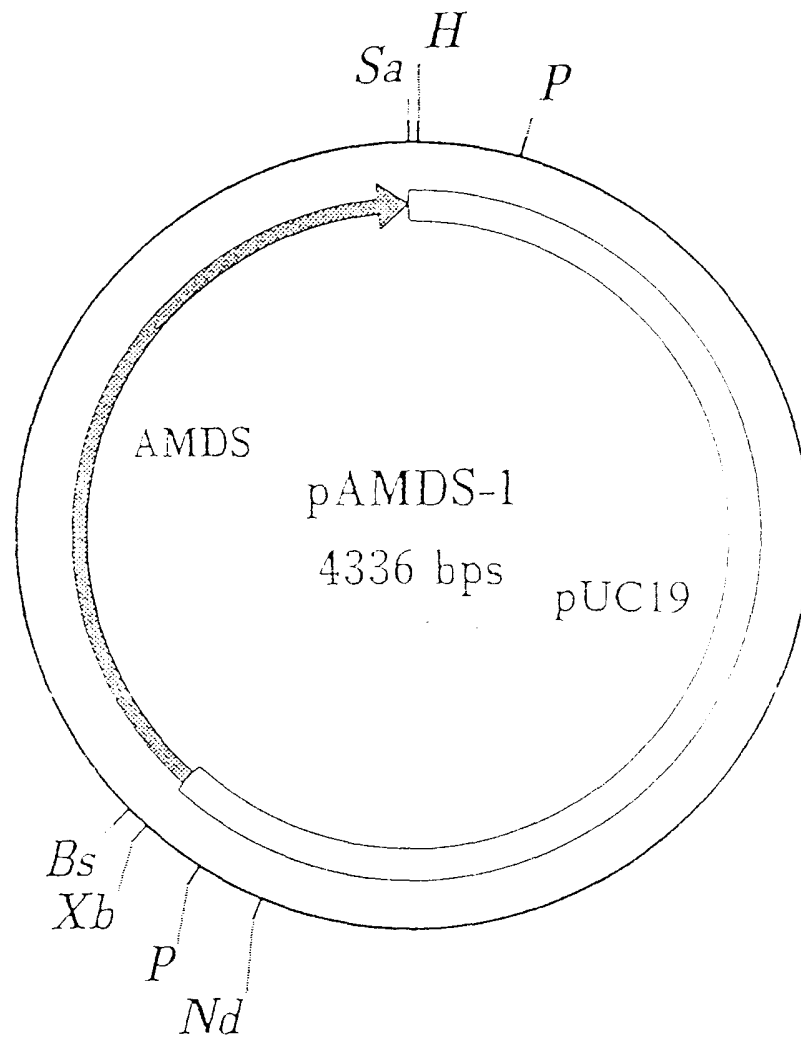
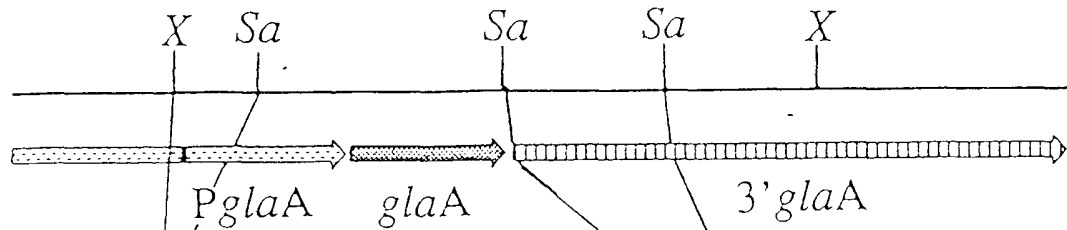
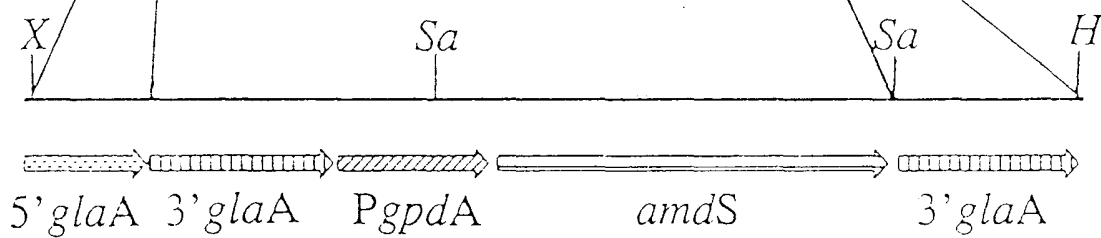


Fig. 1

Genominen *glaA* -lokus

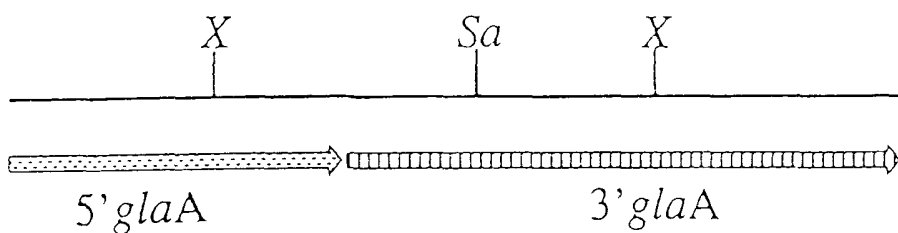


Geeninvaihto kaksinkertaisen tekijäinvaihdon kautta



Geenin vaihtovektori pGBDEL4L

Sisäinen rekombinaatio $3' glaA$ - toistojaksoilla



Genominen typistetty *glaA* -lokus

Fig. 2

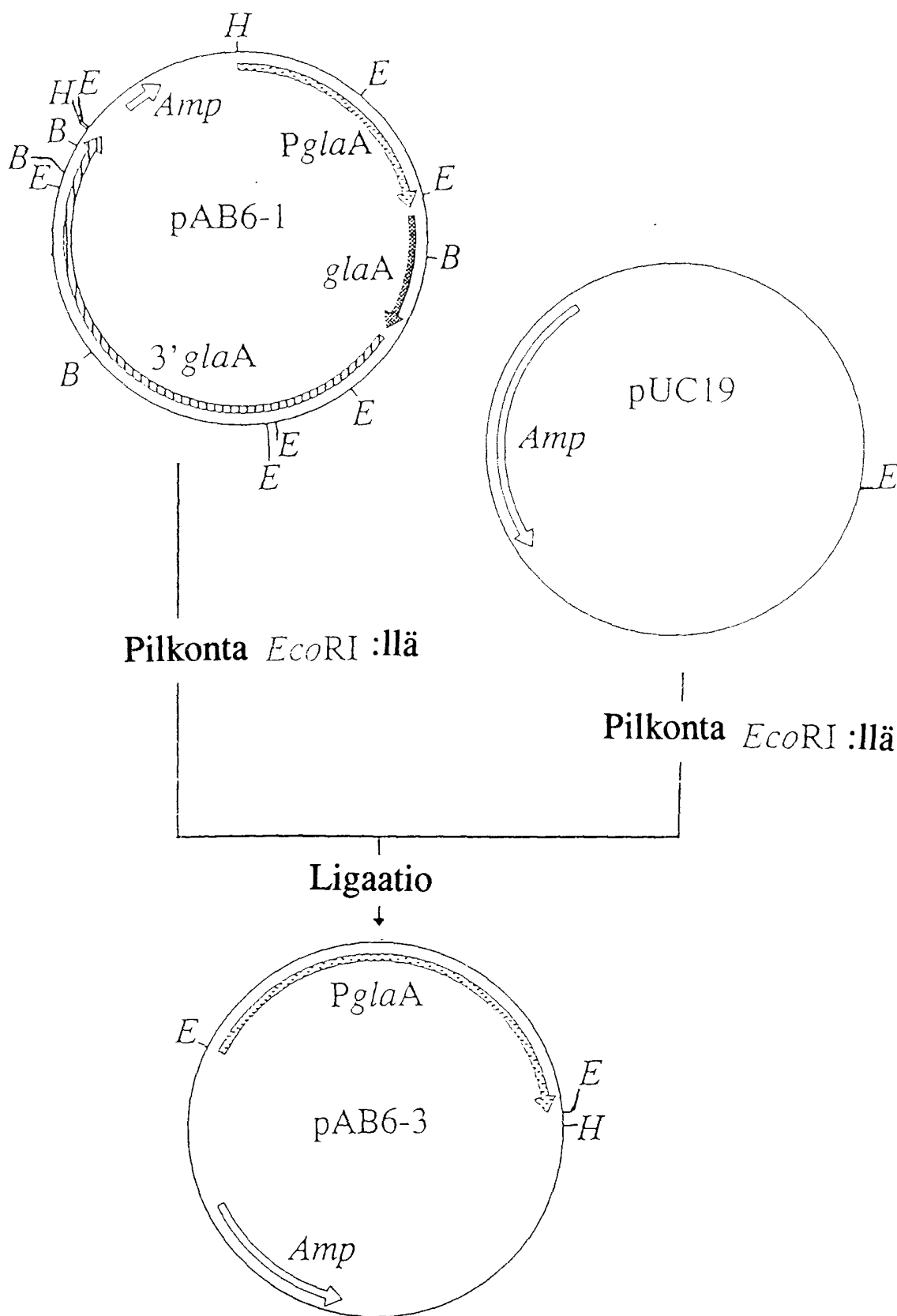


Fig. 3a

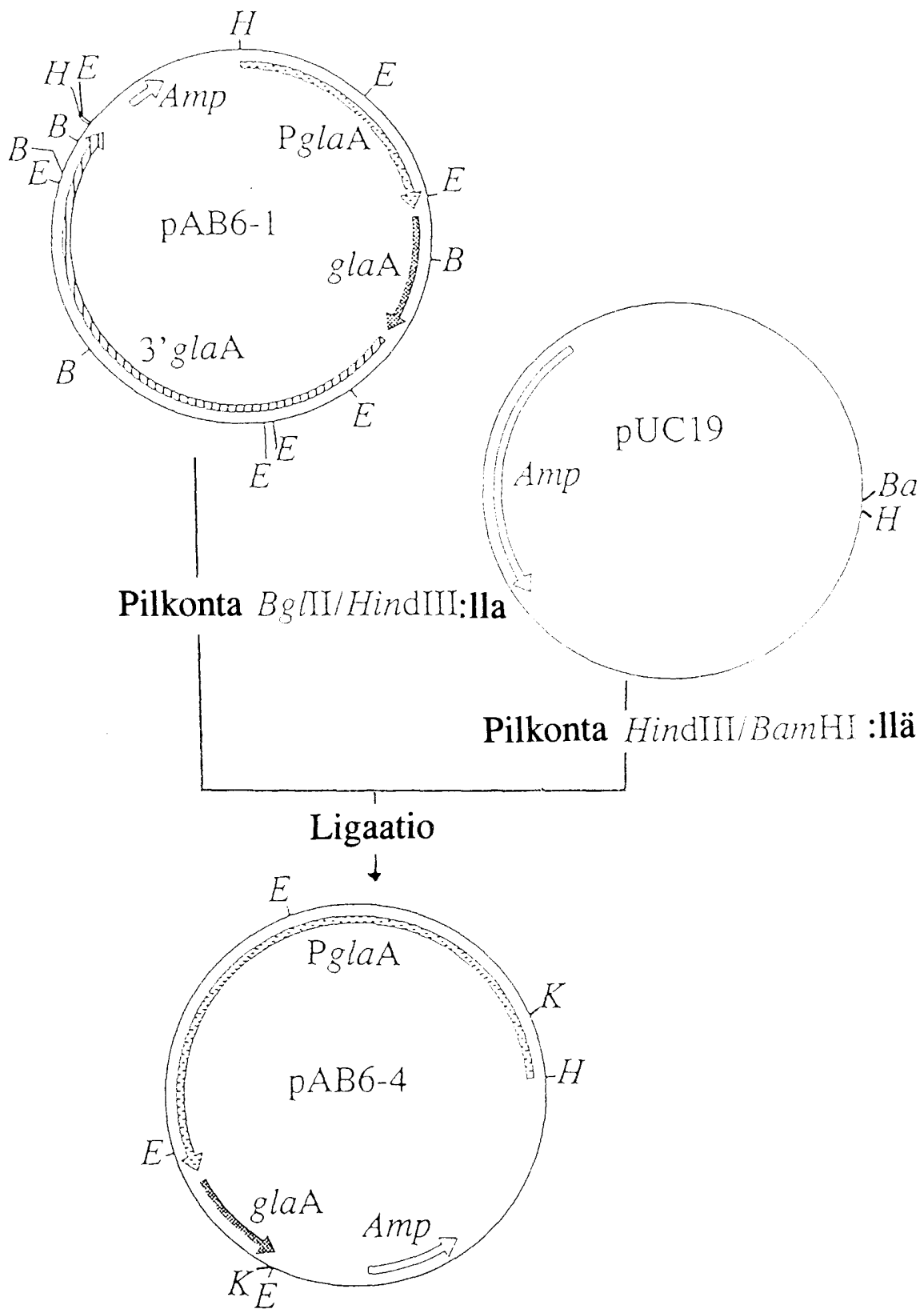


Fig. 3b

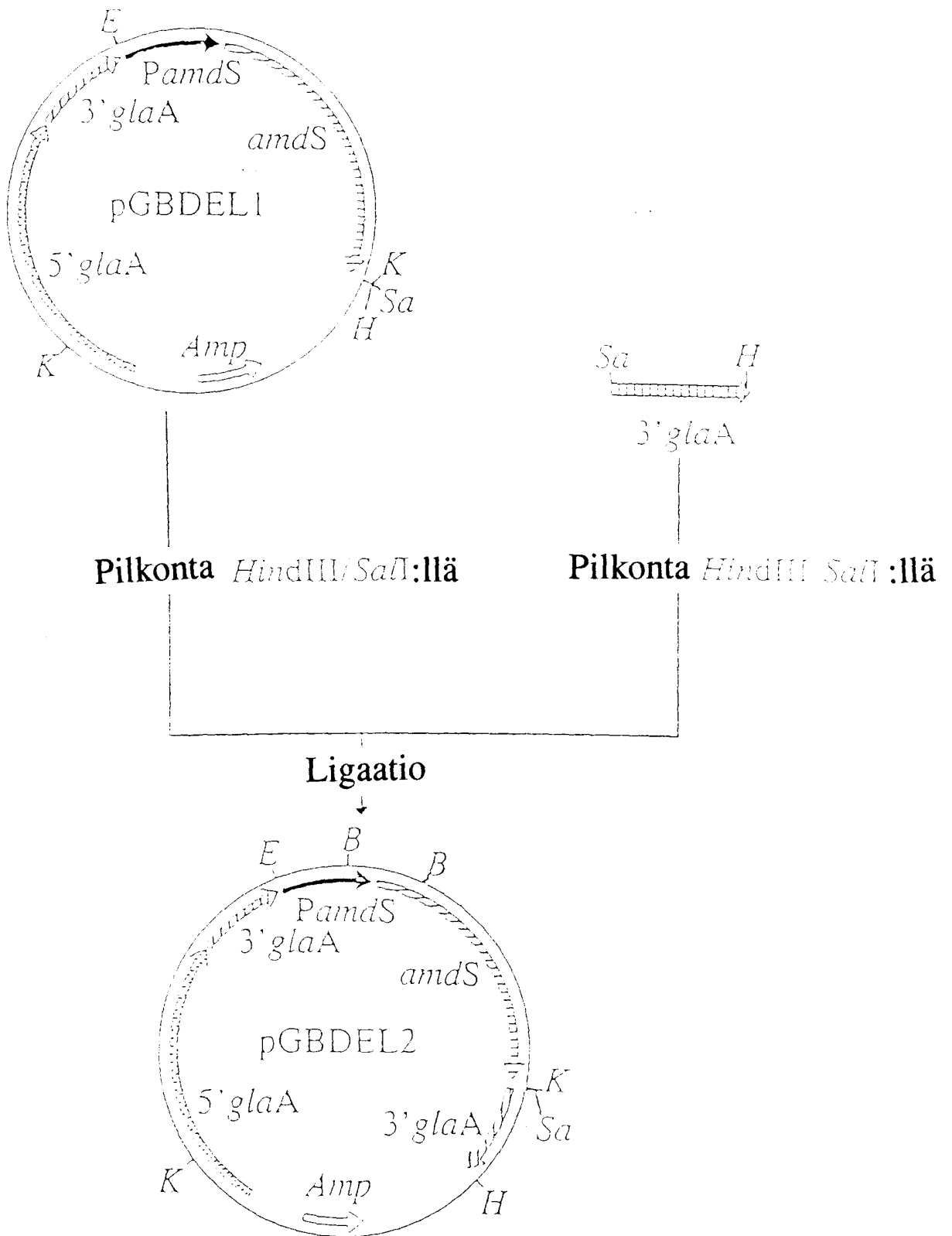


Fig. 4

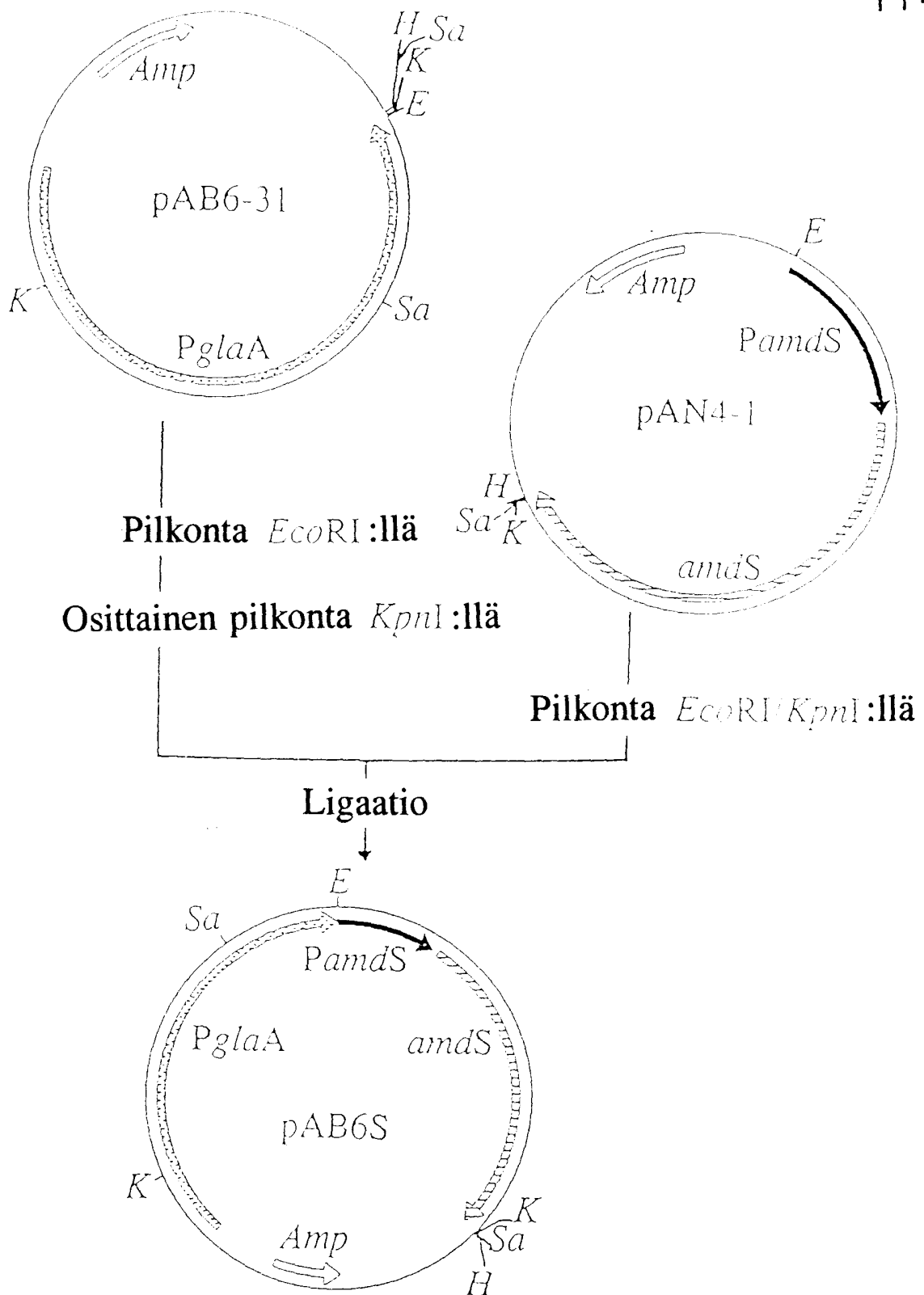


Fig. 5

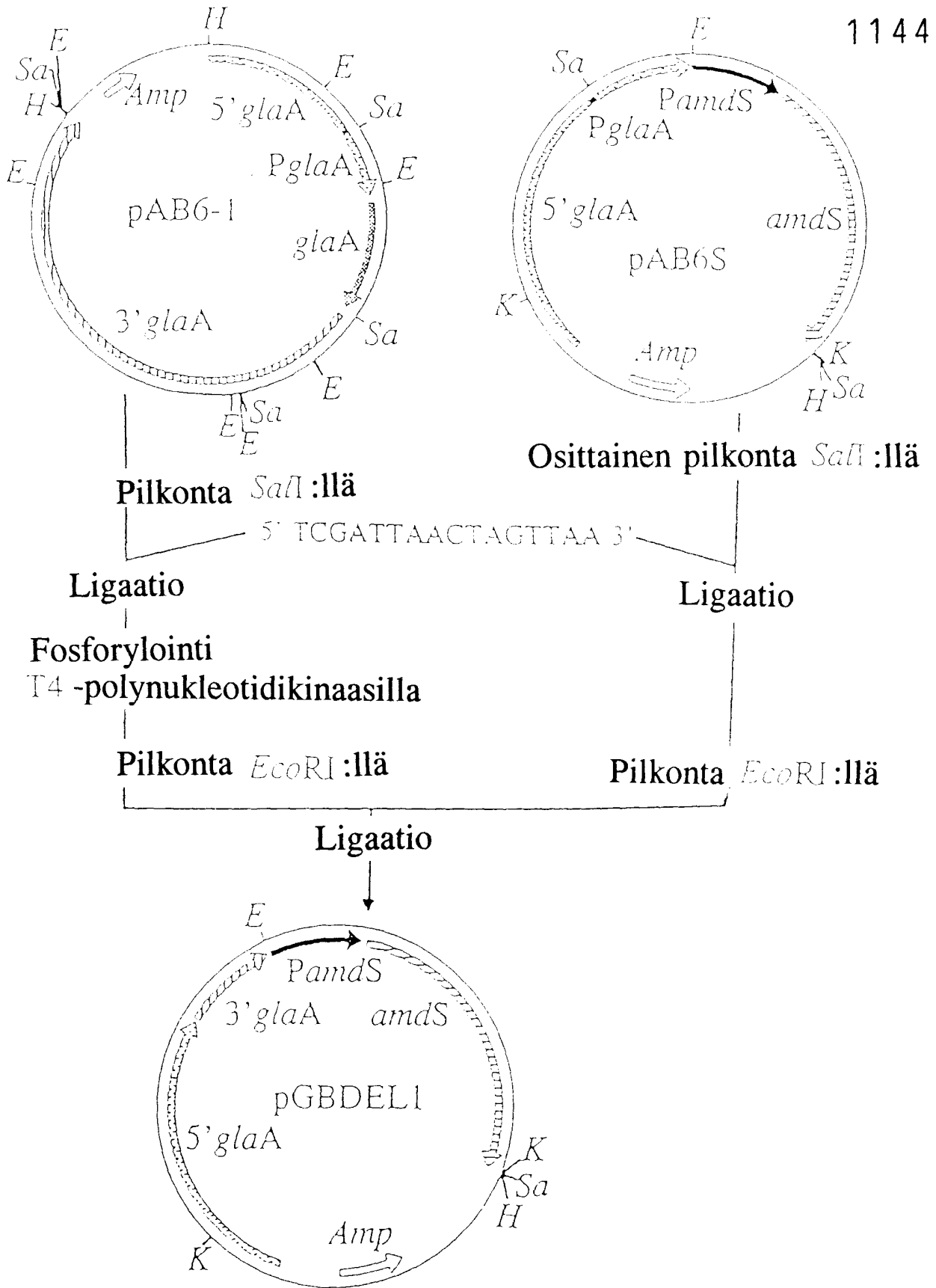
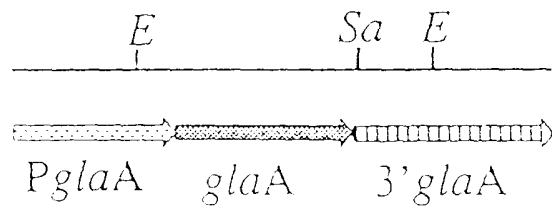


