

- (11) Patentas numeris: **4557** (51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/80**
C12N 15/53
- (21) Paraiškos numeris: **98-152** **C12N 15/56**
C12N 9/06
- (22) Paraiškos padavimo data: **1998 10 23** **C12N 9/24**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 06 25**
- (45) Patentas paskelbimo data: **1999 10 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/ES98/00056**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 03 05**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 10 23**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **P9700482, 1997 03 05, ES**
- (72) Išradėjas:
Jose Luis Barredo-Fuente, ES
Marta Rodriguez-Saiz, ES
Miguel Angel Moreno-Valle, ES
Alfonso J. Collados-de-la-Vieja, ES
Francisco Salto-Maldonado, ES
Bruno Diez-Garcia, ES
- (73) Patentas savininkas:
ANTIBIOTICOS, S.A., Avda. Antibioticos 59/61, 24080 Leon, ES
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT
- (83) Mikroorganizmo deponavimas:
CECT 4849, CECT 4850, CECT 4851, CECT 4852, Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, ES

-
- (54) Pavadinimas:
Glutamato dehidrogenazės, beta-N-acetilheksozaminidazės ir gama-aktino genų promotoriai bei jų panaudojimas filamentinių grybų ekspresijos, sekrecijos ir antisensinėse sistemose
- (57) Referatas:

Išradimas skirtas glutamato dehidrogenazės, β -acetilheksozaminidazės ir γ -aktino genų promotoriams ir jų panaudojimui filamentinių grybų ekspresijos, sekrecijos ir antisensinėse sistemose. Išradimas taip pat skirtas genų promotorių panaudojimui, kurių genai koduoja: (I) *Penicillium chrysogenum* NADP priklausančią glutamato dehidrogenazę (EC.1.4.1.4), (II) *Penicillium chrysogenum* β -N-acetilheksozaminidazę (EC.3.2.1.52) ir (III) *Penicillium chrysogenum* ir *Acremonium chrysogenum* γ -aktiną, kurie gali būti panaudoti galingų ekspresijos ir sekrecijos vektorių konstrukcijai, naudingų tiek *P. chrysogenum*, tiek *A. chrysogenum* bei giminingoms rūšims. Taip pat šie promotoriai gali būti panaudoti genų ekspresijai blokuoti per antisensines konstrukcijas. Reguluojant aukščiau minėtiems promotoriams, įmanoma valdyti kitų genų ekspresiją filamentiniuose grybuose, taip pat padidinant antibiotikų ir/arba jiems būdingų baltymų gamybą.

Išradimas skirtas *Penicillium chrysogenum* *gdh* ir *hex* genų bei *P. chrysogenum* ir *Acremonium chrysogenum* *act* geno ekspresijos techninei sričiai. Analizuojant šių genų nukleotidų seką, aptikta promotorių sritis, turinti transliacijos inicijavimo vietą, kuri gali būti panaudota sukurti galingus ekspresijos ir sekrecijos vektorius, naudojamus tiek *P. chrysogenum*, tiek *A. chrysogenum* ir jų giminingoms rūšims. Be to, šie promotoriai gali būti panaudoti genų ekspresijos blokavimui antisensinėmis konstrukcijomis. Kitų genų ekspresija filamentiniuose grybuose gali būti vykdoma, reguliuojant aukščiau minėtais promotoriais, gaunant padidintą kiekį būdingų antibiotikų ir/arba baltymų.

P. chrysogenum ir *A. chrysogenum* yra filamentiniai grybai, keliantys pramoninį susidomėjimą dėl jų gebos gaminti atitinkamai peniciliną ir cefalosporiną. Pastarojo dešimtmečio metu buvo žymiai išvystyta genetinės manipuliacijos technika, pritaikoma abiejuose mikroorganizmuose. *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* genetinės manipuliacijos techniką sudaro protoplastų transformavimas vektoriais, kurie turi fleomicino atsparumo geną (toliau vadinamas *ble^R* genu) (Kolar, M. et al. (1988), Gene 62, 127-134) kaip selektyvią žymę, o taip pat papildomų dominančių nepaliestų genų kopijų ekspresija ir tiriamo geno promotoriaus pakeitimas kitu promotoriumi, kuris gali pagerinti jo ekspresiją. Homologinių genų ekspresija grybuose, tokiuose, kaip *P. chrysogenum* ar *A. chrysogenum*, gali būti reguliuojama neigiamai, tuo tarpu, kalbant apie heterologinius genus, yra įmanoma, kad jų promotorius nebus efektyviai atpažintas šiais grybais. Siekiant išvengti šių problemų, buvo identifikuoti ir klonuoti genai, kurie yra ekspresuoti esminiai ir kuriuose ši ekspresija neturi neigiamo katabolinio reguliavimo, toliau vadinami stipriais promotoriais. Bendru atveju, manoma, kad aukštos ekspresijos genai turi signalus promotoriaus srityje, kurie palengvina aukštus transkripcijos lygius ir kurie atlieka pagrindinį vaidmenį funkcijose, vykstančiose pirminiame ląstelės

metabolizme. Šie genai yra: genai, kurie koduoja NADP priklausančią glutamato dehidrogenazę (EC.1.4.1.4) (toliau vadinamas *gdh* genu), β -N-acetilheksozaminidazę (EC.3.2.1.52) (toliau vadinamas *hex* genu) ir γ -aktiną (toliau vadinamas *act* genu).

Yra ankstesnės nuorodos į *gdh*, *hex* ir *act* genus iš mikroorganizmų, kitokių nei tie, kurie naudojami šiame išradime. Tinkamiausi bibliografiniai šaltiniai yra: (I) grybo *Neurospora crassa* *gdh* geno nukleotidų seka (Kinnaird, J.H. ir Fincham, J.R.S. (1983), *Gene* 26, 253-260), o taip pat *Aspergillus nidulans* grybo *gdhA* geno ekspresijos reguliavimas (Hawkins, A.R. et al. (1989), *Mol. Gen. Genet.* 418, 105-111), (II) *Candida albicans* grybo *hex1* geno klonavimas ir ekspresija (Cannon, R.D. et al. (1994), *J. Bacteriol.* 2640-2647) ir (III) *A. nidulans* grybo *act* geno charakteristika (Fidel, S. et al.)1988), *Gene* 70, 283-293). *P. chrysogenum* heterologinių genų ekspresija, naudojant *pcbC* ar *penDE* genų promotorius, buvo aprašyta Cantwell, C.A. et al. 1992 m. (*Proc. R. Soc. London Ser. B* 248, 283-289). Be to, *A. chrysogenum* heterologinių genų ekspresija, naudojant β -izopropilmalato dehidrogenazės (Japonijos patentas Nr. 80295/1989) ir gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės genų promotorius (EP A 037622A1/1989) taip pat yra aprašyta.

Genų ekspresijos inaktyvavimas pramoniniuose kamienuose kartais yra reikalingas, siekiant eliminuoti nepageidaujamus fermentų poveikius. Kadangi dėl daugelio pramoninių kamienų chromosomų pasikartojimo laipsnio ploidiškumo lygio labai dažnai yra sunku blokuoti ekspresiją tiesioginiu genų suskaldymu, tenka naudoti sistemas ekspresijos inaktyvinimui, kurios yra nepriklausomos nuo chromosomų pagrindinio skaičiaus pasikartojimo laipsnio lygio. Sukūrus antisensines konstrukcijas, ekspresuotas stiprių promotorių įtakoje, tapo įmanoma nutraukti genų ekspresiją. Tokios rūšies konstrukcijos yra ypatingai naudingos pramoniniuose kamienuose, nes dėl jų chromosomų pagrindinio skaičiaus pasikartojimo laipsnio lygių (Kunkel et al. (1992) *Appl. Microbiol. Biotech.* 36, 499-502) yra sunku visiškai inaktyvuoti genus. Yra aprašytas antisensinių konstrukcijų naudojimas blokuoti fermentų veiklą mielėse (Atkins, D. et al. (1994), *Biol. Chem. H-S* 375, 721-729) ir augaluose (Hamada, T. (1996), *Transgenic research* 5, 115-121; John, M.E. (1996) *Plant Mol. Biol.* 30,

297-306). *Hex* promotorius pasižymi ypatinga ekstraląstelinio fermento kodavimo sąvybe, kuri leidžia jį panaudoti ekstraląstelinių baltymų ekspresijai.

Tačiau nėra nuorodų į jokių šaltinių, kuriuose aprašytos arba filamentinių grybų naudojamų šiame išradime genų sekos arba fermentų, kurie sintezuojami ekspresuojant tuos genus, sekos. Taip pat niekur nėra aprašytas grybų genų stipriųjų promotorių panaudojimas genų ekspresijai, sekrecijai ar inaktyvavimui, aprašytas šiame išradime.

Stipriųjų promotorių naudojimas tam tikrų genų padidintai ekspresijai gali iššaukti penicilino ar cefalosporino gamybos pagerinimą ir taip pat naujų antibiotikų, gautų pakeitimo būdu iš pastarųjų, sintezę.

Šiame išradime aprašytas naujas *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* kamienų, galinčių ekspresuoti homologinius ar heterologinius genus, kontroliuojamus promotorių, gavimo būdas. Yra aprašytas promotorių, atitinkančių genus, kurie koduoja *P. chrysogenum* NADP priklausančią glutamato dehidrogenazę (EC.1.4.1.4) – *gdh* geno, *P. chrysogenum* β -N-acetilheksoaminidazę (EC.3.2.1.52) – *hex* geno ir *P. chrysogenum* bei *A. chrysogenum* γ -aktiną – *act* geno, apibūdinimas ir po to sekantis panaudojimas. Šių promotorių panaudojimas padidintai ekspresuoti genus, susijusius su penicilino ir/arba cefalosporino biosinteze aukščiau minėtuose kamienuose yra vienas iš šio išradimo tikslų. Šie promotoriai taip pat gali būti panaudoti blokuoti genų ekspresiją antisensinių konstrukcijų pagalba.

Šis išradimas yra pagrįstas tuo, kad *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* yra nukleino rūgšties donorai. Turint išgrynintą genomine DNR, buvo sukonstruotos abiejų mikroorganizmų DNR sekų bibliotekos, kaip aprašyta 1 ir 4 pavyzdžiuose, ir buvo atliktas jų skryningas: (I) sintetiniais oligonukleotidais, atitinkančiais *N. crassa* *gdh* geną, siekiant klonuoti homologinį *P. chrysogenum* geną, (II) oligonukleotidų deriniais, sintezuotais pagal β -N-acetilheksoaminidazės fermento amino galo seką, siekiant klonuoti *P. chrysogenum* *hex* geną, ir (III) *A. nidulans* *act* geno fragmentu, siekiant klonuoti homologinius *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* genus. Klonai, išgryninti jų

teigiamos hibridizacijos su atitinkamu mėginiu gebos dėka, vėliau buvo analizuojami, bandant aptikti ieškomus genus.

P. chrysogenum grybo *gdh* genas buvo identifikuotas 7,2 kb *EcoRI* fragmente ir dviejuose atitinkamai 2,9 ir 1,5 kb *BamHI* fragmentuose. DNR srities, turinčios šį geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.1. Po to buvo nustatyta 2816 nukleotidų seka (SEQ ID No:1), turinti atvirą skaitymo rėmelį (ORF) su ryškiai išreikštu pirmenybiniu kodono naudojimo pavyzdžiu, kurio ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 922 pozicijoje ir TAA translacijos beprasmis kodonas buvo aptiktas 2522 pozicijoje. Taip pat buvo aptikti du 159 bp ir 56 bp intronai atitinkamai pozicijose tarp 971-1130 ir 1262-1318. Šis ORF koduoja 49837 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 6,18, kurio 461 aminorūgščių seka (SEQ ID No:5) turi 72,4% tapatumą su *N. crassa fermento* NADP priklausančio glutamato dehidrogenazės fermento aminorūgščių seka. Promotoriaus srityje rastos pirimidinu praturtintos zonos, panašios į tas, kurios yra labai ekspresuotuose genuose, o taip pat dvi numanomos TATA sekos (šios sekos aptinkamos tam tikrų grybų promotoriuose nuo 30 iki 50 bp prieš transkripcijos inicijavimo vietą) (Davis, M.A. ir Hynes, M.J. (1991), *More Gene manipulations in Fungi*, Academic Press, San Diego, California) ir CCAAT seka (kuri aptinkama maždaug 30% eukariotinių genų promotorių nuo 50 iki 200 bp prieš transkripcijos inicijavimo vietą) (Bucher, P. (1990) *J. Mol. Biol.* 212: 563-578). Šis promotorius buvo panaudotas ekspresuoti *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* *E. coli* geną, kuris koduoja β-galaktozidazę (toliau vadinamas *lacZ* genu) ir *S. hindustanus ble^R* geną. Tuo tikslu, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, buvo sukurtos plazmidės pSKGSu ir pALfleo7 (fig.5). Iš gautų rezultatų padaryta išvada, kad *gdh* promotorius (toliau vadinamas *Pgdh*) gali valdyti heterologinių *lacZ* ir *ble^R* genų ekspresiją tiek *P. chrysogenum*, tiek *A. chrysogenum* grybuose, o taip pat ir *E. coli*.

Antisensinių konstrukcijų, ekspresuojamų nuo stiprių promotorių, sukūrimas leidžia nutraukti genų ekspresiją. Šiuo tikslu buvo sukurta plazmidė pALP888 (fig.5), kaip tai aprašyta 1 pavyzdžio 1.3 skyriuje. Gauti rezultatai patvirtina galimybę visiškai ar dalinai blokuoti nepageidaujamą fermentų veiklą *P. chrysogenum*, naudojant antisensines konstrukcijas, naudojant *Pgdh*.

P. chrysogenum hex genas buvo identifikuotas 3,2 kb *SacI* fragmente ir 3,1 kb *Sall* fragmente. DNR srities, turinčios *hex* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.2. Tuomet buvo nustatyta 5240 nukleotidų seka (SEQ ID No:2), patvirtinanti dviejų ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimą, vienas iš jų atitiko *hex* geną. *Hex* geno ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 1324 pozicijoje, o TGA terminacijos kodonas – 3112 pozicijoje. Šis ORF neturi intronų ir koduoja 66545 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,34, kurio 596 amino rūgščių seka (SEQ ID No:6) turi 49,0% identiškumą su *Candida albicans* fermento β -N-acetilheksozaminidazės aminorūgščių seka. Be to, nustatytoji amino rūgščių seka turi polipeptidus, nustatytus chemiškai iš išgryninto fermento 19-40 ir 99-120 pozicijose. Promotoriaus srityje aptiktos dvi pirimidinu praturtintos zonos, numanoma TATA seka ir CAAT seka. Tuomet šis promotorius buvo naudojamas ekspresuoti *S. hindustanus ble^R* geną *P. chrysogenum*. Šiuo tikslu, kaip aprašyta 2 pavyzdyje, buvo sukurta plazmidė pALP480 (fig.6). Iš gautų rezultatų padaryta išvada, kad *hex* promotorius (toliau vadinamas *Phex*) gali kontroliuoti heterologinio *ble^R* geno ekspresiją *P. chrysogenum* grybelyje. Be to, faktas, kad fermentas β -N-acetilheksozaminidazė yra baltymas, gausiai sekretuojamas *P. chrysogenum* į kultūrinę terpę, leidžia panaudoti *hex* geną homologinių ar heterologinių baltymų ekspresijai ir sekrecijai *P. chrysogenum* ar gimininguose grybuose. Ekspresuojami genai gali būti sulieti su promotoriaus sritimi, turinčia *hex* geno sekrecijos signalo seką tuo pačiu skaitymo rėmeliu, ar dar jie gali būti sulieti su pilnu *hex* genu.

P. chrysogenum act genas (toliau vadinamas *actPc*) buvo identifikuotas 5,2 kb *BamHI*, 4,9 kb *EcoRI* ir 5,9 kb *HindIII* fragmentuose. DNR srities, turinčios *actPc* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.3. Turint nustatytą 2994 nukleotidų seką (SEQ ID No:3), buvo patvirtintas ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimas. ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 494 pozicijoje, o TAA beprasmis kodonas – 2250 pozicijoje. Šis ORF turi 5 intronus ir koduoja 41760 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,51, kurio 375 aminorūgščių seka (SEQ ID No:7) turi 98,1% identiškumą su *A. nidulans* γ -aktino baltymo aminorūgščių seka. Promotoriaus

sirtyje aptiktos dvi pirimidimu praturtintos zonos, numanoma TATA seka ir keturios CAAT sekos. Tuomet šis promotorius buvo naudojamas ekspresuoti *S. hindustanus* grybo *ble^R* geną *P. chrysogenum* grybe. Šiuo tikslu, kaip aprašyta 3 pavyzdyje, buvo sukurta plazmidė pALPfleo1 (fig.6). Iš gautų rezultatų padaryta išvada, kad *P. chrysogenum act* promotorius (toliau vadinamas *PactPc*) gali valdyti heterologinio *ble^R* geno ekspresiją *P. chrysogenum*.

A. chrysogenum act genas (toliau vadinamas *actAc*) buvo identifikuotas 2,4 ir 1,1 kb *Sall* fragmentuose, 3,9 kb *SmaI* fragmente ir 8,7 kb *HindIII* fragmente. DNR srities, turinčios *actAc* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.4. Nustatyta 3240 nukleotidų seka (SEQ ID No:4) patvirtino ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimą. ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 787 pozicijoje, o TAA terminacijos kodonas – 2478 pozicijoje. Šis ORF turi 5 intronus ir koduoja 41612 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,51, kurio 375 amino rūgščių seka (SEQ ID No:8) turi 98,4% ir 98,1% identiškumą su aminorūgščių sekomis, atitinkančiomis *A. nidulans* ir *P. chrysogenum* grybų γ -aktino baltymus. Promotoriaus srityje aptiktos pirimidimu praturtintos zonos ir CAAT seka, tačiau TATA sekos egzistavimas nenustatytas. Tuomet šis promotorius buvo naudojamas ekspresuoti *S. hindustanus ble^R* geną *A. chrysogenum*. Šiuo tikslu, kaip aprašyta 4 pavyzdyje, buvo sukurta plazmidė pALCfleo1 (fig.6). Iš gautų rezultatų padaryta išvada, kad *A. chrysogenum act* promotorius (toliau vadinamas *PactAc*) gali kontroliuoti heterologinio *ble^R* geno ekspresiją *A. chrysogenum*.

