(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 961250 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 961250

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 9/02
C12N 1/15
C12N 15/53
C12N 15/80
C12P 7/22
C09B 69/10
D21C 5/00
A23L 2/84
A61K 7/06
C12R 1:66

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.09.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.03.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.03.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **13.09.1994 PCT/US1994/010264**

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

17.09.1993	US	122230	17.09.1993	US	122827
03.12.1993	US	162827	22.12.1993	US	172331

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)
2 •Novo Nordisk Biotech Inc., 1445 Drew avenue, Davis CA 95616-4880, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Wahleithner, Jill Angela, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Christensen, Bjoern Eggert, Danmark, TANSKA, (DK)
3 •Schneider, Palle, Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Puhdistettuja Rhizoctonian neutraalin pH:n lakkaaseja ja näitä koodaav ia nukleiinihappoja
Renade neutral pH lackaser av Rhizoctonia och nukleinsyror kodande för densamma

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

21141 NRRL	21142 NRRL	21156 NRRL	CC 358730 IMI

Puhdistettuja Rhizoctonian neutraalin pH:n lakkaaseja ja näitä koodaavia nukleiinihappoja - Renade neutral pH lackaser av Rhizoctonia och nukleinsyror kodande för densamma

Tähän patenttihakemusjulkaisuun liittyvät patenttihakemusjulkaisut

Tämä patenttihakemusjulkaisu on jatkohakemusjulkaisu patenttihakemusjulkaisuille US 08/122 230, 08/122 827 ja 08/162 827, jotka ovat haettavana samanaikaisesti ja joiden sisältö on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Keksinnön ala

Keksintö liittyy sienten hapetuspelkistysentsyymiä koodaaviin eristettyihin nukleiinihappofragmentteihin ja näiden avulla valmistettuihin puhdistettuihin entsyymeihin. Tarkemmin sanottuna keksintö liittyy neutraalissa pH:ssa toimivaa fenolioksidaasia, erityisesti lakkaasia, koodaaviin nukleiinihappofragmentteihin.

Keksinnön tausta

Lakkaasit (bentseenidioli:happi-oksidoreduktaasit) ovat useita kupariatomeja sisältäviä entsyymejä, jotka katalysoivat fenoliyhdisteiden hapettumista. Lakkaasin välityksellä tapahtuvat hapettumisilmiöt johtavat aryylioksiradikaalivälituotteiden muodostumiseen sopivasta fenolisubstraatista; kun näin muodostuneet välituotteet ovat lopulta kytkeytyneet toisiinsa, niin muodostuu dimeerisiä, oligomeerisia ja polymeerisia reaktiotuotteita. Tällaiset reaktiot ovat tärkeitä luonnossa biosynteettisissä reaktioteissä, jotka johtavat melaniinin, alkaloidien, toksiinien, ligniinien ja humiinihappojen muodostumiseen. Lakkaaseja muodostavat hyvin useat erilaiset sienet, joita ovat askomykeetit, kuten Aspergillus, Neurospora ja Podospora, deuteromykeetti Botrytis, ja kantasienet, kuten Collybia, Fomes, Lentinus,

Pleurotus, Trametes ja Rhizoctonian täydelliset muodot. Lakkaasin substraattispesifisyys on hyvin laaja-alainen ja kukin sienten eri lakkaaseista eroaa muista tavallisesti ainoastaan kvantitatiivisesti sen suhteen, miten se kykenee hapettamaan fenolisubstraatteja. Hyvin laajan substraattivalikoiman johdosta lakkaaseilla on tavallisesti havaittu olevan monia potentiaalisia teollisia sovellutuksia. Näitä ovat ligniinin modifikaatio, paperin lujittaminen, väriaineen siirron inhiboituminen pesuaineissa, fenolin polymerointi, mehujen valmistus, fenolihartsin tuotanto ja jätevesien käsittely.

Vaikkakin lakkaasit kykenevät toimimaan katalyyttisesti samalla tavoin, niin eri sienilajien tuottamat lakkaasit ovat optimilämpötilaltaan ja pH-optimeiltaan erilaiset ja nämä voivat myös olla erilaiset tietyn nimenomaisen substraatin mukaan. Monia näistä sienten lakkaaseista on eristetty ja monien niiden geenejä on kloonattu. Esimerkiksi Choi, et al. [Mol. Plant-Microbe Interactions 5 (1992) 119 - 128] ovat kuvanneet kastanjaruttosienen, Cryphonectria parasitican, lakkaasia koodaavan geenin molekulaarista luonnehtimista ja kloonausta. Kojima, et al. [J. Biol. Chem. 265 (1990) 15224 - 15230; JP 2-238 885] ovat kuvanneet Coriolus hirsutus -valkolahottajakantasienen lakkaasin kahta alleelista muotoa. Germann ja Lerch [Experientia 41 (1985) 801; PNAS USA 83 (1986) 8854 - 8858] ovat esittäneet raportit Neurospora crassan lakkaasigeenin kloonauksesta ja osittaisesta sekvensoinnista. Saloheimo, et al. [J. Gen. Microbiol. 137 (1985) 1537 - 1544; WO 92/01 046] ovat kuvanneet Phlebia radiata -sienestä peräisin olevan lakkaasigeenin rakenteellista analyysia. Käytännöllisesti katsoen kaikki tunnetut sienten lakkaasit toimivat kuitenkin parhaiten happamissa pH-arvoissa (esimerkiksi pH-arvojen 3,0 ja 6,0 välillä) ja ne ovat tyypillisesti inaktiivisia neutraaleissa ja emäksisissä pH-arvoissa. Koska useita edellä mainittuja potentiaalisia teollisia menetelmiä käytetään edullisesti neutraalissa tai emäksisessä pH:ssa, toimivat useimmat sienten lakkaa-

sit heikosti näissä menetelmissä. Siten käytettävissä olevat sienten lakkaasit eivät täytä käyttösovellutusten asettamia vaatimuksia useissa tärkeissä kaupallisissa menetelmissä.

Yksi poikkeus tähän sääntöön on tiettyjen Rhizoctonia-lajien tuottama solunulkoinen lakkaasi. Bollag, et al. ovat raportoineet, että Rhizoctonia praticola tuottaa lakkaasia, jonka pH-optimi on noin 7,0. Tämä tyyppinen lakkaasi olisi aikaisemmin tunnettuja lakkaaseja paljon käyttökelpoisempi niissä teollisissa menetelmissä, joiden käyttö vaatii neutraalia pH:ta. R. praticolan entsyymiä ei ole kuitenkaan puhdistettu eikä luonnehdittu tarkemmin eikä tähän päivämäärään mennessä ole puhdistettu eikä luonnehdittu mitään muutakaan lakkaasia, jolla olisi tämän ominaisuus. Vaikkakin edellä olevan kuvauksen mukaisesti on lisäksi eristetty muita lakkaasigeenejä, niin nämä ovat olleet happamessa pH-arvossa parhaiten toimivia entsyymejä koodaavia geenejä. Koska neutraalissa pH:ssa tai emäksisessä pH:ssa toimivaa lakkaasia itseään eikä tällaista entsyymiä koodaavaa lakkaasigeeniä ole aikaisemmin eristetty ja/tai puhdistettu ja sekvensoitu, niin on jäänyt saavuttamatta se lopputulos, että tällaista entsyymiä olisi voitu tuottaa yhdistelmä-DNA-menetelmillä kaupalliset vaatimukset hyvin täyttävillä saannoilla. Tämä keksintö tarjoaa ratkaisun kuhunkin näistä ongelmista.

<u>Keksinnön yhteenveto</u>

Keksintö liittyy eristettyyn nukleiinihappofragmenttiin, joka sisältää sellaista Rhizoctonian lakkaasia koodaavan nukleiinihapposekvenssin, joka toimii optimaalisesti pH-arvojen 6,0 - 8,5 välillä. Ilmaisu "toimii optimaalisesti" tarkoittaa sitä, että merkittävä osa entsyymin aktiivisuudesta (toisin sanoen vähintään noin 30 % maksimiarvosta, edullisesti vähintään noin 50 % ja edullisimmin 50 %:sta maksimimaaliseen aktiivisuuteen) osuu pH-alueelle, joka on noin 6,0 - 8,5, määritettynä tämän aktiivisuudesta yhdessä tai useammassa lakkaasin vakiomäärityksessä käyttäen substraattina esimerkiksi syringaldatsiinia, ABTS:ää, 2,6-di-

metoksifenolia tai 4-aminopyriinin ja N-etyyli-N-sulfobutyyli-m-toluidiinin seosta. Tämän keksinnön mukaisten lakkaasien edullinen substraatti on syringaldatsiini. Lakkaasi on edullisessa sovellutusmuodossa Rhizoctonia solanin lakkaasi. Tämä keksintö liittyy myös uuden nukleiinihapposekvenssin koodaamaan huomattavan puhtaaseen lakkaasiin. Ilmaisu "huomattavan puhdas" tarkoittaa lakkaasia, joka ei olennaisesti (toisin sanoen ≥90-%:isesti) sisällä ulkopuolisia ei-lakkaasiproteiineja.

Tästä keksinnöstä saadaan uuden lakkaasin tuotannon edistämiseksi myös käyttöön patenttivaatimusten mukaista nukleiinihappofragmenttia sisältäviä vektoreita ja isäntäsoluja, jotka vektorit ja isäntäsolut ovat käyttökelpoisia lakkaasin valmistamiseksi yhdistelmä-DNA-menetelmillä. Nukleiinihappofragmentti on liitetty toiminnallisesti transkriptio- ja translaatiosignaaleihin, jotka kykenevät ohjaamaan lakkaasiproteiinin ilmentymistä halutussa isäntäsolussa. Edullinen isäntäsolu on sienisolu, joka on edullisimmin Aspergillus-suvun sienisolu. Tämän keksinnön mukaista lakkaasia tuotetaan yhdistelmä-DNA-menetelmillä viljelemällä tämän keksinnön mukaisella nukleiinihappofragmentilla transformoitua tai transfektoitua isäntäsolua tai tämän tuottamia soluja lakkaasiproteiinin ilmentämiseen soveltuvissa olosuhteissa ja otetaan lakkaasiproteiini talteen viljelmästä.

Tämän keksinnön mukaiset lakkaasit ovat käyttökelpoisia monissa teollisissa menetelmissä, joissa tarvitaan fenoliyhdisteiden hapettamista. Näitä menetelmiä ovat ligniinin muokkaus, mehujen valmistus, fenolin polymerointi ja fenolihartsin valmistus. Edullisessa sovellutusmuodossa tämän keksinnön mukaista entsyymiä käytetään menetelmässä, jossa suurimpaan tehokkuuteen tarvitaan neutraalia tai jossakin määrin emäksistä pH:ta.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on esitys RSlac1:n nukleotidi- ja aminohapposekvenssistä. Pienet kirjaimet nukleotidisekvenssissä merkitsevät intronien asemaa.

Kuvio 2 on esitys RSlac2:n nukleotidi- ja aminohapposekvenssistä. Pienet kirjaimet nukleotidisekvenssissä merkitsevät intronien asemaa.

Kuvio 3 on esitys pMWR-1-plasmidin restriktiokartasta.

Kuvio 4 on esitys RSlac3:n transloidun alueen nukleotidi- ja aminohapposekvenssistä.

Kuvio 5 on esitys RSlac1:n syringaldatsiinioksidaasiaktiivisuudesta (90 mM puskuri, 20 μM syringaldatsiini, 20 °C).

Kuvio 6 on esitys RSlac2:n syringaldatsiinioksidaasiaktiivisuudesta (93 mM puskuri, 20 μM syringaldatsiini, 20 °C).

Keksinnön yksityiskohtainen selitys

Tiettyjen Rhizoctonia-suvun lajien on raportoitu tuottavan lakkaasia; tästä syystä etsinnässä keskityttiin aluksi näiden entsyymien tunnistamiseen useista eri Rhizoctonia solani -isolaateista. Näytteitä viljellään ja supernatanteista tutkitaan aika ajoin lakkaasi käyttäen tuonnempana kuvattavaa ABTS-menetelmää. Lakkaasia havaitaan kaikista Rhizoctoniaviljelmistä. Talteen otetut lakkaasit erotetaan elektroforeettisesti ja värjätään ABTS:lla. Yksi isolaatti, RS22, tuottaa lakkaasia, jonka pI on emäksinen, joten se valitaan jatkotutkimuksiin.

Jäljellä olevissa tutkimuksissa keskitytään RS22:sta peräisin olevan entsyymin puhdistamiseen ja luonnehtimiseen. Yksityiskohtiin puuttumatta fermentaatioravintoliuos suoda-

tetaan ja se konsentroidaan ultrasuodattamalla käyttäen membraania, jonka leikkausraja on noin 10 000. Ensimmäiseksi suoritetaan ioninvaihtokromatografiavaihe asetaatti-puskurissa pH-arvossa 4,5 eluoiden askelittain NaCl:lla. Tämän jälkeen eluaatti ultrasuodatetaan ja käsitellään uudelleen kromatografisesti ja eluoidaan NaCl-gradientilla. Aktiiviset fraktiot yhdistetään jatkotutkimuksia varten. Näin eristetty ja puhdistettu kokonainen proteiini (tästä käytetään tuonnempana nimitystä RSlac3) sekvensoidaan ensin osittain ja aikaansaatu N-terminaalinen sekvenssi on:
AVRNYKFDIKNVNVAPDGFQRPIVSV (SEKVENSSI ID NO:5)

Proteiini pilkotaan edelleen lysiini- tai glutamiinihappo-spesifisellä proteaasilla ja proteiinista saadaan uusia peptidejä, joiden sekvenssit, jotka voidaan kohdistaa Coriolus hirsutuksen sekvenssien mukaan, ovat seuraavat:

Peptidi 1:
SQYVDGLRGPLVIYDPDDDH (SEKVENSSI ID NO:6)

Peptidi 2:
GLALVFAEAPSQIRQGVQSVQPDDA (SEKVENSSI ID NO:7)

Peptidi 3:
SRYBVBBASTVVMLEBWYHTPAXVLE (SEKVENSSI ID NO:8)

Peptidi 4:
SLGPTPNYVNPXIRDVVRVGGTTVV (SEKVENSSI ID NO:9)

Havaitaan myös seuraavia peptidejä, mutta nämä eivät vastaa Corioluksen sekvenssejä.
Peptidi 5:
IRYVGGPAVX(N?)RSVI (SEKVENSSI ID NO:10)

Peptidi 6:
ILANPA (SEKVENSSI ID NO:11)

Peptidi 7:
YEAPSLPT (SEKVENSSI ID NO:12)

Edellä olevissa sekvensseissä B merkitsee ryhmää, joka on joko asparagiinihappo tai asparagiini, ja X merkitsee tunnistamattomia ryhmiä.

Rhizoctonian lakkaasigeenin seulonnan aloittamiseksi valmistetaan R. solanin genominen kirjasto. Kokonais-DNA pilkotaan osittain Sau3A-restriktioentsyymillä ja sille suoritetaan elektroforeesi agaroosigeelissä 8 ja 21 ke:n suuruisten DNA-fragmenttien eristämiseksi. Fraktioidut fragmentit ligatoidaan λ-faagi EMBL3:n BamHI-päillä varustettuihin käsivarsiin ja tulokseksi saatu faagi pakataan in vitro -olosuhteissa. Näitä faageja käytetään kirjastona 170 000 plakin suuruisen kirjaston valmistamiseksi E. colissa ja se monistetaan 100-kertaisesti tulevaa käyttöä varten.

R. solanin lakkaasigeenin eristämiseen tarkoitettujen koettimien kehittämiseksi analysoidaan konsensussekvenssien määrittämiseksi viiden tunnetun lakkaasin proteiinisekvenssit ja havaittujen konsensussekvenssien (Choi, et al., edellä; Germann ja Lerch, edellä, Saloheimo, et al., edellä, Kojima, et al., edellä) perusteella konstruoidaan kaksi degeneratiivista oligonukleotidia. Nämä oligonukleotidit yhdistetään R. solanin genomiseen DNA:han ja 220 nukleotidista koostuva DNA-fragmentti monistetaan käyttäen taq-polymeraasiketjureaktiota (PCR). Tämän jälkeen 220 nukleotidin suuruinen fragmentti kloonataan plasmidivektoriin.