Fig. 6

Osa pAB6-1:stä



↗ ↖
 AB2154 AB2155

PCR

Alukkeet AB2154
AB2155

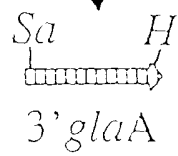


Fig. 7a

9/61

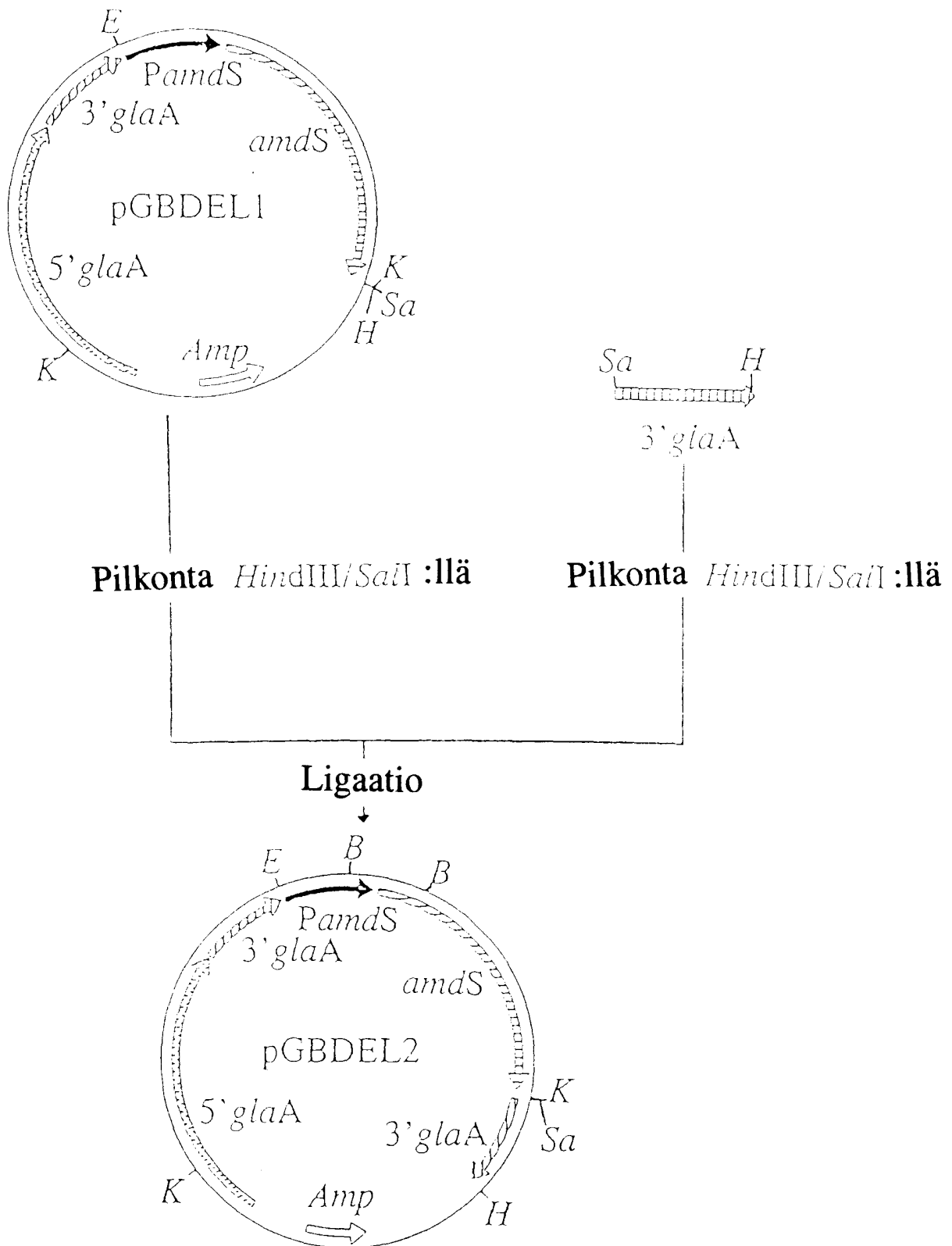


Fig. 7b

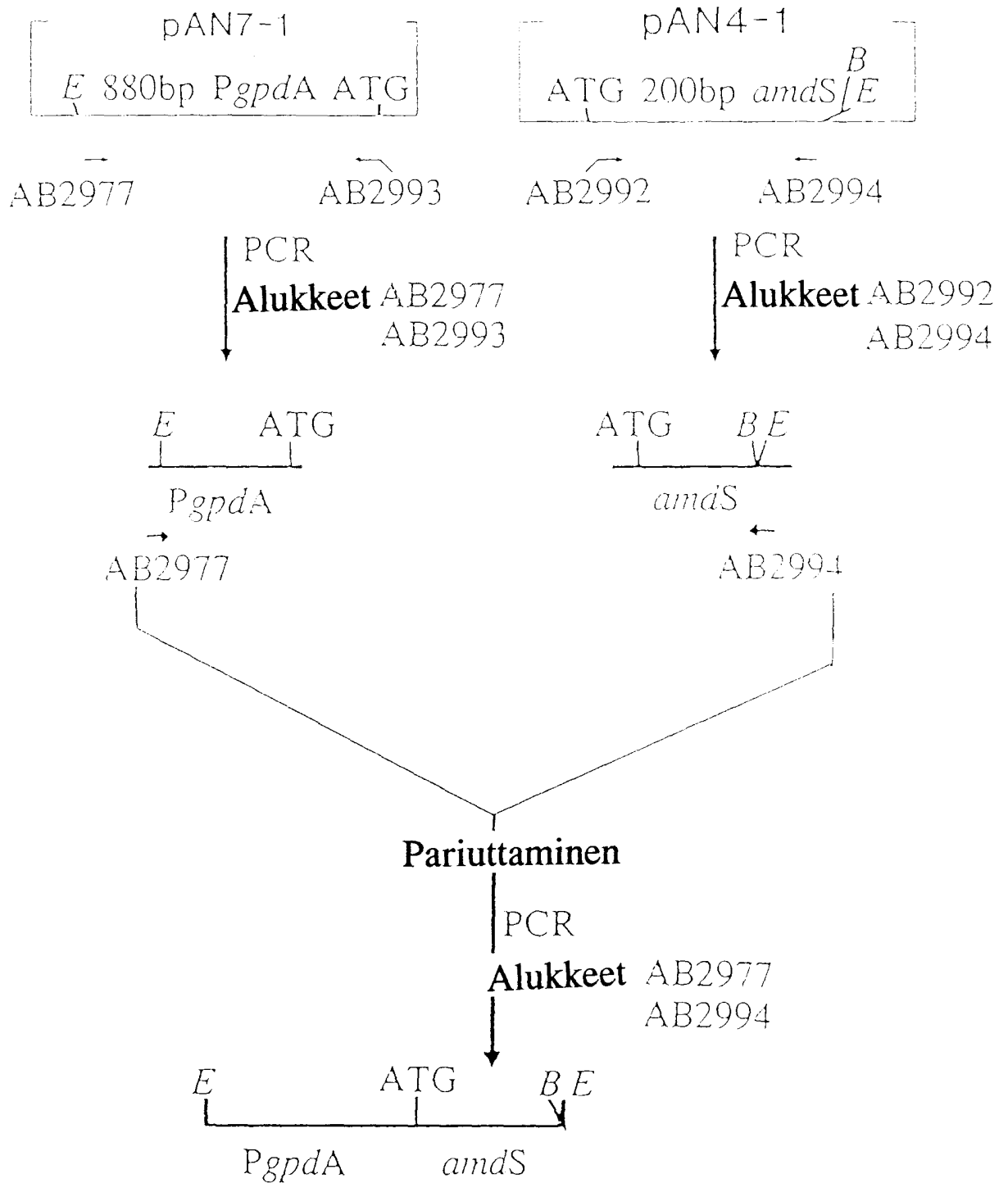


Fig. 8a

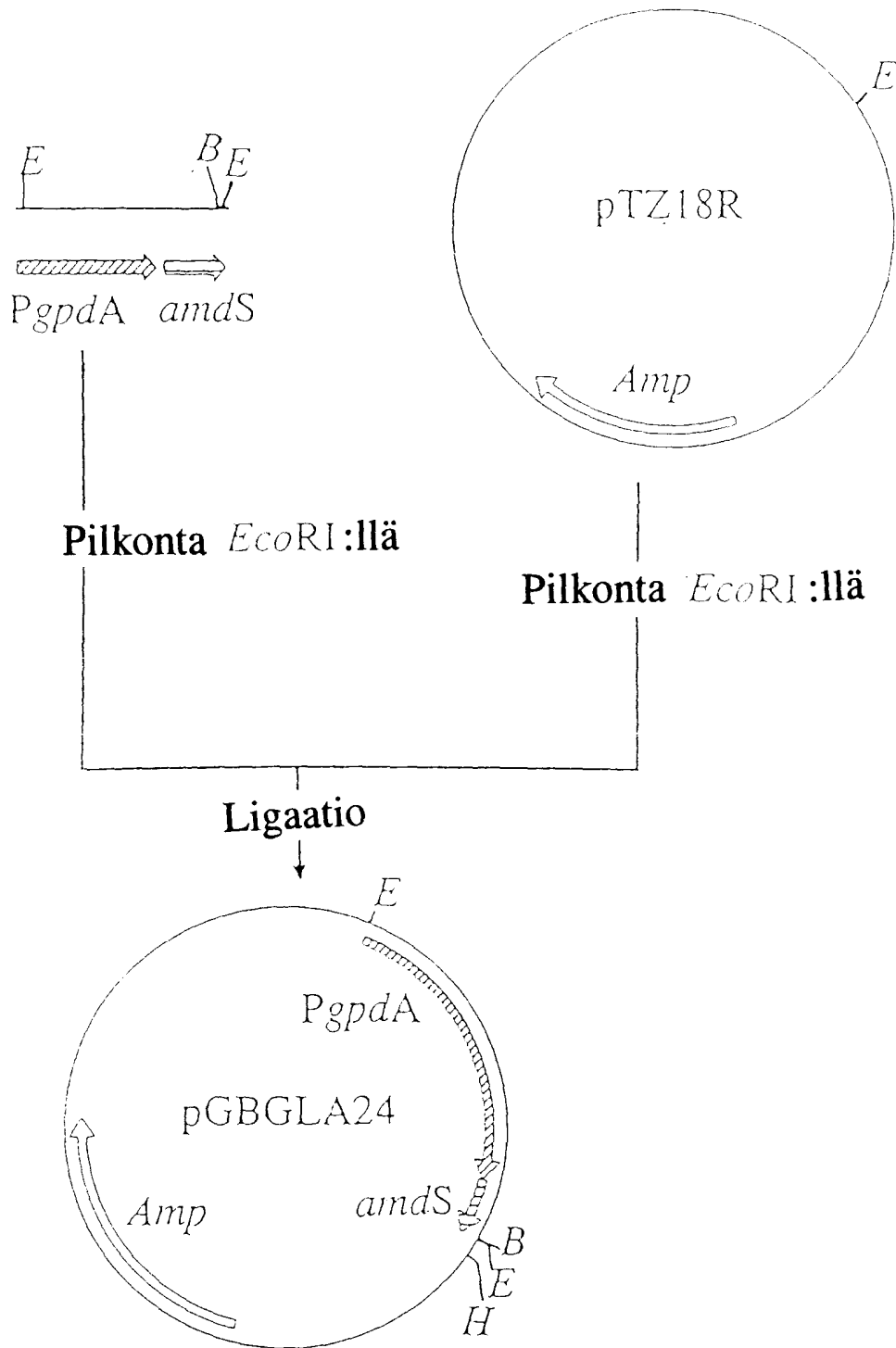


Fig. 8b

12/61

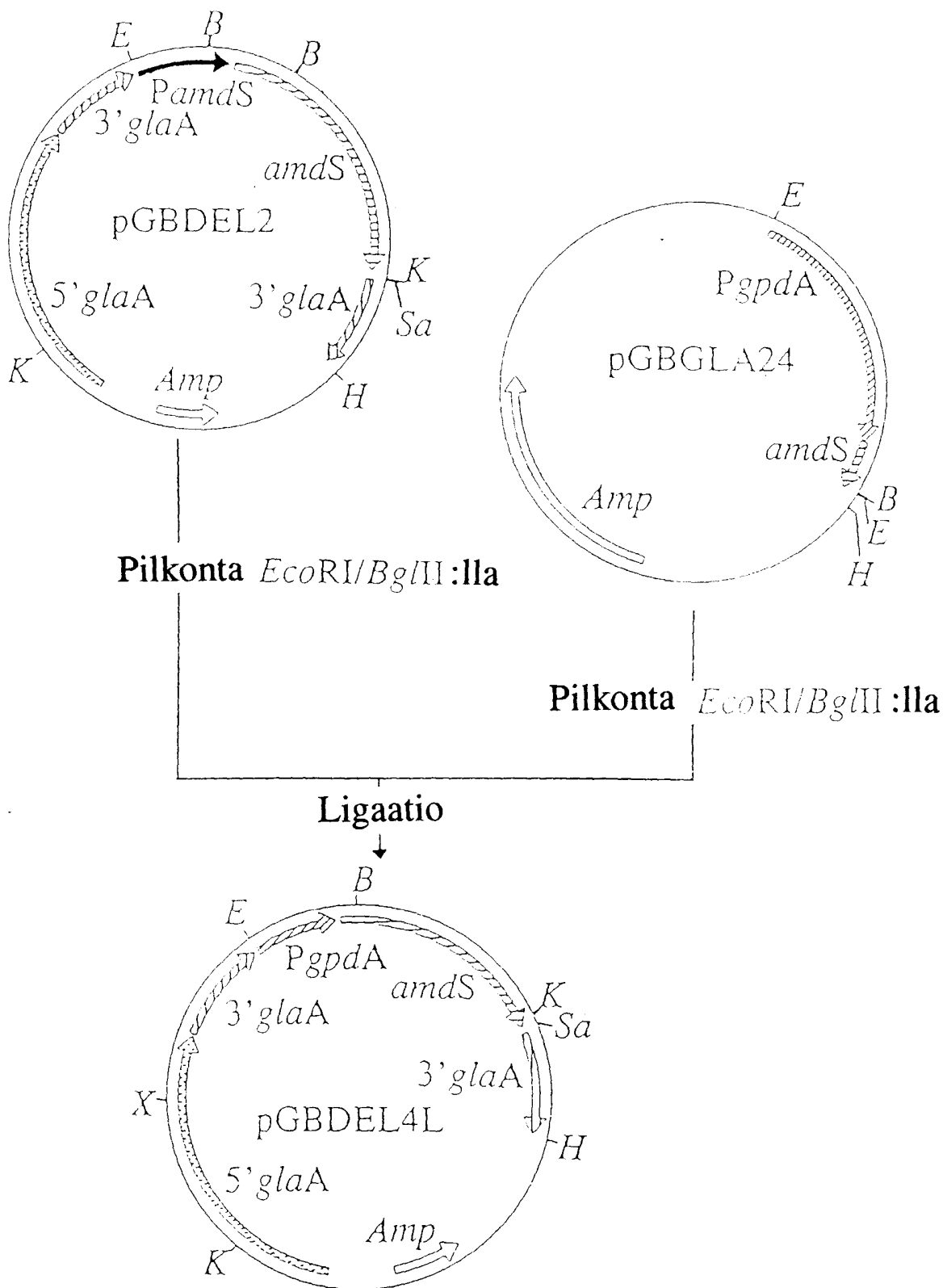


Fig. 9

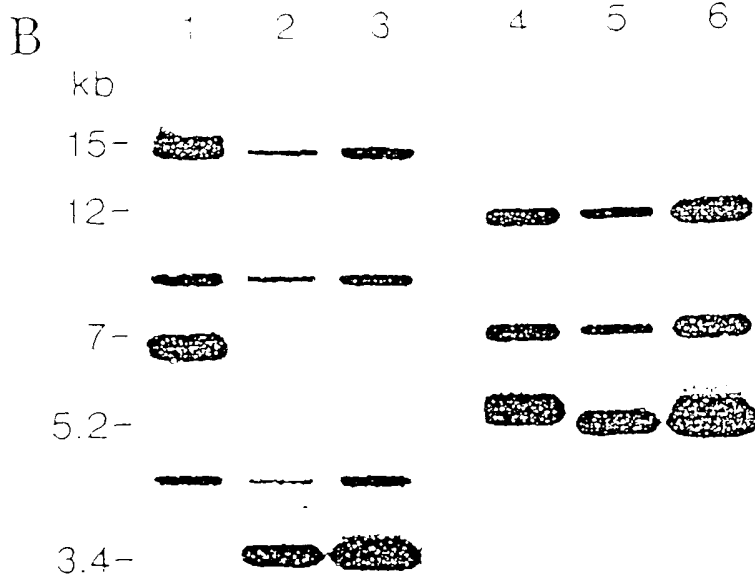
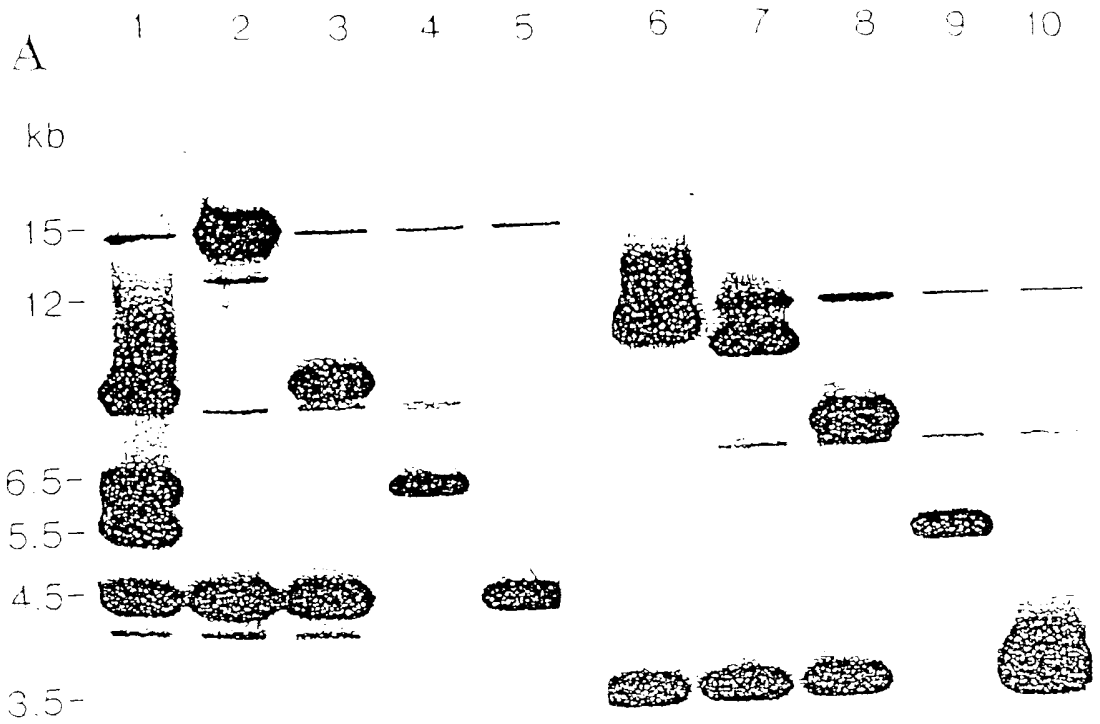


Fig. 10a

15.0 kb 4.5 kb

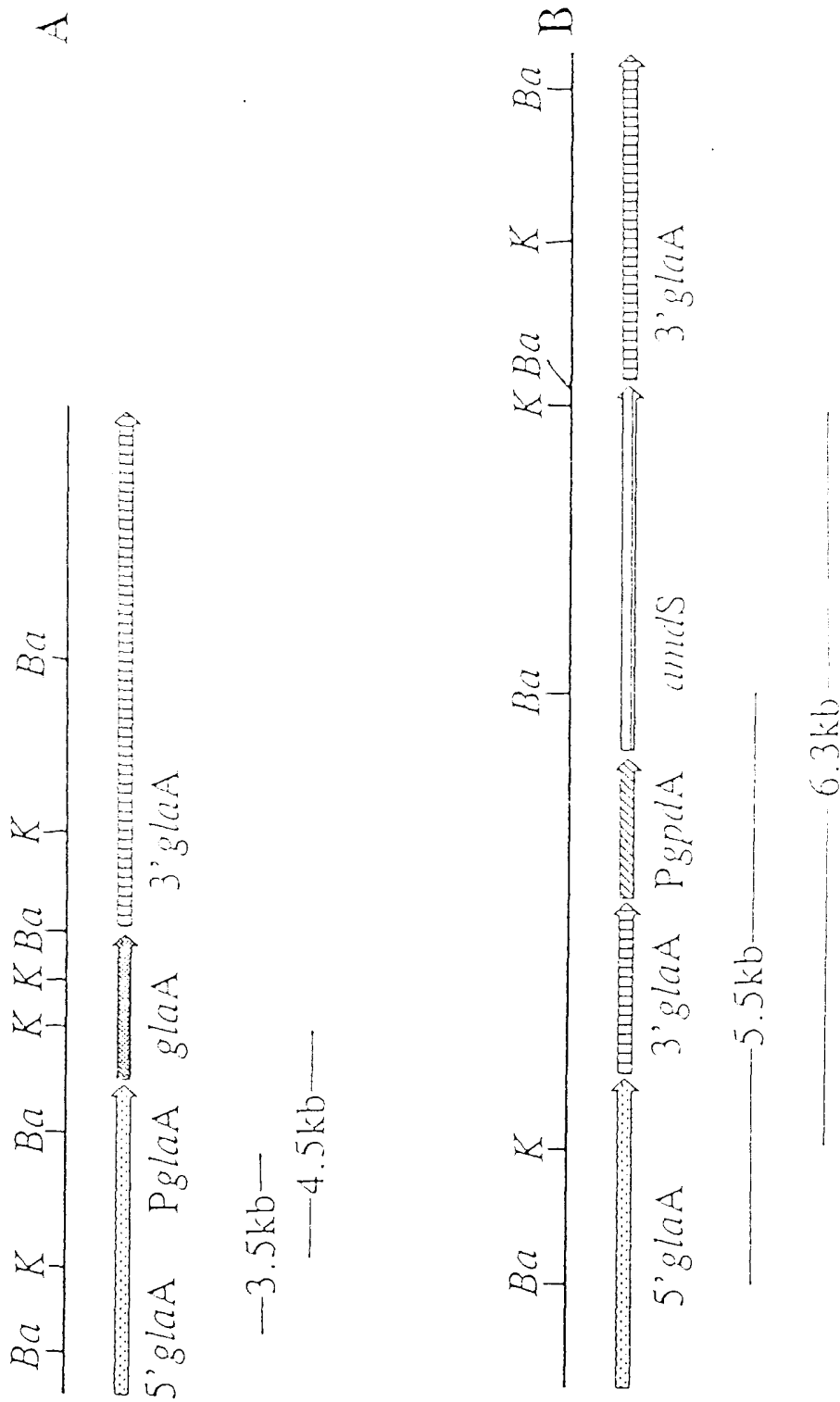


Fig. 10b

120195 4388

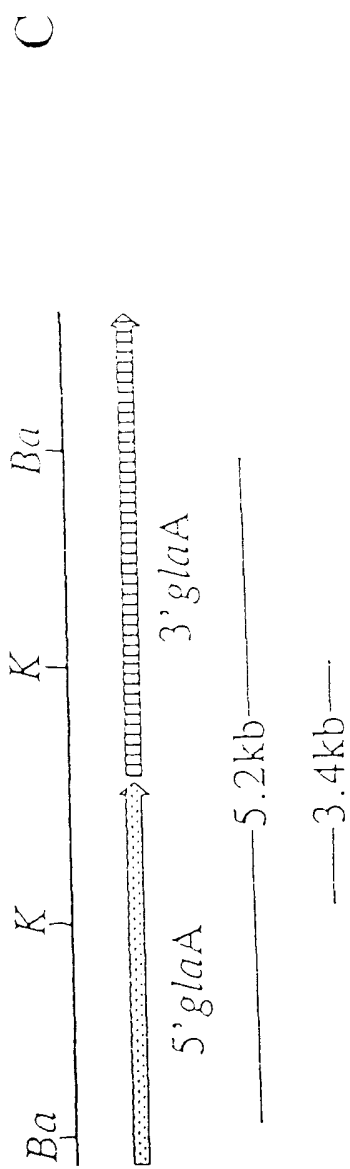
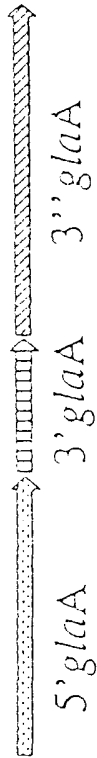