Visais atvejais heterologinio geno ekspresija *P. chrysogenum* ar *A. chrysogenum*, reguliuojant grybų promotoriui, buvo pasiekta, suliejant šį geną teisingame skaitymo rėmelyje. Nors *lacZ* ir *ble^R* genai buvo ekspresuoti kaip pavyzdžiai, panašiu būdu būtų įmanoma ekspresuoti genus, kurie koduoja fermentus, dalyvaujančius penicilino biosintezėje: *pcbAB* (α -aminoadipilcisteinilvalino sintetazė), *pcbC* (izopenicilino N sintetazė), *penDE* (acil-CoA:6-APA aciltransferazė), *pcl* (fenilacetil-CoA ligazė) ir t.t.; ar cefalosporino biosintezėje: *pcbAB* (α -aminoadipilcisteinilvalino sintetazė), *pcbC* (izopenicilino N sintetazė), *cefD* (izopenicilino N izomerazė), *cefEF* (deacetoksicefalosporino C sintetazė/hidroksilazė), *cefG* (deacetoksicefalosporino

C acetiltransferazė) ir t.t. Ekspresuojamas genas gali būti gautas įvairiais būdais: išskirtas iš chromosominės DNR, cDNR sintezuota iš mRNR, sintezuotas chemiškai ir t.t. Pagrindiniai teisingo promotoriaus-geno suliejimo procesai yra aprašyti Sambrook, J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, ir Ausubel *et al.* (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, USA.

P. chrysogenum ir *A. chrysogenum* buvo panaudoti kaip šeimininko kamienai, tačiau gali būti panaudotas bet koks giminingas ar išvestas iš jų kamienas. Būdas, naudojamas protoplastų gavimui ir *P. chrysogenum* transformacijai, pagrįstas Contoral *et al.* 1987 m., (*Biotechnology* 5: 494-497) ir Diez *et al.* 1987 m. (*Curr. Genet.* 12: 277-282) ir aprašytas 1 pavyzdyje. Protoplastų gavimas ir *A. chrysogenum* transformacija aprašyti 4 pavyzdyje. Abiem atvejais selektyvia žyme buvo naudojamas antibiotikas fleomicinas, ir plazmidės pALfleo7, pALP480, pALPfleo1 ar pALCfleo1, turinčios *ble^R* geną, ekspresuojamą, atitinkamai reguliuojant, *Pgdh*, *Phex*, *PactPc* ir *PactAc*. Tačiau būtų galima panaudoti bet kurią žymę, kuri galėtų selektyviai atskirti transformanto kamienus nuo kitų.

Transformantas gali būti užaugintas kultūrinėje terpėje, turinčioje anglies ir azoto šaltinių, kurie gali būti asimiliuoti. Anglies šaltiniais galėtų būti gliukozė, sacharozė, laktozė, krakmolai, glicerinas, organinės rūgštys, alkoholiai, riebalų rūgštys ir t.t., naudojamos pavieniui ar derinyje. Azoto šaltiniais galėtų būti peptonas, salyklo ekstraktas, mielių ekstraktas, kukurūzų mirkymo skystis, glitimas, karbamidas, amonio druskos, nitratai, NZ-aminai, amonio sulfatas ir t.t., naudojami pavieniui ar derinyje. Neorganinės druskos, kurios gali būti naudojamos kaip kultūrinės terpės komponentai, yra fosfatai (pavyzdžiui, kalio fosfatas), sulfatai (pavyzdžiui, natrio sulfatas), chloridai (pavyzdžiui, magnio chloridas) ir t.t., o geležis, magnis, kalcis, manganas, kobaltas ir t.t. gali būti naudojami kaip jonai. Kultivavimo sąlygos, tokios, kaip inkubacijos temperatūra, kultūrinės terpės pH, aeracija, inkubacijos laikas ir t.t. gali būti pasirinktos ir priderintos prie naudojamų kamienų. Tačiau, kalbant apskritai, fermentacija

vykdoma nuo 4 iki 14 dienų anaerobinėmis sąlygomis, esant temperatūrai tarp 20°C ir 30°C, o pH tarp 5 ir 9.

Apibendrinant, galima pasakyti, kad šis išradimas apima: (I) DNR fragmentus, kurie turi *P. chrysogenum* *gdh*, *hex* ir *act* genų ir *A. chrysogenum* *act* geno promotorius, (II) plazmides, turinčias savo sudėtyje aukščiau minėtus promotorius kartu su jų transliacijos inicijavimo vieta, (III) plazmides, kuriose yra įklonuotas homologinis ar heterologinis struktūrinis genas ar antisensinis DNR fragmentas, reguliuojamas šiais promotoriais, (IV) *P. chrysogenum* ar *A. chrysogenum* kamienai, turintys šias plazmides, (V) transformantų kamienus, galinčius ekspresuoti plazmidėje esantį struktūrinį geną ar antisensinę DNR, reguliuojamą promotoriumi, ir (VI) transformantų kamienus, galinčius išskirti homologinius ar heterologinius ekstraląstelinius baltymus, reguliuojamus *Phex*.

Sekantys pavyzdžiai aprašo išradimą išsamiau, neapribojant jo apimties.

1 PAVYZDYS

1.1. *P. chrysogenum* grybo *gdh* geno klonavimas ir apibūdinimas

Siekiant klonuoti *P. chrysogenum* grybo *gdh* geną, fago vektoriuje λGEM12, naudojant nustatytas procedūras, buvo sukurta DNR sekų biblioteka (Sambrook, J. et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Visa grybo DNR (išgryninta Barredo et al. (1994) Ispanijos patente P9400934 aprašytuju būdu) buvo dalinai surestriktuota *Sau3A*I, ir maždaug 20 kb fragmentai buvo išgryninti sacharozės gradiente (10-40%). Šie fragmentai buvo suliguoti su vektoriumi, kuris buvo prieš tai suskaidytas su *Bam*HI ir išgrynintas, ir tuomet ligavimo mišinys buvo supokuotas *in vitro* pagal gamintojo instrukcijas, naudojant Gigapack II Gold (Stratagene) sistemą. Supokavimo reakcijos mišinys iš naujo suspenduotas 500 μl SM, buvo naudojamas infekuoti *E. coli* LE392, siekiant titruoti esančių fagų skaičių, ir *E. coli* NM539, siekiant nustatyti rekombinantinių fagų procentinį kiekį. *E. coli* NM539 yra fago P2 lizogeninis štamai ir sukelia tik lizę, kuomet fagas, kuris infekuoja jį, neturi neesminės centrinės srities. Nustatyta, kad fago titras yra *E. coli* LE392 yra 132 faginių dalelių/μl (iš viso 66000 faginių dalelių), o *E. coli* NM539 – 113 faginių dalelių/μl

(iš viso – 56000 faginių dalelių). Tai reiškė, kad maždaug 85% fagų nešė egzogeninį DNR įtarpą. Būtinų sudaryti užbaigtą DNR sekų biblioteką rekombinantinių fagų skaičius buvo apskaičiuotas pagal lygtį: $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$, kur "p" yra pageidaujama tikimybė, "f" – atrenkamo organizmo, esančio rekombinante, genomo proporcija ir "N" yra reikalingų rekombinanų skaičius. Įvertinant tai, kad *P. chrysogenum* genomas yra maždaug 30000 kb (Fierro *et al.* (1993), Mol. Gen. Genet. 241: 573-578) ir kad supokuotų įtarpų vidurkis yra 18 kb (nepaisant to fakto, kad buvo parinkti maždaug 20 kb dydžiai), buvo gauta *P. chrysogenum* DNR sekų biblioteka su 99,999% tikimybe gauti rekombinantinius fagus. Po to buvo atlikta eilė teorinių patikrinimų, *E. coli* NM539 buvo infekuotos, ir visa DNR sekų biblioteka buvo išsėta ant penkių 150 mm skersmens Petri lėkštelių (maždaug 11300 faginių dalelių/Petri lėkštelėje), surinkta į 50 ml SM, plius 2,5 ml chloroformo ir laikoma 4°C temperatūroje. Tokiu būdu buvo gautas pakankamas ir tipinis paruoštų išsėti bet kuriuo metu rekombinantinių fagų tūris (5300 faginių dalelių/μl).

Apie 60000 faginių dalelių buvo paskleista ant trijų 150 mm skersmens Petri lėkštelių ir tuomet perkelta ant nitroceliuliozės filtrų (BA85, 0.45 μm, Schleicher & Schuell). Šie filtrai buvo hibridizuoti, naudojant standartines metodikas (Sambrook, J. *et al.* (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA), su sintetiniais oligonukleotidais, atitinkančiais *N. crassa gdh* geną. Antrojo ir trečiojo hibridizavimo ciklą metu buvo išvalyta iš viso 10 teigiamų klonų, ir jų DNR buvo veikiami eile restriktazių ir analizuota Southern blot būdu. Šiuo būdu buvo identifikuotas *gdh* genas 7,2 kb *EcoRI* fragmente ir atitinkamai dviejuose 2,9 ir 1,5 kb *BamHI* fragmentuose. Po to, kai buvo atliktas atitinkamas subklonavimas pBluescript I KS(+) (Stratagene) ir pUC13 plazmidėse, buvo sukurtos plazmidės pALP784 ir pALP785, kurios turi abi 2,9 kb *Sau3AI-XbaI* fragmento su *gdh* genu skirtingas orientacijas. DNR srities, turinčios šį geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.1.

Siekiant nustatyti *gdh* geno nukleotidų seką, iš plazmidžių pALP784 ir pALP785 "Erase a base" būdu (Promega) buvo sukonstruota serija klonų ir sekvenuoti didezoksinukleotidų metodu, naudojant "Sequenase" bandymų

rinkinį (USB); abiem atvejais tai buvo atlikta pagal gamintojo instrukcijas. Gautoji 2816 nukleotidų seka (SEQ ID No:1) buvo analizuota pagal Geneplot programą (DNRSTAR), patvirtinant ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimą. ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 922 pozicijoje, ir TAA beprasmis kodonas – 2522 pozicijoje. Taip pat buvo aptikti du 159 bp ir 56 bp intronai atitinkamai pozicijose tarp 971-1130 ir 1262-1318. Šis ORF koduoja 49837 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 6,18, kurio 461 aminorūgšties seka (SEQ ID No:5) turi 72,4% identiškumą su *N. crassa* fermento NADP priklausančios glutamato dehidrogenazės aminorūgščių seka.

Promotoriaus srityje aptinkamos įvairios pirimidinu praturtintos zonos, nors esančioji tarp 766-796 pozicijų yra labiausiai ekstensyvi. Šios zonos aptinkamos labai ekspresuotuose genuose ir yra išdėstytos betarpiškai prieš transkripcijos inicijavimo vietą. Be to, čia yra dvi numanomos TATA sekos (konservatyvi seka grybuose yra TATAAA) pozicijose tarp 752 (TATATAAAT) ir 852 (TATAATTT). Šios TATA sekos aptinkamos grybuose nuo 30 iki 50 bp prieš transkripcijos inicijavimo vietą, todėl labai tikėtina, kad autentiška TATA seka yra išdėstyta 752 pozicijoje, t.y. 42 bp prieš transkripcijos inicijavimo vietą. Maždaug 30% žinomų eukariotinių genų promotoriaus srityje turi CCAAT seką, išdėstyta tarp 50 ir 200 bp prieš transkripcijos inicijavimo vietą. CCAAT seka yra *gdh* geno promotoriaus srities 691 pozicijoje, t.y. apie 105 bp prieš tikėtiną transkripcijos inicijavimo vietą.

1.2. *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* kontrolinių genų ekspresija *gdh* promotoriumi.

P. chrysogenum ir *A. chrysogenum* transformacijos ir transformantų selekcijos procesas buvo atliktas, kaip aprašyta žemiau, priklausomai nuo jų atsparumo antibiotikui fleomicinui. Šiam tikslui buvo būtina sukonstruoti plazmidę pALfleo7, kurios dydis 5,4 kb ir kuri turi *S. hindustanus ble^R* geną, ekspresuojamą nuo *Pgdh*, kuris yra kaip žymė grybams, chloramfenikolo atsparumo geną kaip žymę *E. coli* ir plazmidės pBC KS (+) polilinkerį (Stratagene).

Nežymiai modifikuota protoplastų gamybos ir *P. chrysogenum* transformacijos procedūra aprašyta Cantoral *et al.* 1987 m. (Biotechnology 5: 494-497) ir Diez *et al.* 1987 m. (Curr. Genet. 12: 277-282). Pirmiausia, *P. chrysogenum* buvo užaugintas PM apibrėžtoje terpėje (Anne, J., (1997), Agricultura 25), pridėjus 10% mielių ekstrakto ir inkubuojant 18-21 val. 25°C temperatūroje, ir micelis buvo regeneruotas, perfiltruojant per neilono filtrą ir perplaunant 3-5 tūriais 0,9% NaCl. Išdžiovinus tarp popieriaus filtro, jis buvo iš naujo suspenduotas (100mg/ml) protoplastų buferyje. Kuomet micelio suspensija tapo homogeninė, į protoplastų buferį buvo pridėta Caylasa tirpalo (Cayla) (tūrinis santykis - 4 mg/ml) ir inkubuota 3 val. 25°C temperatūroje, maišant 100 aps/min greičiu. Protoplastų pasirodymas buvo stebimas mikroskopu. Kuomet daugelis iš jų išsilaisvino, jie buvo atskirti nuo micelio, perfiltruojant per neilono filtrą, kurio porų dydis 30 μm. Protoplastų suspensija buvo perplauta tris kartus 0,7 M KCl tirpalu, centrifuguojant 400×g tris minutes tarp perplovimų. Nusėdę protoplastai buvo iš naujo suspenduoti 10 ml KCM tirpalo ir, įvertinus jų koncentraciją Thoma kameroje, buvo praskiesta KMC iki 1-5×10⁸ protoplastų/ml. Po to 100 μl šio tirpalo buvo kruopščiai sumaišyta su 1-10 μg DNR plius 10 μl PCM, ir mišinys buvo inkubuotas atšaldytoje vandens vonioje 20 min. Vėliau buvo pridėta 500 ml PCM, ir mišinys buvo inkubuojamas kambario temperatūroje 20 min, po to buvo pridėta 600 μl KCM. Transformantai buvo atrinkti pagal gebą augti terpėje su 30 μg/ml fleomicino, suteiktą fleomicino atsparumo geno, esančio pALfleo7, pALP480 ir pALPfleo1 plazmidėse. Šiuo tikslu 200 μl transformacijos reakcijos mišinio buvo sumaišyta su 5 ml Czapek terpės, pridėdant sorbitolio (1 M) ir fleomicino (30 μg/ml), ir tuomet tai buvo išsėta ant Petri lėkštelių su 5 ml tos pačios terpės. Lėkštelės buvo inkubuotos 25°C temperatūroje iki pasirodant transformantams (4-8 dienas).

Protoplastų gamybos ir *A. chrysogenum* transformacijos procedūra aprašyta Gutierrez *et al.* (1991), Mol. Gen. Genet. 225: 56-64. Pirmiausia, *A. chrysogenum* kamienas buvo auginamas MMC apibrėžtoje terpėje 20-24 val. 28°C temperatūroje, ir micelis buvo regeneruotas, perfiltruojant per neilono filtrą ir perplaunant 3-5 tūriais 0,9% NaCl. Išdžiovinus jį tarp filtro popieriaus, jis buvo iš naujo suspenduotas (50 mg/ml) protoplastų buferyje. Kuomet micelio

suspensija tapo homogeninė, į ją buvo pridėta DTT iki 10 mM galutinės koncentracijos ir inkubuota 1 val. 28°C temperatūroje, maišant 150 aps/min greičiu. Po to ji buvo centrifuguota 12000×g 15 min. ir nuosėdos buvo iš naujo suspenduotos 30 ml protoplastų buferio. Vėliau į protoplastų buferį buvo pridėta Caylasa tirpalo (Cayla) (tūrinis santykis - 4 mg/ml) ir jis buvo inkubuotas 3 val. 25°C temperatūroje, maišant 100 aps/min greičiu. Protoplastų pasirodymas buvo stebimas mikroskopu. Kuomet daugelis iš jų išlaisvino, jie buvo atskirti nuo micelio, perfiltruojant per neilono filtrą, kurio porų dydis 25 μm. Protoplastų suspensija buvo perplauta tris kartus 0,7 M KCl tirpalu, centrifuguojant 1000×g tris minutes tarp perplovimų. Nusėdę protoplastai buvo iš naujo suspenduoti 10 ml NCM buferio ir įvertinus jų koncentraciją Thoma kameroje, buvo praskiesta KMC iki $1-5 \times 10^8$ protoplastų/ml. Po to 100 μl šio tirpalo buvo kruopščiai sumaišyta su 1-10 μg DNR ir mišinys buvo laikomas atšaldytoje vandens vonioje 20 min. Vėliau buvo pridėta 1 ml CCM, ir mišinys buvo inkubuotas kambario temperatūroje 20 min. Mišinys buvo centrifuguotas 1,000×g 5 minutes, ir nuosėdos buvo iš naujo suspenduotos 800 μl NCM buferio. Transformantai buvo atrinkti pagal gebą augti terpėje su 10 μg/ml fleomicino, suteiktą fleomicino atsparumo geno, esančio pALfleo7 ir pALCfleo1 plazmidėse. Šiuo tikslu 200 μl transformacijos reakcijos mišinio buvo sumaišyta su 5 ml TSA terpės, pridėdant sacharozės (0,3 M) ir fleomicino (10 μg/ml), ir tuomet tai buvo išsėta ant Petri lėkštelių su 5 ml tos pačios terpės. Lėkštelės buvo inkubuotos 28°C temperatūroje iki pasirodant transformantams (5-8 dienas).