PCR-fragmenttia käytetään koettimena monistetusta genomisesta kirjastosta peräisin olevan 25 000 plakin seulomiseksi. Tästä seulonnasta peräisin olevat positiiviset kloonit jakautuvat kahteen ryhmään, joiden osoitetaan myöhemmin DNA-analyysin perusteella koodaavan kahta eri lakkaasigeeniä, RSlac1:tä ja RSlac2:tä. Näiden kummankin geenin nukleotidisekvenssi (SEKVENSSIT ID NO:1 ja 3) ja kummankin proteiinin

ennustettu aminohapposekvenssi (SEKVENSSIT ID NO:2 ja 4) on esitetty kuvioissa 1 ja 2, vastaavassa järjestyksessä ilmoitettuna. Näiden kahden sekvenssin välinen homologia on noin 63 %. RS-lakkaasit ovat noin 30 - 40-%:isesti homologisia Coriolus hirsutuksesta, Phlebia radiatasta, Aspergillus nidulansista, Cryphonectria parasiticasta ja Neurospora crassasta peräisin oleviin tunnettuihin lakkaasisekvensseihin verrattuna. Kumpikin näistä kahdesta koodaavasta sekvenssistä kloonataan ilmentämisvektoriin, joka on liitetty toiminnallisesti Aspergillus oryzaen taka-amylaasin transkriptio- ja translaatiosignaaleihin (ks. kuvio 3). Kumpikin näistä kahdesta lakkaasi-ilmentämisvektoreista transformoidaan Aspergillus oryzae ja Aspergillus niger -isäntäsoluun ja isäntäsoluista seulotaan esiin lakkaasia sisältävät solut.

RSlac3-geenin eristämiseksi puhdistetaan poly-A-RNA anisidiinin läsnäollessa kasvatetun R. solanin myseelistä. Tätä RNA:ta käytetään cDNA:n synteesin templaattina. cDNA fraktioidaan ja kootaan talteen fragmentit, joiden koko on noin 1,7 - 3,5 ke, ja cDNA-kirjasto valmistetaan kloonaamalla fraktioitu DNA hiivavektoriin. Tästä kirjastosta peräisin olevat 3000 transformanttia seulotaan ABTS:lla. 24 tunnin kuluttua havaitaan yhden pesäkkeen olevan positiivinen. Pesäkkeestä peräisin oleva plasmidi eristetään ja insertiofragmentti sekvensoidaan. Ennustetut aminohapposekvenssin osat vastaavat edellä kuvatusta RS 22:sta peräisin olevien fragmenttien sekvenssejä. Täydelliset nukleotidi- ja aminohapposekvenssit on esitetty kuviossa 4 ja SEKVENSSEISSÄ ID NO:13 ja 14, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. RSlac3 on 48-%:isesti homologinen RSlac1:n ja 50-%:isesti homologinen RSlac2:n suhteen. RSlac3 on myös 48-%:isesti homologinen Coriolus hirsutuksen lakkaasigeenin suhteen.

Tämän keksinnön mukaisesti voidaan Rhizoctonian geeni, joka koodaa neutraalissa tai emäksisessä pH:ssa toimivaa lakkaasia, saada edellä kuvattujen menetelmien avulla tai millä

tahansa tällä alalla tunnetulla vaihtoehtoisella menetelmällä käyttäen tässä keksinnössä annettuja tietoja. Geeniä voidaan ilmentää aktiivisessa muodossa käyttäen ilmentämisvektoria. Käyttökelpoinen ilmentämisvektori sisältää yksikön, jonka avulla vektorin on mahdollista liittyä isäntäsolun genomiin tai jonka avulla vektori kykenee replikoitumaan autonomisesti isäntäsolun genomista riippumatta, sekä edullisesti yhden tai useamman fenotyyppisen markkerin, joiden avulla transformoidut isäntäsolut on helppo selektoida. Ilmentämisvektori voi myös sisältää promoottoria, ribosomia sitovaa kohtaa ja translaation aloitussignaalia koodaavia kontrollisekvenssejä sekä mahdollisesti repressorigeenin tai useita erilaisia aktivaattorigeenejä. Jotta ilmennetyn proteiinin olisi mahdollista erittyä, voidaan geenin koodaavan sekvenssin edelle liittää signaalisekvenssiä koodaavia nukleotideja. Tämän keksinnön mukaisesti käsiteltävän lakkaasigeenin ilmentämiseksi säätelysekvenssien ohjaamana liitetään tämä geeni toiminnallisesti säätelysekvensseihin oikeassa lukukehyksessä. Promoottorisekvenssejä, joita voidaan yhdistää plasmidivektoreihin ja jotka voivat ohjata lakkaasigeenin transkriptiota, ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta prokaryoottinen β-laktamaasin promoottori [Villa-Kamaroff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 (1978) 3727 - 3731] ja tac-promoottori [DeBoer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 (1983) 21 - 25]. Muita kirjallisuusviitteitä on myös esitetty julkaisussa "Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American 242 (1980) 74 - 94; ja teoksessa Sambrook, et al., Molecular Cloning, 1989.

Tämän keksinnön mukaisen DNA-konstruktion sisältävä ilmentämisvektori voi olla mikä tahansa vektori, jota voidaan käsitellä asiaankuuluvalla tavalla yhdistelmä-DNA-menetelmillä ja vektori valitaan tyypillisesti sen isäntäsolun mukaan, johon tämä on määrä liittää. Siten vektori voi olla autonomisesti replikoituva vektori, toisin sanoen vektori, joka esiintyy ekstrakromosomaalisena yksikkönä, esimerkiksi

plasmidina tai ekstrakromosomaalisena yksikkönä, minikromosomina tai keinotekoisena kromosomina, jonka replikaatio ei ole riippuvainen kromosomin replikaatiosta. Vektori voi olla vaihtoehtoisesti isäntäsoluun tulonsa jälkeen isäntäsolun genomiin liittyvä vektori, joka replikoituu yhdessä sen(niiden) kromosomi(e)n kanssa, johon(joihin) se on liittynyt.

DNA-sekvenssin on oltava vektorissa yhdistettynä toiminnallisesti sopivaan promoottorisekvenssiin. Promoottori voi olla mikä tahansa DNA-sekvenssi, jolla on transkriptioaktiivisuutta valitussa isäntäsolussa, ja se voi olla peräisin geeneistä, jotka koodaavat isäntäsolun suhteen joko homologisia tai heterologisia proteiineja. Esimerkkejä sopivista promoottoreista tämän keksinnön mukaisen DNA-konstruktion transkription ohjaamiseen erityisesti bakteeri-isännässä ovat E. colin lac-operonin promoottori, Streptomyces coelicolorin agaraasigeenin dagA:n promoottorit, Bacillus licheniformiksen α-amylaasigeenin (amyL) promoottorit, Bacillus stearothermophiluksen maltogeenisen amylaasigeenin (amyM) promoottorit, Bacillus amyloliquefaciensin α-amylaasin (amyQ) promoottorit tai Bacillus subtiliksen xylA- ja xylB-geenien promoottorit. Hiivaisännässä käyttökelpoinen promoottori on eno-1-promoottori. Sieni-isännässä tapahtuvaa transkriptiota varten ovat esimerkkejä käyttökelpoisista promoottoreista promoottorit, jotka ovat peräisin geenistä, jotka koodaavat A. oryzaen taka-amylaasia, Rhizomucor miehein asparagiinihappoproteinaasia, A. nigerin neutraalia α-amylaasia, A. nigerin happamissa olosuhteissa stabiilia α-amylaasia, A. nigerin tai A. awamsiin glukoamylaasia (gluA), Rhizomucor miehein lipaasia, A. oryzaen alkalista proteaasia, A. oryzaen trioosifosfaatti-isomeraasia tai A. nidulansin asetamidaasia. Edullisia ovat TAKA-amylaasin ja gluA:n promoottorit.

Tämän keksinnön mukainen ilmentämisvektori voi myös sisältää sopivan transkription terminaattorin, ja eukaryooteissa

polyadenylaatiosekvenssit, jotka on liitetty toiminnallisesti tämän keksinnön mukaista lakkaasia koodaavaan DNA-sekvenssiin. Voi olla sopivaa, että terminaatio- ja polyadenylaatiosekvenssit ovat peräisin samoista materiaalilähteistä kuin promoottori. Vektori voi lisäksi sisältää sellaisen DNA-sekvenssin, jonka avulla vektori kykenee replikoitumaan kyseessä olevassa isäntäsolussa. Esimerkkejä näistä sekvensseistä ovat plasmidien pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 ja pIJ702 replikaation alkukohdat.

Vektori voi myös sisältää selektiomarkkerin, esimerkiksi geenin, jonka tuote komplementoi isäntäsolussa olevaa puutetta ja jollaisia ovat B. subtiliksesta tai B. licheniformiksesta peräisin olevat dal-geenit, tai antibioottiresistenssin, kuten ampisilliini-, kanamysiini-, kloramfenikoli- tai tetrasykliiniresistenssin, antavan geenin. Esimerkkejä Aspergilluksen selektiomarkkereista ovat amdS, pyrG, argB, niaD ja sC, joka on hygromysiiniresistenssin antava markkeri. Edullisia markkereita käytettäväksi Aspergillus-isäntäsolussa ovat A. nidulansin tai A. oryzaen amdS- ja pyrG-markkerit. Usein käytetty nisäkäsmarkkeri on dihydrofolaattireduktaasi (DHFR) -geeni. Selektio voidaan lisäksi suorittaa käyttämällä kotransformaatiota menetellen esimerkiksi julkaisussa WO 91/17 243 kuvatulla tavalla.

On tavallisesti edullista, että proteiinia ilmennetään solunulkoisesti. Tämän keksinnön mukaiset lakkaasit voivat siten sisältää pre-alueen, jonka avulla ilmentynyt proteiini kykenee erittymään viljelymediumiin. Pre-alue voi olla haluttaessa tämän keksinnön mukaisen lakkaasin suhteen natiivi alue tai sen tilalla voidaan käyttää erilaista pre-aluetta tai signaalisekvenssiä, mikä saadaan asiaankuuluvalla tavalla aikaan käyttämällä pre-alueita koodaavien DNA-sekvenssien tilalla muita vastaavia DNA-sekvenssejä. Pre-alue voi esimerkiksi olla peräisin Aspergillus-lajista peräisin olevasta glukoamylaasi- tai amylaasigeenistä, Bacillus-lajista peräisin olevasta amylaasigeenistä, Rhizomucor mieheistä pe-

räisin olevasta lipaasi- tai proteinaasigeenistä, Saccharomyces cerevisiaesta peräisin olevasta α-tekijän geenistä tai vasikan prokymosiinigeenistä. Silloin kun isäntä on sienisolu, niin erityisen edullinen on A. oryzaen TAKA-amylaasin, A. nigerin neutraalin amylaasin, Bacillus NCIB 11837:sta peräisin olevan maltogeenisen amylaasin, B. stearothermophiluksen α-amylaasin tai Bacillus licheniformiksen subtilisiinin pre-alue. Tehokas signaalisekvenssi on A. oryzaen TAKA-amylaasin signaali, Rhizomucor miehein asaparagiinihappoproteinaasin signaali ja Rhizomucor miehein lipaasin signaali.

Menetelmät, joita käytetään tämän keksinnön mukaisen DNA-konstruktion, promoottorin ja muiden yksiköiden ligatoimiseen, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, ja niiden liittämiseen sopiviin replikaation tarvittavan informaation sisältäviin vektoreihin, ovat tämän alan perusteella tunnettuja (cf. esimerkiksi Sambrook, et al., Molecular Cloning, 1989).

Tämän keksinnön mukaista solua, joka sisältää joko edellä olevan kuvauksen mukaisen tämän keksinnön mukaisen DNA-konstruktion tai ilmentämisvektorin, käytetään edullisesti isäntäsoluna tuotettaessa tämän keksinnön mukaista entsyymiä yhdistelmä-DNA-menetelmillä. Tämä solu voidaan transformoida tämän keksinnön mukaisella DNA-konstruktiolla, mikä tapahtuu asiaankuuluvalla tavalla liittämällä tämä DNA-konstruktio isännän kromosomiin. Tällä tavoin tehdyn liittämisen katsotaan olevan tavallisesti edullista, koska DNA-sekvenssi säilyy melko suurella todennäköisyydellä stabiilina solussa. DNA-konstruktiot voidaan liittää isännän kromosomiin tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi homologisen tai heterologisen rekombinaation avulla. Vaihtoehtoisesti solu voidaan transformoida edellä kuvatulla ilmentämisvektorilla eri tyyppisten isäntäsolujen yhteydessä.

Isäntäsolu voi olla jokin prokaryoottinen solu, kuten jokin bakteerisolu. Esimerkkejä sopivista bakteereista ovat grampositiiviset bakteerit, kuten Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus brevis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus coagulans, Bacillus circulans, Bacillus lautus, Bacillus megaterium, Bacillus thuringiensis tai Streptomyces lividans tai Streptomyces murinus, tai gramnegatiiviset bakteerit, kuten E. coli. Bakteerien transformaatio voidaan esimerkiksi suorittaa käyttämällä protoplastitransformaatiota tai käyttämällä kompetentteja soluja sinänsä tunnetulla tavalla.

Isäntäsolu voi olla myös eukaryootti, kuten jokin nisäkässolu, jokin hyönteissolu, jokin kasvisolu tai edullisesti jokin sienisolu, joihin kuuluvat hiiva ja rihmasienet. Esimerkiksi käyttökelpoisia nisäkässoluja ovat CHO- tai COS-solut. Hiivaisäntäsolu voi olla Saccharomyces- tai Schizosaccharomyces-laji, esimerkiksi Saccharomyces cerevisiae. Käyttökelpoisia rihmasieniä voivat olla Aspergillus-lajit, esimerkiksi Aspergillus oryzae tai Aspergillus niger. Vaihtoehtoisesti voidaan isäntäsoluna käyttää Fusarium-lajin, esimerkiksi F. oxysporumin, kantaa. Sienisolut voidaan transformoida menetelmällä, johon liittyy protoplastien muodostaminen ja protoplastien transformaatio, minkä jälkeen solunseinämä regeneroidaan sinänsä tunnetulla tavalla. Sopiva Aspergillus-isäntäsolujen transformaatiomenetelmä on kuvattu julkaisussa EP 238 023. Sopiva Fusarium-lajin transformaatiomenetelmä on kuvattu julkaisussa Malardier, et al., 1989.

Tästä keksinnöstä saadaan siten käyttöön menetelmä tämän keksinnön mukaisen lakkaasin valmistamiseksi yhdistelmä-DNA-menetelmillä, joka menetelmä sisältää sen, että iljellään edellä kuvattua isäntäsolua entsyymin muodostumiseen johtavissa olosuhteissa ja otetaan entsyymi talteen soluista ja/tai viljelymediumista. Solujen kasvattamiseen käytetty

medium voi olla mikä tahansa tavanomainen medium, joka soveltuu kyseessä olevan isäntäsolun kasvattamiseen ja tämän keksinnön mukaisen lakkaasin ilmentämisen aikaansaamiseen. Sopivia mediumeja on saatavilla kaupallisilta toimittajilta tai niitä voidaan valmistaa julkaistujen valmistuskaavojen mukaisesti (näitä on esimerkiksi talletuslaitoksen American Type Culture Collection luetteloissa).

Tuloksena oleva entsyymi voidaan ottaa talteen mediumista tavanomaisin menetelmin, joita ovat solujen erottaminen mediumista sentrifugoimalla tai suodattamalla, supernatantin tai suodoksen proteiinipitoisten komponenttien saostaminen suolan, esimerkiksi ammoniumsulfaatin, avulla, jonka jälkeen entsyymi puhdistetaan käyttämällä useita erilaisia kromatografisia menetelmiä, esimerkiksi ioninvaihtokromatografiaa, geelisuodatuskromatografiaa, affiniteettikromatografiaa tai muita näitä vastaavia menetelmiä. Eristetty proteiini on SDS-PAGE:n avulla määritettynä edullisesti noin 90-%:isesti puhdasta, ja puhtaus on tärkein elintarvike-, mehu- tai detergenttisovellutuksissa.