Fig. 11

A. niger GBA107



Integratio

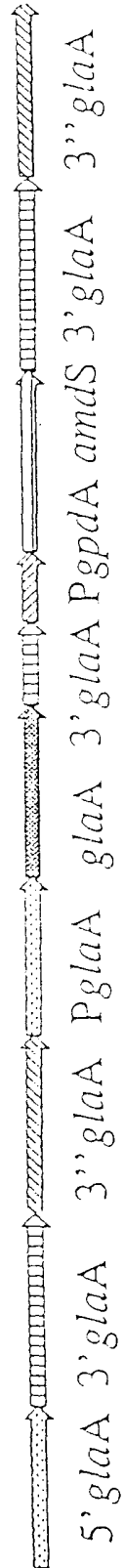


Fig. 12a

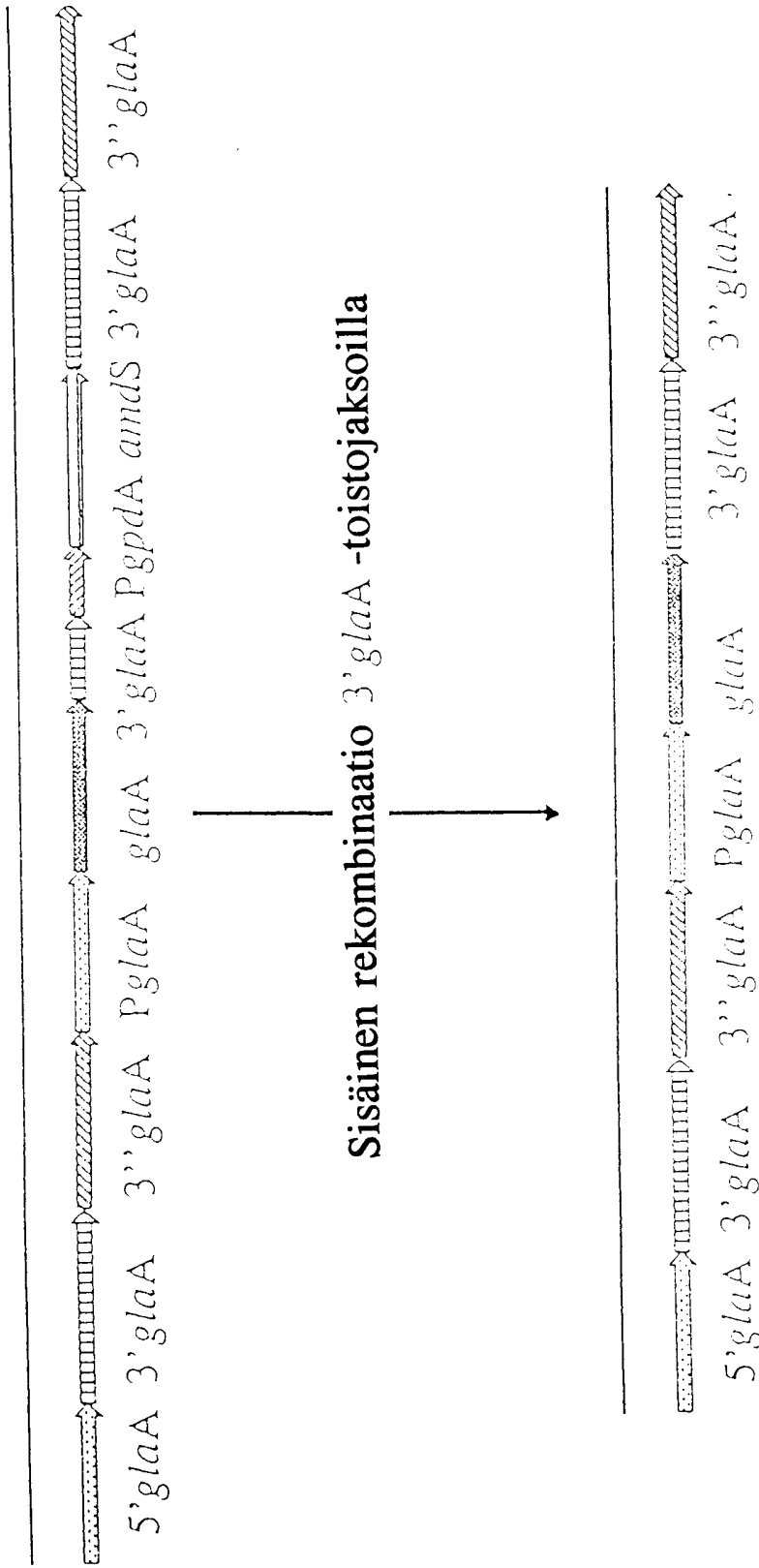


Fig. 12b

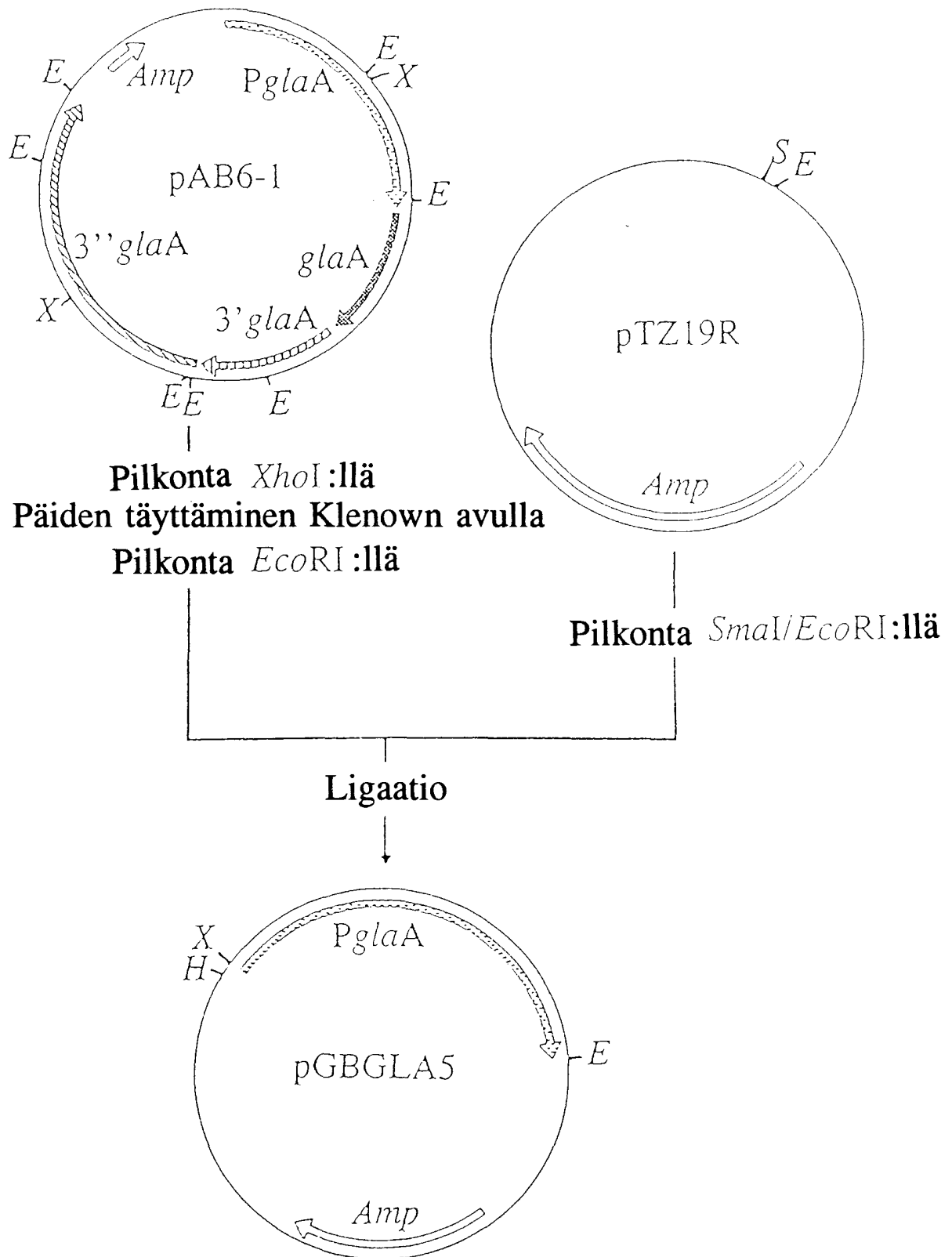


Fig. 13

19/61

5' AGCTTGACGTCTACGTATTAATGCGGCCGCT 3'
 3' ACTGCAGATGCATAATTACGCCGGCGAAGCT 5'

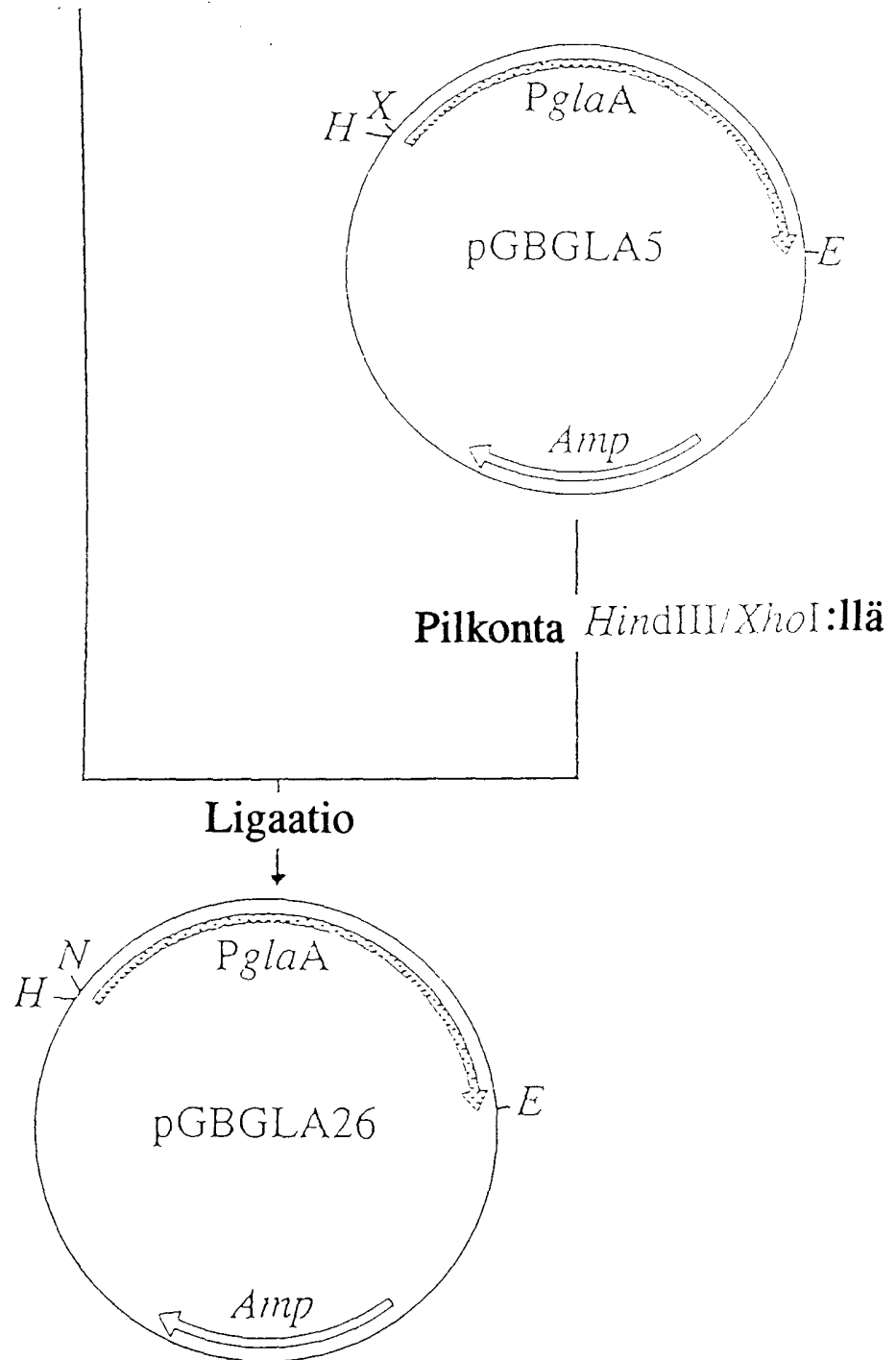


Fig. 14

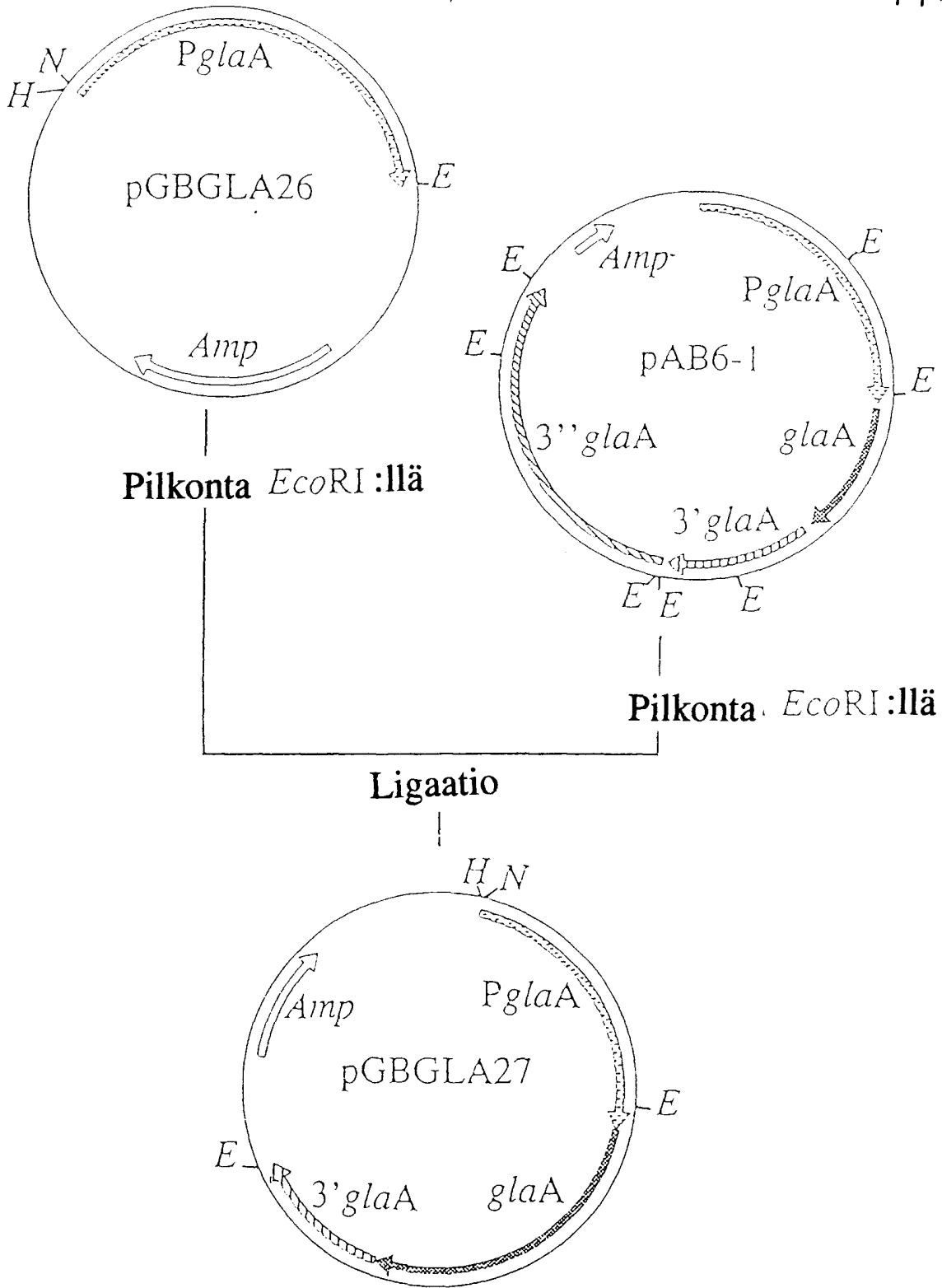
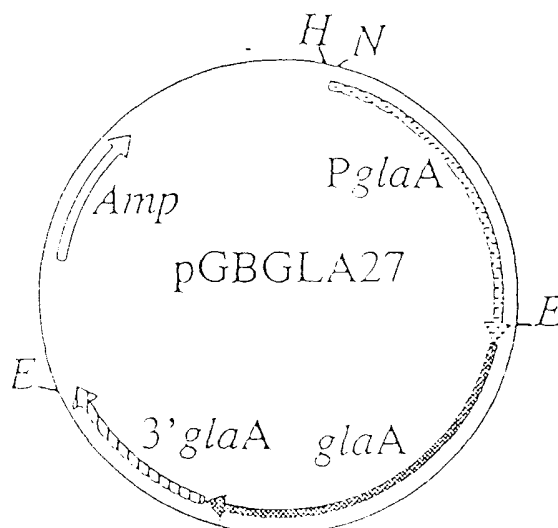


Fig. 15

5' AATTGGGGCCCATTA ACTCGAGC 3'
 3' CCCC GGGTAATTGAGCTCGTTAA 5'



Osittainen pilkonta *EcoRI*:llä

Ligaatio

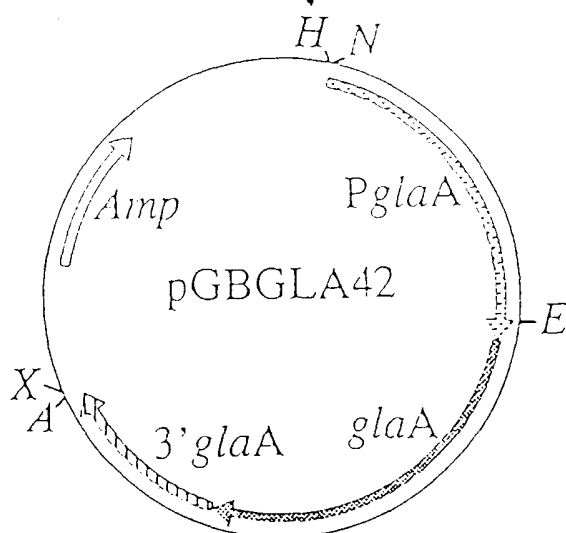


Fig. 16

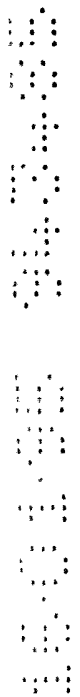
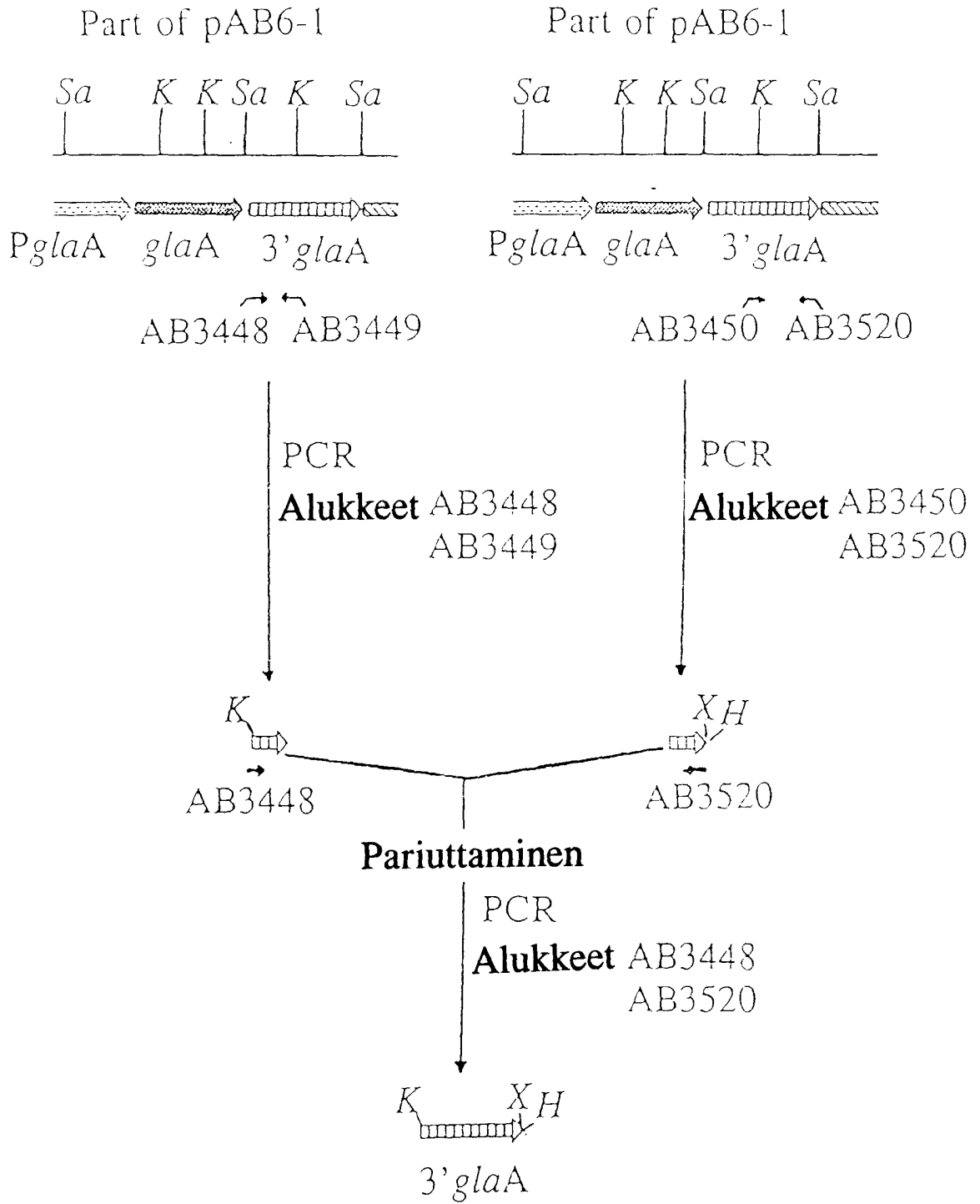


Fig. 17a

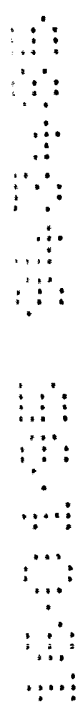
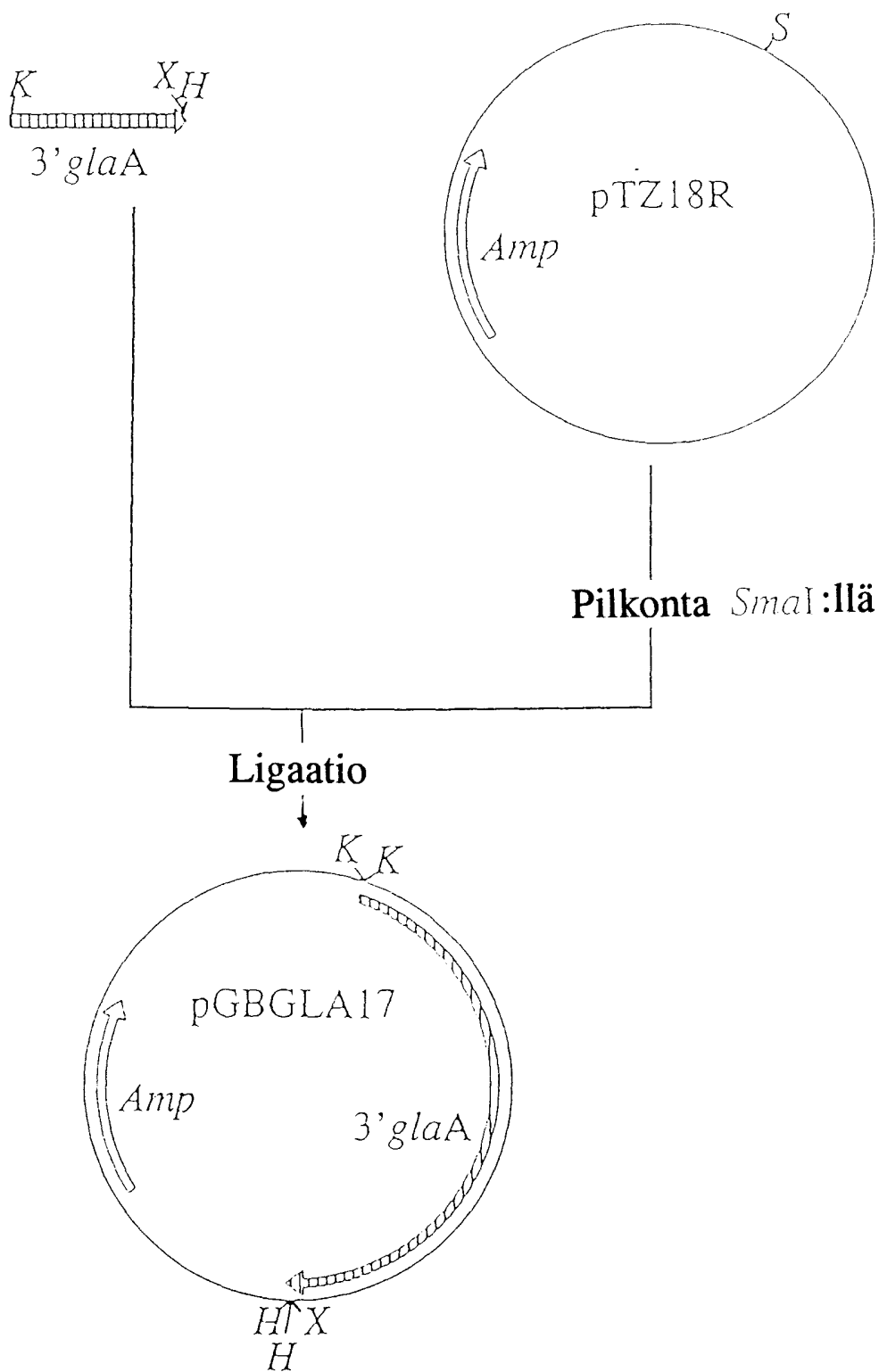