Gauti transformantai buvo analizuoti, siekiant nustatyti (I) DNR, atitinkančios transformacijoje naudotą plazmidę, buvimą, (II) transkripto, atitinkančio kontrolinį geną, egzistavimą ir (III) fermentinį aktyvumą, gautą ekspresuojant geną. Visa DNR buvo gauta pagal sąlygas, aprašytas Barredo *et al.* 1994 m. (Ispanijos patentas P9400931), ir tuomet ji buvo analizuota Southern blot būdu, aprašytu Sambrook *et al.* 1989 m. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Visa totalinė RNR buvo išgryninta aprašytuoju Ausubel *et al.* 1987 m. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA) būdu. Gautoji RNR buvo laikoma išsodinta etanolyje -20°C temperatūroje. Norint ją

panaudoti, ji buvo regeneruota, centrifuguojant $10000 \times g$ $4^{\circ}C$ temperatūroje 20 min. RNR molekulių atskyrimas pagal jų molekulių dydį buvo atliktas agarozės-formaldehido elektroforeze. Po to DNR buvo perkelta ant nitroceliuliozės filtro ir hibridizuota su pageidaujamu mėginiu, visa tai atliekant Sambrook *et al.* 1989 m. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) aprašytuoju būdu. Hibridizavimo juostų atsiradimas parodė transkriptų egzistavimą ir, tuo būdu, gebą ekspresuoti bakterinį geną grybe-šeimininke: *P. chrysogenum* ar *A. chrysogenum*. Fermentinis β -galaktozidazės aktyvumas transformantuose buvo įvertintas Sambrook *et al.* 1989 m. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) aprašytuoju būdu. Fleomicino atsparumo geno ekspresija buvo įvertinta pagal atsparumo lygį, suteiktą *P. chrysogenum* ar *A. chrysogenum* Czapek kietojoje terpėje po 7 dienų inkubavimo $25^{\circ}C$ temperatūroje.

1.2.1. *E. coli lacZ* geno ekspresija *P. chrysogenum* ir *E. coli*, reguliuojant *Pgdh*.

E. coli lacZ genas buvo sulietas transliaciškai su *Pgdh*, siekiant ekspresuoti jį *P. chrysogenum*. Tuo tikslu *lacZ* genas buvo subklonuotas į pML1 plazmidės (Carramolino *et al.* 1989, Gene 77: 31-38) *EcoRI* ir *SalI* kirpimo vietas sukuriant plazmidę pMLac. Po to *Pgdh* buvo įklonuotas tarp pMLac *EcoRI* ir *SmaI* kirpimo vietų, sukuriant plazmidę pSKG (fig.5). Galiausiai, sulfonamido atsparumo genas (Carramolino *et al.* 1989, Gene 77: 31-38) buvo įklonuotas į plazmidės ties pSKG *EcoRI* kirpimo vieta, sukuriant plazmidę pSKGSu (fig.5). *P. chrysogenum* transformantuose su plazmide pSKGSu, atrinktuose pagal jų sulfonamidinį atsparumą, buvo atliktos analizės plazmidės buvimui nustatyti Southern blot būdu ir transkripto, atitinkančio *lacZ* geną, egzistavimui nustatyti - Northern blot būdu. Tuomet buvo išmatuotas fermentinis β -galaktozidazės aktyvumas transformantuose, kurie buvo pozityvūs dviejose ankstesnėse analizėse. Transformantai efektyviai ekspresavo *E. coli lacZ* geną, ir buvo pastebėta, kad β -galaktozidazės aktyvumo lygiai buvo aukštesni tuose transformantuose, kurie turėjo plazmidės, integruotos į jų genomą, kopiją, nei

pavieniuose transformantuose, kurie ekspresavo *lacZ* geną, reguliuojamą triptofano C geno promotoriumi (*trpC*).

Plazmidė pSKG buvo įterpta į *E. coli* DH5α ($\Delta lacZ$), siekiant išsiaiškinti ar *P. chrysogenum* grybo *Pgdh* taip pat galėjo reguliuoti *lacZ* geno ekspresiją *E. coli*. Gautieji transformantai pasižymėjo geba generuoti mėlynąsias kolonijas po dešimties dienų inkubavimo 25°C temperatūroje LB terpėje, į kurią buvo pridėta izopropil- β -galaktozidazės (IPTG) ir 5-brom-4-chlor-3-indolil- β -D-galaktozidazės (X-gal). Šis rezultatas patvirtino, kad *Pgdh-lacZ* darinys ekspresuoja β -galaktozidazės fermentinį aktyvumą *E. coli*, nors ne taip efektyviai kaip endogeninis *E. coli lacZ* genas.

1.2.2. *S. hindustanus ble^R* geno ekspresija *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum*, reguliuojant *Pgdh*.

Ble^R genas be jo promotoriaus srities buvo gautas iš plazmidės pUT737 (Millaney *et al.* (1985), Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) kaip 1100 bp *NcoI-ApaI* fragmentas. Po to šis fragmentas buvo subklonuotas į plazmidę pUT713 (prieš tai ją paveikus su *NcoI-ApaI*) gaunant plazmidę pALfleo5. *Pgdh* buvo iškirptas iš pALP25 kaip 726 bp *EcoRI-BamHI* fragmentas, kuris po to buvo subklonuotas į plazmidę pALfleo5 (prieš tai ją paveikus su *EcoRI-BamHI*), siekiant sukurti pALfleo6. Šios pastarosios plazmidės dydis yra 4,2 kb, ji turi *ble^R* geną, ekspresuojamą, reguliuojant *Pgdh*, ir ampicilino atsparumo geną kaip žymę *E. coli*. Siekiant pakeisti pastarąją žymę chloramfenikolio atsparumo genu, 1900 bp *EcoRI-NotI* fragmentas, turintis *Pgdh*, *ble^R* ir *trpC* geno terminatorių (*TtrpC*), buvo išskirtas iš pALfleo6 ir sujungtas su plazmide pBC KS (+) (Stratagene), paveikta su *EcoRI-NotI*. Taip buvo sukurta plazmidė pALfleo7 (fig.5), kurios dydis yra 5,4 kb ir kuri turi *S. hindustanus ble^R* geną, reguliuojamą *Pgdh*, kaip grybų selekcijos žymę, chloramfenikolio atsparumo geną kaip *E. coli* selekcijos žymę ir plazmidės pBC KS (+) polilinkerį. Nukleotidų sekos nustatymas suliejimo srityje tarp *Pgdh* ir *ble^R* patvirtino pastarojo geno išsidėstymą teisingame skaitymo rėmelyje.

P. chrysogenum ir *A. chrysogenum* transformacijos buvo atliktos plazmide pALfleo7, transformantai buvo atrinkti pagal jų atsparumą atitinkamai 30 μ g/ml ir 10 μ g/ml koncentracijos fleomicinui. Po to maksimalus transformantų

fleomicino atsparumo lygis buvo nustatytas kietoje terpėje. Kai kurie iš jų pasižymėjo geba augti didesnėje nei 100 µg/ml fleomicino aplinkoje. Transformantai, parinkti pagal jų atsparumą fleomicinui, buvo analizuoti, siekiant nustatyti plazmidės buvimą Southern blot būdu ir transcripto, atitinkančio *ble^R* geną, egzistavimą - Northern blot būdu; abiem atvejais gauti teigiami rezultatai. Šie rezultatai patvirtino galimybę ekspresuoti heterologinius genus *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* grybuose, reguliuojant *Pgdh*.

Plazmidė pALfleo7 buvo įterpta į *E. coli*, siekiant sužinoti ar *P. chrysogenum* grybo *Pgdh* taip pat gali reguliuoti *ble^R* geno ekspresiją *E. coli*. Gautieji transformantai pasižymėjo geba augti LB, turinčioje 0,2 µg/ml fleomicino, tuo tarpu kai maksimali fleomicino slopinimo koncentracijai *E. coli* yra mažiau kaip 0,025 µg/ml. Šis rezultatas patvirtino, kad *Pgdh* buvo ekspresuotas *E. coli*, nors ne taip efektyviai kaip *P. chrysogenum*. Transformantas *E. coli* DH5α su plazmide pALfleo7 buvo patalpintas į Spanish Collection of Type Cultures (CECT) su registracijos numeriu CECT4849. Kitos plazmidės, tokios, kaip pALP784 ir pALP785, gali būti gautos iš deponuotos plazmidės paprasčiausiai pasirenkant 2,9 kb *Sau3A*-*Xba*I fragmentą, hibridizuojant su *gdh* geno promotoriumi, esančiu pALfleo7 sudėtyje, ir subklonuojant jį atitinkamai pBluescript I KS (+) ar pUC13.

1.3. Antisensinė ekspresija *P. chrysogenum* ir *A. chrysogenum* reguliuojama *gdh* promotoriumi.

Genų ekspresijos inaktyvinimas pramoniniuose kamienuose kartais yra reikalingas, siekiant eliminuoti nepageidaujamus fermentų poveikius. Kadangi dėl daugelio pramoninių kamienų chromosomų pasikartojimo laipsnio ploidiskumo lygio labai dažnai yra sunku blokuoti ekspresiją tiesioginiu genų suskaldymu ir tenka naudoti sistemas ekspresijos inaktyvinimui, kurios yra nepriklausomos nuo chromosomų pasikartojimo laipsnio lygio. Sukūrus antisensines konstrukcijas, ekspresuotas reguliuojant stipriems promotoriams, tapo įmanoma nutraukti genų ekspresiją.

Žemiau aprašytas *Pgdh* panaudojimo inaktyvuoti ekspresiją geno, kuris koduoja *P. chrysogenum* fenilacetato-2-hidroksilazės (*pahA*), ekspresiją

pavyzdys. Pirmiausia, buvo sukurta plazmidė pALP, turinti *Pgdh* ir *TtrpC*, sulietus per vieną *Bam*HI kirpimo vietą. Plazmidė pALP873 buvo paveikta su *Bam*HI, jos galai buvo užpildyti DNR polimerazės I Klenow fragmentu, ir ji buvo suliguota su 1053 bp *pahA* geno cDNR fragmentu, gautu iš plazmidės pALP555 veikiant ją *Eco*RV. Gautoji plazmidė, pavadinta pALP874, buvo atrinkta, nes ji turėjo antisensinį *pahA* geno fragmentą, giminingą *Pgdh*. Iš šios plazmidės buvo išskirtas 2,5 kb *Eco*RI-*Xba*I fragmentas, turintis antisensinę kasetę, užpildytą veikiant Klenow fragmentu ir subklonuotą į plazmidės pALfleo7 *Eco*RV kirpimo vietą, sukuriant plazmidę pALP888. Pastaroji plazmidė pasižymi tuo, kad jos dydis yra 7,9 kb ir ji turi (I) *pahA* geno, reguliuojamo *PgdhI*, antisensinę kasetę, (II) *ble^R* geną kaip selekcijos žymę grybuose, (III) chloramfenikolo atsparumo geną kaip žymę *E. coli*, ir (IV) plazmidės pBC KS (+) polilinkerį.

Buvo vykdoma *P. chrysogenum* transformacija plazmide pALP888, ir transformantai atrenkami pagal jų atsparumą 30 µg/ml koncentracijos fleomicinui. Maždaug 20% atrinktų transformantų pasižymėjo mažesne fenilacto rūgšties oksidavimo geba, kai kurie iš jų neturėjo šio aktyvumo aptinkamų lygių. Šie transformantai buvo analizuoti, siekiant nustatyti plazmidės buvimą Southern blot būdu ir antisensinio transkripto, atitinkančio *pahA* geną, egzistavimą - Northern blot būdu, naudojant oligonukleoditą, atitinkantį koduojančią grandinę, kaip mėginį. Abiem atvejais gauti teigiami rezultatai, patvirtinantys galimybę visiškai ar dalinai blokuoti nepageidaujamą fermentų aktyvumą *P. chrysogenum*, naudojant antisensines konstrukcijas. Šie rezultatai gali būti ekstrapoliuoti pritaikyti giminingiems filamentiniams grybams ir bet kokiam fermentų aktyvumui, naudojant bet kurį promotorių, aprašytą šiame išradime (*Pgdh*, *Phex*, *PactPc* ir *PactAc*), ar bet kurį kitą turimą promotorių.

2 PAVYZDYS

2.1. *P. chrysogenum hex* geno klonavimas ir apibūdinimas.

P. chrysogenum *celere*, gautame pramoninės fermentacijos metu gaminant peniciliną G, buvo aptiktas pagrindinis baltymas, kuris po išgryninimo ir apibūdinimo pasirodė esąs fermentas β-N-acetilheksozaminidazė. Išgryninto

baltymo amino galo aminorūgščių seka buvo nustatyta Edman skaidymo būdu, ir gautos dvi skirtingos sekos:

- (A) Ala-Pro-Ser-Gly-Ile-His-Asn-Val-Asp-Val-(His)-Val-Val-(Asp)-Asn-(Asp)-Ala-(Asp)-Leu-Gln-Tyr-(Gly)
- (B) Val-Gln-Val-Asn-Pro-Leu-Pro-Ala-Pro-(Arg)-(Arg)-Ile-(Thr)-???(Gly)-(Ser)-(Ser)-(Gly)-(Pro)-(Ile/Thr)-???(Val)

Pagal šias sekas ir įvertinant kodono naudojimo kryptį, kuri egzistuoja keliuose *P. chrysogenum* genuose, buvo suprojektuotos sekančios sintetinių oligonukleotidų kombinacijos:

- (I) 5' TCGACGACGTGSACGTCSACGTTGTGGATGCC 3'
- (II) 5' CCGTAYTGSAGGTCRGCCTCGTTGTCGACGAC 3'
- (III) 5' GGGGCVGGSAGVGGGTTGACYTG 3'

P. chrysogenum grybo *hex* genas buvo klonuotas, naudojant DNR sekų biblioteką ir būdus, aprašytus 1 pavyzdyje. Buvo išgryninta iš viso 11 teigiamų klonų, jų DNR buvo paveikta keliomis restriktazėmis ir analizuota Southern blot būdu. Šiuo būdu *hex* genas buvo identifikuotas 3,2 kb *SacI* ir 2,1 kb *SaII* fragmentuose. *SaII* fragmento subklonavimas pBC KS (+) plazmidėje abiejomis orientacijomis davė plazmides pALP295 ir pALP303. DNR srities, turinčios *hex* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.2.

Siekiant nustatyti *hex* geno nukleotidų seką, buvo panaudotos aukščiau minėtos plazmidės pALP295 ir pALP303, o taip pat pALP319 ir pALP461 (abi 2,8 kb *BamHI* fragmento orientacijos), pALP388 ir pALP389 (abi 2,4 kb *SaII* fragmento orientacijos) bei pALP377 ir pALP378 (abi 1,2 kb *PstI* fragmento orientacijos) (fig.2). Iš šių plazmidžių "Erase a base" (Promega) būdu buvo sukonstruoti keli klonai ir sekvenuoti didezoksinukleotidų būdu, naudojant "Sequenase" bandymų rinkinį (USB), abiem atvejais pagal gamintojo instrukcijas. Gautoji 5240 nukleotidų seka (SEQ ID No:2) buvo analizuota Geneplot programa (DNRSTAR), patvirtinant dviejų ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimą. *Hex* geno ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 1324 pozicijoje, o TGA beprasmis kodonas – 3112 pozicijoje. Šis ORF neturi intronų ir koduoja 66545 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,34) kurio 596 aminorūgščių seka (SEQ ID No:6) turi

49,0% identiškumą su *Candida albicans* fermento β -N-acetilheksozaminidazės aminorūgščių seka. Be to, 19-40 ir 99-120 pozicijose nustatyta aminorūgščių seka turi aminorūgščių sekas, nustatytas chemiškai iš išgryninto fermento. Proteazės atpažinimo vieta (Lys-Arg) atsiranda pozicijose, esančiose betarpiškai greta aukščiau aprašytos aminorūgščių sekos (A) (aminorūgštys 97-98).

Promotoriaus srityje tarp 1106-1128 ir 1182-1200 pozicijų aptinkamos dvi pirimidinu praturtintos zonos, numanoma TATA seka – 1258 (ATAAATA) pozicijoje ir CAAT seka – 1163 pozicijoje.

2.2. *S. hindustanus ble^R* geno ekspresija *P. chrysogenum*, reguliuojama *Phex*.

(I) *P. chrysogenum* transformacijos ir transformantų atrinkimo, (II) DNR analizės, (III) RNR analizės ir (IV) fermentų matavimų procesai buvo atlikti, kaip aprašyta 1 pavyzdžio 1.2 skyriuje.

Siekiant ekspresuoti *ble^R* geną, reguliuojamą *Phex*, pirmiausia buvo sukonstruota *NcoI* kirpimo vieta prieš ATG kodoną, kuris koduoja *hex* geno iniciatorių metioniną. Tai buvo atlikta PRC dėka, naudojant sekancius oligonukleotidus kaip pradmenis:

5' CTCCATGGTGATAAGGTGAGTGACGATG 3'

5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3' (pradmuo –20)

PRC dėka gautasis DNR fragmentas buvo subklonuotas abiejose orientacijose plazmidės pBC KS (+) (Stratagene) *SmaI* kirpimo vietoje, sukuriant pALP427 ir pALP428. Abiejų plazmidžių intarpai buvo sekvenuoti, naudojant bandymų rinkinius "Erase a base" (Promega) ir "Sequenase" (USB), abiem atvejais pagal gamintojo instrukcijas. Tokiu būdu buvo parodyta, kad gautasis *Phex* neturėjo mutacijų ir turėjo *NcoI* kirpimo vietą prieš ATG, kuris koduoja baltymo iniciatorių metioniną.