Erityisen edullisessa sovellutusmuodossa lakkaasia ilmennetään sieni-isäntäsolussa, kuten Aspergilluksessa. Kuten seuraavissa esimerkeissä on yksityiskohtaisesti kuvattu, ligatoidaan lakkaasigeeni plasmidiin, joka sisältää Aspergillus oryzaen TAKA-α-amylaasin promoottorin ja Aspergillus nidulansin amdS-selektiomarkkerin. amdS voi vaihtoehtoisesti olla erillisessä plasmidissa ja sitä voidaan käyttää kotransformaatiossa. Plasmidia (tai plasmideja) käytetään Aspergillus-lajin isäntäsolun, kuten A. oryzaen tai A. nigerin, transformoimiseen julkaisussa Yelton, et al. [PNAS USA 81 (1984) 1470 - 1474] kuvattuja menetelmiä noudattaen.

Alan ammattikokemuksen perusteella on selvää, että tämä keksintö ei rajoitu erityisesti tässä keksinnössä kuvattujen, esimerkiksi kuviossa 1 ja 2 kuvattujen, nukleiinihappofragmenttien käyttöön. On selvää, että tämä keksintö kattaa

myös ne nukleotidisekvenssit, jotka koodaavat samanlaisia aminohapposekvenssejä kuin mitä on kuvattu kuviossa 1, 2 ja 3 mutta jotka poikkeavat näistä erityisesti kuvatuista nukleotidisekvensseistä geneettisen koodin degeneratiivisuuden johdosta. Tämä keksintö kattaa lisäksi myös sellaiset muut nukleotidifragmentit ja näiden koodaamat proteiinit, jotka koodaavat lakkaasiproteiineja, joiden pH-optimi on huomattavan samanlainen kuin Rhizoctonia solanin pH-optimi ja joissa esiintyy merkittävää homologisuutta Rhizoctonia solanin aminohapposekvenssin suhteen. Tämän keksinnön mukaiset koetulokset osoittavat esimerkiksi sen, että useampi kuin yksi Rhizoctonia-laji tuottaa lakkaasia, jonka pH-profiili on haluttua tyyppiä; tästä syystä on odotettua, että muut Rhizoctonia-lajit tuottavat myös samanlaisia lakkaaseja, joita tästä syystä voidaan tässä keksinnössä kuvattuja menetelmiä käyttäen käyttää sellaisten geenien lähteenä, jotka kuuluvat tässä keksinnössä kuvattujen patenttivaatimusten suojapiiriin. Kuten tämän keksinnön mukaisissa esimerkeissä on myös osoitettu, ei ainoastaan ole olemassa useampi kuin yksi nukleotidi- ja aminohapposekvenssi, joka koodaa vaadittuja ominaisuuksia sisältävää lakkaasia, vaan sekvenssi sietää myös huomattavaa vaihtelua samalla kun siitä kuitenkin muodostuu toiminnallinen entsyymi. Tästä syystä tämä keksintö sisältää myös minkä tahansa nukleotidisekvenssin variantin ja tämän koodaaman proteiinin, jossa proteiinissa on jäljellä vähintään noin 80-%:ista homologiaa jonkin kuvioissa 1, 2 ja 3 kuvatun aminohapposekvenssin suhteen ja joissa tässä keksinnössä kuvattujen sekvenssien lakkaasiaktiivisuus ja aktiivisuuden pH-optimi on säilynyt. Tarkemmin sanottuna tässä keksinnössä ajatellaan käytettäväksi variantteja, joissa Rhizoctonian lakkaasin erittäin säilyneillä alueilla on säilynyt korkeanasteinen (toisin sanoen ≥80-%:inen) homologia. Tällaiset alueet on tunnistettu RSLAC1:ssa ryhmiksi 458 - 469 ja RSLAC2:ssa ryhmiksi 478 - 489; ja RSLACI:ssä ryhmiksi 131 - 134 ja RSLAC2:ssa ryhmiksi 132 - 145.

Edellä kuvatuissa luokissa käyttökelpoisia variantteja ovat esimerkiksi variantit, joihin on tehty konservatiivisia aminohapposubstituutioita, jotka substituutiot eivät vaikuta merkittävästi proteiinin aktiivisuuteen. Konservatiivisella substituutiolla tarkoitetaan sitä, että samaan luokkaan kuuluvat aminohapot voidaan korvata millä tahansa muulla tämän luokan aminohapolla. Esimerkiksi poolittomat alifaattiset ryhmät Ala, Val, Leu ja Ile, kuten myös emäksiset ryhmät, Lys ja Arg tai happamet ryhmät Asp ja Glu, voidaan korvata toinen toisillaan. Samoin Ser ja Thr, kuten myös Asn ja Gln, ovat toistensa konservatiivisia substituutioita. Alan ammattikokemuksen perusteella on selvää, että tällaisia substituutioita voidaan tehdä molekyylin toiminnalle kriittisten alueiden ulkopuolella ja silti saadaan aikaan aktiivinen entsyymi. Se, että haluttu aktiivisuus on jäljellä, voidaan määrittää vaikeuksitta käyttämällä ABTS:n hapettumiseen perustuvaa vakiomenetelmää 0,1 M natriumfosfaatissa, jonka pH on 7,0.

Tätä proteiinia voidaan käyttää useissa erilaisissa teollisissa menetelmissä; vaikkakin R. solanin lakkaasi on myös toimintakykyinen matalahkossa pH:ssa, niin entsyymiä käytetään edullisimmin menetelmissä, joita käytetään tavallisesti neutraalissa tai alkalisessa pH:ssa, koska muut lakkaasit eivät ole edullisia tällä pH-alueella. Näitä menetelmiä ovat liuoksessa suoritettava ligniinin, sekä kraft-ligniinin että lignosulfonaattien ligniinin, polymerointi suurimoolimassaisen ligniinin valmistamiseksi. Neutraali/alkalinen lakkaasi on erityisen edullista siinä suhteessa, että kraftligniini liukenee paremmin korkeammissa pH-arvoissa. Tällainen menetelmä on kuvattu esimerkiksi julkaisussa Jin, et al., Holzforschung 45(6) (1991) 467 - 468; US-patenttijulkaisussa nro 4 432 921; julkaisussa EP 0 275 544; julkaisussa PCT/DK93/00 217, 1992.

Tämän keksinnön mukaista lakkaasia voidaan myös käyttää kraft-massan sisältämän ligniinin depolymerointiin in situ

-olosuhteissa, millä saadaan tästä syystä paperimassaa, jonka ligniinipitoisuus on alentunut. Lakkaasin käyttö tällä tavoin on parannus nykyiseen kloorin käyttöön ligniinin depolymeroimiseksi, mikä johtaa kloorattujen aromaattisten yhdisteiden muodostumiseen, jotka yhdisteet ovat ympäristön kannalta paperitehtaiden haitallisia sivutuotteita. Tällaisia käyttömuotoja on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa Current opinion in Biotechnology 3 (1992) 261 - 266; J. Biotechnol. 25 (1992) 333 - 339; Hiroi, et al., Svensk papperstidning 5 (1976) 162 - 166. Koska paperitehtaassa käytettävät olosuhteet ovat tyypillisesti alkaliset, niin tämän keksinnön mukainen lakkaasi on tähän käyttötarkoitukseen käyttökelpoisempi kuin muut tunnetut lakkaasit, jotka toimivat parhaiten happamissa olosuhteissa.

Väriaineiden ja muiden kromoforisten yhdisteiden hapettuminen johtaa siihen, että nämä yhdisteet menettävät värinsä. Lakkaasia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, mikä voi olla erityisen edullista tilanteessa, joissa tekstiilien kesken tapahtuva värin siirtyminen on haitallista, esimerkiksi tekstiiliteollisuudessa ja pesuaineteollisuudessa. Menetelmiä väriaineen siirtymisen inhiboimiseksi ja väriaineen hapettamiseksi on esitetty julkaisuissa WO 92/01 406, WO 92/18 683, EP 0495 836 ja Calvo, Mededelingen van de Faculteit Landbouw-wetenschappen/Rijiksuniversitet Gent. 51 (1991) 1565 - 1567.

Tämän keksinnön mukaista lakkaasia voidaan myös käyttää nesteiden sisältämien fenoliyhdisteiden polymerointiin. Esimerkki tällaisesta käyttömuodosta on mehujen, kuten omenamehun, käsittely siten, että lakkaasi kiihdyttää mehussa olevien fenoliyhdisteiden saostumista, mistä syystä tällä saadaan aikaan stabiilimpi mehu. Näitä sovellutuksia on kuvattu julkaisuissa Stutz, Fruit processing 7/93 (1993) 248 - 252; Maier, et al., Dt. Lebensmittel-rindschau 86(5) (1990) 137 - 142; Dietrich, et al., Fluss. Obst 57(2) (1990)

67 - 73. Tätä keksintöä valaistaan lisäksi seuraavilla esimerkeillä, jotka eivät ole sitä rajoittavia.

Esimerkit

1. R. solanin lakkaasin puhdistus ja luonnehtiminen

Lakkaasientsyymiä muodostuminen tutkitaan yksittäisistä potato dextrose agar (Difco) -mediumissa viljellyistä R. solanin isolaateista siirtämällä voimakasta kasvua sisältävä pieni agarpala 500 ml:n vetoiseen ravistelupulloon, joka sisältää 100 ml CFM:ää (24,0 g potato dextrose broth -mediumia, 3,0 g hiivauutetta, 1,0 ml hivenalkuaineliuosta [0,80 g KH_2PO_4, 0,64 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 0,11 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,80 g $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$, 0,15 g $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, tislattua vettä tilavuuden säätämiseksi 1000 ml:ksi]. Pulloa inkuboidaan huoneenlämmössä ravistellen pulloa nopeudella 200 kierrosta minuutissa vaakasuuntaan pyörivässä ravistelijassa.

Näytteet kootaan talteen 50, 74, 122 ja 170 tunnin kohdalla, ne sentrifugoidaan ja selkeytetyistä supernatanteista tutkitaan lakkaasi käyttämällä sen ABTS:ää (ABTS = 2,2'-atsino-bis(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonihappo). Analyysi suoritetaan lisäämällä 200 µl 2 mM ABTS:ää 0,1 M fosfaattipuskuriin, jonka pH on 7, ja tarkastelemalla absorbanssin muutosta 418 nm:n kohdalta 30 minuutin kuluttua sen jälkeen kun seosta on inkuboitu huoneenlämmössä (noin 23 - noin 25 °C). Tämä menetelmä on modifioitu Pütterin ja Beckerin kuvaamasta peroksidaasianalyysimenetelmästä [Peroxidases, teoksessa Bergmeyer, H.U. (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. III, pp. 286 - 293, 1983].

Kukin 172 tunnin kohdalla talteenotetuista lakkaaseista erotetaan toisistaan elektroforeettisesti ja ne värjätään käyttäen kromogeeninä ABTS:ää. Syntyy useita toisistaan eroavia tuloksia; kannan RS22 osoitetaan tuottavan lakkaasia, jonka pI on emäksinen ja joka valitaan luonnehdittavaksi edelleen.

Lakkaasiaktiivisuus on määritettävissä myös käyttämällä syringaldatsiinimenetelmää. Lakkaasi katalysoi syringaldatsiinin hapettumista tetrametoksiatsobismetyleenikinoniksi aerobisissa olosuhteissa siten, että väri muuttuu keltaisesta sinipunaiseksi. 3000 µl 25 mM asetaattipuskuria, (tämä sisältää 10 mg/l kupari(II)sulfaatti 5 H_2O:ta), jonka pH-arvo on 5,5 ja jota pidetään 30 °C:ssa, yhdistetään 1 cm:n kyvetissä 225 µl:aan 0,28 mM syringaldatsiinia (5 mg, tämä on solubilisoitu 25 ml:aan etanolia ja liuoksen tilavuus on säädetty 50 ml:ksi demineralisoidulla vedellä). Tämän jälkeen seos yhdistetään 100 µl:aan lakkaasilaimennosta (tämä on laimennettu asetaattipuskuriin siten, että absorbanssin lisäys (ΔOD) on alueella 0,1 - 0,6). Reaktioseos pipetoidaan 30 °C:een termostoituun spektrofotometriin ja reaktiota seurataan 503 nm:n kohdalta 10 - 70 sekuntia lakkaasin lisäyksen jälkeen. Entsyymiaktiivisuus lasketaan yhtälöstä ΔOD/minuutti x 0,677 x laimennoskerroin ja se ilmoitetaan LACU:na.

Rhizoctonian lakkaasin puhdistamiseksi suodatetaan 2,1 litraa viljelymediumia, jonka LACU-aktiivisuus on 0,19 LACU/ml, 10 µm suodattimen läpi ja konsentroidaan 230 ml:ksi ultrasuodattamalla käyttäen Filtron Minisette Omega -membraania, jonka leikkausraja on 10 kDA. Näytteen pH on 5,3 ja konsentroidun näytteen aktiivisuus on suoritetun määrityksen mukaan 3,34 LACU/ml.

Näytteen pH säädetään ensin arvoon 4,5 ja näyte suodatetaan pienen saostuman johdosta, minkä jälkeen se pipetoidaan 40 ml:n suuruiseen S Sepharose Fast Flow -kolonniin, joka on tasapainotettu 20 mM asetaattipuskurilla, jonka pH on 4,5 (puskuri A). Kolonni pestään puskuri A:lla ja eluoidaan 1 M NaCl:ää sisältävällä puskuri A:lla. Aktiiviset fraktiot otetaan talteen ja yhdistetään. Nämä yhdistetyt aktiiviset fraktiot konsentroidaan ja puskuri vaihdetaan puskuriksi A Diaflo YM10 -membraanilla varustettua Amicon-ultrasuodatuslaitetta käyttäen. Tämä näyte käsitellään edellä kuvatulla

menetelmällä uudelleen kromatografisesti 5 ml:n suuruisessa Sepharose High Performance -kolonnissa lukuun ottamatta sitä, että eluointi suoritetaan 30 kolonnin tilavuutta vastaavalla määrällä puskuria sellaisella lineaarisella gradientilla, joka muuttuu puskurista A 0,5 M NaCl:ää sisältäväksi puskuriksi A. Tästä puhdistuksesta peräisin olevat suurimman aktiivisuuden sisältävät fraktiot yhdistetään. Puhdistuksesta saadaan noin 45 mg lakkaasia, kun proteiinikonsentraatio on arvioitu sillä perusteella, että yksi absorptioyksikkö A280 nm:n kohdalla vastaa konsentraatiota 1 mg/ml. Proteiini on SDS-PAGE:n perusteella arvioituna > 90-%:isesti puhdasta. SDS-PAGE:n avulla arvioitu suhteellinen moolimassa on noin 67 kDa. Puhdistetun proteiinin ominaisaktiivisuus on 1 LACU/mg. Puhdistetun proteiinin pH-profiili käyttäen substraattina syringaldatsiinia on esitetty seuraavassa taulukossa 1.

Taulukko 1

pH	5	6	7	8
aktiivisuus-%	0,5	31	100	59

Proteiinin sekvensointia varten valmistetaan peptidit käyttäen Achromobacterista peräisin olevaa lysiinispesifistä proteaasia (Achromobacterin proteaasi I) tai Bacillus licheniformiksesta peräisin olevaa glutamiinihappospesifistä proteaasia. Peptidit puhdistetaan käänteisfaasi-HPLC:lla käyttäen lineaarisia gradientteja, jotka on valmistettu 0,08 % vesipitoista TFA:ta sisältävästä 80-%:isesta 2-propanolista (liuotin B) 0,1-%:isessa vesipitoisessa TFA:ssa (liuotin A).

Kokonaisen proteiinin ja puhdistettujen peptidien N-terminaalisen aminohapposekvenssi analysoidaan Applied Biosystems -yhtiön proteiinisekvensointilaitteella 470A valmistajan ohjeiden mukaisesti. Eristetylle proteiinille tehtystä

alustavasta osittaisesta sekvensoinnista saadaan N-terminaalinen sekvenssi, joka on:
AVRNYKFDIKNVNVAPDGFQRPIVSV (SEKVENSSI ID NO:5)

Tämän jälkeen proteiini pilkotaan joko lysiini- tai glutamiinihappospesifisellä proteaasilla ja tunnistetaan seuraavat uudet peptidit. Peptidit 1 - 4 voidaan kohdistaa Coriolus hirsutuksen lakkaasin sekvenssien suhteen:

Peptidi 1:
SQYVDGLRGPLVIYDPDDDH (SEKVENSSI ID NO:6)

Peptidi 2:
GLALVFAEAPSQIRQGVQSVQPDDA (SEKVENSSI ID NO:7)

Peptidi 3:
SRYBVBBASTVVMLEBWYHTPAXVLE (SEKVENSSI ID NO:8)

Peptidi 4:
SLGPTPNYVNPXIRDVVRVGGTTVV (SEKVENSSI ID NO:9)

Peptidi 5:
IRYVGGPAVX(N?)RSVI (SEKVENSSI ID NO:10)

Peptidi 6:
ILANPA (SEKVENSSI ID NO:11)

Peptidi 7:
YEAPSLPT (SEKVENSSI ID NO:12)

Edellä olevissa sekvensseissä merkitsee C tunnistamatonta ryhmää ja B esittää ryhmää, joka on joko asparagiinihappo tai asparagiini.