Fig. 17b

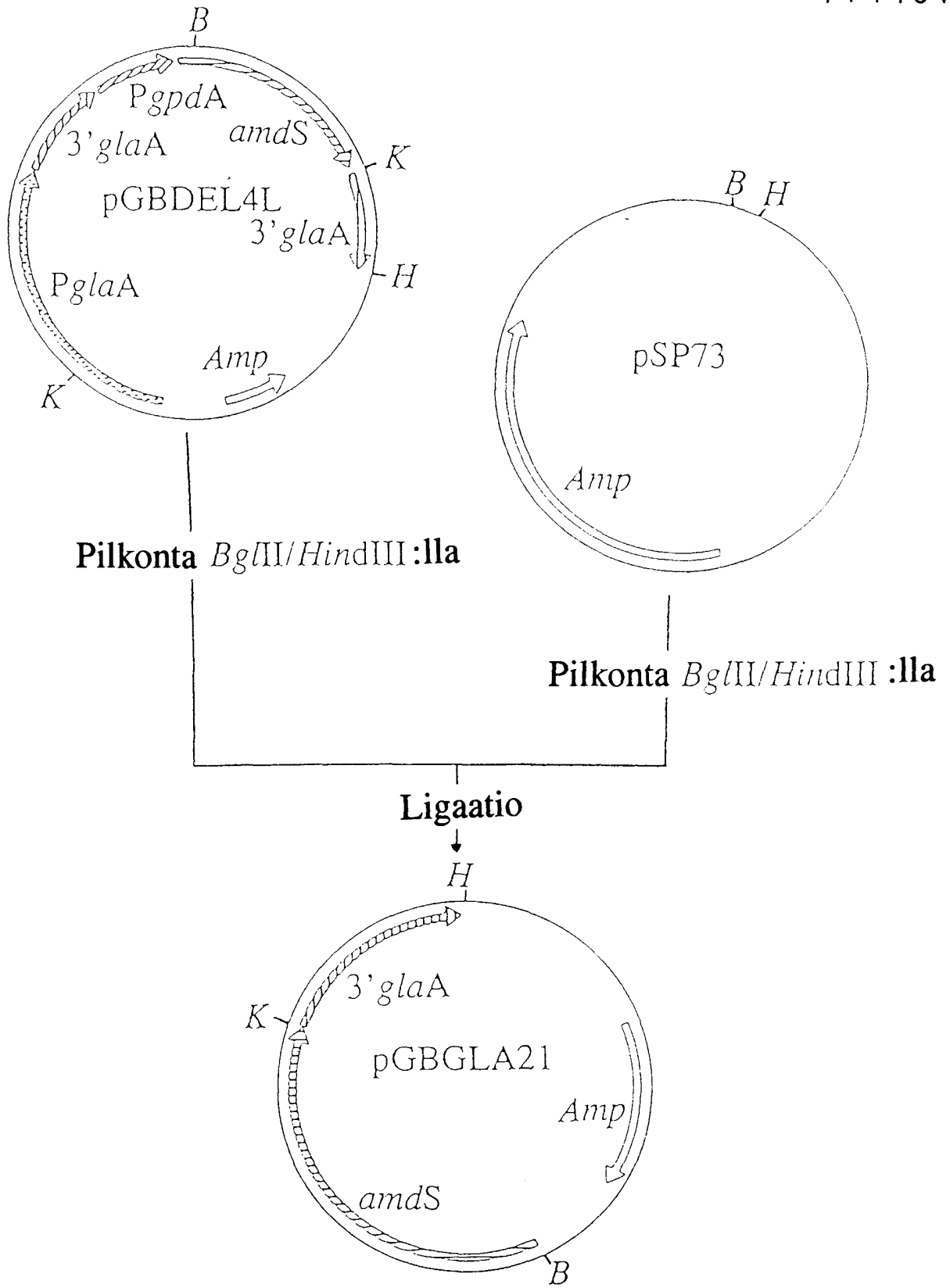


Fig. 18

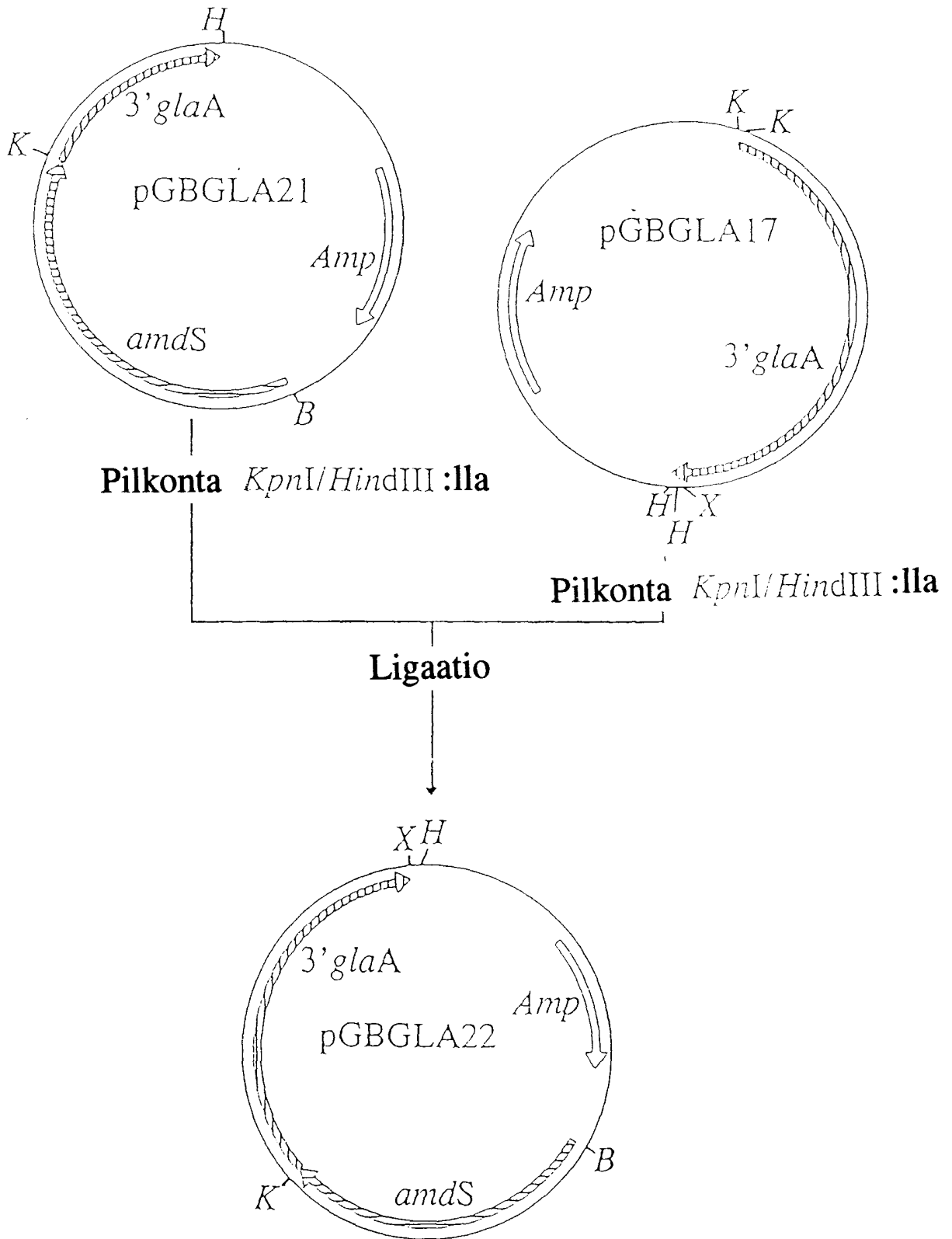


Fig. 19

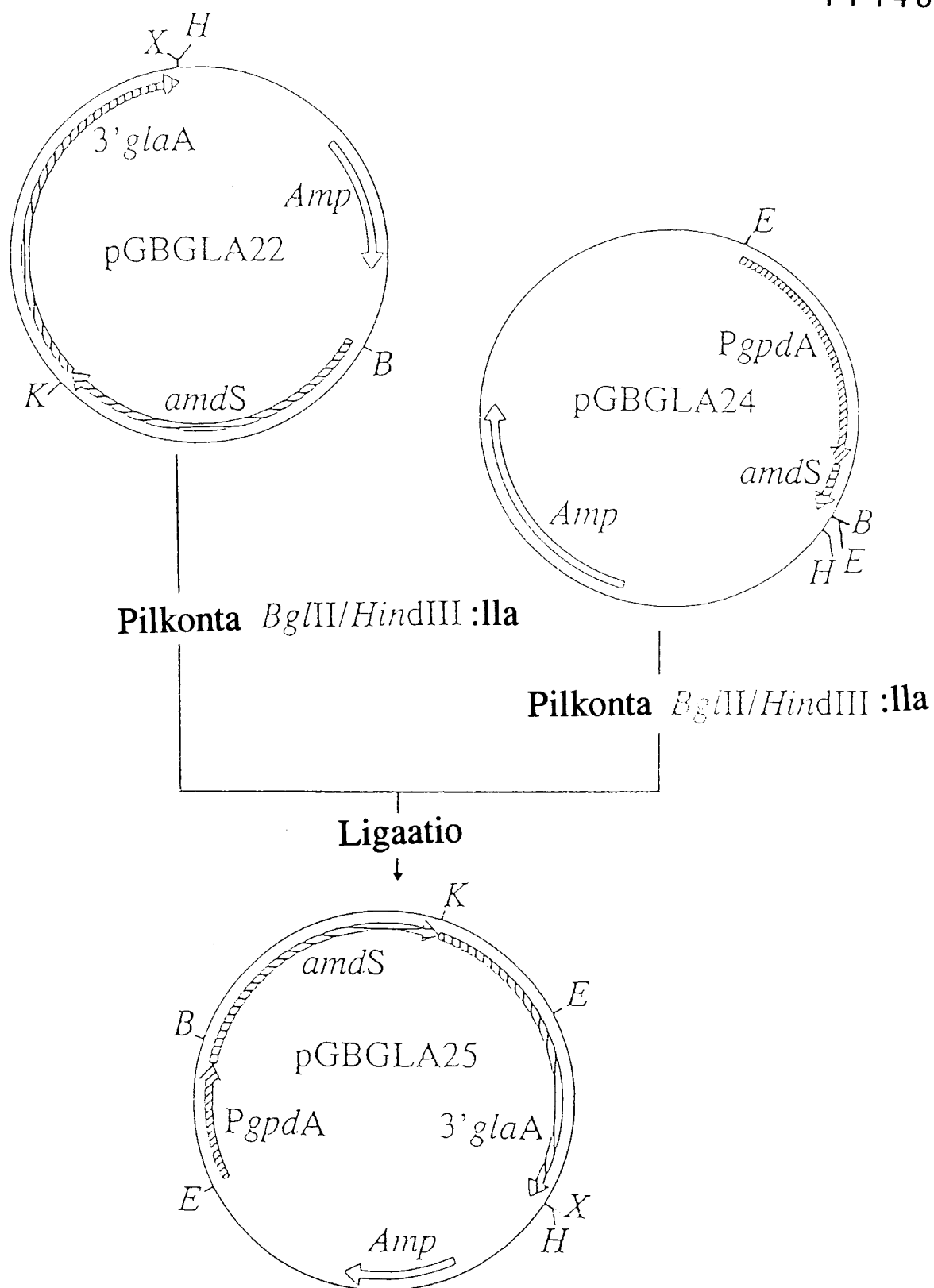
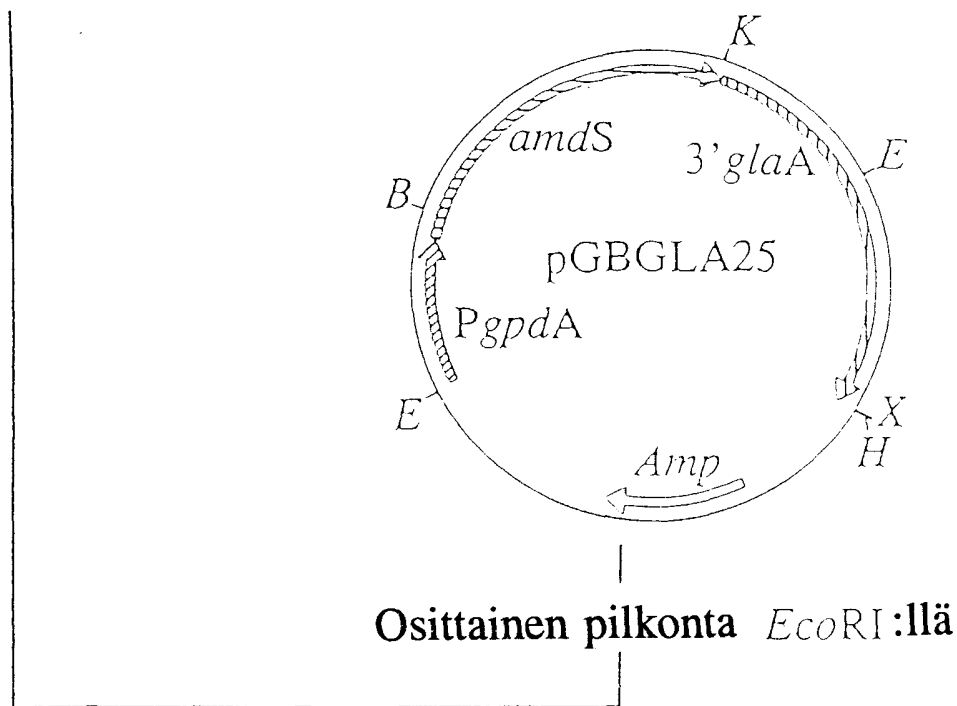


Fig. 20

5' AATTGGGGCCCAGCGTCC 3'
 3' CCCCGGGTCGCAGGTAA 5'



Ligaatio

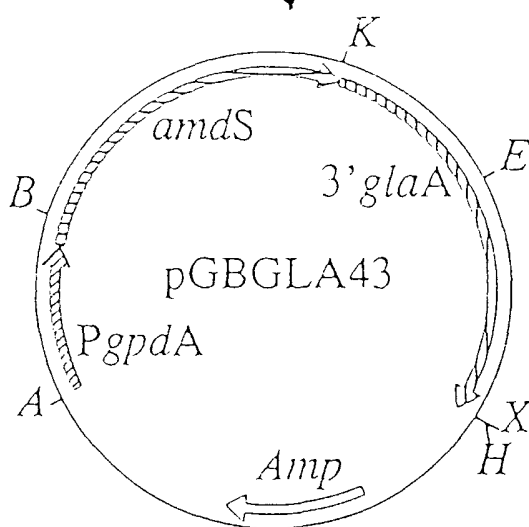


Fig. 21

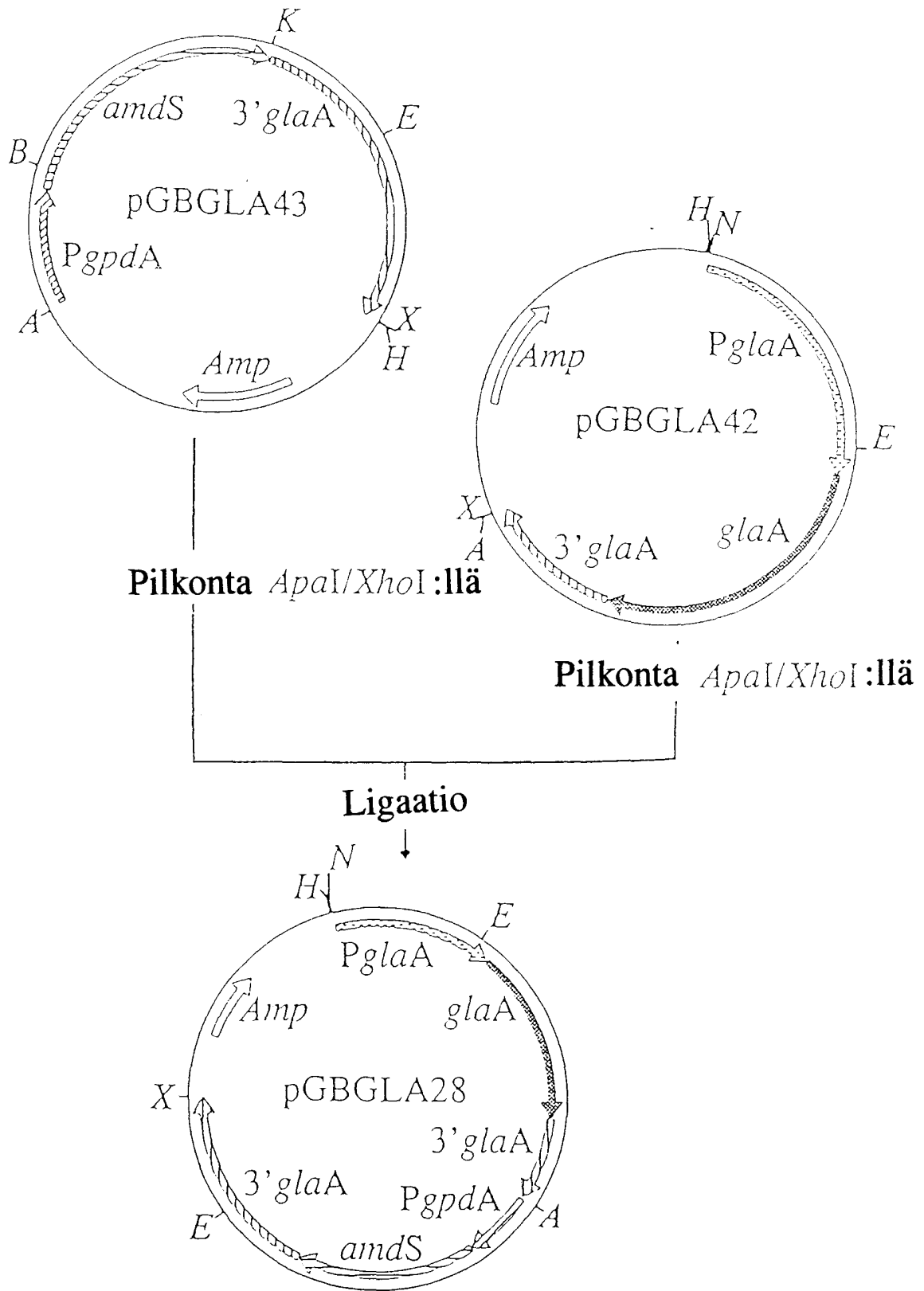


Fig. 22

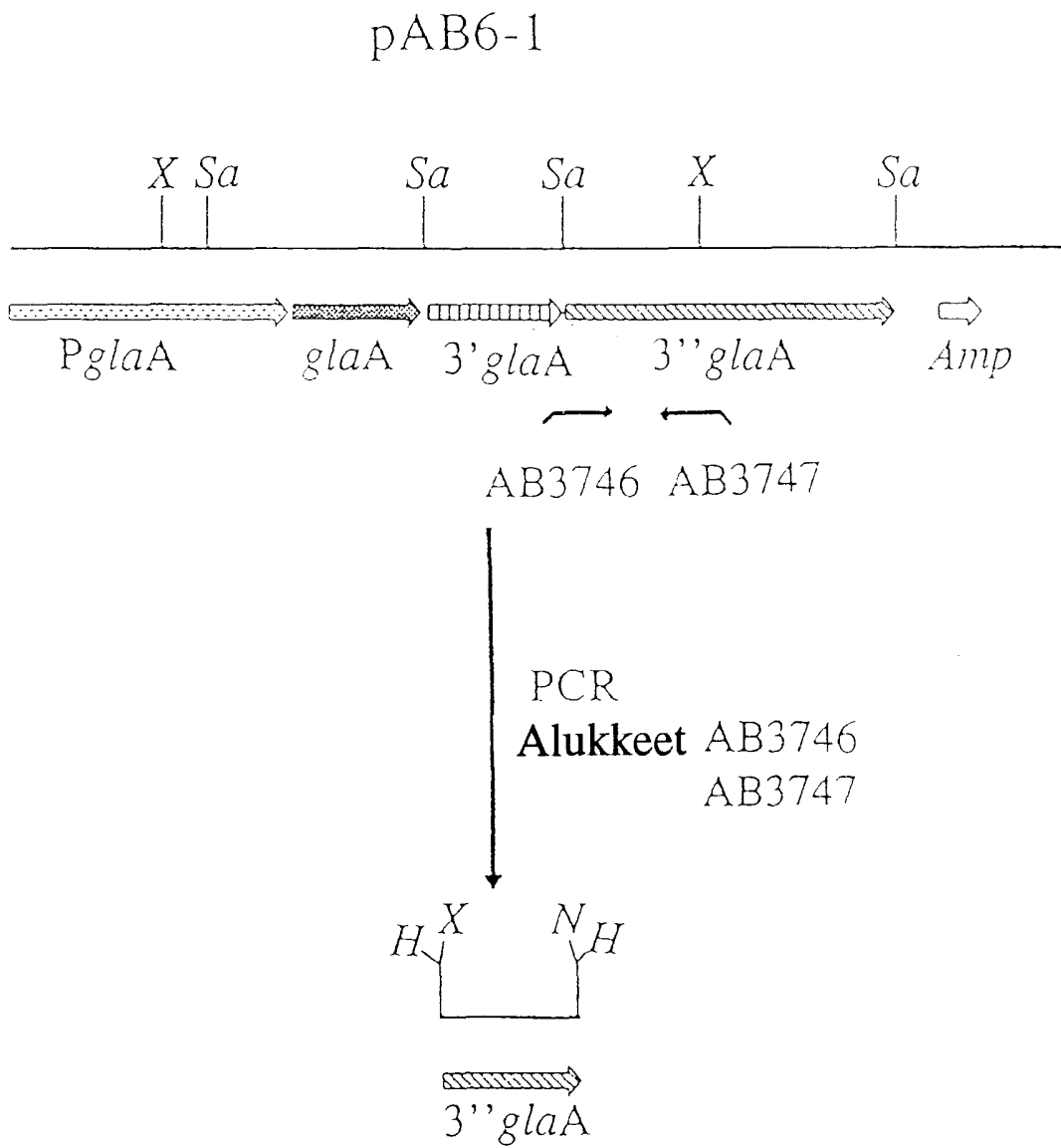
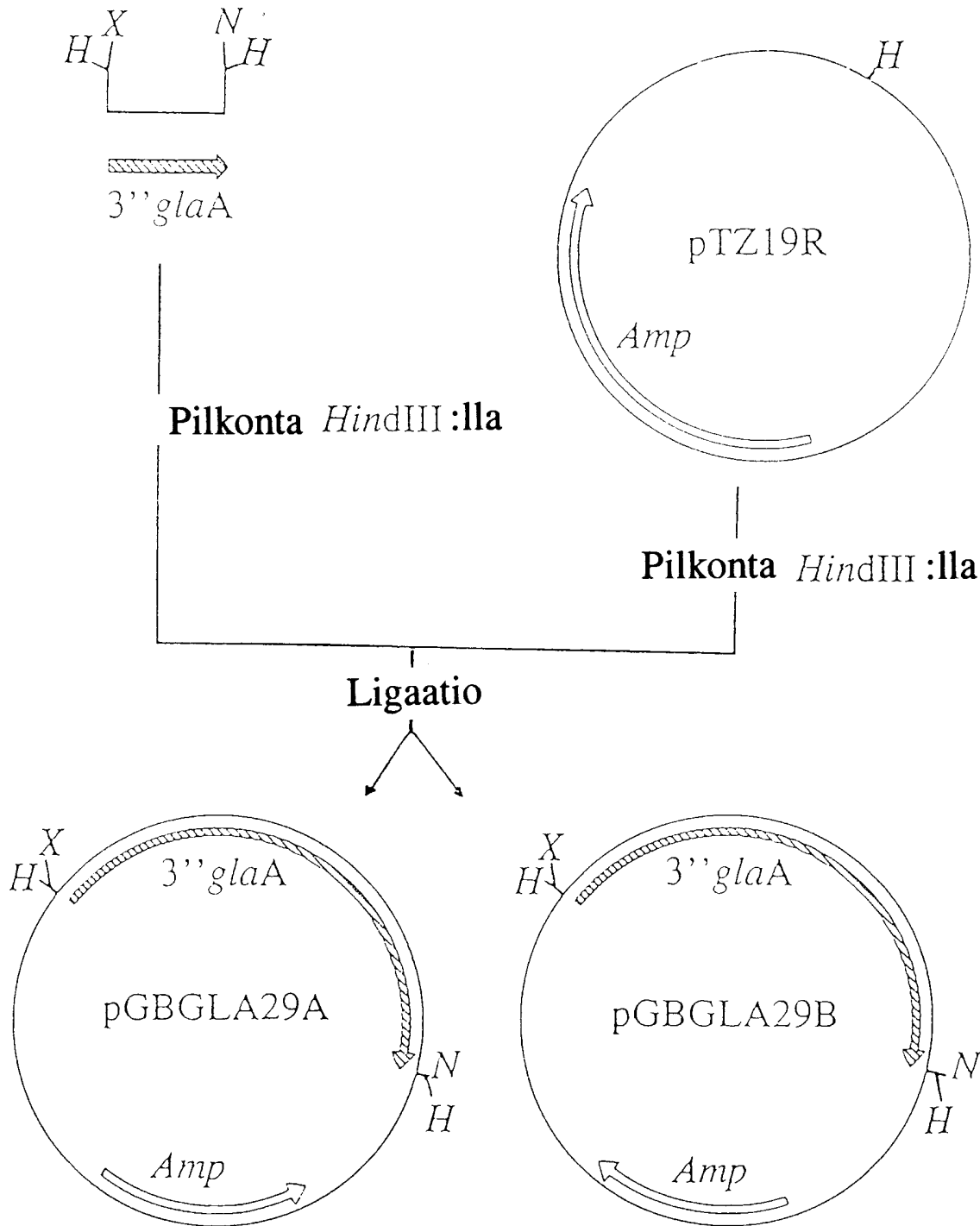