Plazmidė pALP427 buvo pasirinkta *ble^R* geno subklonavimui atlikti. *ble^R* genas be promotoriaus srities buvo gautas iš plazmidės pUT737 (Mullaney *et al.* (1985), Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) kaip 1100 bp *NcoI*-*Apal* fragmentas. Po to šis fragmentas buvo subklonuotas plazmidėje pALP427 (turinčioje *Phex*), prieš tai sukarpytoje su *NcoI*-*Apal*, gaunant plazmidę pALP480 (fig.6). Šios

pastarosios plazmidės dydis yra 5,4 kb, ji turėjo *ble^R* geną, ekspresuojamą, reguliuojant *Phex*, *trpC* geno terminatorių už *ble^R* geno, chloramfenikolio atsparumo geną kaip žymę *E. coli* ir plazmidės pBC KS (+) polilinkerį. Nukleotidų sekos nustatymas suliejimo srityje tarp *Phex* ir *ble^R* patvirtino pastarojo geno išsidėstymą teisingame skaitymo rėmelyje.

P. chrysogenum transformacijos buvo atliktos plazmide pALP480, atrenkant transformantus pagal jų atsparumą 30 µg/ml koncentracijos fleomicinui. Po to maksimalus transformantų fleomicino atsparumo lygis buvo nustatytas kietoje terpėje, kai kurie iš jų pasižymėjo geba augti, esant didesnei nei 100 µg/ml fleomicino koncentracijai. Transformantai, atrinkti pagal jų fleomicino atsparumą, buvo analizuoti Southern blot būdu, siekiant nustatyti plazmidės buvimą, ir Northern blot būdu - siekiant nustatyti transkripto, atitinkančio *ble^R* geną, egzistavimą; abiem atvejais gauti teigiami rezultatai. Šie rezultatai patvirtino heterologinių genų ekspresavimo *P. chrysogenum* galimybę, reguliuojant *Phex*. Transformantas *E. coli* DH5α su plazmide pALP480 buvo deponuotas Spanish Collection of Type Cultures (CECT) su registracijos numeriu CECT4852. Plazmidės pALP295, pALP319, pALP377 ir pALP388 gali būti gautos iš deponuotos plazmidės tiesiog parenkant atitinkamai 2,1 kb *Sall*, 2,8 kb *Bam*HI, 1,2 kb *Pst*I ir 2,4 kb *Sall* DNR fragmentus, hibridizuojant su *hex* geno, esančio plazmidėje pALP480, promotoriumi ir po to subklonuojant juos pBluescript I KS (+).

2.3. *P. chrysogenum* ekstraląstelinė baltymų gamyba, naudojant *hex* geną.

Fermentas β-N-acetilheksozaminidazė yra baltymas, gausiai sekretuojamas *P. chrysogenum* į kultūrinę terpę pramoniniuose fermentatoriuose penicilino G gamybos metu. Šio fermento geba būti sekretuotam leidžia panaudoti *hex* geną homologinių ar heterologinių baltymų ekspresijai ir sekrecijai *P. chrysogenum* ar gimininguose filamentiniuose grybuose.

Fermentas turi sekrecijos signalo seką, sudarytą iš sekančių aminorūgščių: Met-Lys-Phe-Ala-Ser-Val-Leu-Asn-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ser-Ala (SEQ ID No:6 aminorūgštys nuo 1 iki 18). Paprastai, signaliniai peptidai turi tris konservatyvius struktūrinius domenus (Takizawa, N. *et al.* (1994)

Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, Murooka, Y. and Imanaka, T. (eds), Marcel Dekker, Inc. New York): (I) teigiamai įkrautą amino galo sritį, vadinamą "n", kuri paprastai turi nuo 1 iki 5 liekanų ir yra reikalinga efektyviam baltymo pernešimui per membraną (Met-Lys), (II) hidrofobinę sritį, vadinamą "h", sudarytą iš 7-15 liekanų (Phe-Ala-Ser-Val-Leu-Asn-Val-Leu) ir (III) polinę sritį karboksilo gale, vadinamą "c", sudarytą iš 3-7 liekanų (Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Ala). Ląstelės viduje susintetintas prebaltymas subręsta, atskylant dviems bazinėms liekanoms (Lys-Arg, SEQ ID No:6 aminorūgštys 87 ir 98), gaunant subrendusį baltymą.

Įmanomi du variantai baltymų ekspresijai ir sekrecijai pradėti, naudojant *hex* geną: (I) promotoriaus srities, turinčios sekrecijos signalo seką, suliejimas su ekspresuojamo geno kodavimo sritimi skaitymo rėmelyje, ir (II) pilno *hex* geno suliejimas su ekspresuojamo geno kodavimo sritimi skaitymo rėmelyje. Naudojant standartinius molekulinės biologijos metodus (Sambrook, J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA; Ausubel *et al.* (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, USA), bet kuris šios srities specialistas sugebėtų panaudoti promotorių, turintį *hex* geno ar kito užbaigto geno sekrecijos seką, baltymų ekspresijai ir sekrecijai *P. chrysogenus* ar gimininguose filamentiniuose grybuose.

3 PAVYZDYS

3.1. *P. chrysogenum act* geno klonavimas ir apibūdinimas.

P. chrysogenum act genas buvo klonuotas, naudojant DNR sekų biblioteką ir metodus, aprašytus 1 pavyzdyje. Šiuo atveju hibridizacija buvo atlikta su 888 bp *NcoI-ClaI* fragmentu, kurio kilmės šaltinis yra *A. nidulans* grybo *act* genas (Fidel *et al.* (1988), *Gene* 70: 283-293). Iš viso buvo išgryninta 10 teigiamų klonų, jų DNR po to buvo suskaidyta keliomis restriktazėmis ir analizuota Southern blot būdu. Tokiu būdu 5,2 kb *BamHI*, 4,9 kb *EcoRI* ir 5,9 kb *HindIII* fragmentuose buvo identifikuotas *act* genas. *HindIII* fragmentas buvo subklonuotas abiejose orientacijose plazmidėje pBluescript I KS (+) (Stratagene), sukuriant plazmides pALP298 ir pALP299. *EcoRI* fragmento

subklonavimas abiejose orientacijose plazmidėje pBluescript I KS (+) (Stratagene) sukuria plazmidės pALP315 ir pALP316. DNR srities, turinčios *act* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.3.

Siekiant nustatyti *act* geno nukleotidų seką, buvo panaudotos aukščiau minėtos plazmidės pALP315 ir pALP316. Iš šių plazmidžių buvo sukonstruoti keli klonai "Erase a base" (Promega) būdu ir tuomet sekvenuoti dideoksinukleotidų būdu, naudojant "Sequenase" bandymų rinkinį (USB), abiem atvejais pagal gamintojo instrukcijas. Gautoji 2994 nukleotidų seka (SEQ ID No:3) buvo analizuota pagal Geneplot programą (DNRSTAR), patvirtinant ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono panaudojimo pavyzdžiu egzistavimą. *Act* geno ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 494 pozicijoje, o TAA beprasmis kodonas - 2250 pozicijoje. Šis ORF turi 5 intronus 501-616, 649-845, 905-1046, 1078-1180 ir 1953-2021 pozicijose ir koduoja 41760 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,51, kurio 375 aminorūgščių seka (SEQ ID No:7) turi 98,1% identiškumą su *A. nidulans* γ -aktino baltymo aminorūgščių seka. Promotoriaus srityje tarp 356-404 ir 418-469 pozicijų aptiktos dvi ekstensyvios pirimidinu praturtintos zonos, 259 pozicijoje (TATAAAAAT) numanoma TATA seka ir keturios CAAT sekos 174, 217, 230 ir 337 pozicijose.

3.2. *P. chrysogenum ble^R* geno ekspresija, reguliuojant *PactPc*.

Siekiant ekspresuoti *ble^R* geną, reguliuojamą *PactPC*, pirmiausia, prieš ATG kodono, kuris koduoja *hex* geno inicijatorių metioniną, buvo sukonstruota *NcoI* kirpimo vieta. Tai buvo atlikta PCR pagalba, naudojant sekančius oligonukleotidus kaip pradmenis:

5' CTCCATGGTGACTGATTAACAAGGGAC 3'

5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3' (pradmuo -20)

PRC pagalba gautasis DNR fragmentas buvo subklonuotas plazmidės pBC KS (+) (Stratagene) *SmaI* kirpimo vietoje abiejose orientacijose, sukuriant pALPact1 ir pALPact2. Abiejų plazmidžių tarpai buvo sekvenuoti, naudojant bandymų rinkinius "Erase a base" (Promega) ir "Sequenase" (USB), abiem atvejais pagal gamintojo instrukcijas. Šiuo būdu buvo parodyta, kad gautoji

PactPc neturėjo mutacijų ir turėjo *NcoI* kirpimo vietą prieš ATG, kuris koduoja baltymo inicijatorių metioniną.

PALPact1 buvo plazmidė, parinkta atlikti *ble^R* geno subklonavimą. *ble^R* genas be jo promotoriaus srities buvo gautas iš plazmidės pUT737 (Mullaney *et al.* (1985), Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) kaip 1100 bp *NcoI*-*Apal* fragmentas. Tuomet šis fragmentas buvo subklonuotas plazmidėje pALPact1 (nešančioje *PactPc*), prieš tai suskaidytoje su *NcoI*-*Apal*, gaunant plazmidę pALfleo1 (fig.6). Ši pastaroji plazmidė turi *ble^R* geną, ekspresuojamą, reguliuojant *PactPc*, *trpC* geno terminatorių už *ble^R* geno, chloramfenikolio atsparumo geną kaip žymę *E. coli* ir plazmidės pBC KS (+) polijungtuvą. Suliejimo srities tarp *PactPc* ir *ble^R* sekvenavimas patvirtino pastarojo geno įstatymą teisingame skaitymo rėmelyje.

P. chrysogenum transformacijos buvo atliktos plazmide pALPfleo1, atrenkant transformantus pagal jų atsparumą 30µg/ml koncentracijos fleomicinui. Po to maksimalus transformantų fleomicino atsparumo lygis buvo nustatytas kietoje terpėje; kai kurie iš jų pasižymėjo geba augti didesnėje nei 100 µg/ml fleomicino aplinkoje. Transformantai, parinkti pagal jų fleomicino atsparumą, buvo analizuoti, siekiant nustatyti plazmidės buvimą Southern blot būdu ir transcripto, atitinkančio *ble^R* geną, egzistavimą - Northern blot būdu; abiem atvejais gauti teigiami rezultatai. Šie rezultatai patvirtino galimybę ekspresuoti heterologinius genus *P. chrysogenum*, reguliuojant *PactPc*. Transformantas *E. coli* DH5α su plazmide pALP315 buvo deponuotas Spanish Collection of Type Cultures (CECT) su registracijos numeriu CECT4851. Plazmidė pALP316 gali būti gauta iš deponuotos plazmidės pALP315, paprasčiausiai subklonuojant pALP315 intarpą pBluescript I KS (+) *EcoRI* kirpimo vietoje priešingoje orientacijoje.

4 PAVYZDYS

4.1. *P. chrysogenum act* geno klonavimas ir apibūdinimas.

Siekiant klonuoti *A. chrysogenum gdh* geną, buvo sukurta DNR sekų biblioteka fago λGEM12 vektoriuje, kaip aprašyta 1 pavyzdžio 1.1 skyriuje. Gautasis fago titras buvo 50 faginių dalelių/µl (iš viso 20000 faginių dalelių) *E. coli* LE392 ir 41 faginė dalelė/µl (iš viso 20500 faginių dalelių) *E. coli* NM539. Tai

reiškė, kad maždaug 82% fagų nešė egzogeninį DNR fragmentą ir kad *A. chrysogenum* DNR sekų biblioteka gauta su 99,999% tikimybe. Po šių teorinių patikrinimų *E. coli* NM539 buvo infekuotos, ir visa DNR biblioteka buvo išsėta ant trijų 150 mm skersmens Petri lėkštelių (maždaug 7000 faginių dalelių/Petri lėkštelėje), surinkta į 50 ml SM plius 2,5 ml chloroformo ir laikoma 4°C temperatūroje. Šiuo būdu buvo gautas pakankamas ir reprezentatyvus rekombinantinių fagų tūris (2100 faginių dalelių/μl), paruoštas išsėti bet kuriuo metu.

Maždaug 20000 faginių dalelių buvo paskirstyta ant dviejų 150 mm skersmens Petri lėkštelių ir po to perkelta ant nitroceliuliozės filtrų (BA85, 0,45 μm, Schleicher & Schuell). Šie filtrai buvo hibridizuoti, naudojant standartines metodikas (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA), su 888 bp *NcoI*-*Clai* fragmentu, atitinkančiu *A. nidulans act* geną. Iš viso buvo išgryninti 5 teigiami klonai, ir tuomet jų DNR buvo suskaidyta keliomis restriktazėmis ir analizuota Southern blot būdu. Tokiu būdu 8,7 kb *Hind*III fragmente buvo identifikuotas *act* genas. Šis fragmentas buvo subklonuotas abiejose orientacijose plazmidėje pBluescript I KS (+) (Stratagene), sukuriant plazmides pALC52 ir pALC53. DNR srities, turinčios *act* geną, restrikcijos diagrama parodyta fig.4.

Aukščiau minėtosios plazmidės pALC52 ir pALC53 buvo panaudotos nustatyti *act* geno nukleotidų sekai. Iš šių plazmidžių "Erase a base" (Promega) būdu buvo sukonstruoti keli klonai ir sekvenuoti didezoksinukleotidų būdu, naudojant "Sequenase" bandymų rinkinį (USB), abiem atvejais pagal gamintojo instrukcijas. Gautoji 3240 nukleotidų seka (SEQ ID No:4) buvo analizuota pagal Geneplot programą (DNRSTAR), patvirtinant ORF su ryškiai išreikštu preferencinio kodono naudojimo pavyzdžiu egzistavimą. *Act* geno ATG translacijos inicijavimo kodonas buvo aptiktas 787 pozicijoje, o TAA beprasmis kodonas - 2478 pozicijoje. Šis ORF turi 5 intronus 794-920, 952-1123, 1180-1289, 1321-1410 ir 2183-2249 pozicijose ir koduoja 41612 Da baltymą, turintį izoelektrinį tašką 5,51, kurio 375 aminorūgščių seka (SEQ ID No:8) turi 98,4% ir 98,1 % identiškumą su atitinkamai *A. nidulans* ir *P. chrysogenum* γ-aktino baltymų aminorūgščių sekomis. Promotoriaus srityje tarp 607-654 pozicijų aptikta

pirimidinu praturtinta zona, numanoma TATA seka 747 pozicijoje (TTATAAAA) ir CAAT seka 338 pozicijoje.

4.2. *P. chrysogenum ble^R* geno ekspresija, reguliuojant *PactAc*.

Siekiant ekspresuoti *ble^R* geną, reguliuojant *PactAc*, buvo sukonstruota plazmidė pALCfleo1 (fig.6), turinti *ble^R* geną, ekspresuojamą, reguliuojant *PactAc*, *trpC* geno terminatorių už *ble^R* geno, chloramfenikolio atsparumo geną kaip žymę *E. coli* ir plazmidės pBC KS (+) polilinkerį.

Iš plazmidės pUT737 buvo gautas *ble^R* genas be jo promotoriaus srities (Mullaney *et al.* (1985), Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) kaip 1100 bp *NcoI*-*Apal* fragmentas. Tuomet šis fragmentas buvo sulietas skaitymo rėmelyje su *PactPc*, ir pasinaudota tuo, kad *act* genas turi *NcoI* kirpimo vietą prieš ATG, kuris koduoja baltymo iniciatorių metioniną. Tuo tikslu plazmidėje pALCact1 (turinčioje *PactAc*) buvo įklonuotas *ble^R* genas, prieš tai suskaidytas su *NcoI*-*Apal*, gaunant plazmidę pALCfleo1 (fig.6). Suliejimo srities tarp *PactAc* ir *ble^R* geno sekvenavimas patvirtino pastarojo geno išsidėstymą teisingame skaitymo rėmelyje.

P. chrysogenum transformacijos buvo atliktos plazmide pALCfleo1, atrenkant transformantus pagal jų atsparumą 10µg/ml koncentracijos fleomicinui. Po to maksimalus transformantų fleomicino atsparumo lygis buvo nustatytas kietoje terpėje; kai kurie iš jų pasižymėjo geba augti didesnėje nei 30 µg/ml fleomicino aplinkoje. Transformantai, atrinkti pagal jų atsparumą fleomicinui, buvo analizuoti, siekiant nustatyti plazmidės buvimą Southern blot būdu ir transcripto, atitinkančio *ble^R* geną, egzistavimą - Northern blot būdu; abiem atvejais gauti teigiami rezultatai. Šie rezultatai patvirtino galimybę ekspresuoti heterologinius genus *A. chrysogenum*, reguliuojant *PactAc*. *E. coli* DH5α transformantas su plazmide pALC52, turinčia *act* geną, buvo deponuotas Spanish Collection of Type Cultures (CECT), registracijos numeris - CECT4850. Plazmidė pALC53 gali būti gauta iš deponuotas plazmidės pALC52, paprasčiausiai subklonuojant pALC52 intarpą pBluescript I KS (+) *HindIII* kirpimo vietoje priešingoje orientacijoje.

Intarpų, esančių deponuotose plazmidėse, naudojant *E. coli* kaip šeimininką, įterpimas į aktinomicetus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* ar *Saccharomyces*, yra tik technikos ir tinkamiausių vektorių, būtinų šios generacijos ar šeimų transformacijai, pasirinkimo reikalas.

Išsamus brėžinių aprašymas

Fig.1 – *P. chrysogenum* *gdh* geno, koduojančio NADP priklausančios glutamato dehidrogenazės fermento aktyvumą (EC.1.4.1.4), restrikcijos diagrama.

Fig.2 - *P. chrysogenum* *hex* geno, koduojančio β -N-acetilheksozaminidazės fermento aktyvumą (EC.3.2.1.52), restrikcijos diagrama.

Fig.3 – *P. chrysogenum* *act* geno, koduojančio γ -aktiną, restrikcijos diagrama.

Fig.4 - *A. chrysogenum* *act* geno, koduojančio γ -aktiną, restrikcijos diagrama.