2. R. solanin lakkaasigeenin eristäminen

Rhizoctonia-lajeihin luulumattomista lajeista peräisin olevia sienten lakkaasien tunnettuja aminohapposekvenssejä

(Choi, et al., edellä; Germann ja Lerch, edellä, Saloheimo, et al, edellä, ja Kojima, et al, edellä) tutkitaan niiden konsensus-sekvenssien määrittämiseksi. Proteiinin amino-terminaalisessa kolmanneksessa havaitaan kaksi erittäin voimakkaasti identtistä aluetta IHWHGFFQ and TFWYHSH. Näiden konsensus-sekvenssien ja vastaavien DNA-sekvenssien perusteella syntetoidaan kolme degeneratiivista oligonukleotidia, O-lac2 [TGG/AAAGACCATA/GGTGTCG/AGTA/G], sen komplementaarinen muoto O-lac2r, ja O-lac3 [ATCCAT/CTGGCAT/CGGG/CA/TTCTTCC-AG/A], käyttäen Applied Biosystems -yhtiön mallin 394 DNA/RNA-syntetointilaitetta.

Syntetoituja oligonukleotideja käytetään polymeraasiketjureaktiossa (PCR) Rhizoctonia solanin genomisen DNA:n seulontaan, jolla on tarkoitus havaita lakkaasigeeni tai tämän fragmentti. Genomisen DNA:n monistuksiin inkuboidaan 0,5 μg genomista DNA:ta käyttämällä kutakin aluketta, joiden konsentraatio on 1 μM, 200 μM dNTP-molekyylejä ja 1 yksikkö Taq-polymeraasia (Boehringer Mannheim), jotka on valmistettu puskuriin [110 mM Tris-Cl, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1 mg/ml gelatiini; pH 8,3]. Reaktioseoksia inkuboidaan 1 x 5 minuuttia 95 °C:ssa, 30 x [1 minuutti 95 °C:ssa, 1 minuutti 50 - 60 °C:ssa, 1 minuutti 72 °C:ssa] ja 1 x 5 minuuttia 72 °C:ssa. PCR-reaktioilla saadaan monistettua 220 nukleotidin suuruinen DNA-fragmentti. PCR-tuote kloonataan valmistajan ohjeiden mukaisesti TA-kloonausvektoriin (InVitrogen Corp.). Kun PCR-tuote on luonnehdittu sekvensoimalla yksittäisten kloonien DNA, niin saadaan erotettua toisistaan kaksi erillistä lakkaasigeeniä, joille on annettu nimitykset RSlac1 ja RSlac2.

R. solanin genomisen kirjaston valmistamiseksi pilkotaan R. solanin DNA osittain restriktioentsyymillä Sau3A ja sille suoritetaan elektroforeesi 0,8-%:isessa Sea Plaque -agaroosissa (FMC Bioproducts) Tris/asetaatti/EDTA-puskurissa niiden DNA-fragmenttien eristämiseksi, joiden koko on alueella 8,0 - 21 ke. Geelissä fraktioidut fragmentit puhdistetaan

edelleen käyttäen Beta-Agarasea (New England Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaisesti ja ne ligatoidaan sitten BamHI-päillä varustettuihin lamda-faagi EMBL3:n käsivarsiin. Tulokseksi saadut faagit pakataan in vitro -olosuhteissa käyttäen Gigapack II-pakkausuutetta (Stratagene). 25 ml:aan seosta, joka sisältää TB-ravintoliuosta + 0,2 % maltoosia ja 10 $MgSO_4$:ää, ympätään 50 μl:n suuruinen erä yön yli kasvatettua E. coli K802:n (supE, hsdR, gal, metB) viljelmää ja sitä inkuboidaan 37 °C:ssa ravistellen, kunnes A600 = 0,5. 25 μl pakatuista faageista suhteessa 1 : 10 ja 1 : 50 valmistettua laimennosta yhdistetään 250 μl:aan K802-soluja ja näitä inkuboidaan 20 minuuttia 37 °C:ssa. Kuhunkin laimennokseen lisätään 5 μl sulatettua yläkerrosagaria, jota on pidetty 48 °C:ssa. Seos maljataan tämän jälkeen etukäteen lämmitetyille LB-maljoille ja niitä inkuboidaan 37 °C:ssa vähintään 12 tuntia. Näistä faageista valmistetaan E. coli K802:ssa 17 000 plakin suuruinen kirjasto ja tämä monistetaan 100-kertaisesti tulevaa käyttöä varten.

Lakkaasigeenin seulomiseksi maljataan monistetusta genomisesta kirjastosta peräisin olevat 25 000 plakkia NZY/Agarose-maljoille, jotka on tarkoitettu maljan pinnasta siirtyvää plakkimateriaalia sisältävien suodattimien valmistamiseksi tavanomaisia menetelmiä käyttäen. Suodattimet seulotaan käyttäen koettimena 220 nukleotidin suuruista PCR-fragmenttia, joka on varustettu sattumanvaraisesti leimalla siten, että sen aktiivisuus on 5 x 10^8 cpm/μg. Suodattimet hybridisoidaan seoksessa, joka sisältää 50 % formamidia ja 6 x SSC:tä, 16 tuntia 42 °C:ssa ja pestään 0,5 x SSC:tä ja 0,1 % SDS:ää sisältävällä seoksella 65 °C:ssa. Positiiviset kloonit poimitaan ja seulotaan uudelleen tavanomaisin menetelmin. Tunnistetut yhdeksän positiivista kloonia jakautuvat kahteen ryhmään, joiden DNA-sekvenssin analyysin perusteella osoitetaan koodaavan kahta eri lakkaasigeeniä, RSlac1 ja RSlac2. Kunkin näiden geenin täydellinen nukleotidisekvenssi määritetään käyttäen fluoresoivia nukleotideja ja Applied Biosystems -yhtiön automaattista DNA-sekvensointilaitetta

(malli 363A, versio 1.2.0). Nukleotidisekvenssit ja ennustetut aminohapposekvenssit on esitetty kuvioissa 1 ja 2.

RSlac3:n eristämiseksi käytetään templaattina poly A -RNA:ta, joka on puhdistettu 1 mM anisidiinin läsnäollessa kasvatetusta R. solanin myseelistä ja joka on tarkoitettu cDNA:n synteesiin vakiomenetelmien avulla. cDNA-fraktioidaan elektroforeesilla 0,8-%:isessa agaroosigeelissä ja kootaan talteen DNA-fragmentit, joiden koko on alueella 1,7 - 3,5 ke. Tämän jälkeen valmistetaan kirjasto kloonaamalla koon mukaan fraktioitu cDNA hiivailmentämisvektoriin pYES2. Tästä kirjastosta peräisin olevat 3000 hiivatransformanttia maljataan ensin YNB:lle (1,7 g hiivatyppiperusravinnetta, joka ei sisällä aminohappoja, 5 g $(NH_4)_2SO_4$:ää litraa kohti) ja joka sisältää 2 % glukoosia. Kun maljoja on kasvatettu 30 °C:ssa 4 päivää, niin tulokseksi saatavat pesäkkeet maljataan jäljennöksinä YNB:lle, joka sisältää 0,1 % glukoosia, 2 % galaktoosia ja 2 mM ABTS:ää (2,2'-atsinobis(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonihapppoa, Sigma # A-1888) Kun maljoja on kasvatettu 24 tuntia 30 °C:ssa, niin yhden pesäkkeen ympärillä on vaalean vihreä rengas, joka muuttuu vähitellen purppuranpunaiseksi. Tästä pesäkkeestä peräisin oleva plasmidi eristetään ja insertiosekvenssi sekvensoidaan. RSlac3-geenin transloidun osan sekvenssi ja proteiinin sekvenssi on esitetty SEKVENSSEISSÄ ID NO 13 ja 14 ja kuviossa 4.

3. Lakkaasigeenin ilmentäminen

Plasmidi pMWR-1 on pUC:stä peräisin oleva vektori, joka sisältää TAKA-amylaasin transkription säätelysignaalit ja TAKA-amylaasin signaalisekvenssin. Tämä plasmidi muokataan siten, että signaalisekvenssin pilkkoutumiskohdalla on ainutlaatuinen SfiI-kohta, ja sen vieressä oleva 3'-puoleinen NsiI-kohta, siten, että näitä kahta restriktioentsyymiä voidaan käyttää vieraan proteiinin liittämiseen samaan lukukehykseen. Käyttäen PCR-reaktiota, (tämä oli suoritettu edellä kuvatulla tavalla mutta käyttäen templaattina 100 ng

asiaankuuluvaa linearisoitua plasmidi-DNA:ta) ja mutagenisoituja alukkeita, muodostetaan SfiI-kohta RSlac1:n aminohapon 12 kohdalle ja RSlac2:n aminohapon 14 kohdalle, siten että proteiinia koodaavat sekvenssit ovat samassa lukukehyksessä TAKAn signaalisekvenssin suhteen. Lisäksi PCR-monistusta käytetään myös PstI-kohdan (CTGCAG) liittämiseksi RSlac1:n 3'-päähän ja NsiI-kohdan (ATGCAT) liittämiseksi RSlac2:n 3'-päähän.

Transformaatioon tarkoitettuna esikäsittelynä viljellään Aspergillus oryzae -soluja 16 - 20 tuntia YPG:ssa (1 g/l hiivauute, 0,2 g K_2PO_4, 0,125 g/$MgSO_4$, 3,75 g glukoosi) 34 °C:ssa ravistelunopeudella 100 - 120 kierrosta minuutissa ja solut kootaan sitten talteen suodattamalla miracloth'in avulla. Solut pestään Mg-liuoksella (0,6 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$), minkä jälkeen 2 - 6 grammaa soluja otetaan talteen 10 ml:aan MgP:tä MgP (1,2 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$; pH 5,8). Tähän lisätään 1 ml Novozyme® 234:ää (120 mg/ml MgP) ja näytettä pidetään jäiden päällä 5 minuuttia. Seokseen lisätään 1 ml BSA:ta (12 mg/ml) ja näytettä ravistellaan varovasti 34 - 37 °C:ssa. Protoplastit kootaan talteen suodattamalla seos miracloth'in läpi ja seoksen päälle pipetoidaan 5 ml ST:ta (0,6 M sorbitoli, 100 mM Tris; pH 7). Näyte sentrifugoidaan nopeudella 2500 kierrosta minuutissa 15 minuutin ajan ja protoplasteja sisältävä vyöhyke otetaan talteen. Seokseen lisätään sen kaksinkertaista tilavuutta vastaava määrä STC:tä (1,2 M sorbitoli, 10 mM tris, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$; pH 7,5) ja näytettä sentrifugoidaan 5 minuuttia nopeudella 2500 kierrosta minuutissa. Saostuma pestään kaksi kertaa 5 ml:lla STC:tä ja protoplastit suspendoidaan 0,5 - 1 ml:aan STC:tä.

Transformaatiota varten protoplastien konsentraatio säädetään alueelle 1 - 5 x 10^7/ml. 100 µl:aan protoplastiliuosta lisätään korkeintaan 10 µl DNA-liuosta (5 - 10 µg superkierteistä DNA:ta) ja 0,2 ml PEG:tä (60 % PEG4000, 10 mM Tris, 10 mM $CaCl_2 \cdot H_2O$; pH 7,5) ja yhdistettyjä materiaaleja

sekoitetaan perusteellisesti. Näytettä pidetään huoneenlämmössä 25 minuuttia; siihen lisätään tämän jälkeen ensin 0,2 ml PEG:tä seosta samalla sekoittaen ja sitten 0,85 ml PEG:tä seosta samalla sekoittaen. Seosta pidetään huoneenlämmössä 20 minuuttia, minkä jälkeen se sentrifugoidaan nopeudella 4000 kierrosta minuutissa 15 minuuttia. Saostuma pestään 2 ml:lla STC:tä sentrifugoimalla seosta 10 minuutin ajan nopeudella 2500 kierrosta minuutissa. Protoplastit suspendoidaan uudelleen 0,2 - 0,5 ml:aan STC:tä ja ne levitetään tämän jälkeen COVE-maljoille. COVE-medium (pH 7) sisältää 342,3 g/l sakkaroosia, 25 g/l agaria ja suolaliuosta, jonka koostumus on 26 g/l KCl, 26 g/l $MgSO_4 \cdot H_2O$, 76 g/l KH_2PO_4 ja 50 ml/l hivenmetalleja; hivenmetallit ovat 40 mg/l $NaB_4O_7 \cdot 10\ H_2O$, 400 mg/l $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 1200 mg/l $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 700 mg/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 800 mg/l $Na_2MoO_2 \cdot 2\ H_2O$, 10 g/l $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$). Autoklavoinnin jälkeen liuokseen lisätään 10 ml/l suodatettua 1 M asetamidia ja 5 - 10 ml 3 M CsCl:ää. Transformantit selektoidaan kasvattamalla solut COVE-mediumissa, joka sisältää hiilenlähteenä asetamidia.

Lakkaasin muodostuminen näytteissä varmistetaan suorittamalla määritys edellä kuvatulla tavalla ABTS:n hapetusmenetelmällä 2 mM ABTS:ää sisältävässä COVE'n mediumissa pH-arvoissa 5 ja 7,3. Sekä RSlac1:llä että RSlac2:lla esiintyy lakkaasiaktiivisuutta pH 5:ssä ja pH 7:ssä toisin kuin kontrollilakkaasilla, jossa pH-arvossa 7,3 ei esiinny olennaisesti lainkaan aktiivisuutta.

Sekä RSlac1:n että RSlac2:n ilmentymistuotteista tutkitaan oksidaasiaktiivisuus useissa erilaisissa pH-arvoissa käyttäen substraattina syringaldatsiinia. Määritys suoritetaan pH-alueella 4 - 9 olennaisesti samoin kuin mitä on kuvattu edellä olevan natiivin proteiinin määrityksen kyseessä ollessa. Kuten kuvioissa 5 ja 6 on esitetty, ovat molemmat lakkaasit aktiivisia arvon 5 ylittävissä pH-arvoissa ja RSlac1:n aktiivisuus on erityisen hyvä arvon 6 ylittävissä pH-arvoissa. Aktiivisuustulokset ovat verrattavissa yleises-

ti tuloksiin, jotka on saatu RS 22:sta eristetystä RSlac3-lakkaasista (ks. edellä oleva taulukko 1), ja laajin aktiivisuusalue on RSlac1:llä.

Biologisten materiaalien tallettaminen

Seuraavat biologiset materiaalit on talletettu Budapestin sopimuksen ehtoja noudattaen talletuslaitokseen International Mycological Institute, Genetic Resource Reference Collection, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, ja niille on annettu seuraavat hakunumerot.

Talletus	Hakunumero
Rhizoctonia solani RS22	IMI CC 358730

Seuraavat biologiset materiaalit on talletettu Budapestin sopimuksen ehtoja noudattaen talletuslaitokseen Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604.