Fig. 23a



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99

Fig. 23b

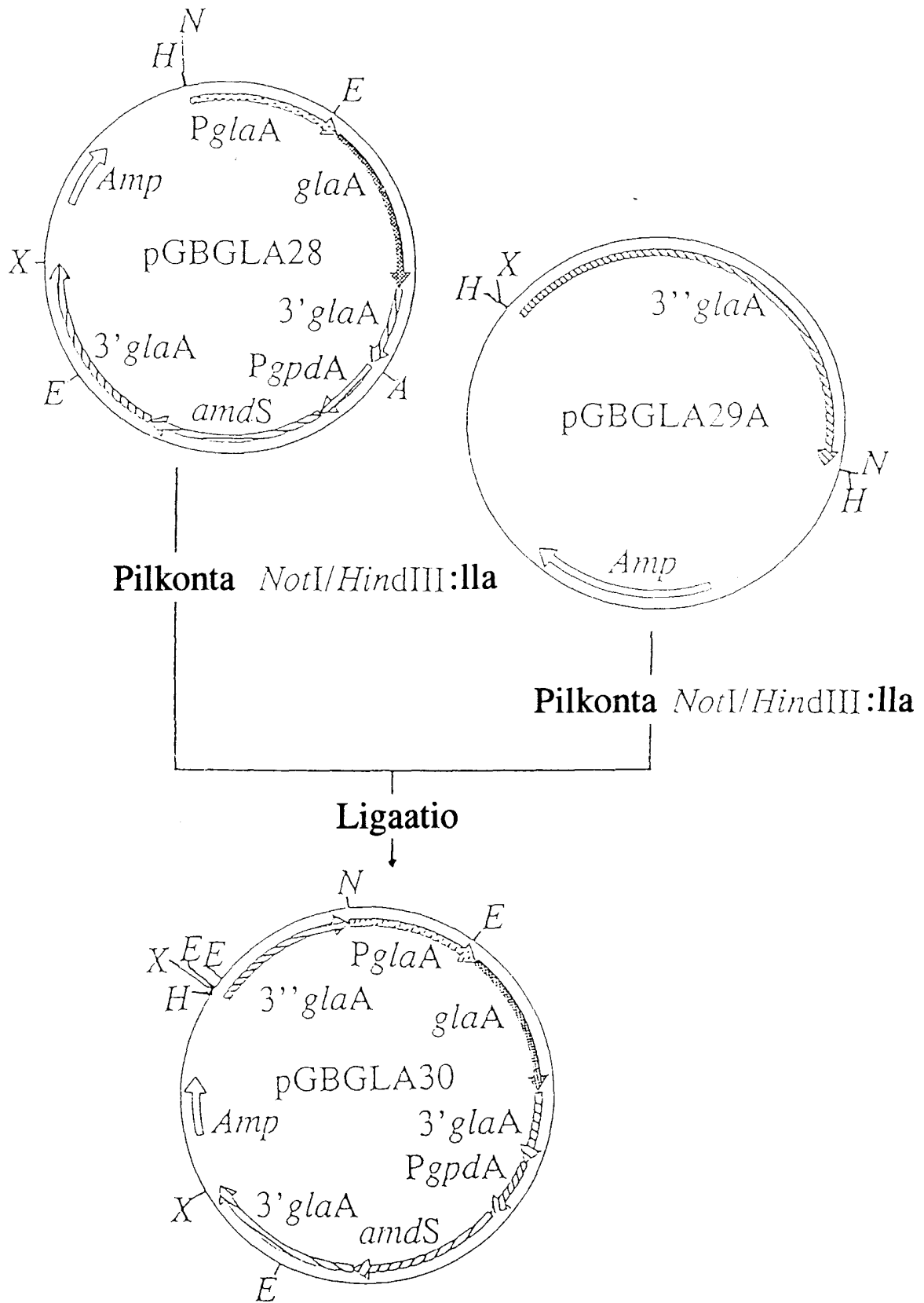
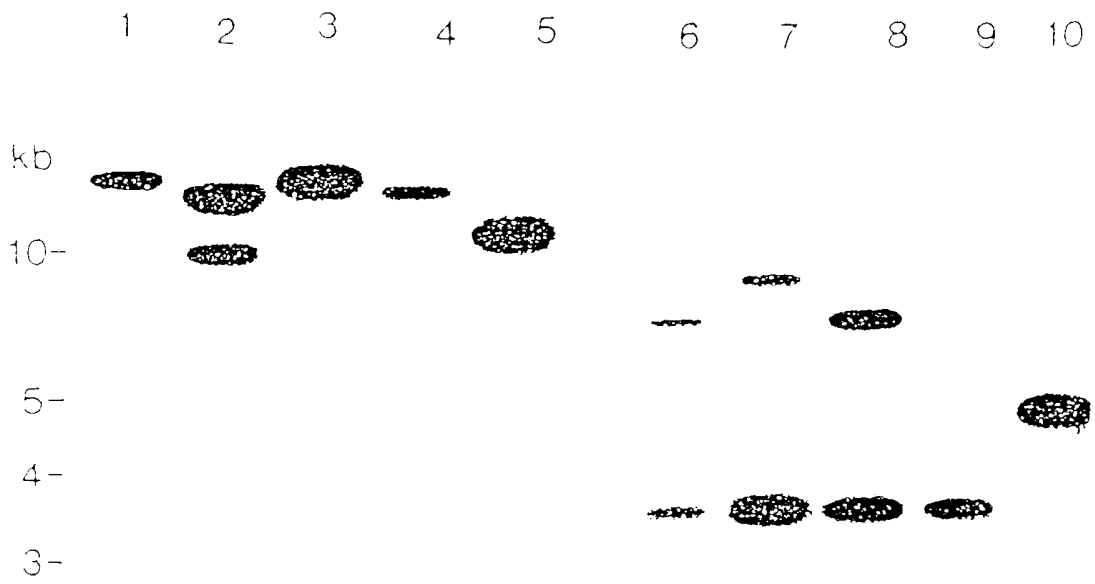


Fig. 24



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Fig. 25

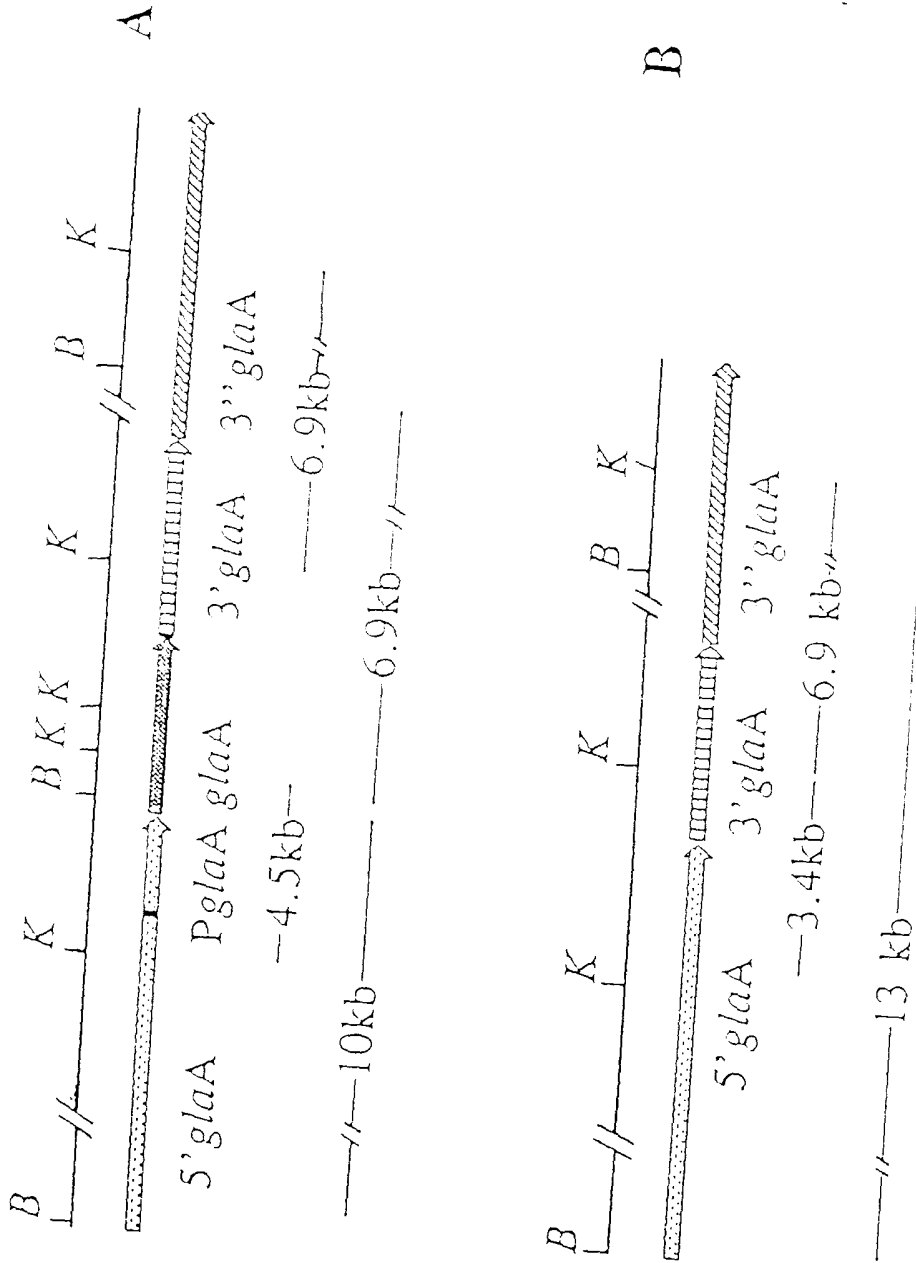


Fig. 26a

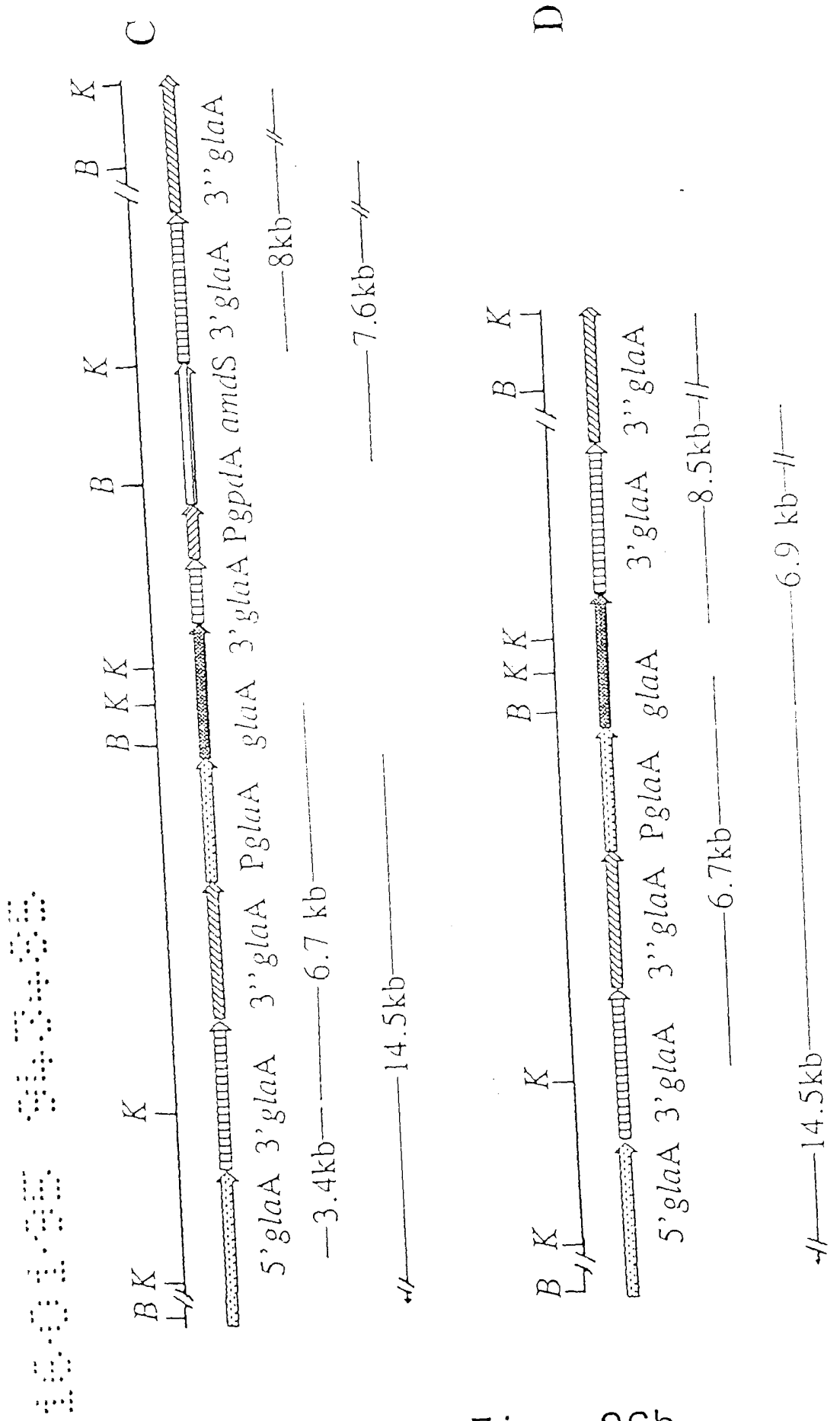


Fig. 26b

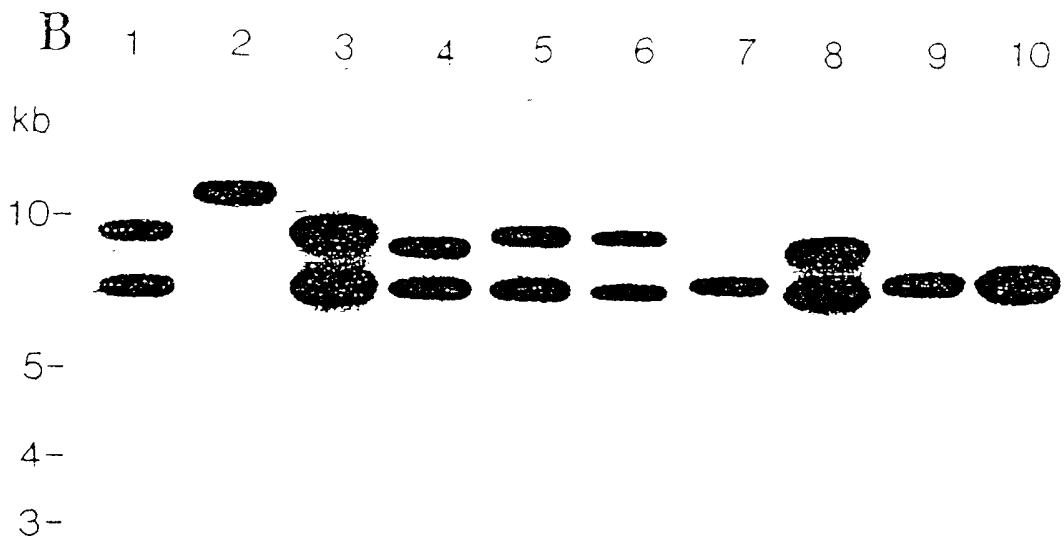
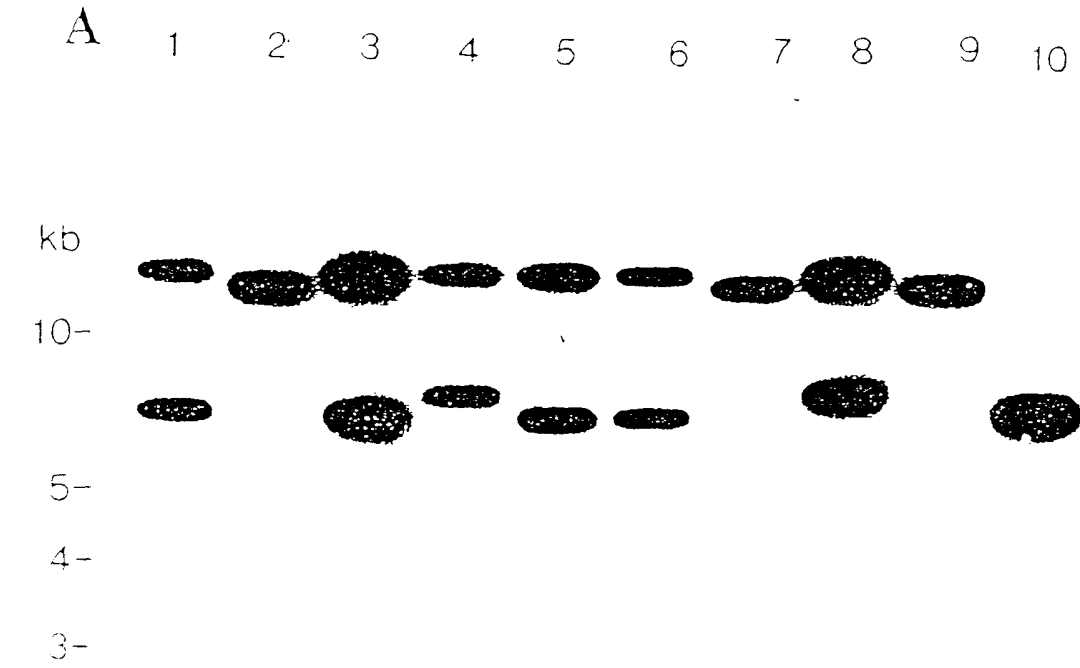
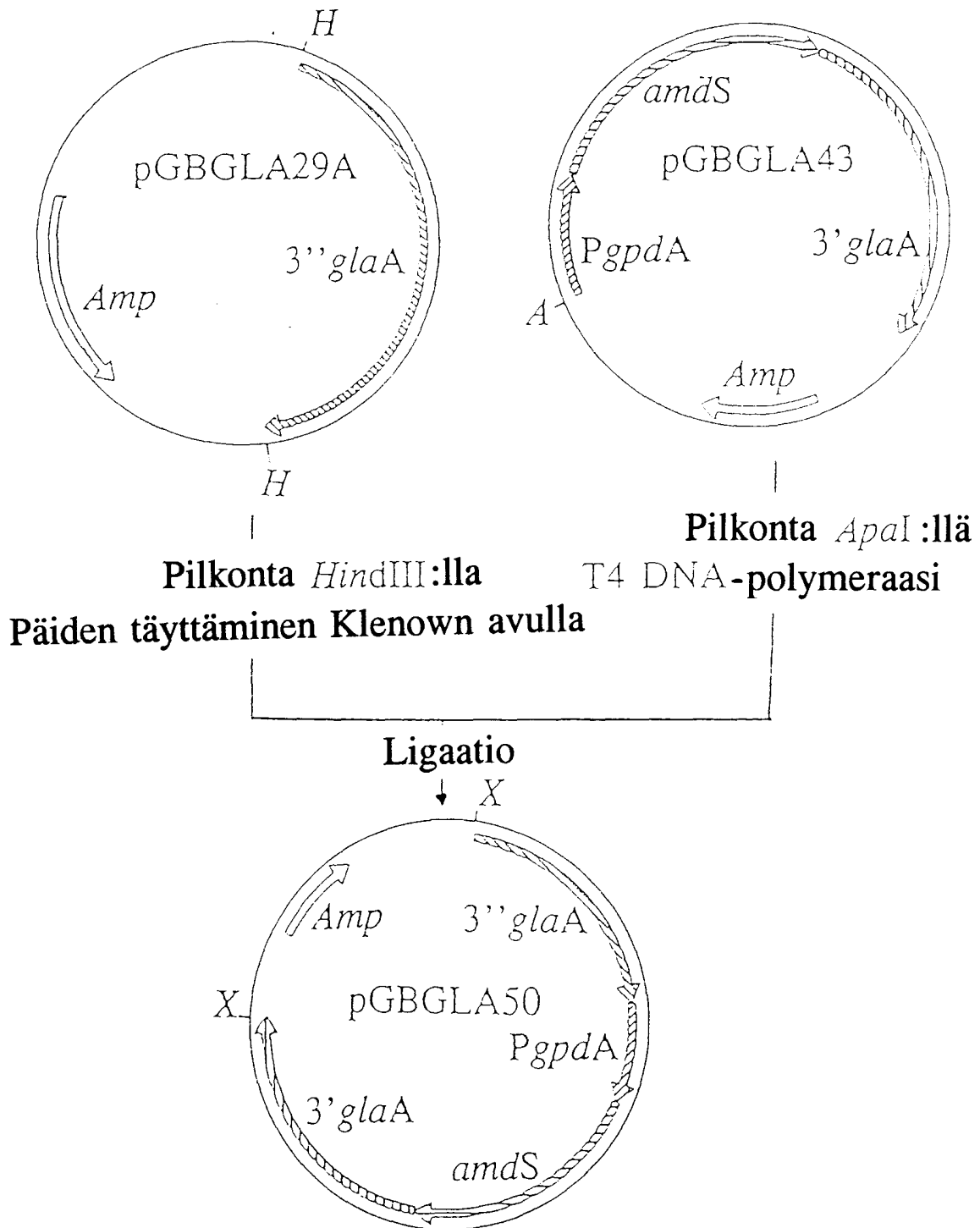