Fig.5 – *E. coli* *lacZ* geno, *S. hindustanus* *ble^R* geno ir *P. chrysogenum* *pahA* geno ekspresijos *P. chrysogenum* ir/arba *A. chrysogenum*, reguliuojant promotoriui *Pgdh*, vektoriai.

Fig.6 – *S. hindustanus* *ble^R* geno ekspresijos *P. chrysogenum* ir/arba *A. chrysogenum*, reguliuojant promotoriams *Phex*, *PactPc*, *PactAc*, vektoriai.

SEKŲ SĄRAŠAS

BENDRA INFORMACIJA

PAREIŠKĖJAS:

PAVADINIMAS: ANTIBIOTICS, S.A.U.

GATVĖ: Avda de Burgos, 8-A

MIESTAS: Madridas

VALSTIJA AR PROVINCIIJA: Madridas

ŠALIS: Ispanija

PAŠTO KODAS: 28036

TELEFONAS: 91-3841200

FAKSAS: 91-3841220

PAVADINIMAS: "GLUTAMATO DEHIDROGENAZĖS, β -N-ACETILHEKSOZAMINI-
DAZĖS IR γ -AKTINO GENŲ PROMOTORIAI BEI JŲ PANAUDOJIMAS
FILAMENTINIŲ GRYBŲ EKSPRESIJOS, SEKRECIJOS IR
ANTISENSINĖSE SISTEMOSE".

SEKŲ SKAIČIUS: 8

KORESPONDENCIJOS ADRESAS:

ADRESAS: ANTIBIOTICS, S.A.U.

GATVĖ: Avda de Burgos, 8-A

MIESTAS: Madridas

VALSTIJA AR PROVINCIJA: Madridas

ŠALIS: Ispanija

PAŠTO KODAS: 28036

KOMPIUTERIZUOTA FORMA:

LAIKMENA: 3,5" DISKAS

KOMPIUTERIS: PC

OPERACINĖ SISTEMA: WINDOWS

PROGRAMA: WORD

INFORMACIJA APIE ADVOKATĄ/AGENTĄ:

VARDAS, PAVARDĖ: ALBERTO DE ELZABURU

REGISTRACIJOS NUMERIS: 232/1

ADRESAS: Miguel Angel, 21
28010-Madridas

TELERYŠIŲ INFORMACIJA :

TELEFONAS: 3085900

FAKSAS: 3193810

TELEKSAS AR ELEKTRONINIS PAŠTAS: elzaburu@elzaburu.es

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:1

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 2816 pagrindinės poros

TIPAS: nukleotidai

GIJŲ SKAIČIUS: 2

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĒS TIPAS: genomine DNR

HIPOTETIŠKA: ne

ANTISENSINĒ: ne

KILMĒS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidēs pALP784 ir pALP785

POZICIJA GENOME: nežinoma

YPATYBĒ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti seka

VIETA: jungtis (922...970, 1131...1261, 1319...2521)

YPATYBĒ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 971...1130

YPATYBĒ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 1262...1318

YPATYBĒ:

KITA INFORMACIJA: gdh genas

ACC AAG GTC GCT GAG GCC ATG AAG GAG CAC GGT GAC TGG TGG TAAATTAGTC 2531
 The Lys Val Ala Glu Ala Met Lys Glu His Gly Asp Trp Trp
 450 455 460
 GCATCCCCAT TTATTCTGGG AGGTGTTCTG TGACCGATTTC TGTCCTCTCT TAAGGAGAGG 2591
 CAGCTTTGAT GCAATTTCTT TTCATTTAAA TAGCTTTTAA CCCTTTTGTG CAAGCGGGTT 2651
 ACGGATAGAG GCGCTTGGTT TTCTCCACTG TTGCATTGGA TTGATATCCC CACTTGAGCA 2711
 CCGCTGTTTG TTTTGGTCT GCACTTGGGA CTGTCATGAT GATAATGAGA TACAATGAAT 2771
 AACTTAAAAA TAATTGTGTG GTCTCGTAAA GTTGTAACCT CTAGA 2816

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:2

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 5240 bazių porų

TIPAS: nukleotidai

GIJŲ SKAIČIUS: 2

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: genominė DNR

HIPOTETIŠKA: ne

ANTISENSINĖ: ne

KILMĖS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidės Palp295 ir pALP388

POZICIJA GENOMOJE: nežinoma

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti seka

VIETA: 1324...3111

KITA INFORMACIJA: hex genas

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:2

GTCGACCTCG CAACAGTCCA GAAGCAGGCC GCGTATCTCG CCGGCAGCCG GGTAAACCGGC 60
 CTAGTAACCC AGGGTAGCAA TGGCGAAGCC GTCCACCTAG ACCGGGAAGA ACCCAAGCCC 120
 ATCAGACCCG CCACACGCCG CCGCTGGAC GCAGCCGGCT ACAGCAACAT GCCGGTGATT 180
 GCCGGCTGTG GCGCCGCTC AACCCGTGAG ACCATCCAAT TGTGCCAGGA CTCGGGTGCA 240
 GCAGGGCCCG ACCCTCTCT CGTGCTCCCA CCCAGCTACT ACAAGTCCCT CGTGAGCACC 300
 GAGTCCATGC ACGCCCACTT CCGGGCTGTC GCGGATGCCT CGCCCGTCCC TGTCTCATC 360
 TACAACITCC CCGCCGTCCA GTCCGGCTC GATCTCAGCT CAGATGATAT CTTAACTCTC 420
 GCAGAACAAC CCAATATCAT CCGCTGTAAG CTCACGTCCG GCACACCGGG TAAGTTGGCT 480
 CGTGTTCGGG CCGCCAAGCC GGATTTCTTG ACTTTTGGTG GCTCCGCCGA TTTACGCTG 540
 CAGACGCTCG TTGTTGGTGG CCGGGGATTT ATCGGTGGCG TGGCTAACAT GATTCCTCGC 600
 TCGTGTGTGC GTCTGATGGA GTTGTATCGT GCTGGGAAGG TTCACGAGCC GCAGAAGGTG 660
 CAGGCTATTG TTGCCCGCGC TGACTGGGCT GCTATCCATG GTGGCTTTAT CGCTGTTAAG 720
 ACGGGCCCTCC AAGCCTACCA CCGTTACCGT GGTCTTCTCT CCGCCCTTIG TGTCTGCTCT 780
 TCTGCTAAGG ATCGCCAGC CATTGAGGAG GAGTTCGGG AGGGAATGGA CTTGAGAGG 840

TCGTTGGAGT	CCTAATGGAT	ATAGTAGATT	AAATCATGAT	TACCAGAGAT	CCCATGTCCA	900
GATTTCTATT	CCTTTCCAGG	GGTTTTCCAG	GGGTTTTCCA	GATGTTTTCC	AGGTGTTTTC	960
CAATGTTTC	AGTTTGCTC	ATAGATCGAC	AGACCGGTGT	GACTGTGTCA	TTTGCCAGTA	1020
CATCCGGAGA	TCCCGTAGCT	TTCCCCCTCT	TTAICTTTTA	ATATTGTTG	TTATATGGGA	1080
GTCAAGTTG	CATGTAGAGG	TTGCACCTCT	TCTCTCTCTC	TTTCCCTTGA	ATTATTTCAG	1140
TCCAGGTGT	GTTAGTCTA	TGCAATGTA	CTAGGGAGCT	GTTTGTMTT	CCCCTTCCCC	1200
AGGGTTGCAT	CCTGGGCCAT	TCCCCATTCC	GATGAAAGAT	CGACAATGCA	GCTAAACATA	1260
AAATGTTCTG	GTTATCTCT	GGCCACAGTT	TCTCTACTTT	TCATCGTCAC	TCACCTTATC	1320
AAC ATG AAG TTC GCC TCG GTC TTG AAT GTG CTC GGG GCC CTG ACG GCT	Met Lys Phe Ala Ser Val Leu Asn Val Leu Gly Ala Leu Thr Ala	1 5 10 15				1368
GCG TCC GCC GTC CAA CTC AAT CCA CTT CCC GCC CCC CGT AAC ATC ACC	Ala Ser Ala Val Gln Val Asn Pro Leu Pro Ala Pro Arg Asn Ile Thr	20 25 30				1416
TGG GGA TCC TCC GGT CCA ATC CAA GTC AAC AAC TTG AAT CTC AAC GGT	Trp Gly Ser Ser Gly Pro Ile Gln Val Asn Asn Leu Asn Leu Asn Gly	35 40 45				1464
CCT CAC TCC CCT TTG CTC ACT CAA GCT TGG GAG CGA GCA TGG GAA ACC	Pro His Ser Pro Leu Leu Thr Gln Ala Trp Glu Arg Ala Trp Glu Thr	50 55 60				1512
ATC ACC ACC CTG CAA TGG GTT CCT GCT GCT GTT GAA TCC CCA ATC GCC	Ile Thr Thr Leu Gln Trp Val Pro Ala Ala Val Glu Ser Pro Ile Ala	65 70 75				1560
TCC TAT CCG GCC TTC CCC ACC TCG ACC CCT GTC TCC TCT GCC CCC AAG	Ser Tyr Pro Ala Phe Pro Thr Ser Thr Pro Val Ser Ser Ala Pro Lys	80 85 90 95				1608
GCC AAA CGC GCG CCC TCC GGA ATC CAT AAC GTC GAT GTT CAT GTG GTG	Ala Lys Arg Ala Pro Ser Gly Ile His Asn Val Asp Val His Val Val	100 105 110				1656
GAC AAC GAT GCC GAT CTC CAA TAC CCT CTC GAT CAA TCC TAT ACA CTG	Asp Asn Asp Ala Asp Leu Gln Tyr Gly Val Asp Glu Ser Tyr Thr Leu	115 120 125				1704
GTA GTG AGC GAT GGT GGC ATC AGG ATC AAT TCT CAG ACG GTC TGG GGT	Val Val Ser Asp Gly Gly Ile Arg Ile Asn Ser Gln Thr Val Trp Gly	130 135 140				1752
GTG TTG CAG GCA TTC ACC ACC CTG CAG CAG ATT ATC ATC TCG GAT GGG	Val Leu Gln Ala Phe Thr Thr Leu Gln Gln Ile Ile Ile Ser Asp Gly	145 150 155				1800
AAG GGC GGT TTG ATC ATT GAA CAG CCC GTC AAG ATC AAG GAT GCC CCG	Lys Gly Gly Leu Ile Ile Glu Gln Pro Val Lys Ile Lys Asp Ala Pro	160 165 170				1848
CTG TAC CCC CAT CGT GGT ATC ATG ATA GAC ACC GGG CGC AAC TTC ATT	Leu Tyr Pro His Arg Gly Ile Met Ile Asp Thr Gly Arg Asn Phe Ile	180 185 190				1896
ACC GTT CGC AAG CTC CTT GAG CAG ATC GAC GGT ATG GCC CTG TCC AAG	Thr Val Arg Lys Leu Leu Glu Gln Ile Asp Gly Met Ala Leu Ser Lys	195 200 205				1944
CTC AAT GTT CTC CAC TGG CAC TTG GAC GAT TCT CAG TCG TCG CCC ATC	Leu Asn Val Leu His Trp His Leu Asp Asp Ser Gln Ser Trp Pro Met	210 215 220				1992
CAG ATG AGC TCC TAC CCG GAG ATG ACC AAA GAT GCT TAC TCG CCT CGC	Gln Met Ser Ser Tyr Pro Glu Met Thr Lys Asp Ala Tyr Ser Pro Arg	225 230 235				2040
GAA ATC TAC ACC GAG CAC GAC ATG CGC CGC GTG ATT GCC TAC GCA CGC	Glu Ile Tyr Thr Glu His Asp Met Arg Arg Val Ile Ala Tyr Ala Arg	240 245 250 255				2088

GCG CGA CGT GTC CGC GTC ATC CCC GAG GTC GAC ATG CCC GCC CAC TCA Ala Arg Gly Val Arg Val Ile Pro Glu Val Asp Met Pro Ala His Ser 260 265 270	3136
GCC TCC CCC TCC CAG CAG GTC GAC CCG GAG ATC GTG GCA TGT GCC GAA Ala Ser Gly Trp Gln Gln Val Asp Pro Glu Ile Val Ala Cys Ala Glu 275 280 285	3184
TCC TCC TGG TCG AAC GAC GTT TGG GCG GAG CAC ACC GCC GTC CAG CCG Ser Trp Trp Ser Asn Asp Val Trp Ala Glu His Thr Ala Val Gln Pro 290 295 300	2232
AAC CCT GGC CAG CTC GAC ATT ATC TAC CCC AAG ACC TAC GAA GTT GTC Asn Pro Gly Gln Leu Asp Ile Ile Tyr Pro Lys Thr Tyr Glu Val Val 305 310 315	2280
AAC AAT GTC TAC CAG GAA TTG TCT CGC ATC TTC AGC GAC AAC TTG TTC Asn Asn Val Tyr Gln Glu Leu Ser Arg Ile Phe Ser Asp Asn Leu Phe 320 325 330 335	2328
CAC GTT GGT GCA GAC GAG ATC CAG CCC AAC TGC TAC AAC TAC AGC ACC His Val Gly Ala Asp Glu Ile Gln Pro Asn Cys Tyr Asn Tyr Ser Thr 340 345 350	2376
CAT ATC ACT AAG TGG TTT GCC GAG GAT CCC TCG CGC ACC TAC AAC GAC His Ile Thr Lys Trp Phe Ala Glu Asp Pro Ser Arg Thr Tyr Asn Asp 355 360 365	2424
CTT GCG CAG TAC TGG GTT GAC CAT TCC ATG CCC ATC TTC CGT AGT GTC Leu Ala Gln Tyr Trp Val Asp His Ser Met Pro Ile Phe Arg Ser Val 370 375 380	2472
GGC GAC CAC CGC CGT CTT ATG ATG TGG GAG GAC ATA GCT ATC GCC AGT Gly Asp His Arg Arg Leu Met Met Trp Glu Asp Ile Ala Ile Ala Thr 385 390 395	2520
GAA AGC GCC CAC GAC GTC CCC AAA GAC GTC ATC ATG CAG ACC TGG AAC Glu Ser Ala His Asp Val Pro Lys Asp Val Ile Met Gln Thr Trp Asn 400 405 410 415	2568
ACC GGC GAG GGT GAG GGT AAC ATC AAG AAA CTC ACC TCC GCC GGC TAC Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asn Ile Lys Lys Leu Thr Ser Ala Gly Tyr 420 425 430	2616
GAC GTT GTC GTT TCG ACC TCC GAT TTC CTC TAC CTC GAC TGC GGC CGC Asp Val Val Val Ser Thr Ser Asp Phe Leu Tyr Leu Asp Cys Gly Arg 435 440 445	2664
GCC GGC TAT GTC ACC AAC GAC GCC CGC TAC AAC GTG CAG AGC AAC ACC Gly Gly Tyr Val Thr Asn Asp Ala Arg Tyr Asn Val Gln Ser Asn Thr 450 455 460	2712
GAC GGC GGA GTG AAC TTC AAC TAC GGC GGC GAC GGT GGC TCC TCG TGC Asp Gly Gly Val Asn Phe Asn Tyr Gly Gly Asp Gly Gly Ser Trp Cys 465 470 475	2760
GCC CCC TAC AAG ACC TGG CAG CGC ATC TAC GAC TAC GAC TTC CTC ACC Ala Pro Tyr Lys Thr Trp Gln Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Phe Leu Thr 480 485 490 495	2808
AAT CTC ACT TCC TCC GAA GCG AAG CAC ATT ATC GGC GCC GAG GCT CCT Asp Leu Thr Ser Ser Glu Ala Lys His Ile Ile Gly Ala Glu Ala Pro 500 505 510	2856
TTG TGG TCG GAG CAG GTC GAC GAT GTG ACC GTC TCC AGC GTG TTC TGG Leu Trp Ser Glu Gln Val Asp Asp Val Thr Val Ser Ser Val Phe Trp 515 520 525	2904
CCT CGC GCT GCT GCT CTG GGT GAG CTT GTC TGG TCT GGT AAC CGT GAC Pro Arg Ala Ala Ala Leu Gly Glu Leu Val Trp Ser Gly Asn Arg Asp 530 535 540	2952
GCT GCG GGT AGA AAG CGT ACC ACC AGC TTT ACT CAG CGT ATT CTC AAC Ala Ala Gly Arg Lys Arg Thr Thr Ser Phe Thr Gln Arg Ile Leu Asn 545 550 555	3000