Talletus	Hakunumero
E. coli, joka sisältää α-amylaasin signaalisekvenssiin fuusioidun RSlac1:n (EMCC 00844)	NRRL B-21141
E. coli, joka sisältää RSlac2:n, jossa on SfiI-kohtaan sijoitettu insertiosekvenssi (EMCC 00845)	NRRL B-21142
E. coli, joka sisältää RSlac3:n (EMCC 0088)	NRRL B-21156

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:
(i) HAKIJA:
(A) NIMI: Novo Nordisk A/S
(B) KATU: Novo Alle
(C) KAUPUNKI: Bagsvaerd
(D) MAA: Tanska
(E) POSTINUMERO tai -KOODI: DK-2880
(F) PUHELIN: +45 4444 8888
(G) TELEFAX: +45 4449 3256
(F) TELEX: 37304

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: Novo Nordisk Biotech, Inc.
(E) KATU: 1445 Drew Avenue
(C) KAUPUNKI: Davis, Kalifornia
(D) MAA: Yhdysvallat
(E) POSTINUMERO TAI -KOODI: 95616-4880
(F) PUHELIN: (916) 757-8100
(G) TELEFAX: (916) 758-0317

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: PUHDISTETTUJA NEUTRAALIN pH:n LAKKAASEJA JA NÄITÄ KOODAVIA NUKLEIINIHAPPOJA

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 14

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
(A) VASTAANOTTAJA: Novo Nordisk of North America, Inc.
(B) KATU: 405 Lexington Avenue, Suite 6400
(C) KAUPUNKI: New York
(D) OSAVALTIO TAI LÄÄNI: New York
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO TAI -KOODI: 10174-6401

(v) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Disketti
(B) TIETOKONE: IBM PC -yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Versio #1.25

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: annettavana
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 13.9.1994

(vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 08/172 331
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 22.12.1993

(vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 08/122 230
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 17.9.1993

(vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 08/122 827
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 17.9.1993

(vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 08/162 827
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 3.12.1993

(viii) ASIAMIEHEN TIEDOT:
(A) NIMI: Lowney Dr., Karen A.
(B) REKISTERINUMERO: 31 274
(C) VIITE/LUETTELONUMERO: 4052.204-WO

(ix) TIETOLIIKENNEYHTEYSTIEDOT:
(A) PUHELIN: 212-867-0123
(B) TELEFAX: 212-878-9655

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 2838 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän DNA)

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: Rhizoctonia laccase

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 302..351

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 463..512

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 576..633

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 760..818

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 822..877

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1001..1054

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1316..1372

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1697..1754

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1827..1880

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1992..2051

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2157..2206

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2348..2404

(ix) OMINAISPIIRTEET:

(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2438..2498

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) ASEMA: yhdysmuoto(170..301, 352..462, 513..575, 634..759, 819
..821, 878..1000, 1055..1315, 1373..1696, 1755
..1826, 1881..1991, 2052..2156, 2207..2347, 2405
..2437, 2499..2621)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1:

```
AGCGTCACAC CAGACATCGG ATGAAAACGG AAAGTGTATG CGCCATTTGA CGTCTGCGGC   60

AACCACTGTT CATCTCGCGA GCTAACATGG GCGACGTATA AGAAGAACGC GAGAATGGGC  120

AGATTTCGAT ATCCCCTCTC GTCTCGGTTT TGGTCTCGGC TTGCCTCTA ATG GCG      175
                                                          Met Ala
                                                            1

CGC ACC ACT TTC CTT GTC TCG GTT TCG CTC TTT GTT TCC GCT GTT CTT     223
Arg Thr Thr Phe Leu Val Ser Val Ser Leu Phe Val Ser Ala Val Leu
          5                  10                  15

GCG CGC ACC GTC GAG TAC GGC TTG AAG ATT AGT GAT GGG GAG ATA GCT     271
Ala Arg Thr Val Glu Tyr Gly Leu Lys Ile Ser Asp Gly Glu Ile Ala
     20                  25                  30

CCT GAC GGT GTT AAG CGT AAT GCG ACT TTG GTACGCACTC CTTGTAATCC       321
Pro Asp Gly Val Lys Arg Asn Ala Thr Leu
 35                  40

AACAATTCAA GGTTTCTGAT GCTTGGTCAG GTA AAT GGA GGG TAT CCC GGT CCA   375
                                Val Asn Gly Gly Tyr Pro Gly Pro
                                 45                  50

CTC ATT TTT GCC AAC AAG GGG GAT ACT CTC AAA GTC AAG GTC CAA AAC    423
Leu Ile Phe Ala Asn Lys Gly Asp Thr Leu Lys Val Lys Val Gln Asn
         55                  60                  65

AAG CTC ACG AAT CCT GAG ATG TAT CGC ACC ACT TCC ATC GTATGTTCGT     472
Lys Leu Thr Asn Pro Glu Met Tyr Arg Thr Thr Ser Ile
     70                  75                  80

TCGATATCTA CTAATACATC CGTCGCTAAA TATCTTGTAG CAT TGG CAC GGT CTC    527
                                           His Trp His Gly Leu
                                                        85

TTA CAA CAT AGA AAC GCC GAC GAC GAC GGT CCT TCG TTC GTC ACT CAG    575
Leu Gln His Arg Asn Ala Asp Asp Asp Gly Pro Ser Phe Val Thr Gln
             90                  95                 100

GTAGGATTCT GGAAGGTTGG CCTGAACTCT CTGTTAACCG ACAACCCGAT GTCACCAG    633

TGC CCG ATT GTT CCA CGC GAG TCG TAT ACT TAC ACC ATA CCT CTG GAC    681
Cys Pro Ile Val Pro Arg Glu Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Pro Leu Asp
        105                 110                 115

GAT CAA ACC GGA ACC TAT TGG TAC CAT AGC CAC TTG AGT TCG CAA TAC    729
Asp Gln Thr Gly Thr Tyr Trp Tyr His Ser His Leu Ser Ser Gln Tyr
    120                 125                 130

GTT GAT GGT CTT CGA GGC CCG CTG GTA ATC GTGAGTATCT TGACTTGTCT      779
Val Asp Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Ile
135                 140
```

```
ACTGAAGGCA ACGAGACTAA AACAAGCGTC GATTCACAG TAT GTTCGTCTCC          831
                                              Tyr
                                              145
CCTTTATTTA GCTCTGGATC TTCATTTCTC ACGTAATACA TGATAG GAT CCC AAG     886
                                                 Asp Pro Lys

GAT CCT CAC AGG CGT TTG TAT GAT GTT GAC GAT GAG AAG ACC GTC CTG    934
Asp Pro His Arg Arg Leu Tyr Asp Val Asp Asp Glu Lys Thr Val Leu
    150                 155                 160

ATC ATC GGT GAC TGG TAT CAT GAA TCG TCC AAG GCA ATC CTT GCT TCT    982
Ile Ile Gly Asp Trp Tyr His Glu Ser Ser Lys Ala Ile Leu Ala Ser
165                 170                 175                 180

GGT AAC ATT ACC CGA CAG GTAAGTGATA CATGCCGGTC CCAGAAAAAT          1030
Gly Asn Ile Thr Arg Gln
                185

TCTCTAAATT CATTTTAATT ACAG CGA CCG GTC TCT GCC ACC ATC AAC GGC     1081
                          Arg Pro Val Ser Ala Thr Ile Asn Gly
                                  190                 195

AAA GGT CGA TTT GAC CCT GAC AAC ACT CCT GCC AAC CCA GAT ACT CTG    1129
Lys Gly Arg Phe Asp Pro Asp Asn Thr Pro Ala Asn Pro Asp Thr Leu
                200                 205                 210

TAC ACC CTC AAG GTC AAG CGA GGG AAG CGC TAT CGT CTG CGT GTC ATC    1177
Tyr Thr Leu Lys Val Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Arg Leu Arg Val Ile
            215                 220                 225

AAT AGC TCG GAG ATC GCT TCG TTC CGA TTC AGT GTG GAA GGT CAC AAG    1225
Asn Ser Ser Glu Ile Ala Ser Phe Arg Phe Ser Val Glu Gly His Lys
        230                 235                 240

GTG ACT GTG ATT GCT GCC GAT GGC GTC TCT ACC AAA CCG TAT CAG GTC    1273
Val Thr Val Ile Ala Ala Asp Gly Val Ser Thr Lys Pro Tyr Gln Val
    245                 250                 255

GAT GCG TTT GAT ATT CTA GCA GGA CAG CGC ATA GAT TGC GTC            1315
Asp Ala Phe Asp Ile Leu Ala Gly Gln Arg Ile Asp Cys Val
260                 265                 270

GTAAGTGTCG TCCGAACCCA CATCTGAGCT CAAGTGTTGA TACATGCGCG CTTATAG     1372

GTG GAG GCG AAC CAA GAA CCC GAC ACA TAC TGG ATC AAC GCA CCG CTG    1420
Val Glu Ala Asn Gln Glu Pro Asp Thr Tyr Trp Ile Asn Ala Pro Leu
    275                 280                 285

ACC AAC GTG CCC AAC AAG ACC GCT CAG GCT CTC CTC GTT TAT GAG GAG    1468
Thr Asn Val Pro Asn Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Val Tyr Glu Glu
290                 295                 300                 305

CAT CGT CGG CCG TAC CAC CCT CCA AAG GGC CCG TAT CGC AAG TGG AGC    1516
Asp Arg Arg Pro Tyr His Pro Pro Lys Gly Pro Tyr Arg Lys Trp Ser
                310                 315                 320

GTC TCT GAG GCG ATC ATC AAG TAC TGG AAT CAC AAG CAC AAG CAC GGA    1564
Val Ser Glu Ala Ile Ile Lys Tyr Trp Asn His Lys His Lys His Gly
            325                 330                 335

CGT GGT TTG CTG TCT GGA CAT GGA GGT CTC AAG GCT CGG ATC ATC GAG    1612
Arg Gly Leu Leu Ser Gly His Gly Gly Leu Lys Ala Arg Met Ile Glu
        340                 345                 350

GGT AGC CAT CAT CTG CAT TCG CGC AGC GTC GTT AAG CGC CAG AAT GAG    1660
```

```
Gly Ser His His Leu His Ser Arg Ser Val Val Lys Arg Gln Asn Glu
    355                 360                 365

ACC ACC ACT GTT GTA ATG GAC GAG AGC AAG CTC GTT GTAAGTACCA        1706
Thr Thr Thr Val Val Met Asp Glu Ser Lys Leu Val
370                 375                 380

TATTTAAAAG TTGGTTGGGT TTCGAATACT TATTTCAACT TTTCTTAG CCA CTG GAA  1763
                                                  Pro Leu Glu

TAC CCC GGC GCT GCA TGC GGG TCT AAA CCT GCT GAC CTC GTC TTG GAT   1811
Tyr Pro Gly Ala Ala Cys Gly Ser Lys Pro Ala Asp Leu Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

CTC ACT TTT GGT TTG GTATGTAGCC AAATCGCCCA TATACAGGAT ACTGAATATT  1866
Leu Thr Phe Gly Leu
                405

GTTTGTGCGT GTAG AAC TTT GCT ACC GGG CAC TGG ATG ATC AAC GGT ATC   1916
                Asn Phe Ala Thr Gly His Trp Met Ile Asn Gly Ile
                            410                 415

CCA TAC GAG TCT CCC AAA ATC CCC ACA TTG CTC AAG ATC CTC ACT GAT   1964
Pro Tyr Glu Ser Pro Lys Ile Pro Thr Leu Leu Lys Ile Leu Thr Asp
        420                 425                 430

GAG GAC GGG GTT ACC GAG TCT GAC TTC GTATGTTCCC TTTTCGGTAT         2011
Glu Asp Gly Val Thr Glu Ser Asp Phe
    435                 440

CTTCGTATGC GTGCACTGAC TCGTGCTGGT GGGAATTTAG ACC AAG GAG GAG CAC   2066
                                           Thr Lys Glu Glu His
                                                   445

ACA GTC ATA CTC CCG AAG AAC AAA TGC ATC GAA TTC AAC ATC AAG GGG   2114
Thr Val Ile Leu Pro Lys Asn Lys Cys Ile Glu Phe Asn Ile Lys Gly
        450                 455                 460

AAC TCG GGT ATT CCC ATT ACG CAC CCC GTA CAT CTT CAC GGT           2156
Asn Ser Gly Ile Pro Ile Thr His Pro Val His Leu His Gly
    465                 470                 475

GTAAGTGCAT ATCGGATGGT TTACGATACT AAGGCTCATC AAC AG CAC ACT        2212
                                              His Thr

TGG GAT GTC GTA CAA TTT GGC AAC AAC CCA CCC AAT TAT GTC AAT CCT   2260
Trp Asp Val Val Gln Phe Gly Asn Asn Pro Pro Asn Tyr Val Asn Pro
480                 485                 490                 495

CCC CGT AGG GAC GTG GTT GGC TCT ACA GAT GCG GGT GTG AGG ATT CAG   2308
Pro Arg Arg Asp Val Val Gly Ser Thr Asp Ala Gly Val Arg Ile Gln
                500                 505                 510

TTC AAG ACC GAC AAT CCA GGA CCG TGG TTC CTG CAC TGC GTGCGTCGGT    2357
Phe Lys Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys
            515                 520

CCCCATCGTC CGTTATGGTT TTTCTAATAC GTCCCATTCT ATTTTAG CAT ATT GAC   2413
                                              His Ile Asp
                                                  525

TGG CAT CTT GAG GAG GGT TTC GCA GTGAGTACTG AGACCTAAGT GCTACTCGGC  2467
Trp His Leu Glu Glu Gly Phe Ala
        530                 535
```

```
TCATTACTGA TTACCGCATG TATGCGTCTA G ATG GTG TTT GCT GAA GCG CCC    2519
                                   Met Val Phe Ala Glu Ala Pro
                                                   540

GAA GCC GTC AAG GGA GGT CCA AAG AGC GTG GCC GTG GAC TCT CAG TGG    2567
Glu Ala Val Lys Gly Gly Pro Lys Ser Val Ala Val Asp Ser Gln Trp
        545                 550                 555

GAA GGG CTG TGT GGC AAG TAC GAC AAC TGG CTA AAA TCA AAT CCG GGC    2615
Glu Gly Leu Cys Gly Lys Tyr Asp Asn Trp Leu Lys Ser Asn Pro Gly
    560                 565                 570

CAG CTG TAGGCGTATC GCAGCCACAT TGGTGATGAT TGAAAGTTGC ATCTTGTTCC    2671
Gln Leu
575

TATAACCGGC TCTTATATAC GGGTGTCTCC CAGTAAAGTC GTAGCCCAAT TTCAGCCGAG 2731

ACAGATATTT AGTGGACTCT TACTCTTGTG TCCCATTGAC GCACATCGTT GCATCAAACC 2791

TGCTTTTTAT CGTCCCTCTT TGTAATTTGT GTTGCTGTAA TGTATCG              2838
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 576 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2:

```
Met Ala Arg Thr Thr Phe Leu Val Ser Val Ser Leu Phe Val Ser Ala
  1               5                  10                  15

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

Ile Ala Pro Asp Gly Val Lys Arg Asn Ala Thr Leu Val Asn Gly Gly
         35                  40                  45

Tyr Pro Gly Pro Leu Ile Phe Ala Asn Lys Gly Asp Thr Leu Lys Val
     50                  55                  60

Lys Val Gln Asn Lys Leu Thr Asn Pro Glu Met Tyr Arg Thr Thr Ser
 65                  70                  75                  80

Ile His Trp His Gly Leu Leu Gln His Arg Asn Ala Asp Asp Asp Gly
                 85                  90                  95

Pro Ser Phe Val Thr Gln Cys Pro Ile Val Pro Arg Glu Ser Tyr Thr
            100                 105                 110

Tyr Thr Ile Pro Leu Asp Asp Gln Thr Gly Thr Tyr Trp Tyr His Ser
        115                 120                 125

His Leu Ser Ser Gln Tyr Val Asp Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Ile
    130                 135                 140

Tyr Asp Pro Lys Asp Pro His Arg Arg Leu Tyr Asp Val Asp Asp Glu
145                 150                 155                 160