Fig. 27



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Fig. 28

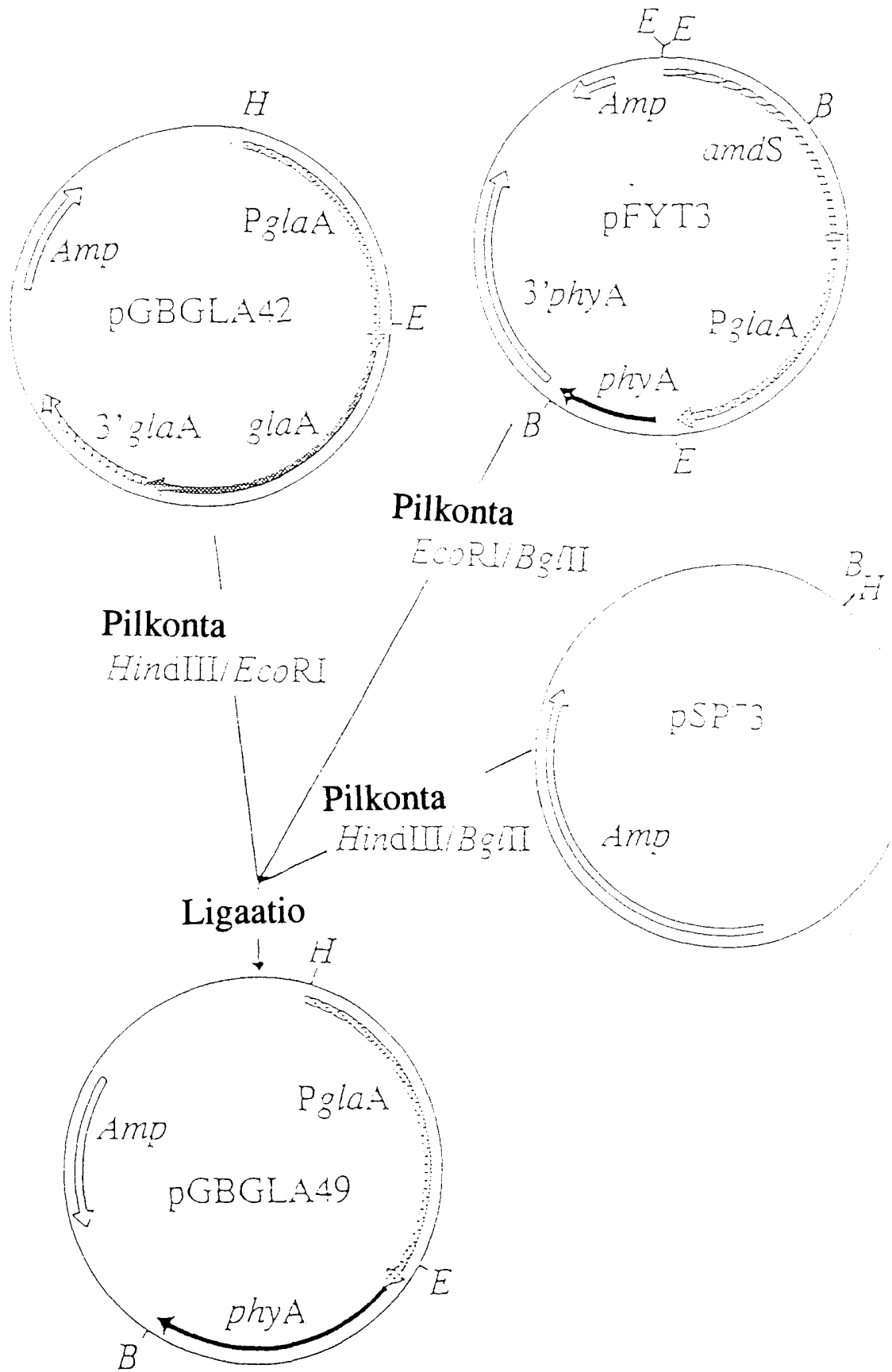


Fig. 29

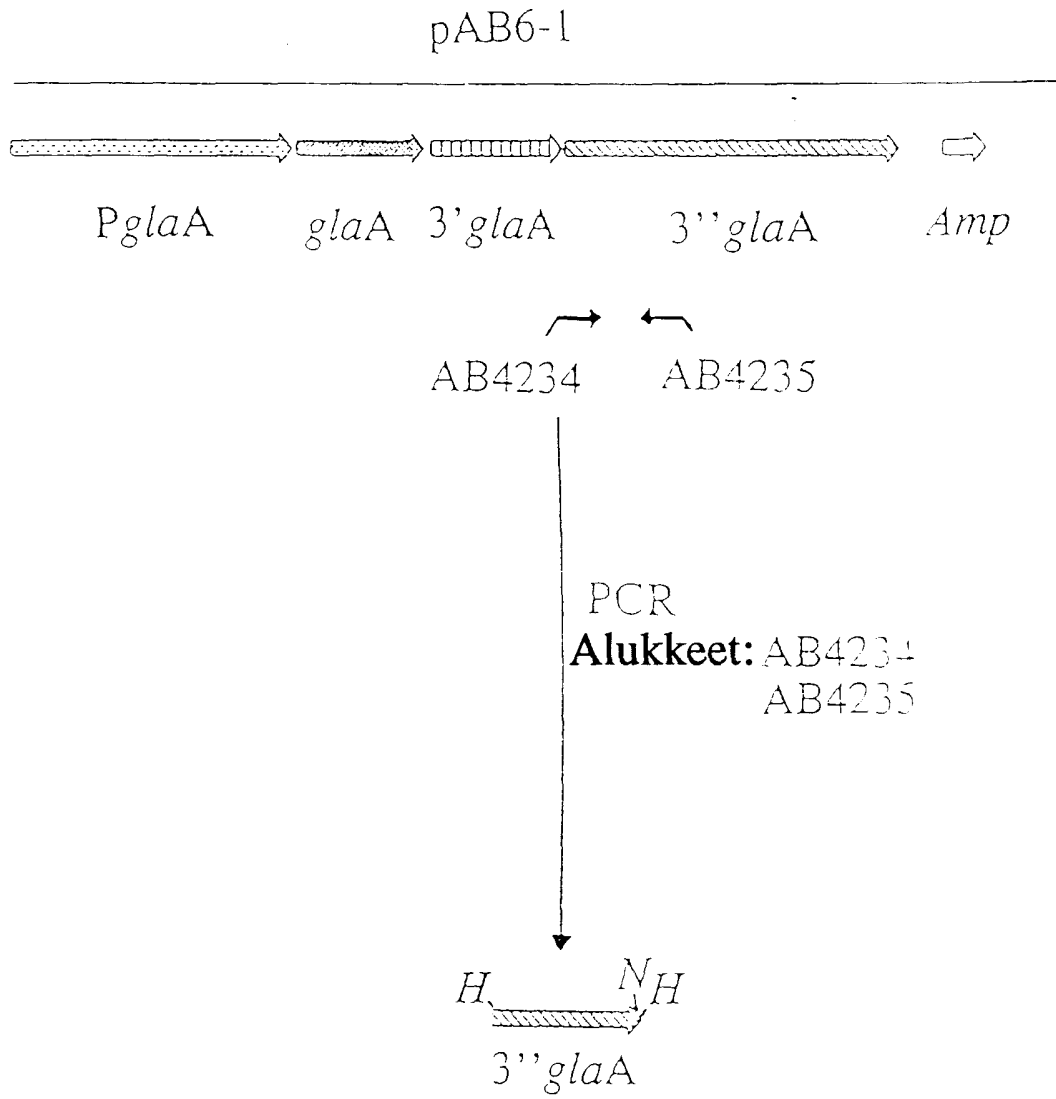


Fig. 30a

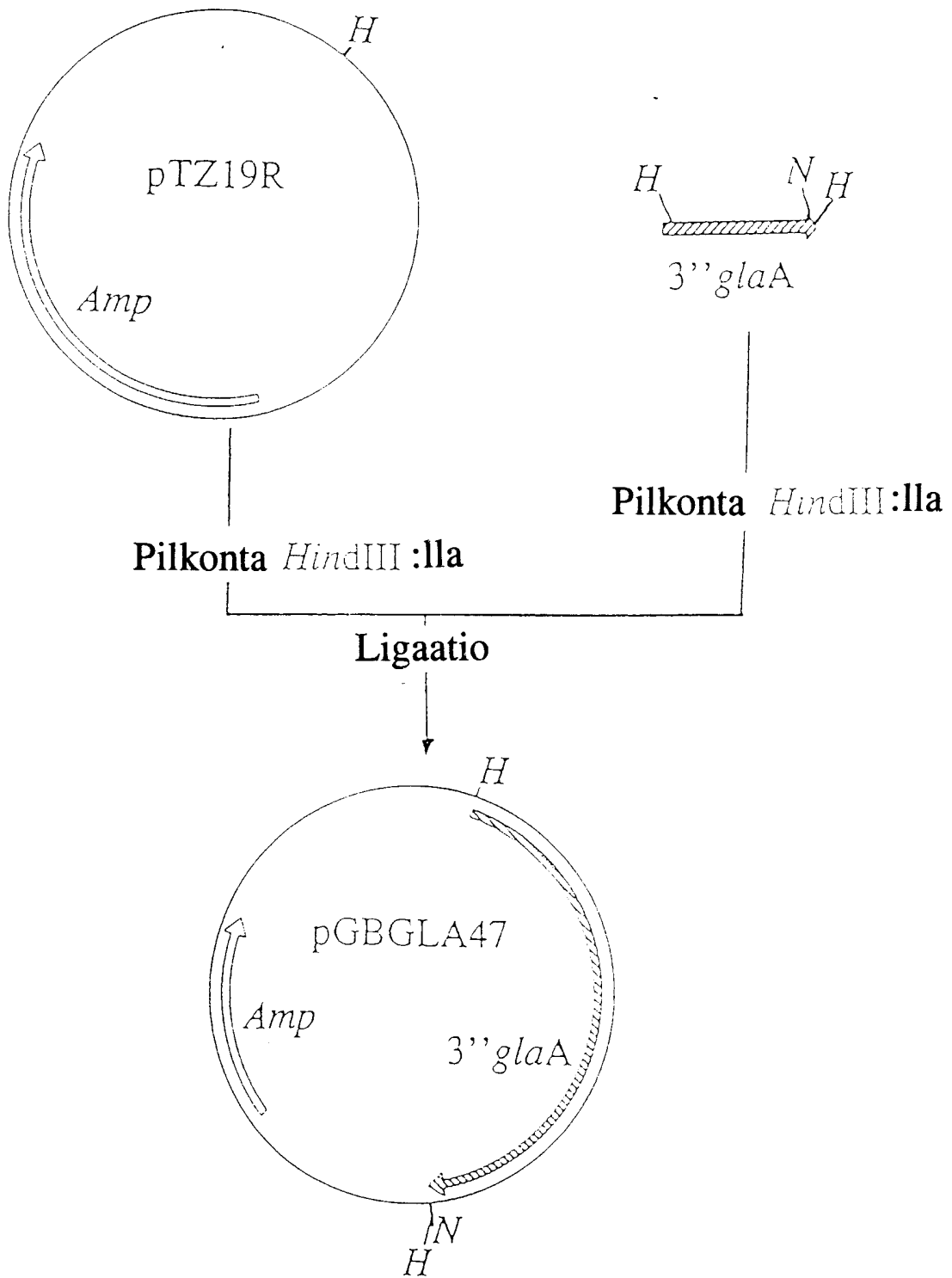


Fig. 30b

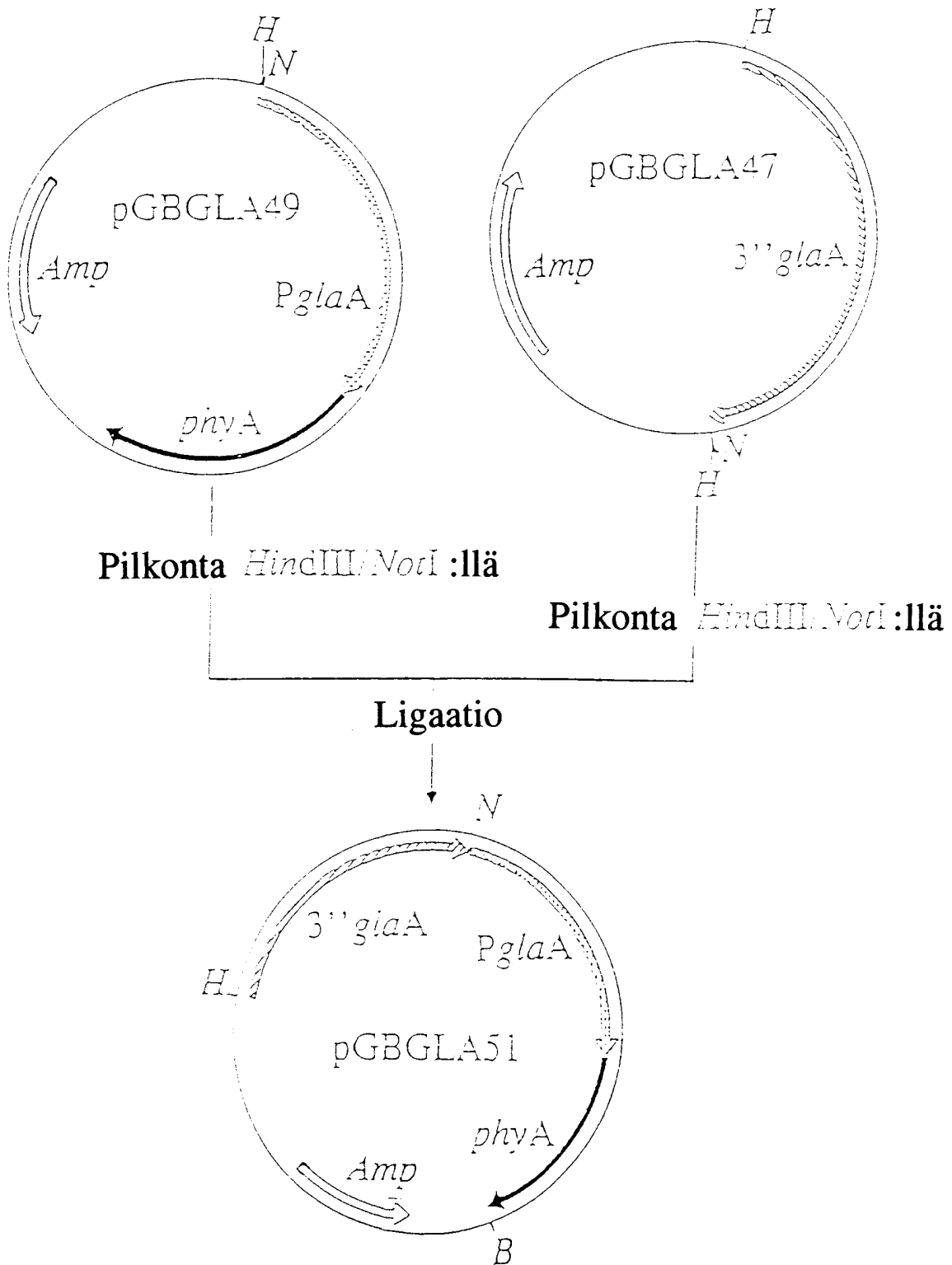


Fig. 31

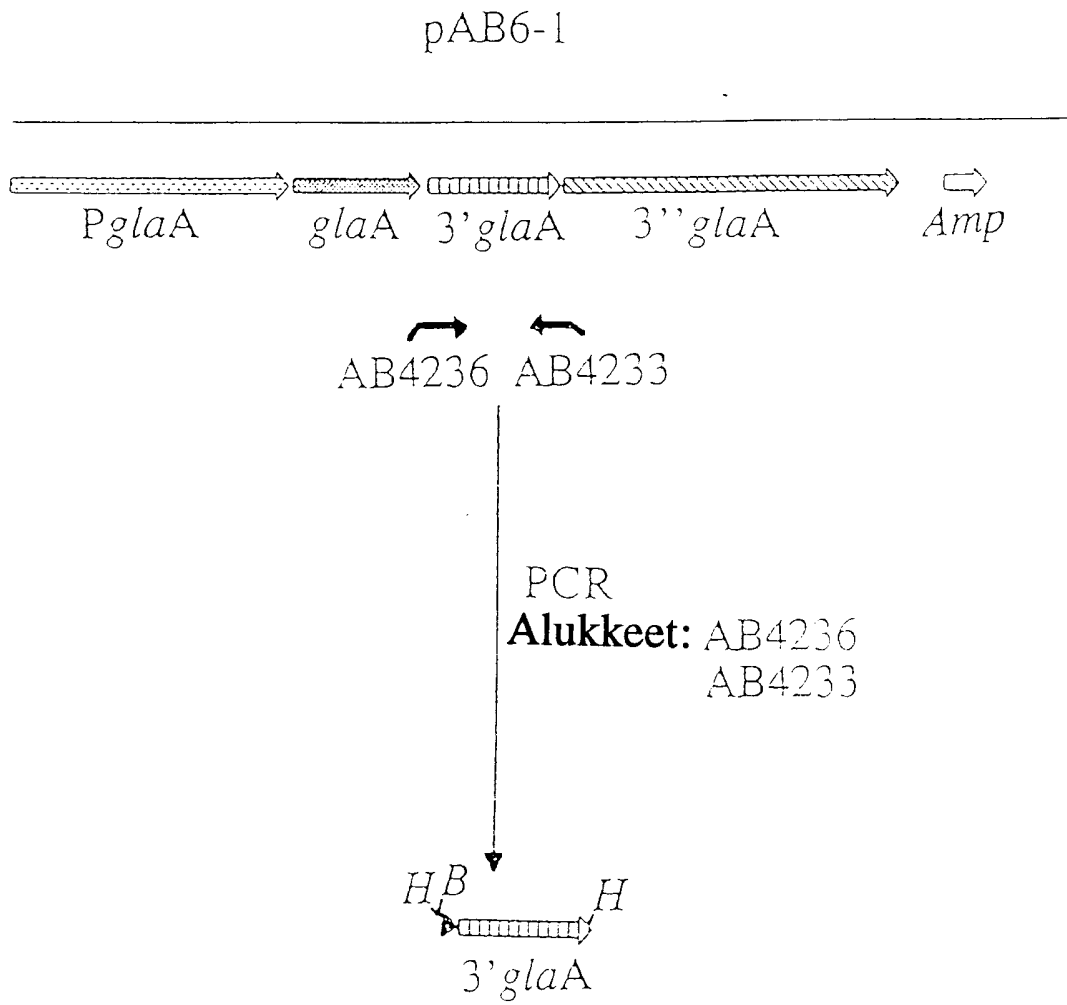


Fig. 32a

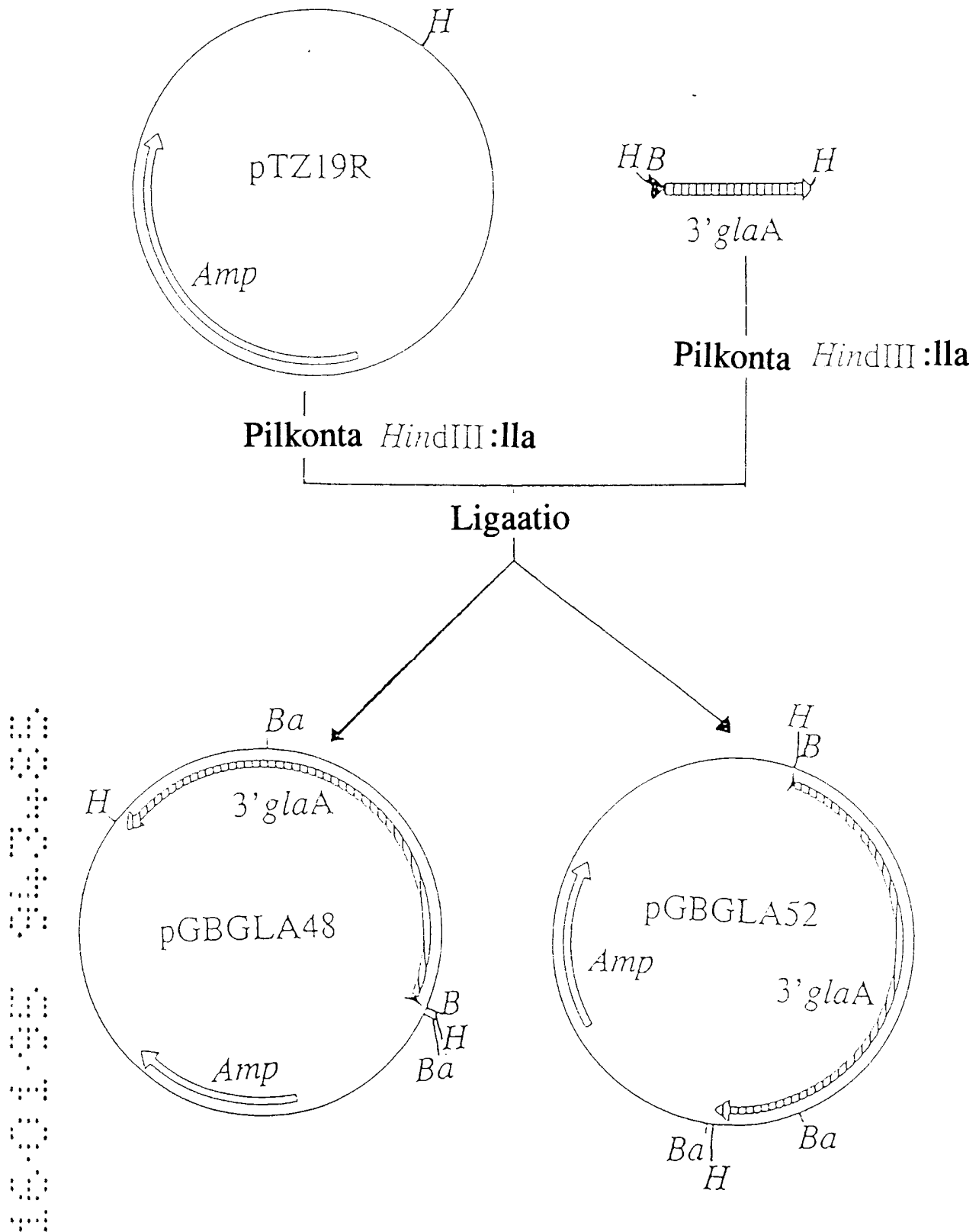


Fig. 32b

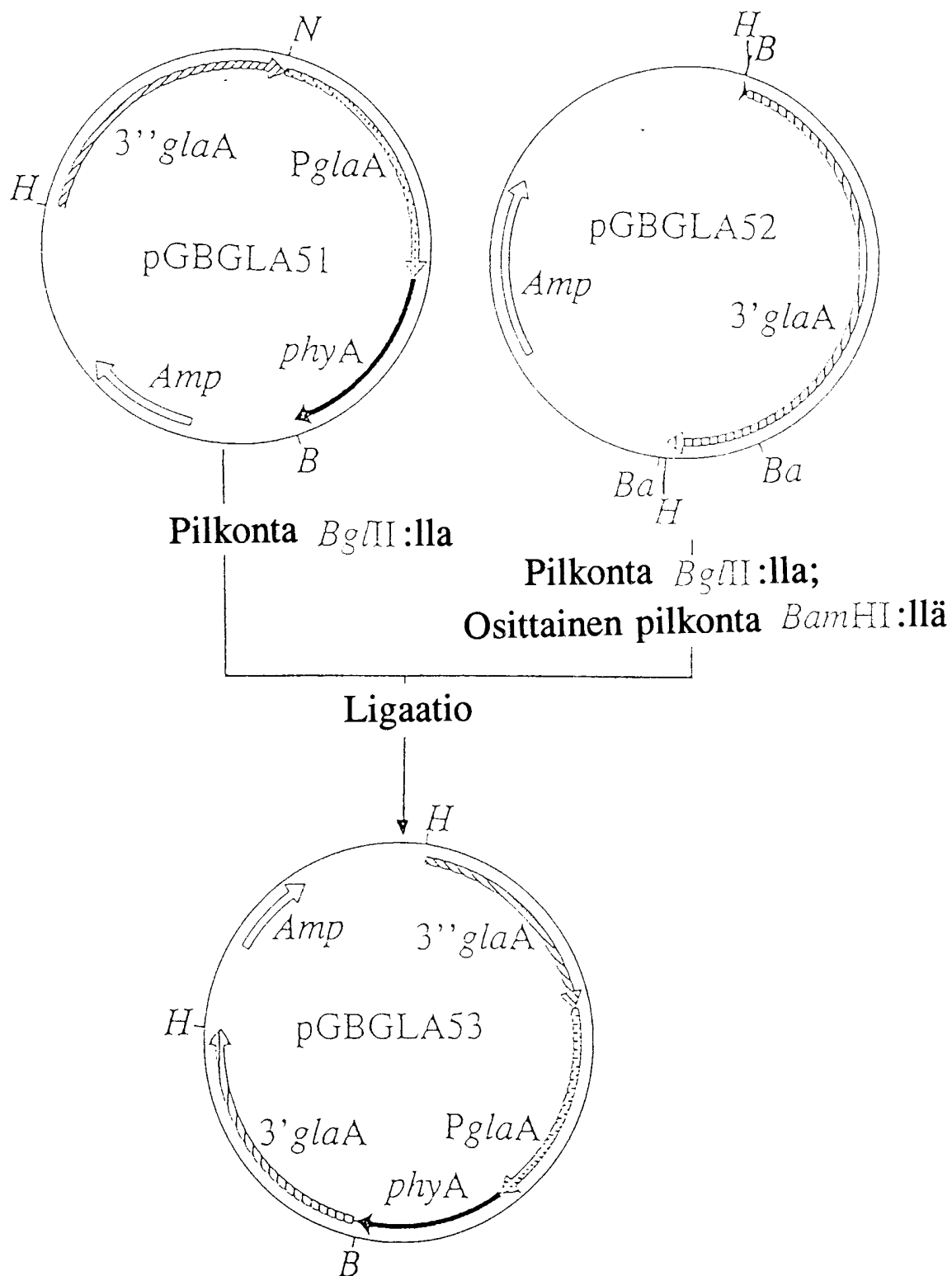
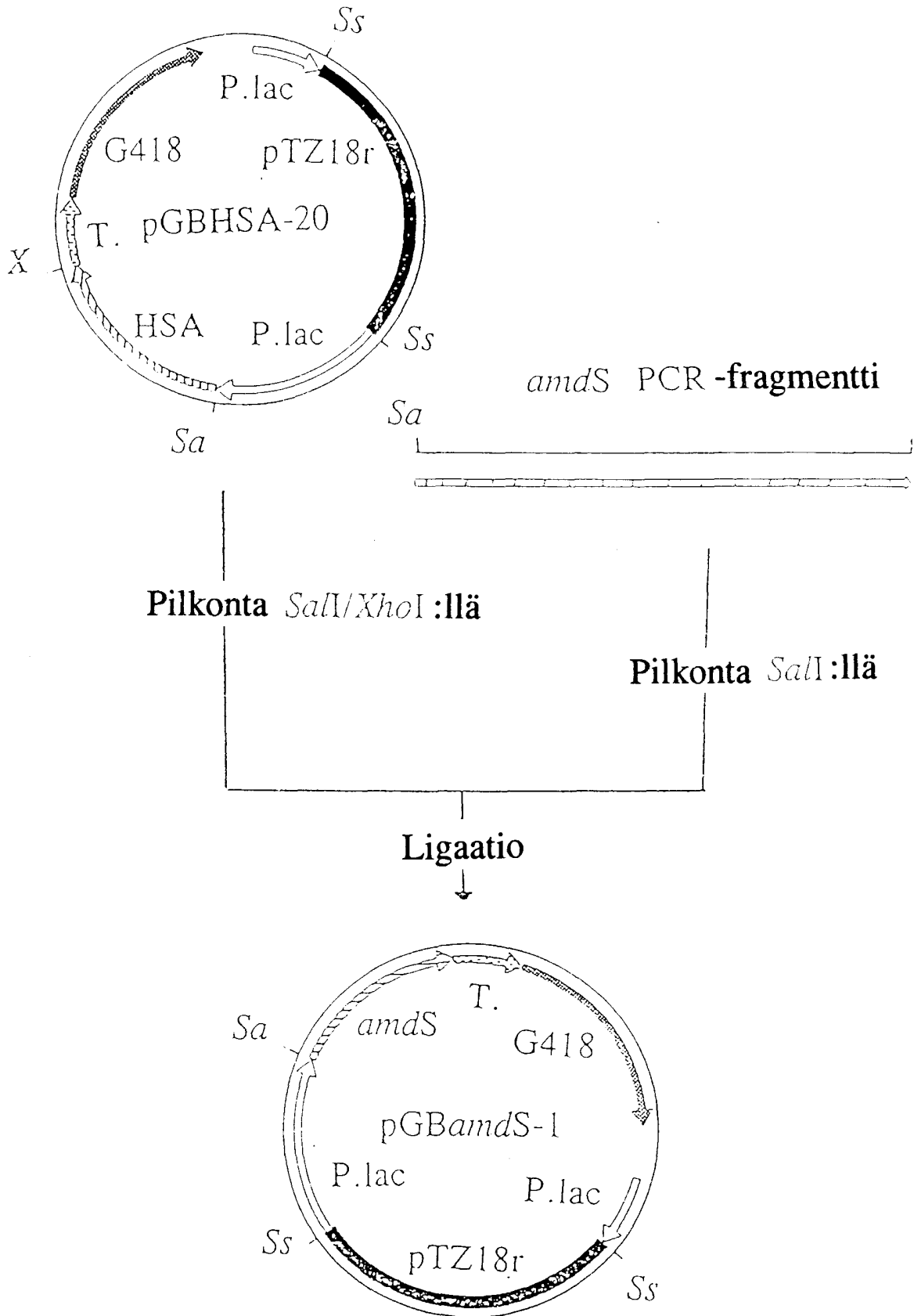