TTC CGT GAA TAC CTC GTT GCC AAT GGT GTG ATG GCT ACT GCT CTT GTG	3048
Phe Arg Glu Tyr Leu Val Ala Asn Gly Val Met Ala Thr Ala Leu Val	
560 565 570 575	
CCG AAG TAT TGT CTG CAG CAC CCT CAT GCT TGC GAC CTC TAT AAA AAC	3096
Pro Lys Tyr Cys Leu Gln His Pro His Ala Cys Asp Leu Tyr Lys Asn	
580 585 590	
CAG ACT GTA ATG TCT TGATTGTGGT TAAGCTGGAC TGCTAGTGAG CCTTACAAC	3151
Gln Thr Val Met Ser	
595	
GCCTCTTCGT CTGTATATAC TTATTCTATC TTCGATACCC AATTCGATTG GAATTTCTTC	3211
CAGGATACAT GTCCCTGATC AGTATACCAT TTCACGTCCA CATTCAATCT TCAGCAACAC	3271
GAATTTATCC AAACCAATCA CCACCCTAGA TCTACCACAA CACTACCTTT ATACATATCT	3331
ACTTCATACC CAATCCCATT CCAACCAGGC GCAAAAGGCG TCCCCAGTCC AATCAAAT	3391
CAGCCCCCGG AGCCCAACCC TCTCCACATA TCCATACCCT AATCAAATC ACCTTAATCT	3451
AAACAAATCC ATCAAGCCCA AGGACCCAC AGACCTCCCC TTCCCAACCC ACCCAGTCCA	3511
CCTCCACAAA CCAAACCCCA AATCAGAACT GCCGTGCAAC TCTCCGTCTT AGAACTCGCC	3571
CTTCCGTCCC CTCCCGAACT TAGATGGGCT TCCGGACGGC TTGCTGTATG CACTATGCAT	3631
GTAGTACGCA GTACGCCOTA CACATGTAGT AGGGGATATA TGTAIGTACT ATGTACGCAT	3691
GTTCAGTAC GCAGTACGTA GTGTGGCATG CAGGTCCAGCT AGCATTGGCA GTAGCATATA	3751
CGGCATAACC TAGCTATGTC ATCTAATATT CTTCGGTATA TACCACATGG TACGGAAITA	3811
GATGCAATAC ATGTACATGT ACATGTGCAT ACCTAGGTAC AAAGTGAATC TCGTATTGT	3871
ATGTCTAGTC GTGTATAAGT GTAGTCCCAT GTCATATATA CAAGCCATA CCGCATCGGA	3931
GCAAACCAGC CCATTCAGAC ATCCCTGCTC GAAACCCAGT CTACGGATTG AGACCGGGCT	3991
GAGCTGGGGT TTGGGTGTGG CTGCATGCCG AGCCTACAT ACGTAGGGAG ATATGTGCA	4051
CAGGATGCAG GGAATGACAA ATTGACGAAT TGAGAAATAC GCGAGTGGT ACATGTTAAT	4111
TCTCGTTCCG GAIGTTTATG TTTACCTAGG TATACTGGCT GGGGGTCCG CATACACGTG	4171
CGAATTTGTG GCAATCTGTC AGTGGCCAGG TCCGTGTGG ATTTATATGT TTGGATGGG	4231
GATGGTCAAT GGGTATTCCA AGGAGGATGT ATCATCTGCT TTACACCGTC CCTTGCCTGG	4291
GATTTGGATT GAATTCCTCT TTCCAGGTCG ATGTAGATTC TTCCCCGGAG CTATTCCGGT	4351
ACAACCTTGG CTTCATATA TCATGTGTCC ATACTAAGTA CAGACGCTTC GATTCGGGT	4411
GCTGCGAGTA GATCGGGAAC TGAATCTGCA TGTCGTACA CGAAGGTTG TACAAGCAGG	4471
CGGTCCCTCT GCGTAACCGG TTGTTTATGT TATTGGATTT GGTATTCGTC TAATATGAT	4531
GATTTGGGAT AAGCTTCTAT CCTGGGAATG GGTGCTTGGT ATAGTTCAGC CTAGTACTTC	4591
GTCTTCTATG TGATATTTCC AAAATAGTAG TTTTCGGTAA GTATATCTCC TACCTTTGAC	4651
TTTGGTTTGT GGTTTACGTC TTACCTGGCG TTTAGAGGGA GGGATAGCTT TCTGTATCAC	4711
CGTCCGTGTT CAACGTGGAT CCGGGTCCCT TCCCTGATAT ATATCTTGGC TTATGTTTCG	4771
TGCGGTAGTG CCGGTTCTGA TAATGCATGT CTGGTATATC ATACGGCATT AGTGACTGGG	4831
ACGTTGAGGT CGAGCTTGGT TTGAGGTTAC ATATATTGAG CCAAAATGGT CGAAAATATA	4891
TATCAACATT GCCAAAACAG AACTTCATTC GTTGGATGCC ATGCCAAAT GCTAATAGGT	4951
CTTGATCTTA CTCTGACTCC TATCTCATCT CACCTTGGTT ATTCTGTACA CAGCATTAC	5011
CCCAAGAACC AGGTATAGTC TGATCGTGGA TTGGGGCCAC GACAAAATAG AAGGTCTCGT	5071
GTTTAGGGCG ACGAATCTGG CACTGCATTC CAGACGGGCC TGCCGAGAAT TTGCAGCATT	5131
TTATATCTAC ATGGTGTTC CCGGTGTGT GTGGGTGTTT CATGATAAT CCTGGTTCAT	5191
TCTGACGTGC GTATGTATCC CTGGAAGCC TCCTAGGGCC TCGCTCGAC	5240

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:3

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 2994 bazių poros

TIPAS: nukleotidai

GIJŲ SKAIČIUS: 2

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: genominė DNR

HIPOTETIŠKA: ne

ANTISENSINĖ: ne

KILMĖS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidės pALP315 ir pALP316

POZICIJA GENOMOJE: nežinoma

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti seka

VIETA: jungtis (494...500, 617...647, 846...901, 1047...1077,
1181...1952, 2022...2249)

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 501...616

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 648...845

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 902...1046

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 1078...1180

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 1953...2021

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: act genas

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:3

GAATTCAGCA	GCCACGGAG	TCCATAAGAC	ACCAAGACAC	AGCCATTGTA	TGGATTATAT	60
ATGCCATGTA	TGCTTGACAA	TGCTGTATAA	GTACTGTAAT	ACAAGGTAAA	CCCCCAACCC	120
GGTCAAGGTA	CGTCTCCCG	CCGTACCCAA	AAGGGTCCCC	AAGAATGTCC	ACGCAATACT	180
TTTAGGTAGA	CATTGAAGGA	ATCCAAGTGA	GAAATTCAT	GAACATGAAC	AATAGTTCTG	240
CCATATAATC	TTTATAAGTA	TATAAATCAG	AAAGAGAATT	ATATACAAA	GGGTAGATCT	300
GGAGGGGGTT	CAGAGTTAAG	GCCTCAGGCA	GGCGCACAAT	CCCAGCCATC	ACAAACCCCT	360
CTCCACTCTT	CCCTCTCTCT	CTCTTCTTTC	TTCCCTTCTC	CCCTAATCCC	AACTATATCC	420


```

ATC AAG GAG AAG CTT TGC TAC GTC GCC CTC GAC TTC GAG CAG GAG ATC      1736
Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Ile
      215      220      225
CAG ACC GCT TCC CAG AGC TCC AGC CTC GAG AAG TCC TAC GAG CTT CCC      1784
Gln Thr Ala Ser Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro
      230      235      240
GAT GGA CAG GTC ATC ACT ATT GGC AAC GAG CGC TTC CGT GCT CCT GAG      1832
Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Ala Pro Glu
      245      250      255
GCT CTG TTC CAG CCT AAC GTT CTT GGC CTC GAG TCT GGC GGT ATC CAC      1880
Ala Leu Phe Gln Pro Asn Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly Gly Ile His
      260      265      270      275
GTC ACC ACC TTC AAC TCC ATC ATG AAG TGT GAT GTT GAT GTC CGT AAG      1928
Val Thr Thr Phe Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Val Arg Lys
      280      285      290
GAT CTC TAC GGC AAC ATT GTC ATG GTAAGAAAA AGCCTCCAGA GCTGATGTTC      1982
Asp Leu Tyr Gly Asn Ile Val Met
      295
CGCAAAGATC CCCACTAACA TACAACCTCT TTTTTTTAG TCT GGT GOT ACC ACC      2036
Ser Gly Gly Thr Thr
      300
ATG TAC CCC GGT ATC TCC GAC CGT ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCT CTT      2084
Met Tyr Pro Gly Ile Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu
      305      310      315      320
GCT CCT TCT TCC ATG AAG GTC AAG ATC ATC GCT CCC CCC GAG CGC AAG      2132
Ala Pro Ser Ser Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys
      325      330      335
TAC TCC GTC TGG ATC GGT GGA TCC ATT CTG GCC TCC CTG TCG ACC TTC      2180
Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe
      340      345      350
CAG CAG ATG TGG ATC TCC AAG CAG GAG TAC GAC GAG AGC GGT CCT TCC      2228
Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser
      355      360      365
ATC GTT CAC CGC AAG TCC TTC TTAGCTTCTT GCAGCACTTT ACTACTCGTA      2279
Ile Val His Arg Lys Cys Phe
      370      375
TTGGCTGGTA CTTTCCCTGGT GTATCAAAAA GCAGGATGGA GGCCTGGTG GATTGCAAGC      2339
GTGTGGGAC TCGATTATC AAGCGGATAG CCTGAAAATG GAATCTCGAT TTTAGTGGAA      2399
TAGAGTCGGT CGTTTTCTTT TTGTTACTCT TTACCTTACT CTTTACTCGA TCTCTATCCA      2459
TCCATTCTG CTTTGAACCA TTTACCTTT ACTCCATCTT TTTCCCTTTC CTCATTGGAA      2519
TCCGCTGTCC CGTCCACCTC TCTGATTGTT TTGCCTGGAC GGGTCTCTCG CGATGCGGCA      2579
TCAACAGGT ACTGTAGGG CAAGGATGTA TATGGAGTTG GTTGGCTATA GGGATTAGGT      2639
TCCGTTGTCC TTTCCGACGT CTTCTACGTC TTTGTTCTAG CCCCTTGGCT TGTCTTCAAC      2699
TAAACTGCCC TTGTCCGTAG CTTTTACGT GACTTTGACT TCAAATATC CACTGGTTCC      2759
TTGTATTCTG CTAGAAACGC TGGTCAACG CTTGTTGAAT GTCTTCTATG TCCAACATCT      2819
ACAAGACGTA TCCGAGAAGA CACAAAAAG GCTCTGAGGA AAGTCTACTA AAAACTTGGC      2879
CAGGCCOGAT TAGGCCTTTG TCATGGTTAT TGTACTGTCA TTCGATCAGT CCATATTGAT      2939
ATTCTGGGAA TATGTAGGCT GACGAGATAA ATGGCACCCA TTGGGTGTGT ATCTT      2994

```

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:4

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 3240 bazių porų

TIPAS: nukleotidai

GIJŲ SKAIČIUS: 2

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: genomine DNR

HIPOTETIŠKA: ne

ANTISENSINĖ: ne

KILMĖS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidės pALC52 ir pALC53

POZICIJA GENOME: nežinoma

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti seka

VIETA: jungtis (787...793, 921...951, 1124...1179, 1290...1320,
1411...2182, 2250...2477)

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 794...920

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 952...1123

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 1180...1289

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 1321...1410

YPATYBĖ:

PAVADINIMAS/RAKTAS: intronas

VIETA: 2183...2249

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: act genas

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:4

GCCAGGCTGG	CACCGGCCTG	CCTTGATGG	AGATGCCTAC	TCGTACTATG	CCTACAGGTA	60
TGGGCTTTC	GCGTGTGGT	AGCTTGGGAC	CGCGCGGCTG	CTGACGACCC	AAGGCAAGCT	120
GGTAACAATGG	CGGCACGAAA	TTCCTCTCTG	CTGCTCGTC	CTCTGGGTG	GCAGGGGTAC	180
GAGTGCAGGT	ATGATGGGAC	GCCAGAGGAG	TGACGGAGCC	TGTCCGTTG	GCACGAGTAC	240
TGTACGAGTA	CTCGTACTGT	AGGTCCAGCG	ACTGTGGTGG	TACTGCTAGG	TGGAAATGGG	300
TCCAGCAGGC	ATGCAGCTCC	CAGCCACCGT	CGTAAACCAA	TCAGTTAAAG	CAGCAACGCA	360
ACCCGCCCCC	GTFTTCTGC	CAGAAATTTG	GGCGGTGTCC	TGCCCCCAGT	CGCTGTTGCC	420
CGCCCTTGT	TGGTGCCTA	CAGGCTGCAC	CACAGGTAAC	AACAGCCCGC	CCCAGGTCTT	480

TGTAGGTGCC CAGTGAATGC CCGGTGCCCA CAAGTTTCTC GTGGCATCCA CTGGCGGACT 540
 TGAAGGCCCA TCAGTGAATGC TTCCCTCCTT TCCCGTCCA CATCTCACTC AGCTCAGCCA 600
 AGCCAAGCCT CTCTCCCCC GTCTCCATTC CATCTTCTC TCTCCAGGAC CCTTAAGAGT 660
 CCTCTCTGCT CAGTGGACC ATCTTGGCT CCCAGCCCCA CGACATCTGC ATCGTCTGGG 720
 CTCTTGACA CTCTGCATT TCTTCTTAT AAAACCTGT TACCGCTCTT CCGTAAATCC 780
 GACGCC ATG GAG G GTACGTGTCC CCGCAAGCCA CTCCCGCTC CCTACTACC CCTA 837
 Met Glu
 1
 TCGCGC ATCCACACGG CCGCGCGATG CCTAGCCATC GCGAGGGTGC ATCGCAACGA CTT 896
 GGCTAAC TCTTCTTCCG TTCACAG AG GAG GTC GCC GCC CTC GTT ATC GAC 946
 Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp
 5 10
 AAT GG GTAAGCTGGC CCGCTGTCTC ACCGACATCC ATCGTCCCCC TGGCCTGTGT 1001
 Asn Gly
 CGACATGGGA GCTCCAGGG GTCCCTTCCA CGAGCGGCTC GATTGCCAAA ATCCACGAG 1061
 ATCGGGCCAT ACTGAGCCGA CACTCGTGTG TTTTCTGGAC ATTAGGACTG ACTTGATTCT 1121
 AC T TCG GGT ATG TGC AAG GCC GGT TTC GCC GGT GAT GAT CCT CCC CGA 1189
 Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg
 15 20 25
 GCT GTT TTC C GTAAGTACCC CACTTCCACC CGTGGAGCTC CCCAATTGTC CACCGCCAGG 1229
 Ala Val Phe
 30
 GCGAGAAGGG GGCASAACGG GGCAAACTGC ATCGCAACA TGGCTAATTC GATCGGACAG 1289
 CG TCC ATT GTC GGT CGT CCG CGC CAC CAT GG GTAAGTTTCC GGCCCGAGCC 1340
 Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His His Gly
 35 40
 GACACTCTC ACCCCCCCCC GCGGGGTCC TAAGCGAGTC AGCGGTGGT CTGACCGCTG 1400
 GATACTATAG C ATC ATG ATC GGC ATG GGC CAG AAG GAC TCG TAC GTC GGT 1450
 Ile Met Ile Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly
 45 50 55
 GAC GAG GCT CAC TCC AAG CGT GGT ATC CTC ACC CTG CGC TAC CCC ATT 1498
 Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Ile
 60 65 70
 GAG CAC GGT GTT GTC ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAG ATC TGG CAC 1546
 Glu His Gly Val Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His
 75 80 85
 CAC ACC TTC TAC AAC GAG CTG CGT GTT GCC CCC GAG GAG CAC CCG GTC 1594
 His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val
 90 95 100
 CTG CTC ACC GAG GCG CCC ATC AAC CCC AAG TCC AAC CGT GAG AAG ATG 1642
 Leu Leu Thr Glu Ala Pro Ile Asn Pro Lys Ser Asn Arg Glu Lys Met
 105 110 115
 ACC CAG ATC GTC TTC GAG ACC TTC AAC GCC CCT GCC TTC TAC CTC TCC 1690
 Thr Gln Ile Val Phe Glu Thr Phe Asn Ala Pro Ala Phe Tyr Val Ser
 120 125 130 135
 ATC CAG GCC GTC CTG TCA CTG TAC GCC TCC GGC CGT ACG ACC GGT ATC 1738
 Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile
 140 145 150
 GTC CTG GAC TCT GGT GAT GGT GTC ACC CAC GTT GTC CCC ATC TAC GAG 1786
 Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Val Val Pro Ile Tyr Glu
 155 160 165
 GGT TTC GCC CTG CCC CAC GCC ATT GCC CGT GTC GAC ATG GCT GGT CGT 1834
 Gly Phe Ala Leu Pro His Ala Ile Ala Arg Val Asp Met Ala Gly Arg
 170 175 180
 GAT CTC ACC GAC TAC CTC ATG AAG ATC CTG GCC GAG CGC GGC TAC ACC 1882
 Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Ala Glu Arg Gly Tyr Thr
 185 190 195

TTC TCC ACC ACG GCC GAG CGT GAG ATT GTC CGT GAC ATC AAG CAG AAG 1930
 Phe Ser Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys
 200 205 210 215
 CTC TGC TAC GTC GCC CTC GAC TTC GAG CAG GAG ATC CAG ACT GCC GCC 1978
 Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Ile Gln Thr Ala Ala
 220 225 230
 CAG AGC TCC AGC CTG GAG AAG TCC TAC GAG CTT CCC GAC GGC CAG GTC 2026
 Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val
 235 240 245
 ATC ACC AIT GGC AAT GAG CGC TTC CGT GCT CCC GAG GCT CTC TTC CAG 2074
 Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Ala Pro Glu Ala Leu Phe Gln
 250 255 260
 CCC TCC GTC CTG GGT CTC GAG AGC GGC GCC ATC CAC GTC ACC ACC TTC 2122
 Pro Ser Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly Gly Ile His Val Thr Thr Phe
 265 270 275
 AAC TCC ATC ATG AAG TGC GAC GTC GAT GTC CGT AAG GAT CTG TAC GCC 2170
 Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Val Arg Lys Asp Leu Tyr Gly
 280 285 290 295
 AAC ATT GTC ATG GAAAGTCAGA TGCCGGCCCT GGAAGACACC TCATTTAOGA TCT 2225
 Asn Ile Val Met
 TGCTAAC ACCAATTTTT TTTTTAG TCT GGT GGT ACC ACC ATG TAC CCT GCC 2276
 Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro Gly
 300 305
 CTC TCT GAC CGT ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCT CTT GCT CCT TCT TCC 2324
 Leu Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Ser
 310 315 320
 ATG AAG GTC AAG ATC AIT GCT CCC CCG GAG CGC AAG TAC TCC GTC TGG 2372
 Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys Tyr Ser Val Trp
 325 330 335 340
 ATC GGT GGT TCC AIT CTG GCG TCT CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG 2420
 Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp
 345 350 355
 ATC TCG AAG CAG GAG TAC GAC GAG AGC GGC CCC TCC ATC GTC CAC CGC 2468
 Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His Arg
 360 365 370
 AAG TGC TTC TAAGGTATGT TGTCGTCCGG AAGCCGGATA CCCGAATGTA AGGTGACAG 2527
 Lys Cys Phe
 375
 CTTGAAAAG ACAAGGCAAC CGGCCAGAAC CAAATCCTC CACCCTCCGC AAAAGAAGGC 2587
 CAAGATGTCG GAGTCGGTGG CGACCGATGC AACGTCTACT CACGTGCGCG CGTATCCAC 2647
 TCAAGTCTCA TATTTACGAA AAGTTATTTT ACATGGTCAG GCGGTGGTGG GCGTTGCCCTT 2707
 TTCTCGGAAC AGACATGACG GCGGCCACTI TTGTAGTCGG ATGCGTITTAG GGATGCGAGC 2767
 CTAGGGGTGT AGGAAGCTGA GGTGGATATA CAATAACTTT TTTTGCTTTC CGTCTAGAC 2827
 TCGTTCATG GGAAGACGTG ACCGAATCGC TTGCTGTCT AATAGCCAGC TTGATCAGGC 2887
 GAGTCGGGTT GTTGTGTTT CAGTTTGAGA GGTGCACCAG CGTATTTGTA TGGCCGAGGT 2947
 AGGTATTATG GTCTCGTATT TGCAACACTA GAGCTCGCTT GCTCGTTTTT ACCAGCAGTG 3007
 TCGTCTGCCA TGCCCGGGCT CCGACTCTCG TCTGGCTTCT CAGACCGTGC CTCGTCAATA 3067
 GTATATATCC CCGTAGTAAC CTCGGCACTA GCCGGTTCCT TGTCGTCTTC CTGCTCGCCG 3127
 ATGAGCTTCC TGTACTTGGC CCTCTTCTTC TTGTCGGCGC TGGCAGCCCT CTTCTGCTTG 3187
 ATGCCCCCGA CCATGGCGGA CCGCTCTGTC TCCCGTIGA GCAGCTCGTC GAC 3240