Lys Thr Val Leu Ile Ile Gly Asp Trp Tyr His Glu Ser Ser Lys Ala
                165                 170                 175
```

Ile Leu Ala Ser Gly Asn Ile Thr Arg Gln Arg Pro Val Ser Ala Thr
180 185 190

Ile Asn Gly Lys Gly Arg Phe Asp Pro Asp Asn Thr Pro Ala Asn Pro
195 200 205

Asp Thr Leu Tyr Thr Leu Lys Val Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Arg Leu
210 215 220

Arg Val Ile Asn Ser Ser Glu Ile Ala Ser Phe Arg Phe Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly His Lys Val Thr Val Ile Ala Ala Asp Gly Val Ser Thr Lys Pro
245 250 255

Tyr Gln Val Asp Ala Phe Asp Ile Leu Ala Gly Gln Arg Ile Asp Cys
260 265 270

Val Val Glu Ala Asn Gln Glu Pro Asp Thr Tyr Trp Ile Asn Ala Pro
275 280 285

Leu Thr Asn Val Pro Asn Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Val Tyr Glu
290 295 300

Glu Asp Arg Arg Pro Tyr His Pro Pro Lys Gly Pro Tyr Arg Lys Trp
305 310 315 320

Ser Val Ser Glu Ala Ile Ile Lys Tyr Trp Asn His Lys His Lys His
325 330 335

Gly Arg Gly Leu Leu Ser Gly His Gly Gly Leu Lys Ala Arg Met Ile
340 345 350

Glu Gly Ser His His Leu His Ser Arg Ser Val Val Lys Arg Gln Asn
355 360 365

Glu Thr Thr Thr Val Val Met Asp Glu Ser Lys Leu Val Pro Leu Glu
370 375 380

Tyr Pro Gly Ala Ala Cys Gly Ser Lys Pro Ala Asp Leu Val Leu Asp
385 390 395 400

Leu Thr Phe Gly Leu Asn Phe Ala Thr Gly His Trp Met Ile Asn Gly
405 410 415

Ile Pro Tyr Glu Ser Pro Lys Ile Pro Thr Leu Leu Lys Ile Leu Thr
420 425 430

Asp Glu Asp Gly Val Thr Glu Ser Asp Phe Thr Lys Glu Glu His Thr
435 440 445

Val Ile Leu Pro Lys Asn Lys Cys Ile Glu Phe Asn Ile Lys Gly Asn
450 455 460

Ser Gly Ile Pro Ile Thr His Pro Val His Leu His Gly His Thr Trp
465 470 475 480

Asp Val Val Gln Phe Gly Asn Asn Pro Pro Asn Tyr Val Asn Pro Pro
485 490 495

Arg Arg Asp Val Val Gly Ser Thr Asp Ala Gly Val Arg Ile Gln Phe
500 505 510

Lys Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Trp
515 520 525

His Leu Glu Glu Gly Phe Ala Met Val Phe Ala Glu Ala Pro Glu Ala

530 535 540

Val Lys Gly Gly Pro Lys Ser Val Ala Val Asp Ser Gln Trp Glu Gly
545 550 555 560

Leu Cys Gly Lys Tyr Asp Asn Trp Leu Lys Ser Asn Pro Gly Gln Leu
565 570 575

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 3117 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän DNA)

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: Rhizoctonia laccase

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) ASEMA: yhdysmuoto(393..524, 577..687, 737..799, 860..985, 104
..1045, 1097..1219, 1269..1538, 1601..1996, 2047
..2118, 2174..2284, 2338..2439, 2495..2635, 2693
..2725, 2786..2899)

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 525..576

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 688..736

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 800..859

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 986..1042

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1220..1268

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1539..1600

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1823..1936

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1973..2046

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2119..2173

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni

(B) ASEMA: 2285..2337

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2440..2494

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 2636..2692

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: introni
(B) ASEMA: 1046..1096

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3:

```
GAGTGATCCG CCAGAGTTCA GGCGGATAAG TTCCTAAATA GTCATTCGCC TATTCGTGTA   60

CCTCAGCATA CTGACGACAT ACCGCCAGAT CGCCCTCGGT TCGGGCGTGG CATACGTTCG  120

CAAGGGCACC TCACGGAGCA AACTCTAAAA AGCTTCGGCA TGGATTGCAT TTTGTATTGT  180

AAACAAGTTA CGAGAAAAAC AATAGATCAG TTTTTGCCGA ATCGGATGGC TTGAAACGGA  240

AGTACCGATG GCCGATCCGA GTCGAATGAA TTAACGCATC TGAAACGGGA CCCTGAGTCG  300

AGGCACCCGC CGGCCTTGGC CGTATAAGTC ACTTGTCGCC AACTAGCACT TTTTCATTCC  360

CCCTTTTCTT CTTCCTCGTC TTCTTCTTCT CT ATG GCT CGG TCG ACT ACT TCA     413
                                       Met Ala Arg Ser Thr Thr Ser
                                         1               5

CTC TTT GCA CTG TCT CTC GTT GCT TCA GCG TTT GCT CGA GTC GTT GAC     461
Leu Phe Ala Leu Ser Leu Val Ala Ser Ala Phe Ala Arg Val Val Asp
          10                  15                  20

TAT GGG TTT GAT GTG GCT AAT GGG GCA GTT GCT CCG GAT GGT GTA ACA     509
Tyr Gly Phe Asp Val Ala Asn Gly Ala Val Ala Pro Asp Gly Val Thr
     25                  30                  35

AGG AAC GCG GTT CTC GTGAGTTAGC TGTAAGATGG TGTATATGCT GGTTGCCTAA     564
Arg Asn Ala Val Leu
 40

CGGGAATGTC AG GTC AAT GGT CGC TTC CCT GGT CCA TTG ATC ACC GCC       612
              Val Asn Gly Arg Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Ala
               45                  50                  55

AAC AAG GGG GAT ACA CTT AAA ATC ACC GTG CGG AAT AAA CTC TCC GAT     660
Asn Lys Gly Asp Thr Leu Lys Ile Thr Val Arg Asn Lys Leu Ser Asp
            60                  65                  70

CCA ACT ATG CGA AGG AGC ACG ACC ATC GTTAGTACTT CCCCTCATCT           707
Pro Thr Met Arg Arg Ser Thr Thr Ile
          75                  80

GTCTTGAAAC TTTCTCATCT TTTTTGAAG CAC TGG CAC GGT CTG CTC CAA CAC     760
                                 His Trp His Gly Leu Leu Gln His
                                                   85

AGG ACG GCA GAA GAA GAT GGC CCG GCC TTT GTA ACC CAG GTATGCCTTA     809
Arg Thr Ala Glu Glu Asp Gly Pro Ala Phe Val Thr Gln
 90                  95                  100

TCCTATCGCT GCTCTGTCCC CGCGTCCTTC CCTGACTCGG GCGATTCTAG TGC CCG     865
                                                        Cys Pro
```

```
ATT CCT CCG CAA GAA TCG TAC ACC TAT ACG ATG CCG CTC GGC GAA CAG    913
Ile Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Tyr Thr Met Pro Leu Gly Glu Gln
105                 110                 115                 120

ACC GGC ACG TAT TGG TAC CAC AGC CAC TTG AGC TCC CAG TAT GTG CAC    961
Thr Gly Thr Tyr Trp Tyr His Ser His Leu Ser Ser Gln Tyr Val Asp
                125                 130                 135

GGG TTG CGT GGG CCC ATC GTT ATT GTAAGTCTTC ATTTAACCTT ATTCTTGGTT   1015
Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Ile
            140

ATGGCTGATT GTGACGTCGT GGTTAGT ATG TTCGTGGCTT CCACAAGAAG            1065
                              Met
                              145

TCAGCAGCCC TTGAAGCTAA CTTTATTCCA G GAC CCC CAC GAC CCG TAC AGA     1117
                                  Asp Pro His Asp Pro Tyr Arg
                                                  150

AAC TAC TAT GAT GTC GAC GAC GAG CGT ACG GTC TTT ACT TTA GCA GAC    1165
Asn Tyr Tyr Asp Val Asp Asp Glu Arg Thr Val Phe Thr Leu Ala Asp
        155                 160                 165

TGG TAC CAC ACG CCG TCG GAG GCT ATC ATT GCC ACC CAC GAT GTC TTG    1213
Trp Tyr His Thr Pro Ser Glu Ala Ile Ile Ala Thr His Asp Val Leu
    170                 175                 180

AAA ACG GTACGCGTTA ATCCTTCTAG CTTTCTTTCC TTGGGTCACT TTCTATCAG      1268
Lys Thr
185

ATC CCC GAC TCG GGT ACG ATC AAC GGC AAA GGC AAA TAC GAT CCT GCT    1316
Ile Pro Asp Ser Gly Thr Ile Asn Gly Lys Gly Lys Tyr Asp Pro Ala
            190                 195                 200

TCG GCT AAC ACC AAC AAC ACG ACA CTC GAG AAC CTC TAC ACT CTC AAA    1364
Ser Ala Asn Thr Asn Asn Thr Thr Leu Glu Asn Leu Tyr Thr Leu Lys
        205                 210                 215

GTC AAA CGC GGC AAG CGG TAT CGC CTG AGG ATT ATC AAC GCC TCG GCC    1412
Val Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Arg Leu Arg Ile Ile Asn Ala Ser Ala
    220                 225                 230

ATC GCT TCG TTC CGG TTC GGC GTG CAG GGC CAC AAG TGC ACG ATC ATC    1460
Ile Ala Ser Phe Arg Phe Gly Val Gln Gly His Lys Cys Thr Ile Ile
235                 240                 245                 250

GAG GCT GAT GGC GTC CTC ACC AAA CCG ATC GAG GTC GAT GCG TTT GAT    1508
Glu Ala Asp Gly Val Leu Thr Lys Pro Ile Glu Val Asp Ala Phe Asp
                255                 260                 265

ATT CTA GCA GGC CAG AGG TAT AGC TGC ATC GTAAGTCTAC CTATGCCTTG      1558
Ile Leu Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Cys Ile
            270                 275

TTGTGGAGAT AAGAACCTGA CTGAATGTAT GCGCTCCAAT AG TTG AAG GCC GAC     1612
                                              Leu Lys Ala Asp
                                                          280

CAA GAT CCT GAT TCC TAC TGG ATA AAT GCG CCA ATC ACA AAC GTT CTC    1660
Gln Asp Pro Asp Ser Tyr Trp Ile Asn Ala Pro Ile Thr Asn Val Leu
                285                 290                 295

AAC ACC AAC GTC CAG GCA TTG CTA GTG TAT GAA GAT GAC AAG CGT CCT    1708
```

```
Asn Thr Asn Val Gln Ala Leu Leu Val Tyr Glu Asp Asp Lys Arg Pro
            300                 305                 310

ACT CAC TAC CCC TGG AAG CCG TTT TTG ACA TGG AAG ATA TCA AAT GAA   1756
Thr His Tyr Pro Trp Lys Pro Phe Leu Thr Trp Lys Ile Ser Asn Glu
        315                 320                 325

ATC ATT CAG TAC TGG CAG CAC AAG CAC GGG TCG CAC GGT CAC AAG GGA   1804
Ile Ile Gln Tyr Trp Gln His Lys His Gly Ser His Gly His Lys Gly
    330                 335                 340

AAG GGG CAT CAT CAT AAA GTC CGG GCC ATT GGA GGT GTA TCC GGG TTG   1852
Lys Gly His His His Lys Val Arg Ala Ile Gly Gly Val Ser Gly Leu
345                 350                 355                 360

AGC TCC AGG GTT AAG AGC CGG GCG ACT GAC CTA TCG AAG AAG GCT GTC   1900
Ser Ser Arg Val Lys Ser Arg Ala Ser Asp Leu Ser Lys Lys Ala Val
                365                 370                 375

GAG TTG GCT GCT GCA CTC GTT GCG GGT GAG GCC GAG TTG GAC AAG AGG   1948
Glu Leu Ala Ala Ala Leu Val Ala Gly Glu Ala Glu Leu Asp Lys Arg
            380                 385                 390

CAG AAT GAG GAT AAT TCG ACT ATT GTA TTG GAT GAG ACC AAG CTT ATT   1996
Gln Asn Glu Asp Asn Ser Thr Ile Val Leu Asp Glu Thr Lys Leu Ile
        395                 400                 405

CTAAGTCCCT TAATTTTTTT CGGTGTCACG GAAGCTAACC CGCGTAATAG CCG TTG    2052
                                                        Pro Leu
                                                            410

GTT CAA CCT GGT GCA CCG GGC GGC TCC AGA CCA GCT GAC GTC GTG GTC   2100
Val Gln Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Arg Pro Ala Asp Val Val Val
                415                 420                 425

CCT CTG GAC TTT GGC CTC GTATGTGGCT TCTTGTTATT CGTCCGGAAT         2148
Pro Leu Asp Phe Gly Leu
            430

GCAAACTGAT TTGGGTGGGC TATAG AAC TTT GCC AAC GGA CTG TGG ACG ATA   2200
                          Asn Phe Ala Asn Gly Leu Trp Thr Ile
                              435                 440

AAC AAT GTC TCC TAC TCC CCT CCG GAT GTC CCT ACT CTC CTC AAG ATC   2248
Asn Asn Val Ser Tyr Ser Pro Pro Asp Val Pro Thr Leu Leu Lys Ile
            445                 450                 455

TTG ACC GAC AAA GAC AAA GTC GAC GCT TCT GAC TTC GTAGGTTCCT       2294
Leu Thr Asp Lys Asp Lys Val Asp Ala Ser Asp Phe
        460                 465

CTTCTTCTTT TCAAACTAGC TACTGACATT AAGTGAACGT CAG ACG GCC GAT GAA   2349
                                            Thr Ala Asp Glu
                                            470

CAC ACG TAT ATT CTT CCA AAG AAC CAA GTT GTC GAG TTG CAC ATC AAG   2397
His Thr Tyr Ile Leu Pro Lys Asn Gln Val Val Glu Leu His Ile Lys
    475                 480                 485

GGA CAG GCT TTG GGA ATC GTA CAC CCC CTT CAT CTG CAT GGC           2439
Gly Gln Ala Leu Gly Ile Val His Pro Leu His Leu His Gly
490                 495                 500

GTACGTCTTT CTCACACTGT TCCAGCTCCT ATTCTCTAAC ACACTCCTGC GATAG CAT  2497
                                                            His
```

```
GCG TTC GAC GTC GTC CAA TTC GGC GAC AAC GCT CCA AAC TAC GTG AAC   2545
Ala Phe Asp Val Val Gln Phe Gly Asp Asn Ala Pro Asn Tyr Val Asn
505                 510                 515                 520

CCT CCG CGT AGG GAT GTA GTA GGC GTA ACT GAT GCT GGA GTC CGT ATC   2593
Pro Pro Arg Arg Asp Val Val Gly Val Thr Asp Ala Gly Val Arg Ile
                525                 530                 535

CAG TTC AGA ACC GAT AAC CCG GGC CCT TGG TTC CTC CAT TGC           2635
Gln Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys
            540                 545                 550

GTATGCTCTT CATCTCCCAC CGCTTGTTCT TTACTTATGG TTTACCTTGC GATTTAG    2692

CAC ATT GAT TGG CAC TTG GAA GAA GGA TTT GCT GTAAGTTATT ATTCCTATTC 2745
His Ile Asp Trp His Leu Glu Glu Gly Phe Ala
                555                 560

CGAAGCATCG GGGAGATGCT AACCAAGGGT GTGTTTTAAG ATG GTA TTC GCC GAA   2800
                                            Met Val Phe Ala Glu
                                                        565

GCG CCT GAA GAT ATC AAG AAA GGC TCT CAG AGT GTC AAG CCT GAC GGA   2848
Ala Pro Glu Asp Ile Lys Lys Gly Ser Gln Ser Val Lys Pro Asp Gly
            570                 575                 580

CAA TGG AAG AAA CTA TGC GAG AAG TAT GAG AAG TTG CCT GAA GCA CTG   2896
Gln Trp Lys Lys Leu Cys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Pro Glu Ala Leu
        585                 590                 595

CAG TGAAGTTGCA GTTGTTTCCC ATTCGGGAAC TGGCTCACTA  TTCCTTTTGC       2949
Gln

ATAATTCGGA CTTTTATTTT GGGACATTAT TGGACTATGG ACTTGTTTGT CACACCCTCG 3009

CTCACTGTGT CCCTCGTTGA GTACCTATAC TCTATTCGTA TAGTGGGAAT ATGGAATATC 3069

GGATGTAATA AATGCTCGTG CGTTTGGTGC TCGAAATGGG GTAGGACT              3117
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 599 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4:

```
Met Ala Arg Ser Thr Thr Ser Leu Phe Ala Leu Ser Leu Val Ala Ser
 1               5                  10                  15

Ala Phe Ala Arg Val Val Asp Tyr Gly Phe Asp Val Ala Asn Gly Ala
            20                  25                  30

Val Ala Pro Asp Gly Val Thr Arg Asn Ala Val Leu Val Asn Gly Arg
        35                  40                  45

Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Ala Asn Lys Gly Asp Thr Leu Lys Ile
    50                  55                  60

Thr Val Arg Asn Lys Leu Ser Asp Pro Thr Met Arg Arg Ser Thr Thr
65                  70                  75                  80
```

Ile His Trp His Gly Leu Leu Gln His Arg Thr Ala Glu Glu Asp Gly
85 90 95

Pro Ala Phe Val Thr Gln Cys Pro Ile Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr
100 105 110

Tyr Thr Met Pro Leu Gly Glu Gln Thr Gly Thr Tyr Trp Tyr His Ser
115 120 125

His Leu Ser Ser Gln Tyr Val Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Ile
130 135 140