Fig. 33



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99

Fig. 34

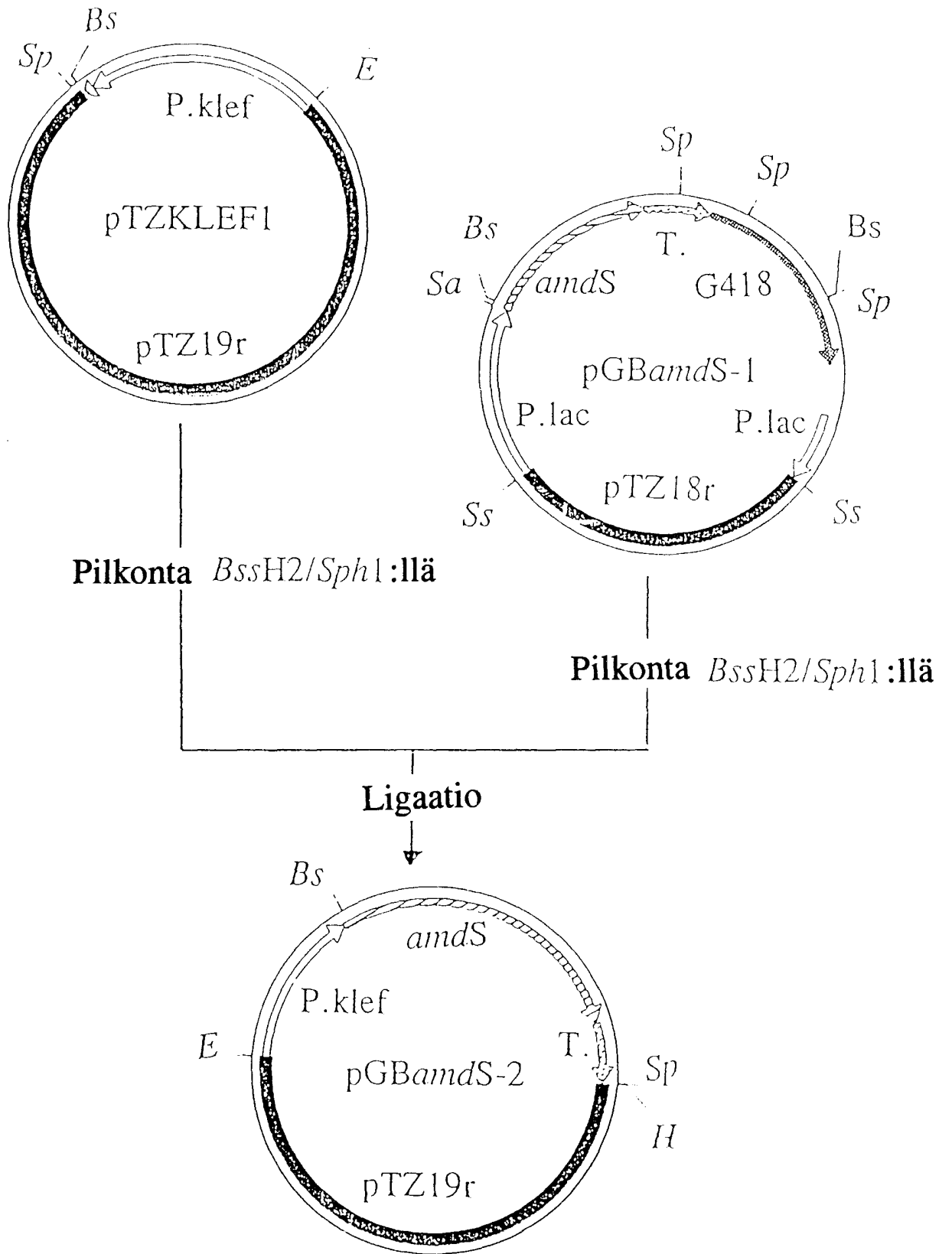


Fig. 35

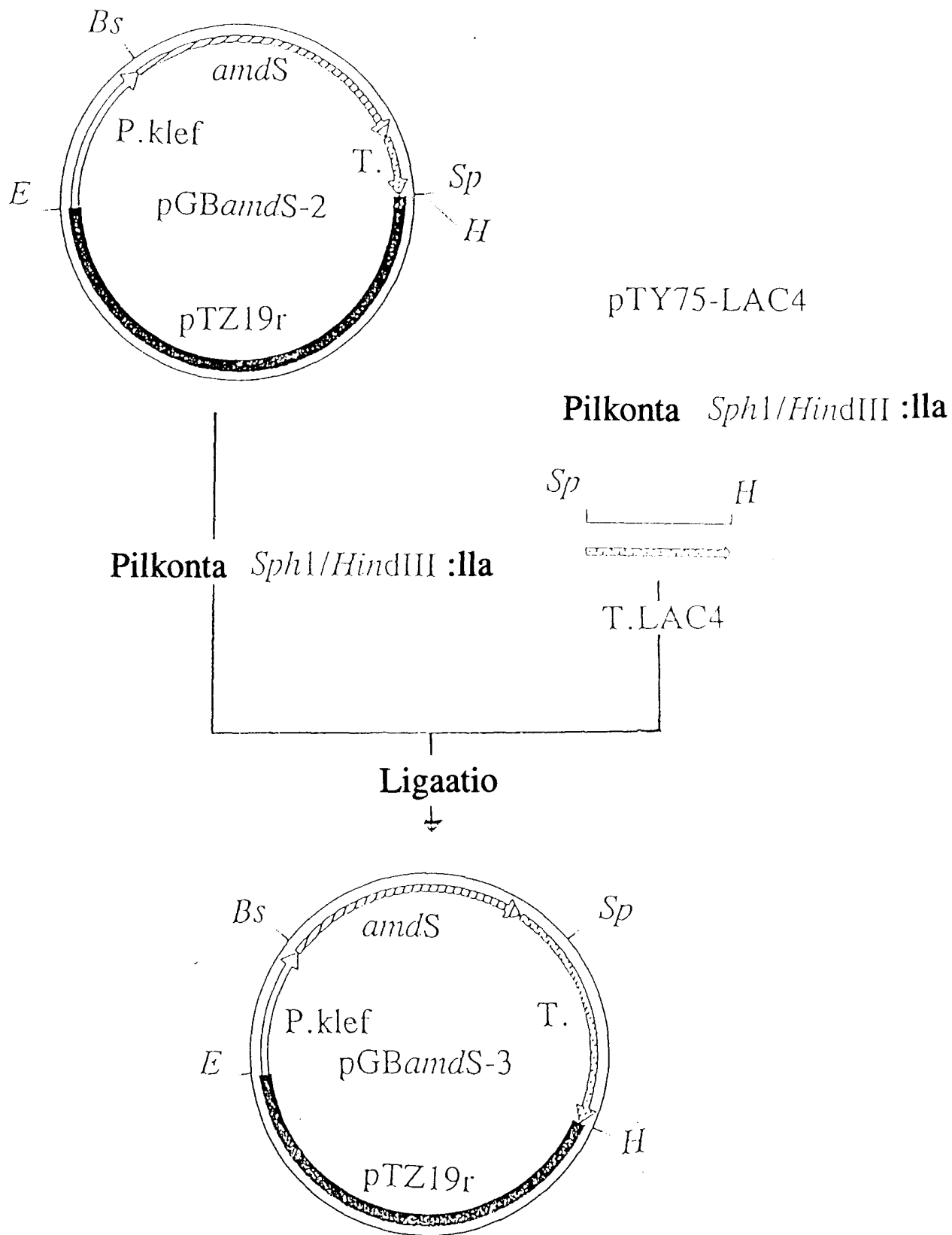


Fig. 36

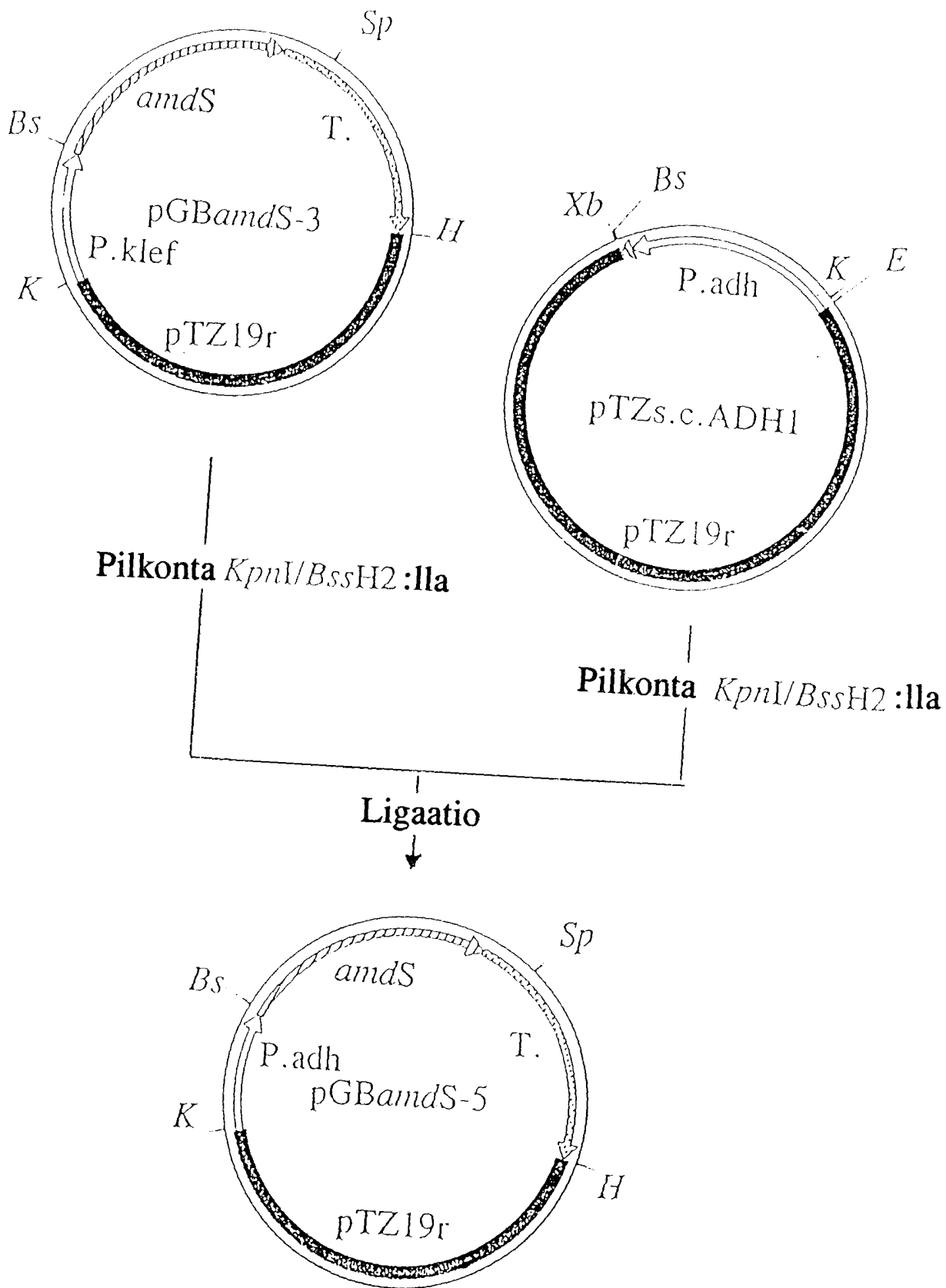


Fig. 37

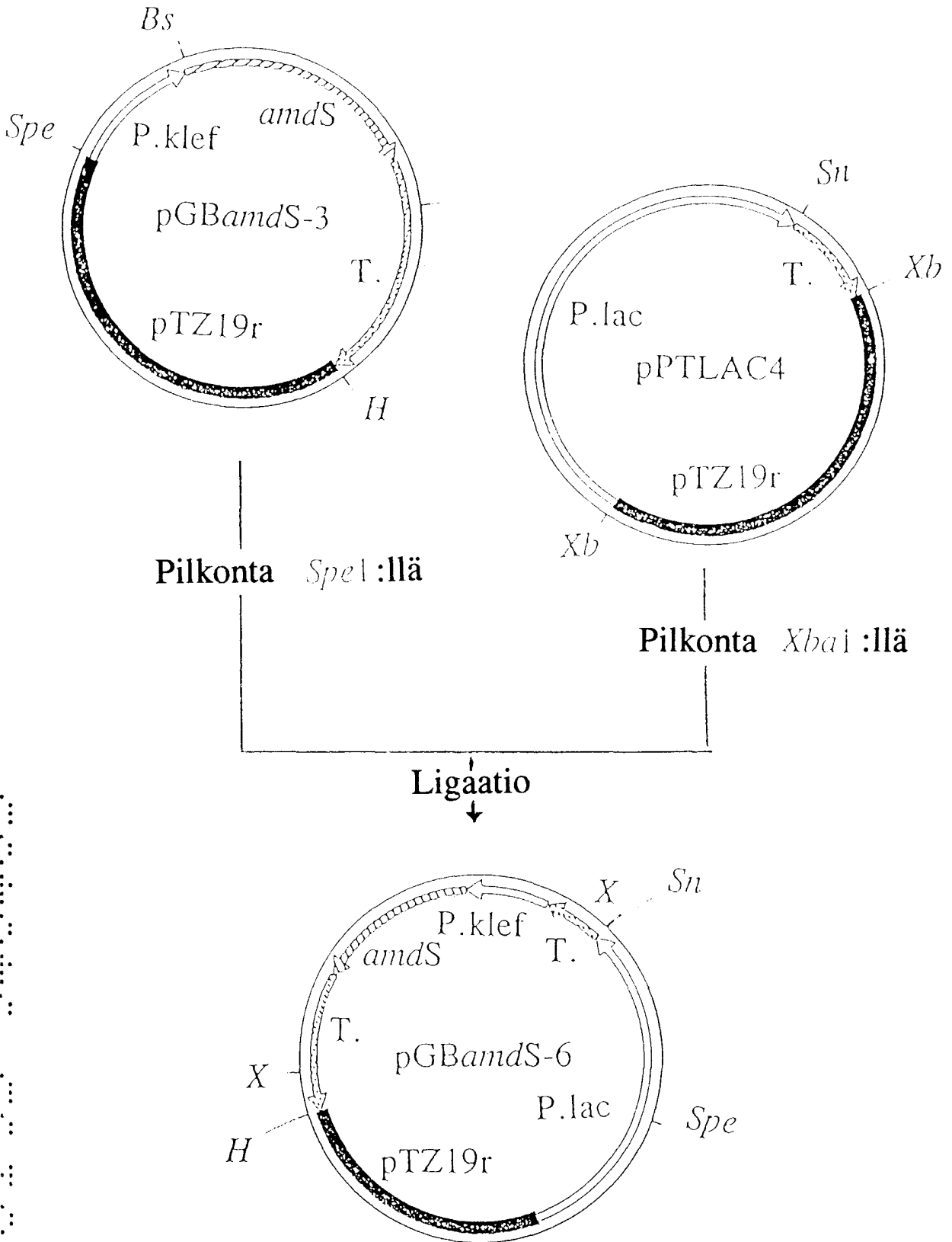


Fig. 38

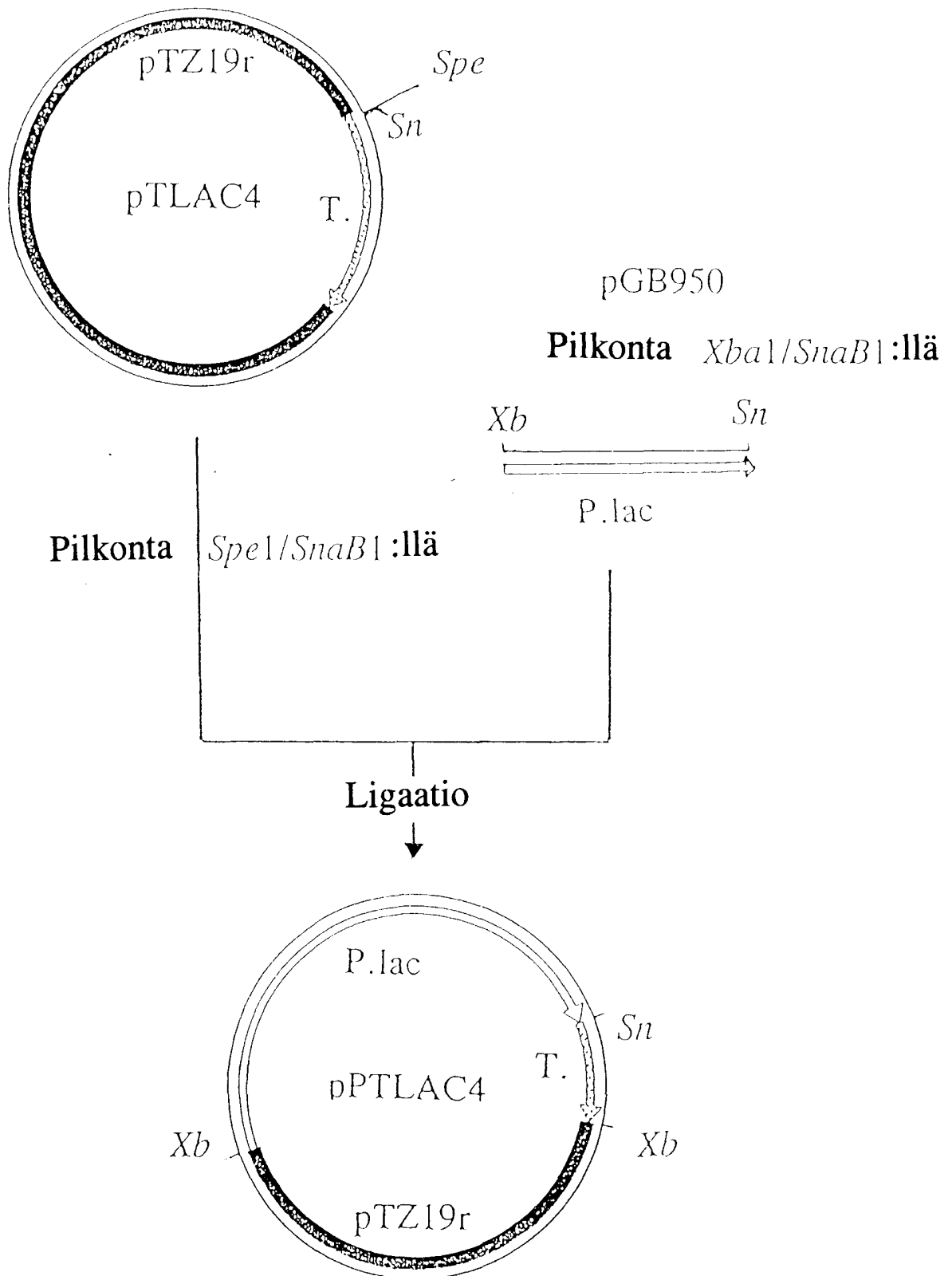


Fig. 39

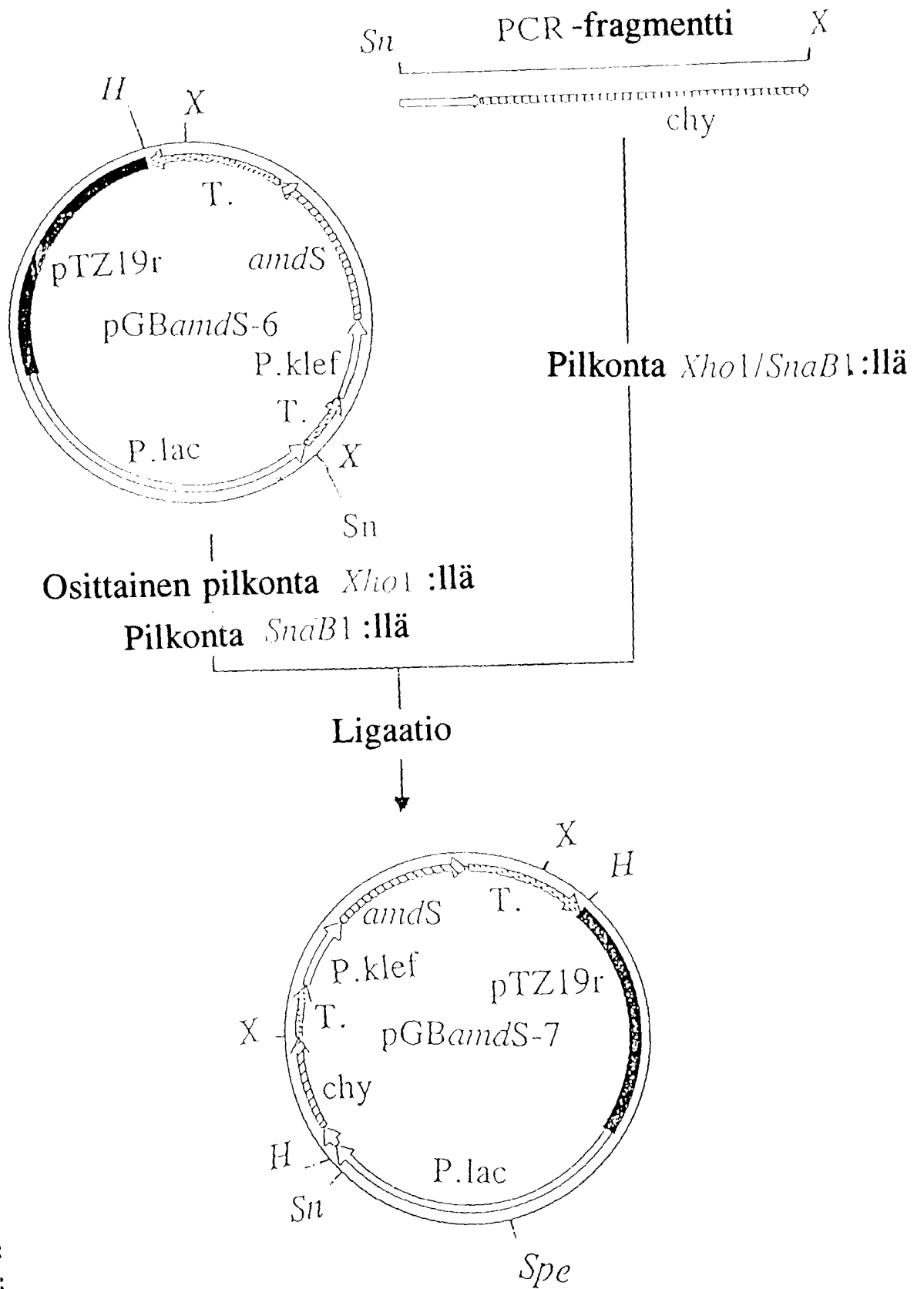
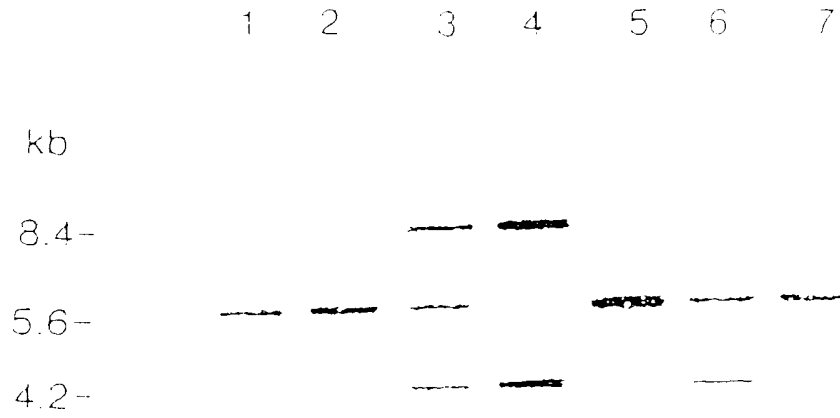