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:5

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 461 aminorūgštys

TIPAS: aminorūgštys

GIJŲ SKAIČIUS: 1

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

KILMĖS ŠALTINIS: Penicillium chrysogenum

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: fermento glutamatodehidrogenazės (EC.1.4.1.4)
aminorūgščių seka, molekulinė masė 49837 Da.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:5

Met	Met	Gln	Asn	Leu	Pro	Phe	Glu	Pro	Glu	Phe	Glu	Gln	Ala	Tyr
1			5						10					15
Lys	Glu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr	Leu	Phe	Gln	Lys
			20						25					30
Lys	Pro	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Ser	Val	Pro	Glu
			35						40					45
Arg	Val	Ile	Gln	Phe	Arg	Val	Val	Trp	Glu	Asp	Asp	Lys	Gly	Gln
			50						55					60
Val	Gln	Ile	Asn	Arg	Gly	Tyr	Arg	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Ala	Leu
			65						70					75
Gly	Pro	Tyr	Lys	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	His	Pro	Thr	Val	Asn	Leu
			80						85					90
Ser	Ile	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly	Phe	Glu	Gln	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala
			95						100					105
Leu	Thr	Gly	Leu	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Asp	Phe
			110						115					120
Asp	Pro	Lys	Gly	Lys	Thr	Asp	Asn	Glu	Ile	Arg	Arg	Phe	Cys	Val
			125						130					135
Ser	Phe	Met	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	His	Ile	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp
			140						145					150
Val	Pro	Ala	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Gly	Phe
			155						160					165
Met	Phe	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ile	Arg	Asn	Gln	Trp	Glu	Gly	Val
			170						175					180
Leu	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Trp	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Arg	Pro
			185						190					195
Glu	Ala	Thr	Gly	Tyr	Gly	Val	Val	Tyr	Tyr	Val	Glu	His	Met	Ile
			200						205					210
Gln	His	Ala	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Arg	Val
			215						220					225

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Ala	Gln	Tyr	Ala	Ala	Leu	Lys	230	235	240
Val	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Asp	Ser	Gln	245	250	255
Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Glu	260	265	270
Glu	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Arg	Lys	Gln	Ile	275	280	285
Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Gln	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Lys	Phe	Lys	Tyr	290	295	300
Ile	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Asp	305	310	315
Val	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Thr	Gln	Asn	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Glu	320	325	330
Ala	Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Cys	Lys	Phe	Ile	Ala	Glu	Gly	335	340	345
Ser	Asn	Met	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Glu	Ala	350	355	360
His	Arg	Asp	Ala	Asn	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Tyr	Ala	Pro	365	370	375
Gly	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	380	385	390
Met	Ala	Gln	Asn	Ser	Ala	Arg	Val	Asn	Trp	Ser	Arg	Glu	Glu	Val	395	400	405
Asp	Ser	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Met	Glu	Asp	Cys	Phe	Asn	Asn	Gly	410	415	420
Leu	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Tyr	Val	Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Val	Leu	425	430	435
Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Gly	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	440	445	450
Ala	Glu	Ala	Met	Lys	Glu	His	Gly	Asp	Trp	Trp					455	460	

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:6

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 596 aminorūgštys

TIPAS: aminorūgštys

GIJŲ SKAIČIUS: 1

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

KILMĖS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: fermento β -N-acetilheksozaminidazės (EC.3.2.1.52)

aminorūgščių seka, molekulinė masė 66545 Da.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:6

Met	Lys	Phe	Ala	Ser	Val	Leu	Asn	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala
1				5						10				15
Ala	Ser	Ala	Val	Gln	Val	Asn	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg	Asn	Ile
				20					25					30
Thr	Trp	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Ile	Gln	Val	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu
				35					40					45
Asn	Gly	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Leu	Thr	Gln	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala
				50					55					60
Trp	Glu	Thr	Ile	Thr	Thr	Leu	Gln	Trp	Val	Pro	Ala	Ala	Val	Glu
				65					70					75
Ser	Pro	Ile	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ala	Phe	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Val
				80					85					90
Ser	Ser	Ala	Pro	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro	Ser	Gly	Ile	His	Asn
				95					100					105
Val	Asp	Val	His	Val	Val	Asp	Asn	Asp	Ala	Asp	Leu	Gln	Tyr	Gly
				110					115					120
Val	Asp	Glu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Asp	Gly	Gly	Ile	Arg
				125					130					135
Ile	Asn	Ser	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr	Thr
				140					145					150
Leu	Gln	Gln	Ile	Ile	Ile	Ser	Asp	Gly	Lys	Gly	Gly	Leu	Ile	Ile
				155					160					165
Glu	Gln	Pro	Val	Lys	Ile	Lys	Asp	Ala	Pro	Leu	Tyr	Pro	His	Arg
				170					175					180
Gly	Ile	Met	Ile	Asp	Thr	Gly	Arg	Asn	Phe	Ile	Thr	Val	Arg	Lys
				185					190					195
Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Asp	Gly	Met	Ala	Leu	Ser	Lys	Leu	Asn	Val
				200					205					210
Leu	His	Trp	His	Leu	Asp	Asp	Ser	Gln	Ser	Trp	Pro	Met	Gln	Met
				215					220					225
Ser	Ser	Tyr	Pro	Glu	Met	Thr	Lys	Asp	Ala	Tyr	Ser	Pro	Arg	Glu
				230					235					240
Ile	Tyr	Thr	Glu	His	Asp	Met	Arg	Arg	Val	Ile	Ala	Tyr	Ala	Arg
				245					250					255
Ala	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Ile	Pro	Glu	Val	Asp	Met	Pro	Ala	His
				260					265					270
Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Gln	Gln	Val	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Ala	Cys
				275					280					285
Ala	Glu	Ser	Trp	Trp	Ser	Asn	Asp	Val	Trp	Ala	Glu	His	Thr	Ala
				290					295					300
Val	Gln	Pro	Asn	Pro	Gly	Gln	Leu	Asp	Ile	Ile	Tyr	Pro	Lys	Thr
				305					310					315
Tyr	Glu	Val	Val	Asn	Asn	Val	Tyr	Gln	Glu	Leu	Ser	Arg	Ile	Phe
				320					325					330
Ser	Asp	Asn	Leu	Phe	His	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Ile	Gln	Pro	Asn
				335					340					345
Cys	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Thr	His	Ile	Thr	Lys	Trp	Phe	Ala	Glu	Asp
				350					355					360
Pro	Ser	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	Leu	Ala	Gln	Tyr	Trp	Val	Asp	His
				365					370					375
Ser	Met	Pro	Ile	Phe	Arg	Ser	Val	Gly	Asp	His	Arg	Arg	Leu	Met
				380					385					390

Met	Trp	Glu	Asp	Ile	Ala	Ile	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	His	Asp	Val	395	400	405
Pro	Lys	Asp	Val	Ile	Met	Gln	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	410	415	420
Gly	Asn	Ile	Lys	Lys	Leu	Thr	Ser	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	Val	Val	425	430	435
Ser	Thr	Ser	Asp	Phe	Leu	Tyr	Leu	Asp	Cys	Gly	Arg	Gly	Gly	Tyr	440	445	450
Val	Thr	Asn	Asp	Ala	Arg	Tyr	Asn	Val	Gln	Ser	Asn	Thr	Asp	Gly	455	460	465
Gly	Val	Asn	Phe	Asn	Tyr	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Trp	Cys	Ala	470	475	480
Pro	Tyr	Lys	Thr	Trp	Gln	Arg	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Phe	Leu	Thr	485	490	495
Asn	Leu	Thr	Ser	Ser	Glu	Ala	Lys	His	Ile	Ile	Gly	Ala	Glu	Ala	500	505	510
Pro	Leu	Trp	Ser	Glu	Gln	Val	Asp	Asp	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val	515	520	525
Phe	Trp	Pro	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Val	Trp	Ser	Gly	530	535	540
Asn	Arg	Asp	Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Arg	Thr	Thr	Ser	Phe	Thr	Gln	545	550	555
Arg	Ile	Leu	Asn	Phe	Arg	Glu	Tyr	Leu	Val	Ala	Asn	Gly	Val	Met	560	565	570
Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Pro	Lys	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Pro	His	Ala	575	580	585
Cys	Asp	Leu	Tyr	Lys	Asn	Gln	Thr	Val	Met	Ser					590	595	

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:7

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 375 aminorūgštys

TIPAS: aminorūgštys

GIJŲ SKAIČIUS: 1

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

KILMĖS ŠALTINIS: Penicillium chrysogenum

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: γ -aktino baltymo, kurio molekulinė masė 41760 Da aminorūgščių seka.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:7

Met	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15
Met	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val
				20					25					30
Phe	Pro	Ser	Ile	Val	Gly	Arg	Pro	Arg	His	His	Gly	Ile	Met	Ile
				35					40					45
Gly	Met	Gly	Gln	Lys	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser
				50					55					60
Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val
				65					70					75
Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe
				80					85					90
Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Ile	Leu	Leu
				95					100					105
Thr	Glu	Ala	Pro	Ile	Asn	Pro	Lys	Phe	Asn	Arg	Glu	Lys	Met	Thr
				110					115					120
Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Tyr	Val	Ser
				125					130					135
Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Gly
				140					145					150
Ile	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	Pro	Ile
				155					160					165
Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Ser	Arg	Val	Asp	Met
				170					175					180
Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu
				185					190					195
Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arg
				200					205					210
Asp	Ile	Lys	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln
				215					220					225
Glu	Ile	Gln	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr
				230					235					240
Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Glu	Arg	Phe
				245					250					255
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Asn	Val	Leu	Gly	Leu	Glu
				260					265					270
Ser	Gly	Gly	Ile	His	Val	Thr	Thr	Phe	Asn	Ser	Ile	Met	Lys	Cys
				275					280					285
Asp	Val	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ile	Val	Met	Ser
				290					295					300
Gly	Gly	Thr	Thr	Met	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Arg	Met	Gln	Lys
				305					310					315
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Met	Lys	Val	Lys	Ile	Ile
				320					325					330
Ala	Pro	Pro	Glu	Arg	Lys	Tyr	Ser	Val	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile
				335					340					345
Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Gln	Gln	Met	Trp	Ile	Ser	Lys	Gln
				350					355					360
Glu	Tyr	Asp	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ile	Val	His	Arg	Lys	Cys	Phe
				365					370					375

INFORMACIJA APIE SEQ ID No:8

SEKOS CHARAKTERISTIKOS

ILGIS: 375 aminorūgštys

TIPAS: aminorūgštys

GIJŲ SKAIČIUS: 1

TOPOLOGIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

KILMĖS ŠALTINIS: Acremonium chrysogenum

YPATYBĖ:

KITA INFORMACIJA: γ -aktino baltymo, kurio molekulinė masė 41612 Da aminorūgščių seka.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No:8

Met	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15
Met	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val
				20					25					30
Phe	Pro	Ser	Ile	Val	Gly	Arg	Pro	Arg	His	His	Gly	Ile	Met	Ile
				35					40					45
Gly	Met	Gly	Gln	Lys	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser
				50					55					60
Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val
				65					70					75
Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe
				80					85					90
Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Val	Leu	Leu
				95					100					105
Thr	Glu	Ala	Pro	Ile	Asn	Pro	Lys	Ser	Asn	Arg	Glu	Lys	Met	Thr
				110					115					120
Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Tyr	Val	Ser
				125					130					135
Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Gly
				140					145					150
Ile	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	Pro	Ile
				155					160					165
Tyr	Glu	Gly	Phe	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Ala	Arg	Val	Asp	Met
				170					175					180
Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu
				185					190					195

Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arg
				200					205					210
Asp	Ile	Lys	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln
				215					220					225
Glu	Ile	Gln	Thr	Ala	Ala	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr
				230					235					240
Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Glu	Arg	Phe
				245					250					255
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Glu
				260					265					270
Ser	Gly	Gly	Ile	His	Val	Thr	Thr	Phe	Asn	Ser	Ile	Met	Lys	Cys
				275					280					285
Asp	Val	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ile	Val	Met	Ser
				290					295					300
Gly	Gly	Thr	Thr	Met	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Asp	Arg	Met	Gln	Lys
				305					310					315
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Met	Lys	Val	Lys	Ile	Ile
				320					325					330
Ala	Pro	Pro	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ser	Val	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile
				335					340					345
Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Gln	Gln	Met	Trp	Ile	Ser	Lys	Thr
				350					355					360
Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Arg	Pro	Ser	Ile	Val	His	Arg	Lys	Cys	Phe
				365					370					375

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Genų ekspresijos padidinimo arba blokavimo mikroorganizmuose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genų, dalinių genų sekų arba DNR fragmentų ekspresiją minėtuose mikroorganizmuose vykdo kontroliuojant *Penicillium chrysogenum gdh* geno promotoriumi.

2. Genų ekspresijos padidinimo arba blokavimo mikroorganizmuose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genų, dalinių genų sekų arba DNR fragmentų ekspresiją minėtuose mikroorganizmuose vykdo kontroliuojant *Penicillium chrysogenum hex* geno promotoriumi.

3. Baltymų ekstraląstelinės ekspresijos mikroorganizmuose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtuose mikroorganizmuose ekspresuojamą geną sulieja su *Penicillium chrysogenum hex* genu.

4. Genų ekspresijos padidinimo arba blokavimo mikroorganizmuose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genų, dalinių genų sekų arba DNR fragmentų ekspresiją minėtuose mikroorganizmuose vykdo kontroliuojant *Penicillium chrysogenum act* genu.

5. Genų ekspresijos padidinimo arba blokavimo mikroorganizmuose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genų, dalinių genų sekų arba DNR fragmentų ekspresiją minėtuose mikroorganizmuose vykdo kontroliuojant *Acremonium chrysogenum act* genu.

6. Būdas pagal 1-5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuotas mikroorganizmas yra eukariotas, išskyrus žmogų, geriausia *Penicillium*, *Aspergillus* arba *Acremomonium*.

7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geriausias naudojamas mikroorganizmas yra *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* arba *Acremomonium chrysogenum*.

8. 2811 bp DNR darinys, išskirtas iš *P. chrysogenum*, apribotas Sau3AI ir XbaI restriktazių kirpimo vietomis, turintis *gdh* geno promotorių.

9. 7737 bp DNR darinys, išskirtas iš *P. chrysogenum*, apribotas BamHI ir SacI restriktazių kirpimo vietomis, turintis *hex* geno promotorių.

10. 4947 bp DNR darinys, išskirtas iš *P. chrysogenum*, apribotas BglIII ir EcoRI restriktazių kirpimo vietomis, turintis *act* geno promotorių.

11. 8650 bp DNR darinys, išskirtas iš *A. chrysogenum*, apribotas dviem HindIII restriktazių kirpimo vietomis, turintis *act* geno promotorių.

12. DNR seka, identifikuota kaip SEQ No:1, turinti *P. chrysogenum gdh* geną.

13. DNR seka, identifikuota kaip SEQ No:2, turinti *P. chrysogenum hex* geną.

14. DNR seka, identifikuota kaip SEQ No:3, turinti *P. chrysogenum act* geną.

15. DNR seka, identifikuota kaip SEQ No:4, turinti *A. chrysogenum act* geną.

16. Nukleotidų sekos, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad restrikcijos sąlygomis jos gali būti hibridizuojamos su DNR dariniiais pagal 8-15 punktą.

17. Aminorūgščių seka, identifikuota kaip SEQ ID No:5, atitinkanti *P. chrysogenum* fermentą glutamatdehidrogenazę.

18. Aminorūgščių seka, identifikuota kaip SEQ ID No:6, atitinkanti *P. chrysogenum* fermentą β -N-acetilheksozaminidazę.

19. Aminorūgščių seka, identifikuota kaip SEQ ID No:7, atitinkanti *P. chrysogenum* baltymą γ -aktiną.

20. Aminorūgščių seka, identifikuota kaip SEQ ID No:8, atitinkanti *A. chrysogenum* baltymą γ -aktiną.

21. Vektoriai, turintys DNR darinius pagal 8-16 punktus arba jų fragmentus.

22. Vektoriai pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juos sudaro plazmidė.

23. Vektoriai pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juos sudaranti plazmidė yra pALP784, pALP785 ir pALfleo7.

24 Vektoriai pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juos sudaranti plazmidė yra pALP295, pALP319, pALP377, pALP388 ir pALP480.