Met Asp Pro His Asp Pro Tyr Arg Asn Tyr Tyr Asp Val Asp Asp Glu
145 150 155 160

Arg Thr Val Phe Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Thr Pro Ser Glu Ala
165 170 175

Ile Ile Ala Thr His Asp Val Leu Lys Thr Ile Pro Asp Ser Gly Thr
180 185 190

Ile Asn Gly Lys Gly Lys Tyr Asp Pro Ala Ser Ala Asn Thr Asn Asn
195 200 205

Thr Thr Leu Glu Asn Leu Tyr Thr Leu Lys Val Lys Arg Gly Lys Arg
210 215 220

Tyr Arg Leu Arg Ile Ile Asn Ala Ser Ala Ile Ala Ser Phe Arg Phe
225 230 235 240

Gly Val Gln Gly His Lys Cys Thr Ile Ile Glu Ala Asp Gly Val Leu
245 250 255

Thr Lys Pro Ile Glu Val Asp Ala Phe Asp Ile Leu Ala Gly Gln Arg
260 265 270

Tyr Ser Cys Ile Leu Lys Ala Asp Gln Asp Pro Asp Ser Tyr Trp Ile
275 280 285

Asn Ala Pro Ile Thr Asn Val Leu Asn Thr Asn Val Gln Ala Leu Leu
290 295 300

Val Tyr Glu Asp Asp Lys Arg Pro Thr His Tyr Pro Trp Lys Pro Phe
305 310 315 320

Leu Thr Trp Lys Ile Ser Asn Glu Ile Ile Gln Tyr Trp Gln His Lys
325 330 335

His Gly Ser His Gly His Lys Gly Lys Gly His His His Lys Val Arg
340 345 350

Ala Ile Gly Gly Val Ser Gly Leu Ser Ser Arg Val Lys Ser Arg Ala
355 360 365

Ser Asp Leu Ser Lys Lys Ala Val Glu Leu Ala Ala Ala Leu Val Ala
370 375 380

Gly Glu Ala Glu Leu Asp Lys Arg Gln Asn Glu Asp Asn Ser Thr Ile
385 390 395 400

Val Leu Asp Glu Thr Lys Leu Ile Pro Leu Val Gln Pro Gly Ala Pro
405 410 415

Gly Gly Ser Arg Pro Ala Asp Val Val Val Pro Leu Asp Phe Gly Leu
420 425 430

Asn Phe Ala Asn Gly Leu Trp Thr Ile Asn Asn Val Ser Tyr Ser Pro

435 440 445

Pro Asp Val Pro Thr Leu Leu Lys Ile Leu Thr Asp Lys Asp Lys Val
450 455 460

Asp Ala Ser Asp Phe Thr Ala Asp Glu His Thr Tyr Ile Leu Pro Lys
465 470 475 480

Asn Gln Val Val Glu Leu His Ile Lys Gly Gln Ala Leu Gly Ile Val
485 490 495

His Pro Leu His Leu His Gly His Ala Phe Asp Val Val Gln Phe Gly
500 505 510

Asp Asn Ala Pro Asn Tyr Val Asn Pro Pro Arg Arg Asp Val Val Gly
515 520 525

Val Thr Asp Ala Gly Val Arg Ile Gln Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly
530 535 540

Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Trp His Leu Glu Glu Gly Phe
545 550 555 560

Ala Met Val Phe Ala Glu Ala Pro Glu Asp Ile Lys Lys Gly Ser Gln
565 570 575

Ser Val Lys Pro Asp Gly Gln Trp Lys Lys Leu Cys Glu Lys Tyr Glu
580 585 590

Lys Leu Pro Glu Ala Leu Gln
595

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5:

Ala Val Arg Asn Tyr Lys Phe Asp Ile Lys Asn Val Asn Val Ala Pro
1 5 10 15

Asp Gly Phe Gln Arg Pro Ile Val Ser Val
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 20 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6:

Ser Gln Tyr Val Asp Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Ile Tyr Asp Pro
1 5 10 15

Asp Asp Asp His
20

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 26 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7:

Ser Arg Tyr Asx Val Asx Asx Ala Ser Thr Val Val Met Leu Glu Asx
1 5 10 15

Trp Tyr Arg Thr Pro Ala Xaa Val Leu Glu
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 25 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8:

Ser Leu Gly Pro Thr Pro Asn Tyr Val Asn Pro Xaa Ile Arg Asp Val
1 5 10 15

Val Arg Val Gly Gly Thr Thr Val Val
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 25 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9:

Gly Leu Ala Leu Val Phe Ala Glu Ala Pro Ser Gln Ile Arg Gln Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Val Gln Pro Asp Asp Ala
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:10:

Ile Arg Tyr Val Gly Gly Pro Ala Val Xaa Arg Ser Val Ile
1 5 10

(2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:11:

Ile Leu Ala Asn Pro Ala
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:12:

Tyr Glu Ala Pro Ser Leu Pro Thr
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 1912 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: Rhizoctonia laccase

(ix) OMINAISPIIRTEET:
(A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) ASEMA: 85..1671

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:13:

```
CTAACGCTTG GTGCCGAGCT CGGATCCACT AGTAACGCGC GCCAGTGTGC TGGAATTCGC   60

GGCCGCGTCG ACACCTCCTT CAAG ATG CTT TCT AGC ATT ACC CTC CTA CCT      111
                              Met Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Pro
                                1               5

TTG CTC GCT GCG GTC TCA ACC CCC GCC TTT GCT GCC GTC CGC AAC TAT    159
Leu Leu Ala Ala Val Ser Thr Pro Ala Phe Ala Ala Val Arg Asn Tyr
 10                  15                  20                  25

AAG TTC GAC ATC AAG AAC GTC AAT GTC GCT CCC GAT GGC TTT CAG CGC    207
Lys Phe Asp Ile Lys Asn Val Asn Val Ala Pro Asp Gly Phe Gln Arg
                 30                  35                  40

TCT ATC GTC TCC GTC AAC GGT TTA GTT CCT GGC ACG TTG ATC ACG GCC    255
Ser Ile Val Ser Val Asn Gly Leu Val Pro Gly Thr Leu Ile Thr Ala
             45                  50                  55

AAC AAG GGT GAC ACC TTG CGC ATT AAT GTC ACG AAT CAA CTC ACG GAC    303
Asn Lys Gly Asp Thr Leu Arg Ile Asn Val Thr Asn Gln Leu Thr Asp
         60                  65                  70

CCT AGT ATG CGT CGT GCC ACA ACG ATT CAT TGG CAT GGA TTG TTC CAA    351
Pro Ser Met Arg Arg Ala Thr Thr Ile His Trp His Gly Leu Phe Gln
     75                  80                  85
```

```
GCT ACT ACC GCC GAC GAG GAT GGC CCC GCA TTC GTC ACG CAA TGC CCT    399
Ala Thr Thr Ala Asp Glu Asp Gly Pro Ala Phe Val Thr Gln Cys Pro
 90                  95                 100                 105

ATT GCG CAA AAT TTG TCC TAT ACA TAC GAG ATC CCA TTG CGC GGC CAA    447
Ile Ala Gln Asn Leu Ser Tyr Thr Tyr Glu Ile Pro Leu Arg Gly Gln
                110                 115                 120

ACA GGA ACC ATG TGG TAT CAC GCC CAT CTT GCG AGT CAA TAT GTC GAT    495
Thr Gly Thr Met Trp Tyr His Ala His Leu Ala Ser Gln Tyr Val Asp
            125                 130                 135

GGA TTG CGA GGC CCT TTG GTC ATC TAT GAT CCA AAC GAC CCA CAC AAG    543
Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Ile Tyr Asp Pro Asn Asp Pro His Lys
        140                 145                 150

TCG CGC TAC GAC GTG GAT GAT GCG AGC ACA GTA GTC ATG CTT GAG GAC    591
Ser Arg Tyr Asp Val Asp Asp Ala Ser Thr Val Val Met Leu Glu Asp
    155                 160                 165

TGG TAC CAT ACT CCG GCA CCC GTT CTA GAA AAG CAA ATG TTC TCG ACT    639
Trp Tyr His Thr Pro Ala Pro Val Leu Glu Lys Gln Met Phe Ser Thr
170                 175                 180                 185

AAT AAC ACC GCT CTG CTC TCT CCT GTT CCG GAC TCG GGT CTT ATC AAT    687
Asn Asn Thr Ala Leu Leu Ser Pro Val Pro Asp Ser Gly Leu Ile Asn
                190                 195                 200

GGC AAA GGG CGC TAT GTG GGC GGT CCC GCA GTT CCC CGG TCA GTA ATC    735
Gly Lys Gly Arg Tyr Val Gly Gly Pro Ala Val Pro Arg Ser Val Ile
            205                 210                 215

AAC GTA AAA CGT GGG AAA CGA TAT CGC TTG CGC GTA ATC AAC GCT TCT    783
Asn Val Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Arg Leu Arg Val Ile Asn Ala Ser
        220                 225                 230

GCT ATC GGG TCG TTT ACC TTT TCG ATC GAA GGA CAT AGT CTG ACT GTC    831
Ala Ile Gly Ser Phe Thr Phe Ser Ile Glu Gly His Ser Leu Thr Val
    235                 240                 245

ATT GAG GCC GAT GGG ATC CTG CAC CAG CCC TTG GCT GTT GAC AGC TTC    879
Ile Glu Ala Asp Gly Ile Leu His Gln Pro Leu Ala Val Asp Ser Phe
250                 255                 260                 265

CAG ATT TAC GCT GGA CAA CGC TAC TCT GTC ATC GTT GAA GCC AAC CAA    927
Gln Ile Tyr Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Val Ile Val Glu Ala Asn Gln
                270                 275                 280

ACC GCC GCC AAC TAC TGG ATT CGT GCA CCA ATG ACC GTT GCA GGA GCC    975
Thr Ala Ala Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Pro Met Thr Val Ala Gly Ala
            285                 290                 295

GGA ACC AAT GCA AAC TTG GAC CCC ACC AAT GTC TTT GCC GTA TTG CAC   1023
Gly Thr Asn Ala Asn Leu Asp Pro Thr Asn Val Phe Ala Val Leu His
        300                 305                 310

TAC GAG GGA GCG CCC AAC GCC GAA CCC ACG ACG GAA CAA GGC AGT GCT   1071
Tyr Glu Gly Ala Pro Asn Ala Glu Pro Thr Thr Glu Gln Gly Ser Ala
    315                 320                 325

ATC GGT ACT GCA CTC GTT GAA GAG AAC CTC CAT GCG CTC ATC AAC CCT   1119
Ile Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Asn Leu His Ala Leu Ile Asn Pro
330                 335                 340                 345

GGC GCT CCG GGC GGC TCC GCT CCC GCA GAC GTT TCC CTC AAT CTT GCA   1167
Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Pro Ala Asp Val Ser Leu Asn Leu Ala
                350                 355                 360
```

```
ATT GGG CGC AGC ACA GTT GAT GGG ATT CTT AGG TTC ACA TTT AAT AAC   1215
Ile Gly Arg Ser Thr Val Asp Gly Ile Leu Arg Phe Thr Phe Asn Asn
            365                 370                 375

ATC AAG TAC GAG GCT CCT TCG TTG CCC ACG CTC TTG AAG ATT TTG GCA   1263
Ile Lys Tyr Glu Ala Pro Ser Leu Pro Thr Leu Leu Lys Ile Leu Ala
        380                 385                 390

AAC AAT GCG AGC AAT GAC GCC GAT TTC ACG CCA AAT GAG CAC ACT ATC   1311
Asn Asn Ala Ser Asn Asp Ala Asp Phe Thr Pro Asn Glu His Thr Ile
    395                 400                 405

GTA TTG CCA CAC AAT AAA GTT ATC GAG CTC AAT ATC ACC GGA GGT GCA   1359
Val Leu Pro His Asn Lys Val Ile Glu Leu Asn Ile Thr Gly Gly Ala
410                 415                 420                 425

GAC CAC CCT ATC CAT CTC CAC GGC CAT GTG TTT GAT ATC GTC AAA TCA   1407
Asp His Pro Ile His Leu His Gly His Val Phe Asp Ile Val Lys Ser
                430                 435                 440

CTC GGT GGT ACC CCG AAC TAT GTC AAC CCG CCA CGC AGG GAC GTA GTT   1455
Leu Gly Gly Thr Pro Asn Tyr Val Asn Pro Pro Arg Arg Asp Val Val
            445                 450                 455

CGT GTC GGA GGC ACC GGT GTG GTA CTC CGA TTC AAG ACC GAT AAC CCA   1503
Arg Val Gly Gly Thr Gly Val Val Leu Arg Phe Lys Thr Asp Asn Pro
        460                 465                 470

GGC CCA TGG TTT GTT CAC TGC CAC ATT GAC TGG CAC TTG GAG GCT GGG   1551
Gly Pro Trp Phe Val His Cys His Ile Asp Trp His Leu Glu Ala Gly
    475                 480                 485

CTC GCA CTT GTC TTT GCC GAG GCC CCC AGC CAG ATT CGC CAG GGT GTC   1599
Leu Ala Leu Val Phe Ala Glu Ala Pro Ser Gln Ile Arg Gln Gly Val
490                 495                 500                 505

CAG TCG GTC CAG CCC AAC AAT GCC TGG AAC CAG CTC TGC CCC AAG TAC   1647
Gln Ser Val Gln Pro Asn Asn Ala Trp Asn Gln Leu Cys Pro Lys Tyr
                510                 515                 520

GCG GCT CTT CCT CCC GAT TTG CAG T                                1672
Ala Ala Leu Pro Pro Asp Leu Gln
            525
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:14 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 529 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:14:

```
Met Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Ala Val Ser Thr
  1               5                  10                  15

Pro Ala Phe Ala Ala Val Arg Asn Tyr Lys Phe Asp Ile Lys Asn Val
            20                  25                  30

Asn Val Ala Pro Asp Gly Phe Gln Arg Ser Ile Val Ser Val Asn Gly
        35                  40                  45

Leu Val Pro Gly Thr Leu Ile Thr Ala Asn Lys Gly Asp Thr Lau Arg
    50                  55                  60
```

Ile Asn Val Thr Asn Gln Leu Thr Asp Pro Ser Met Arg Arg Ala Thr
65 70 75 80

Thr Ile His Trp His Gly Leu Phe Gln Ala Thr Thr Ala Asp Glu Asp
85 90 95

Gly Pro Ala Phe Val Thr Gln Cys Pro Ile Ala Gln Asn Leu Ser Tyr
100 105 110

Thr Tyr Glu Ile Pro Leu Arg Gly Gln Thr Gly Thr Met Trp Tyr His
115 120 125

Ala His Leu Ala Ser Gln Tyr Val Asp Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val
130 135 140

Ile Tyr Asp Pro Asn Asp Pro His Lys Ser Arg Tyr Asp Val Asp Asp
145 150 155 160

Ala Ser Thr Val Val Met Leu Glu Asp Trp Tyr His Thr Pro Ala Pro
165 170 175

Val Leu Glu Lys Gln Met Phe Ser Thr Asn Asn Thr Ala Leu Leu Ser
180 185 190

Pro Val Pro Asp Ser Gly Leu Ile Asn Gly Lys Gly Arg Tyr Val Gly
195 200 205

Gly Pro Ala Val Pro Arg Ser Val Ile Asn Val Lys Arg Gly Lys Arg
210 215 220

Tyr Arg Leu Arg Val Ile Asn Ala Ser Ala Ile Gly Ser Phe Thr Phe
225 230 235 240

Ser Ile Glu Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Ile Leu
245 250 255

His Gln Pro Leu Ala Val Asp Ser Phe Gln Ile Tyr Ala Gly Gln Arg
260 265 270

Tyr Ser Val Ile Val Glu Ala Asn Gln Thr Ala Ala Asn Tyr Trp Ile
275 280 285

Arg Ala Pro Met Thr Val Ala Gly Ala Gly Thr Asn Ala Asn Leu Asp
290 295 300

Pro Thr Asn Val Phe Ala Val Leu His Tyr Glu Gly Ala Pro Asn Ala
305 310 315 320

Glu Pro Thr Thr Glu Gln Gly Ser Ala Ile Gly Thr Ala Leu Val Glu
325 330 335

Glu Asn Leu His Ala Leu Ile Asn Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Pro Ala Asp Val Ser Leu Asn Leu Ala Ile Gly Arg Ser Thr Val Asp
355 360 365

Gly Ile Leu Arg Phe Thr Phe Asn Asn Ile Lys Tyr Glu Ala Pro Ser
370 375 380

Leu Pro Thr Leu Leu Lys Ile Leu Ala Asn Asn Ala Ser Asn Asp Ala
385 390 395 400

Asp Phe Thr Pro Asn Glu His Thr Ile Val Leu Pro His Asn Lys Val
405 410 415

Ile Glu Leu Asn Ile Thr Gly Gly Ala Asp His Pro Ile His Leu His