Fig. 40

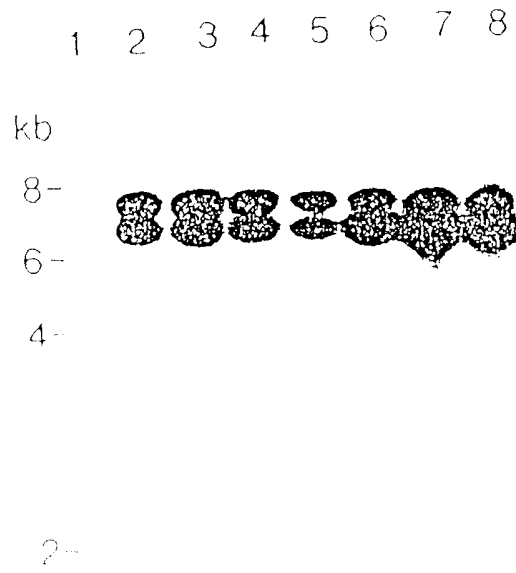


0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99

Fig. 41

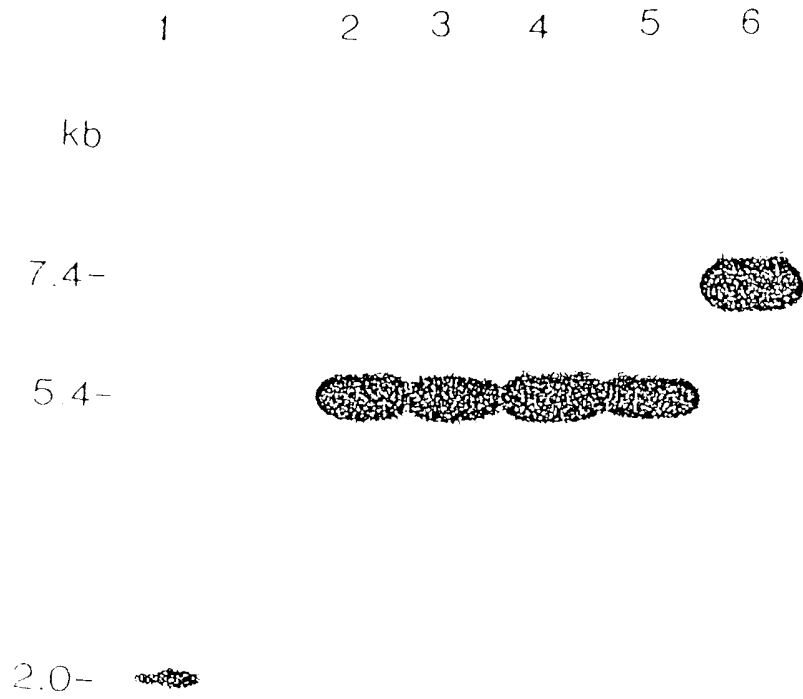


Fig. 42



0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0

Fig. 43



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Fig. 44

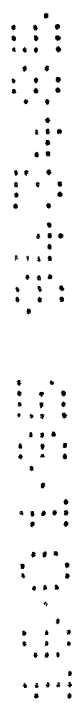
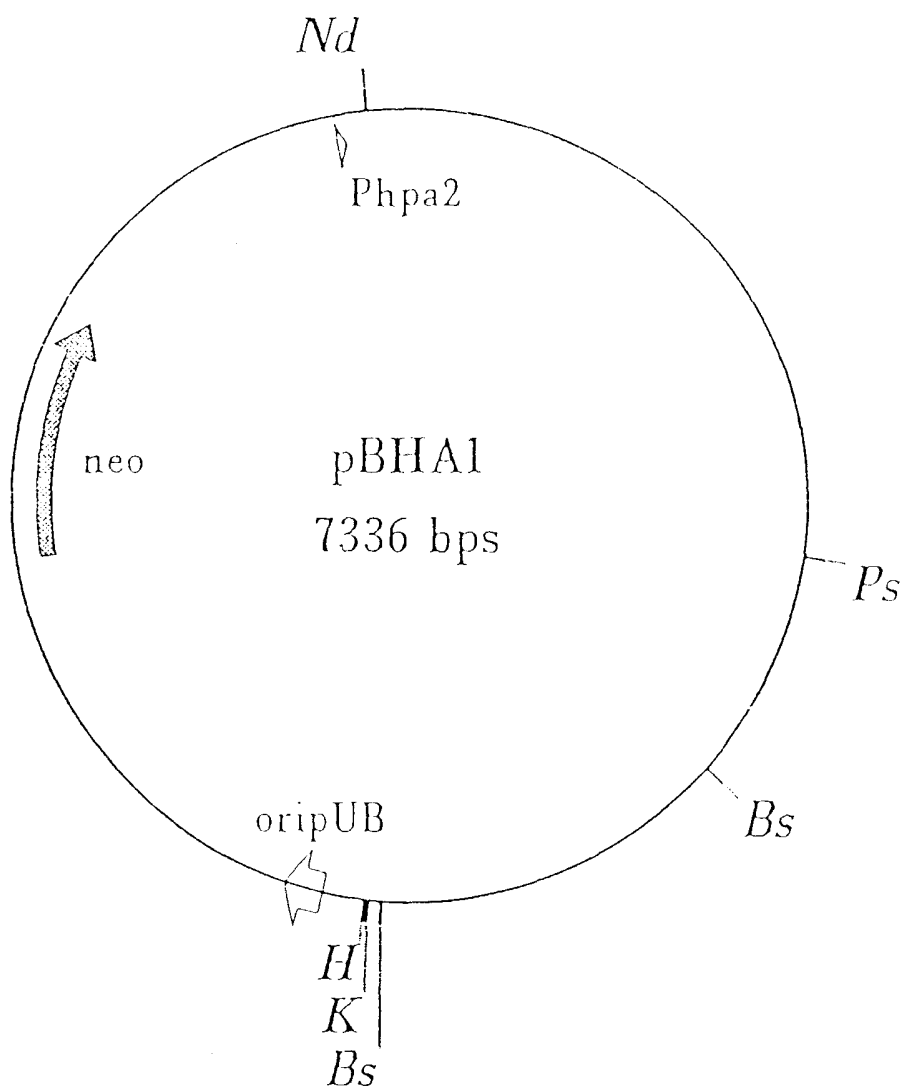
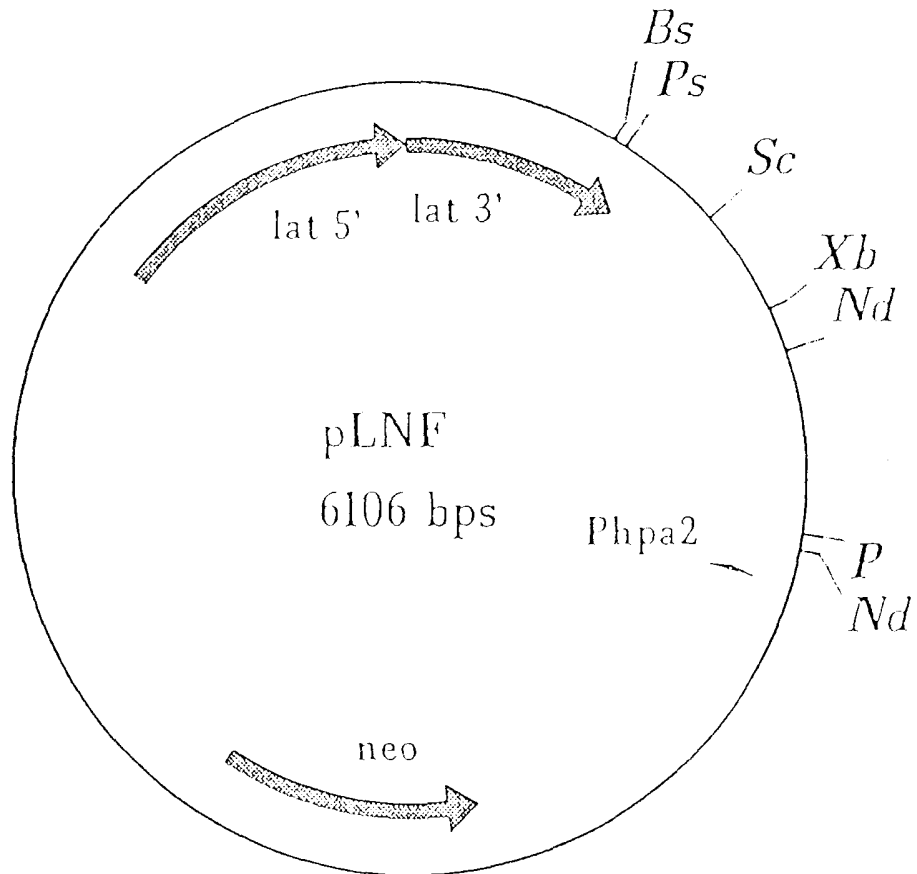
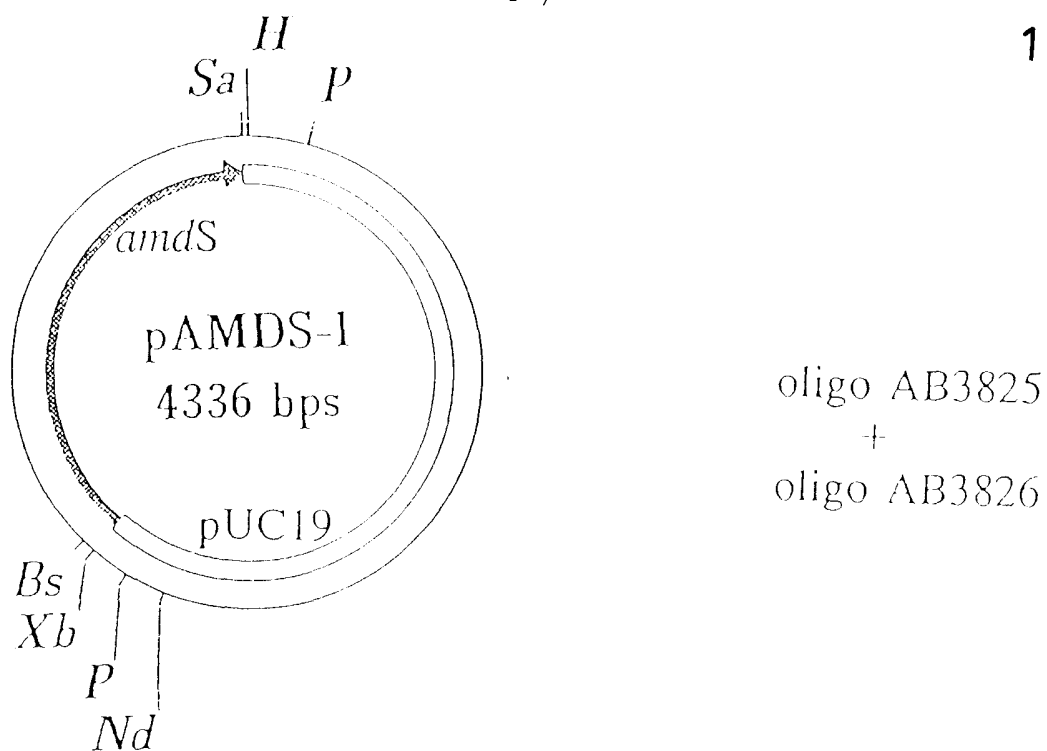


Fig. 45



8
9
0
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 46



pAMDS-1xBssH2xXbaI

pariuttaminen

Ligaatio

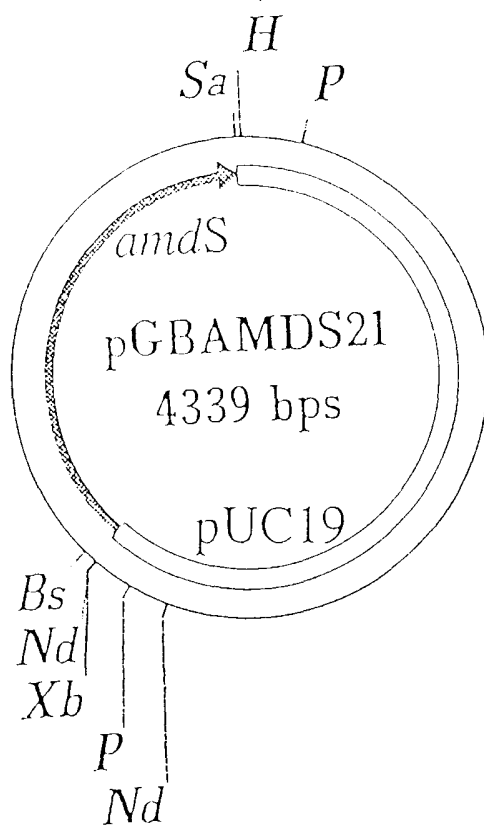


Fig. 47

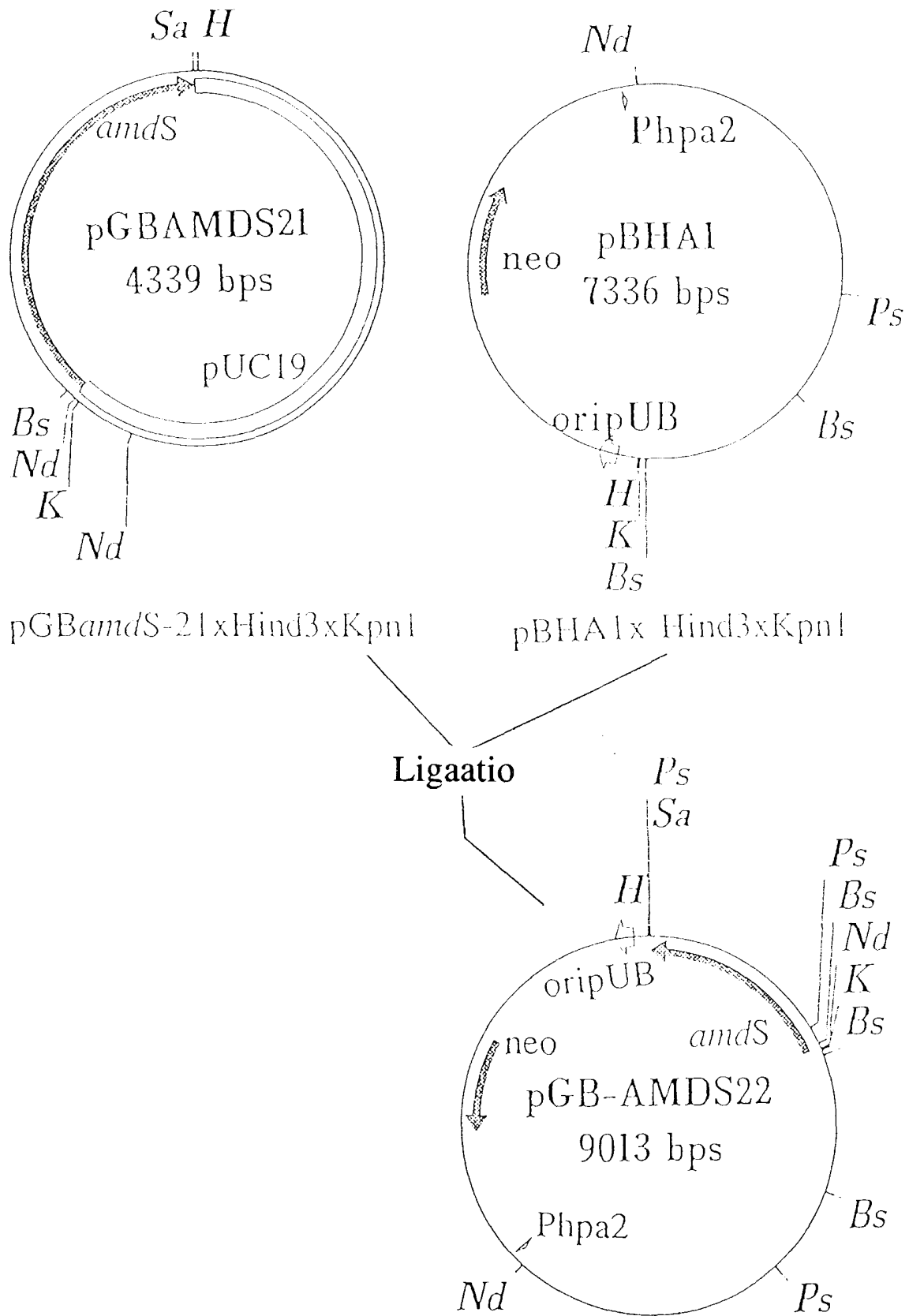
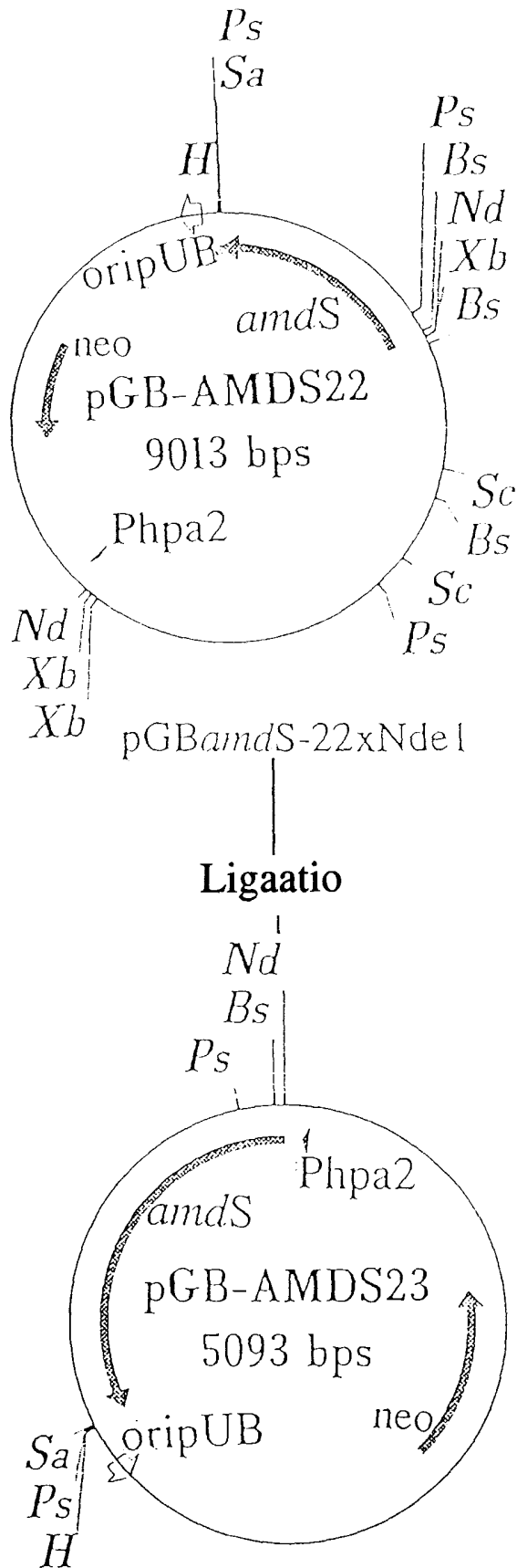
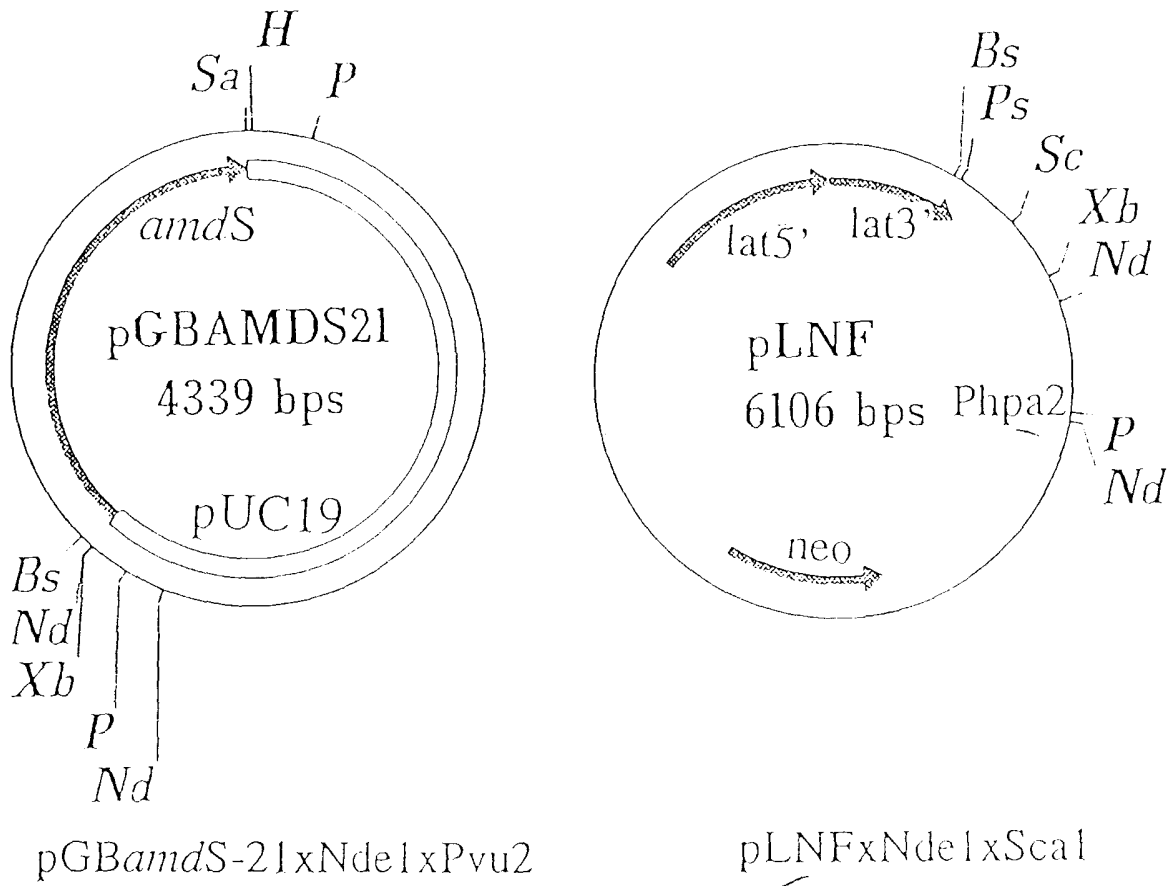


Fig. 48



0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X
Y
Z
[
]
^
_
`
~
{|

Fig. 49



Ligaatio

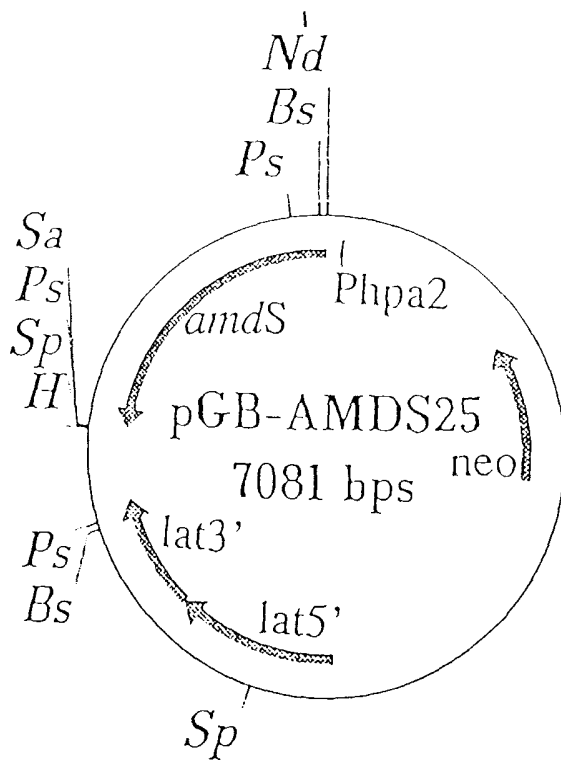
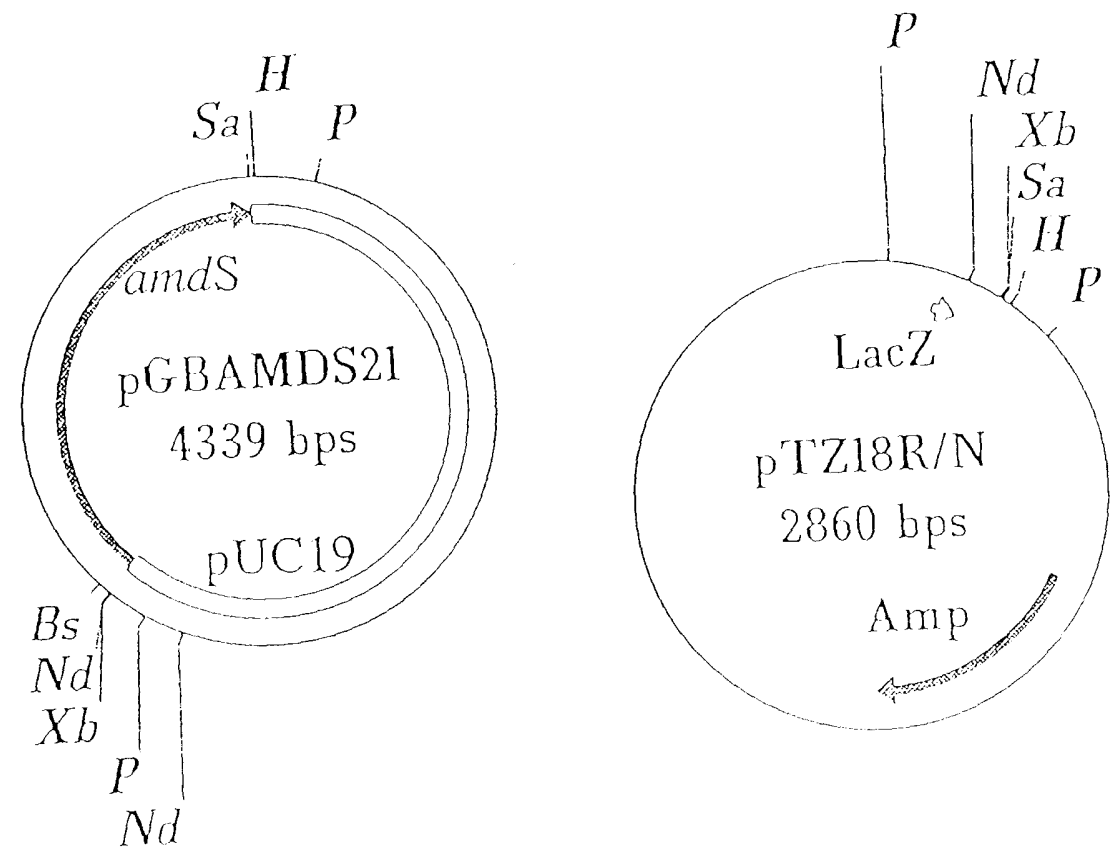


Fig. 50



pGB*amdS*-21xNde1xHind3 pTZ18RNxNde1xHind3

Ligaatio

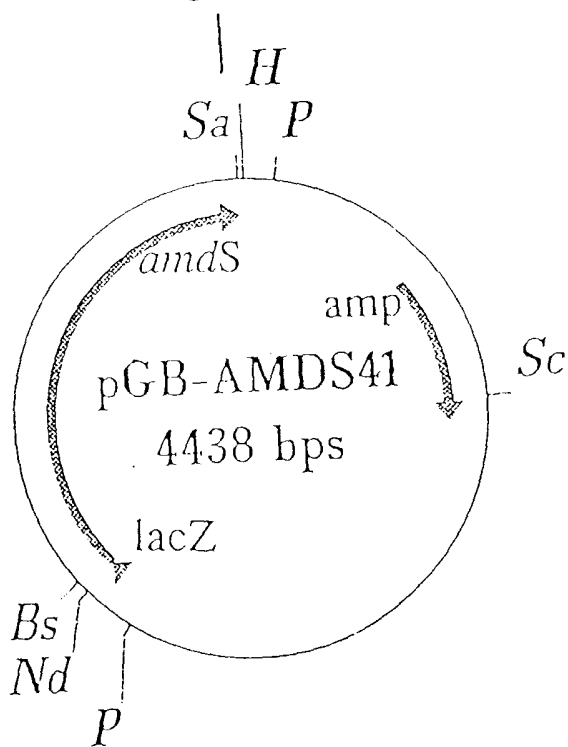


Fig. 51