25. Vektoriai pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juos sudaranti plazmidė yra pALP315 ir pALP316.

26. Vektoriai pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juos sudaranti plazmidė yra pALC52 ir pALC53.

27. Transformuotų organizmų, išskyrus žmogų, su padidinta homologinių arba heterologinių genų ekspresija gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina tokios operacijos:

a) vektorių, kurie turi pilnas arba dalines SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3 arba SEQ ID No:4 arba jų rekombinantinius DNR darinius, konstravimas;

b) vektorių įvedimas į šeimininkų, išskyrus žmogų, organizmus, gaunant transformuotus organizmus, kurie ekspresuoja homologinius arba heterologinius genus;

c) transformuotų organizmų, pasižyminčių padidinta homologinių arba heterologinių genų ekspresija, lyginant su netransformuotais kontroliniais organizmais, atrinkimas.

28. Transformuotų organizmų, išskyrus žmogų, sugebančių gaminti ekstraląstelinius baltymus, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina tokios operacijos:

a) vektorių, turinčių pilną arba dalinę SEQ ID No:2 arba jos rekombinantinius DNR darinius, konstravimas;

b) vektorių įvedimas į šeimininkų, išskyrus žmogų, organizmus, gaunant transformuotus organizmus, kurie ekspresuoja ir sekretuoja bent vieną baltymą;

c) transformuotų organizmų, galinčių sekretuoti bent vieną baltymą aukštesniu lygiu nei netransformuoti kontroliniai organizmai, atrinkimas.

29. Transformuotų organizmų, išskyrus žmogų, su antisensine genų ekspresija, pilnai arba dalinai blokuojant jų aktyvumą, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina tokios operacijos:

a) vektorių, turinčių pilnas arba dalines SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3 arba SEQ ID No:4 arba jų rekombinantinius DNR darinius, konstravimas;

b) vektorių įvedimas į šeimininkų, išskyrus žmogų, organizmus, gaunant transformuotus organizmus su antisensine genų ekspresija;

c) transformuotų organizmų, pasižyminčių visiškai arba dalinai blokuota genų ekspresija, lyginant su netransformuotais kontroliniais organizmais, atrinkimas.

30. Transformuočių organizmų gavimo būdas pagal 27 ir 29 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame naudoja vektorius pagal 21-26 punktus arba iš jų gautus vektorius.
31. Transformuočių organizmų gavimo būdas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame naudoja vektorius pagal 24 punktą arba iš jų gautus vektorius.
32. Transformuočių organizmų gavimo būdas pagal 27-31 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame šeimininko organizmas yra eukariotas, išskyrus žmogų, geriausia *Penicillium*, *Aspergillus* arba *Acremomonium*.
33. Būdas pagal 32 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame geriausias mikroorganizmas yra *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* arba *Acremomonium chrysogenum*.
34. Transformuočių organizmų gavimo būdas pagal 27-31 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame šeimininko organizmas yra prokariotas, geriausia *Escherichia coli* arba aktinomicetas.
35. Transformuoti organizmai, išskyrus žmogų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad į juos yra įvestos DNR sekos pagal 8-16 punktus, dalinai arba pilnai įeinančios į vektorius pagal 21-26 punktus, gaunami 27-34 punktuose aprašytais būdais.
36. Transformuotas organizmas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra prokariotas, geriausia *Escherichia coli* arba aktinomicetas.
37. Transformuotas organizmas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra eukariotas, geriausia *Penicillium*, *Aspergillus* arba *Acremomonium*.
38. Transformuotas organizmas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geriausiu atveju jis yra *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Acremomonium chrysogenum* arba *Saccharomyces cerevisiae*.
39. Organizmas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra grynas kamienas, būtent CECT4849, CECT4852, CECT4851 arba jų mutantai ir jų transformuoti dariniai.
40. Transformuočių organizmų pagal 35-39 punktus panaudojimas antibiotikų gamybai.

41. Transformuotų organizmų pagal 35-39 punktus panaudojimas penicilino gamybai.

42. Transformuotų organizmų pagal 35-39 punktus panaudojimas cefalosporinų gamybai.

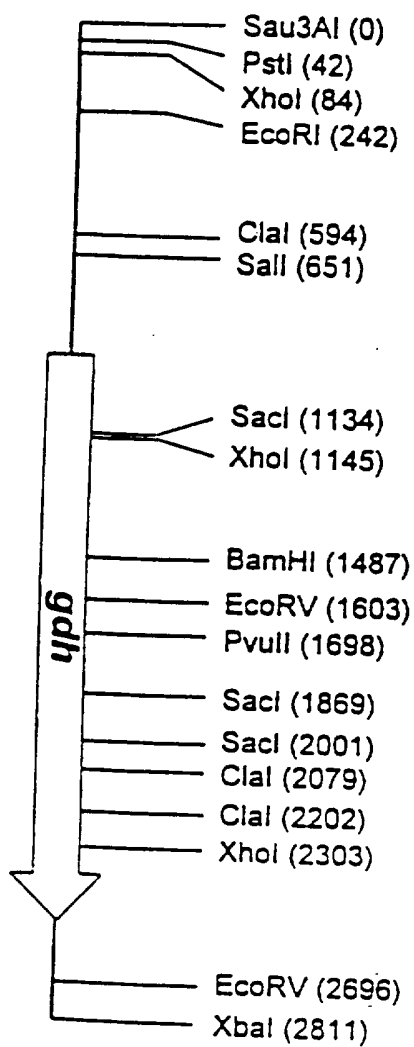


Fig. 1

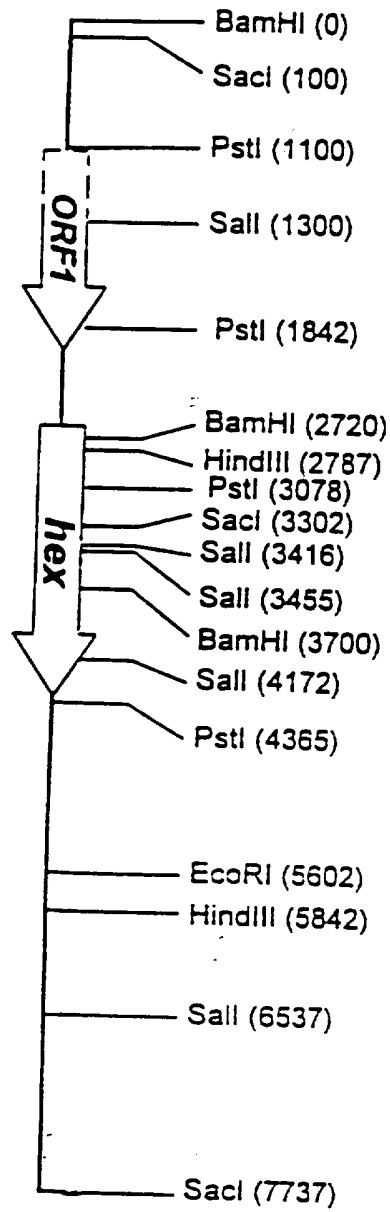


Fig. 2

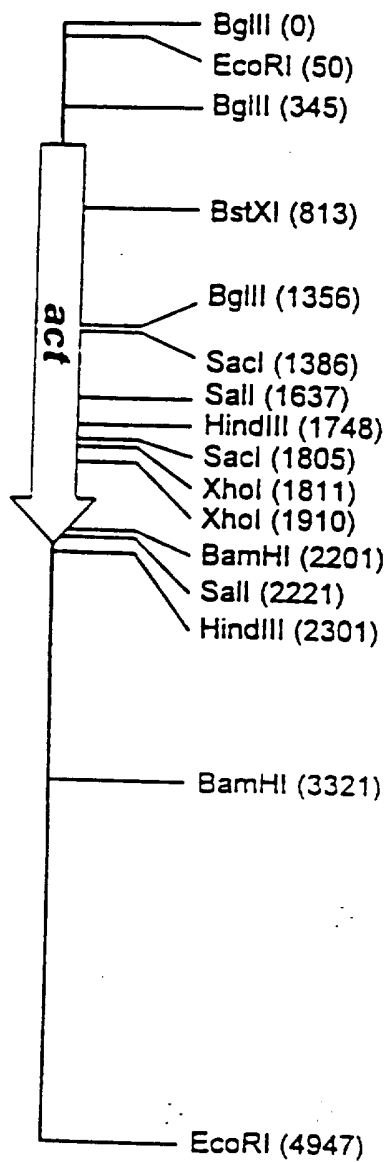


Fig. 3

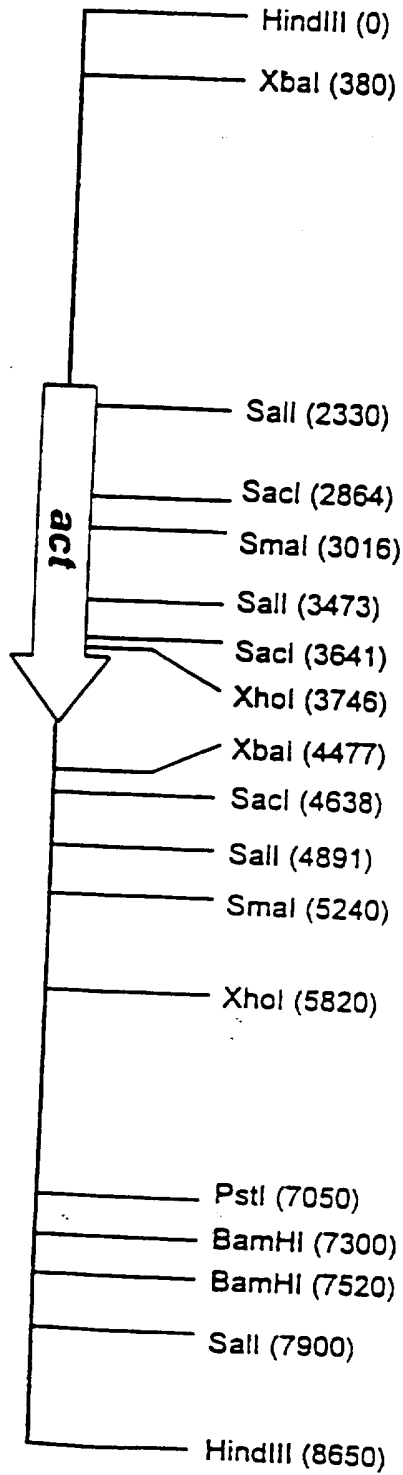


Fig. 4

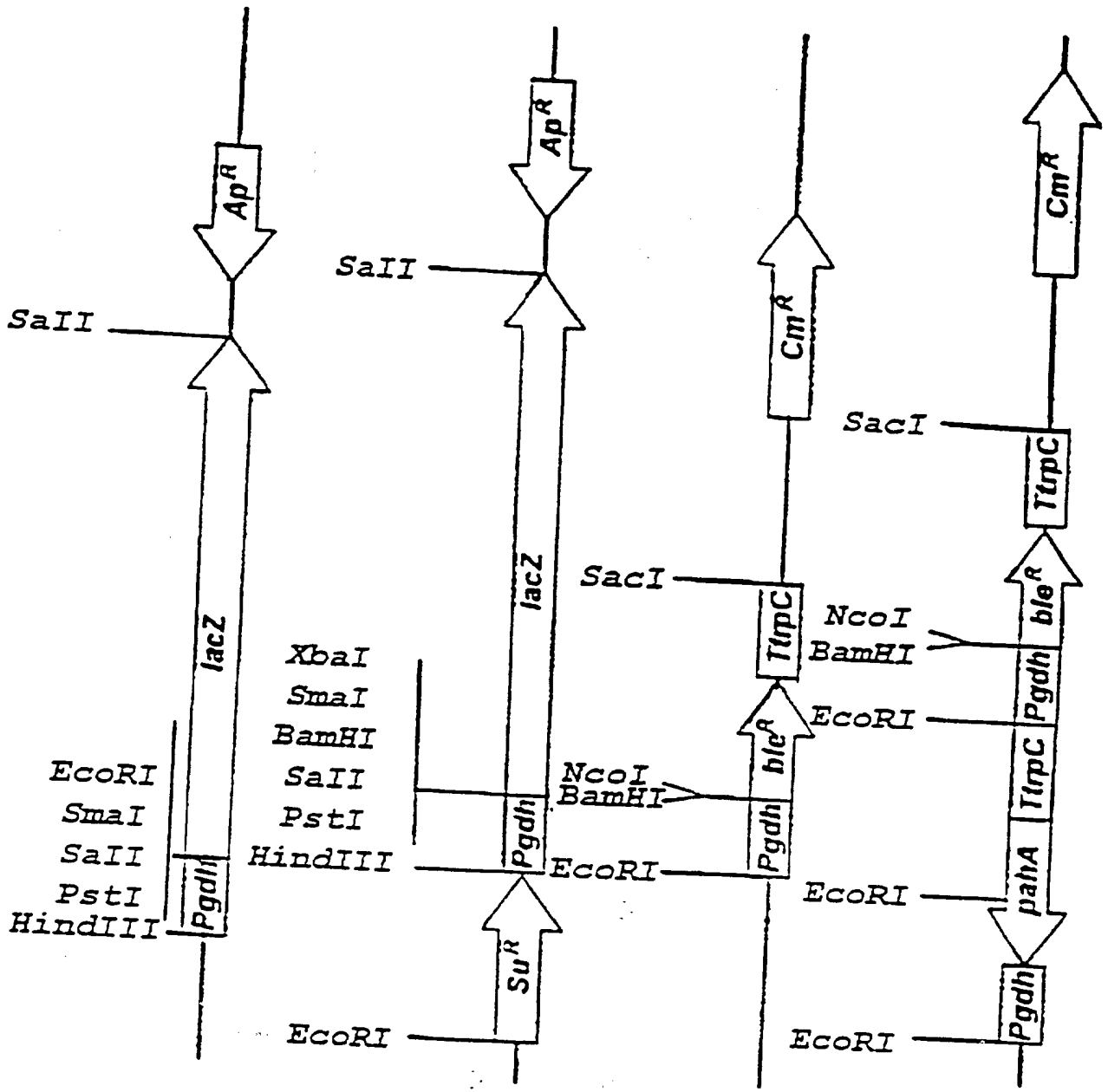


Fig. 5

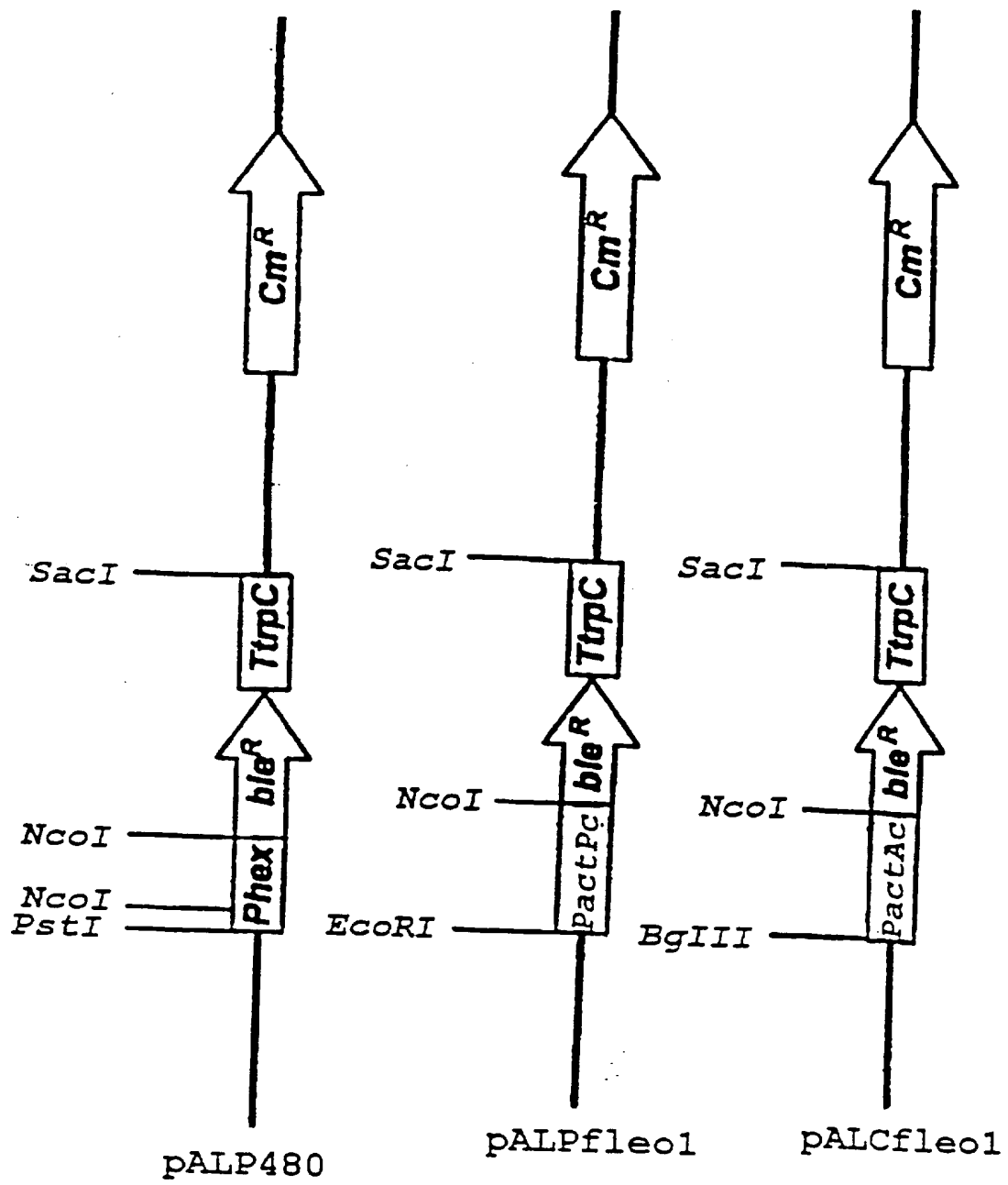


Fig. 6