```
                    420                 425                 430

Gly His Val Phe Asp Ile Val Lys Ser Leu Gly Gly Thr Pro Asn Tyr
        435                 440                 445

Val Asn Pro Pro Arg Arg Asp Val Val Arg Val Gly Gly Thr Gly Val
    450                 455                 460

Val Leu Arg Phe Lys Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Val His Cys
465                 470                 475                 480

His Ile Asp Trp His Leu Glu Ala Gly Leu Ala Leu Val Phe Ala Glu
                485                 490                 495

Ala Pro Ser Gln Ile Arg Gln Gly Val Gln Ser Val Gln Pro Asn Asn
            500                 505                 510

Ala Trp Asn Gln Leu Cys Pro Lys Tyr Ala Ala Leu Pro Pro Asp Leu
        515                 520                 525

Gln
```

Patenttivaatimukset

1. Nukleiinihappofragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää Rhizoctonian lakkaasia koodaavan nukleiinihapposekvenssin, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää Rhizoctonia solanin lakkaasia koodaavan sekvenssin.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:2 kuvattua aminohapposekvenssiä koodaavan nukleiinihapposekvenssin.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:4 kuvattua aminohapposekvenssiä koodaavan nukleiinihapposekvenssin.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sellaisen nukleiinihapposekvenssin, joka koodaa proteiinia, joka sisältää yhden tai useamman SEKVENSSEISSÄ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 tai 12 kuvatuista aminohapposekvensseistä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää nukleiinihapposekvenssin, joka koodaa SEKVENSSISSÄ ID NO:14 kuvattua aminohapposekvenssiä.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:1 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:3 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:13 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää NRRL B-21141:ssä olevan nukleiinihapposekvenssin.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää NRRL B-21142:ssä olevan nukleiinihapposekvenssin.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää RS22:n tuottamaa lakkaasia koodaavan nukleiinihapposekvenssin.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fragmentti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää NRRL B-21156:ssa olevan nukleiinihapposekvenssin.

14. Olennaisesti puhdas Rhizoctonian lakkaasientsyymi, t u n n e t t u siitä, että se toimii optimaalisesti pH-arvossa, joka on alueella noin 6,0 - 8,5.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se on Rhizoctonia solanin lakkaasi.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:2 kuvatun sekvenssin tai sekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti homologinen tämän suhteen.

17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:4 kuvatun sekvenssin tai sekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti homologinen tämän suhteen.

18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yhden tai useamman peptidisekvensseistä, jotka on esitetty SEKVENSSEISSÄ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, tai sekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti homologinen yhden tai useamman näiden peptidin suhteen.

19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:14 kuvatun sekvenssin tai sekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti homologinen tämän suhteen.

20. Yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sellaisen nukleiinihappofragmentin, joka sisältää sellaista Rhizoctonian lakkaasia koodaavan nukleiinihappo-sekvenssin, joka toimii optimaalisesti pH-alueella, joka on noin 6,0 - 8,5.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että fragmentti on liitetty toiminnallisesti promoottorisekvenssiin.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että promoottori on sienen tai hiivan promoottori.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että promoottori on Aspergillus oryzaen TAKA-amylaasipromoottori.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että promoottori on Aspergillus nigerin tai Aspergillus awamsiin glukoamylaasi (Glu A) -promoottori.

25. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se myös sisältää selektiomarkkerin.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että selektiomarkkeri on Aspergillus nidulansin tai Aspergillus oryzaen amdS-markkeri.

27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että selektiomarkkeri on Aspergillus nidulansin, Aspergillus nigerin, Aspergillus awamoriin tai Aspergillus oryzaen pyrG-markkeri.

28. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekä Aspergillus oryzaen TAKA-amylaasin promoottorin ja Aspergillus nidulansin tai Aspergillus oryzaen amdS- tai pyrG-markkerin.

29. Isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää heterologisen nukleiinihappofragmentin, joka sisältää optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5 toimivaa Rhizoctonian lakkaasia koodaavan nukleiinihapposekvenssin.

30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on sienisolu.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on Aspergillus-solu.

32. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että fragmentti on liitetty isäntäsolun genomiin.

33. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että fragmentti sisältyy vektoriin.

34. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää fragmentin, joka sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:2 kuvattua aminohapposekvenssiä koodaavan sekvenssin.

35. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää fragmentin, joka sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:4 kuvattua aminohapposekvenssiä koodaavan sekvenssin.

36. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää fragmentin, joka sisältää SEKVENSSISSÄ ID NO:14 kuvattua aminohapposekvenssiä koodaavan sekvenssin.

37. Patenttivaatimuksen 29 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää fragmentin, joka sisältää sekvenssin, joka koodaa yhtä tai useampaa SEKVENSSEISSÄ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 tai 12 kuvattua aminohapposekvenssiä.

38. Menetelmä sellaisen lakkaasientsyymin aikaansaamiseksi, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää sen, että viljellään isäntäsolua, joka sisältää optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5 toimivaa Rhizoctonian lakkaasientsyymiä koodaavaa nukleiinihapposekvenssiä sisältävän nukleiinihappofragmentin, entsyymin ilmentymiseen johtavissa olosuhteissa ja otetaan entsyymi talteen viljelmästä.

39. Menetelmä ligniinin tai lignosulfaattisubstraatin polymeroimiseksi liuoksessa, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sen, että substraatti saatetaan kosketukseen sellaisen Rhizoctonian lakkaasin kanssa, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5.

40. Menetelmä kraftmassan depolymeroimiseksi in situ -olosuhteissa, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sen, että massa saatetaan kosketukseen sellaisen Rhizoctonian lakkaasin kanssa, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5.

41. Menetelmä väriaineiden hapettamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sen, että saatetaan väriaine kosketukseen sellaisen Rhizoctonian lakkaasin kanssa, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5.

42. Menetelmä fenoliyhdisteiden polymeroimiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sen että fenoliyhdiste saatetaan kosketukseen sellaisen Rhizoctonian lakkaasin kanssa, joka toimii optimaalisesti pH-alueella noin 6,0 - 8,5.

```
   1 AGCGTCACACCAGACATCGGATGAAAACGGAAAGTGTATGCGCCATTTGACGTCTGCGGC    60

  61 AACCACTGTTCATCTCGCGAGCTAACATGGGCGACGTATAAGAAGAACGCGAGAATGGGC   120

 121 AGATTTCGATATCCCCTCTCGTCTCGGTTTTGGTCTCGGCTTGCCTCTAATGGCGCGCAC   180
                                                   M  A  R  T     4

 181 CACTTTCCTTGTCTCGGTTTCGCTCTTTGTTTCCGCTGTTCTTGCGCGCACCGTCGAGTA   240
   4   T  F  L  V  S  V  S  L  F  V  S  A  V  L  A  R  T  V  E  Y    24

 241 CGGCTTGAAGATTAGTGATGGGGAGATAGCTCCTGACGGTGTTAAGCGTAATGCGACTTT   300
  24   G  L  K  I  S  D  G  E  I  A  P  D  G  V  K  R  N  A  T  L    44

 301 GGgtacgcactccttgtaatccaacaattcaaggtttctgatgcttggtcagTAAATGGA   360
  44                                                   V  N  G     47

 361 GGGTATCCCGGTCCACTCATTTTTGCCAACAAGGGGGATACTCTCAAAGTCAAGGTCCAA   420
  47  G  Y  P  G  P  L  I  F  A  N  K  G  D  T  L  K  V  K  V  Q    67

 421 AACAAGCTCACGAATCCTGAGATGTATCGCACCACTTCCATCgtatgttcgttcgatatc   480
  67  N  K  L  T  N  P  E  M  Y  R  T  T  S  I                     81

 481 tactaatacatccgtcgctaaatatcttgtagCATTGGCACGGTCTCTTACAACATAGAA   540
  81                                   H  W  H  G  L  L  Q  H  R     90
```

FIG. 1A

```
541 ACGCCGACGACGACGGTCCTTCGTTCGTCACTCAGgtaggattctggaaggttggcctga   600
 90 N  A  D  D  D  G  P  S  F  V  T  Q                             102

601 actctctgttaaccgacaacccgatgtcaccagTGCCCGATTGTTCCACGCGAGTCGTAT   660
102                                   C  P  I  V  P  R  E  S  Y    111

661 ACTTACACCATACCTCTGGACGATCAAACCGGAACCTATTGGTACCATAGCCACTTGAGT   720
111  T  Y  T  I  P  L  D  D  Q  T  G  T  Y  W  Y  H  S  H  L  S   131

721 TCGCAATACGTTGATGGTCTTCGAGGCCCGCTGGTAATCTgtgagtatcttgacttgtct   780
131  S  Q  Y  V  D  G  L  R  G  P  L  V  I                       144

781 actgaaggcaacgagactaaaacaagcgtcgattcacagATGgttcgtctccccttttatt   840
144                                          Y                    145

841 tagctctggatcttcatttctcacgtaatacatgatagATCCCAAGGATCCTCACAGGCG   900
144                                       D  P  K  D  P  H  R  R   152

901 TTTGTATGATGTTGACGATGAGAAGACCGTCCTGATCATCGGTGACTGGTATCATGAATC   960
152   L  Y  D  V  D  D  E  K  T  V  L  I  I  G  D  W  Y  H  E  S   172

961 GTCCAAGGCAATCCTTGCTTCTGGTAACATTACCCGACAgtaagtgatacatgccggtcc  1020
172   S  K  A  I  L  A  S  G  N  I  T  R  Q                      185
```

FIG. 1B

18-03-96 96 1250

```
1021 cagaaaaattctctaaattcattttaattacagGCGACCGGTCTCTGCCACCATCAACGG 1080
 185                                  R  P  V  S  A  T  I  N  G   194

1081 CAAAGGTCGATTTGACCCTGACAACACTCCTGCCAACCCAGATACTCTGTACACCCTCAA 1140
 194   K  G  R  F  D  P  D  N  T  P  A  N  P  D  T  L  Y  T  L  K   214

1141 GGTCAAGCGAGGGAAGCGCTATCGTCTGCGTGTCATCAATAGCTCGGAGATCGCTTCGTT 1200
 214   V  K  R  G  K  R  Y  R  L  R  V  I  N  S  S  E  I  A  S  F   234

1201 CCGATTCAGTGTGGAAGGTCACAAGGTGACTGTGATTGCTGCCGATGGCGTCTCTACCAA 1260
 234   R  F  S  V  E  G  H  K  V  T  V  I  A  A  D  G  V  S  T  K   254

1261 ACCGTATCAGGTCGATGCGTTTGATATTCTAGCAGGACAGCGCATAGATTGCGTCgtaag 1320
 254   P  Y  Q  V  D  A  F  D  I  L  A  G  Q  R  I  D  C  V         272

1321 tgtcgtccgaacccacatctgagctcaagtgttgatacatgcgcgcttatagGTGGAGGC 1380
 272                                                  V  E  A   275

1381 GAACCAAGAACCCGACACATACTGGATCAACGCACCGCTGACCAACGTGCCCAACAAGAC 1440
 275   N  Q  E  P  D  T  Y  W  I  N  A  P  L  T  N  V  P  N  K  T   295

1441 CGCTCAGGCTCTCCTCGTTTATGAGGAGGATCGTCGGCCGTACCACCCTCCAAAGGGCCC 1500
 295   A  Q  A  L  L  V  Y  E  E  D  R  R  P  Y  H  P  P  K  G  P   315

1501 GTATCGCAAGTGGAGCGTCTCTGAGGCGATCATCAAGTACTGGAATCACAAGCACAAGCA 1560
 315   Y  R  K  W  S  V  S  E  A  I  I  K  Y  W  N  H  K  H  K  H   335
```

FIG. 1C

```
1561 CGGACGTGGTTTGCTGTCTGGACATGGAGGTCTCAAGGCTCGGATGATCGAGGGTAGCCA 1620
 335   G  R  G  L  L  S  G  H  G  G  L  K  A  R  M  I  E  G  S  H  340

1621 TCATCTGCATTCGCGCAGCGTCGTTAAGCGCCAGAATGAGACCACCACTGTTGTAATGGA 1680
 340   H  L  H  S  R  S  V  V  K  R  Q  N  E  T  T  T  V  V  M  D  350

1681 CGAGAGCAAGCTCGTTgtaagtaccatatttaaaagttggttgggtttcgaatacttatt 1740
 350   E  S  K  L  V

1741 tcaacttttcttagCCACTGGAATACCCCGGCGCTGCATGCGGGTCTAAACCTGCTGACC 1800
 350                 P  L  E  Y  P  G  A  A  C  G  S  K  P  A  D   365

1801 TCGTCTTGGATCTCACTTTTGGTTTGgtatgtagccaaatcgcccatatacaggatactg 1860
 365 L  V  L  D  L  T  F  G  L                                     374

1861 aatattgtttgtgcgtgtagAACTTTGCTACCGGGCACTGGATGATCAACGGTATCCCAT 1920
 374                       N  F  A  T  G  H  W  M  I  N  G  I  P   387

1921 ACGAGTCTCCCAAAATCCCCACATTGCTCAAGATCCTCACTGATGAGGACGGGGTTACCG 1980
 387 Y  E  S  P  K  I  P  T  L  L  K  I  L  T  D  E  D  G  V  T   407

1981 AGTCTGACTTgtatgttccctttttcggtatcttcgtatgcgtgcactgactcgtgctggt 2040
 407 E  S  D  F                                                    411

2041 gggaatttagCACCAAGGAGGAGCACACAGTCATACTCCCGAAGAACAAATGCATCGAAT 2100
 411             T  K  E  E  H  T  V  I  L  P  K  N  K  C  I  E   427
```

FIG. 1D

10-03-96 96 1250

```
2101 TCAACATCAAGGGGAACTCGGGTATTCCCATTACGCACCCCGTACATCTTCACGGTgtaa 2160
 427 F  N  I  K  G  N  S  G  I  P  I  T  H  P  V  H  L  H  G       446

2161 gtgcatatcggatggtttacgatactaaggctcatcaacttttagCACACTTGGGATGT 2220
 446                                                H  T  W  D  V  451

2221 CGTACAATTTGGCAACAACCCACCCAATTATGTCAATCCTCCCCGTAGGGACGTGGTTGG 2280
 451   V  Q  F  G  N  N  P  P  N  Y  V  N  P  P  R  R  D  V  V  G  471

2281 CTCTACAGATGCGGGTGTGAGGATTCAGTTCAAGACCGACAATCCAGGACCGTGGTTCCT 2340
 471   S  T  D  A  G  V  R  I  Q  F  K  T  D  N  P  G  P  W  F  L  491

2341 GCACTGgtgcgtcggtccccatcgtccgttatggtttttctaatacgtcccattctattt 2400
 491   H  C                                                        493

2401 tagCCATATTGACTGGCATCTTGAGGAGGGTTTCGCAAgtgagtactgagacctaagtgc 2460
 493      H  I  D  W  H  L  E  E  G  F  A                          504

2461 tactcggctcattactgattaccgcatgtatgcgtctagTGGTGTTTGCTGAAGCGCCCG 2520
 504                                        M  V  F  A  E  A  P    511

2521 AAGCCGTCAAGGGAGGTCCAAAGAGCGTGGCCGTGGACTCTCAGTGGGAAGGGCTGTGTG 2580
 511 E  A  V  K  G  G  P  K  S  V  A  V  D  S  Q  W  E  G  L  C  531

2581 GCAAGTACGACAACTGGCTAAAATCAAATCCGGGCCAGCTGTAGGCGTATCGCAGCCACA 2640
 531 G  K  Y  D  N  W  L  K  S  N  P  G  Q  L  *                 545
```

FIG. 1E

18-03-96 96 1250

```
2641 TTGGTGATGATTGAAAGTTGCATCTTGTTCCTATAACCGGCTCTTATATACGGGTGTCTC 2700

2701 CCAGTAAAGTCGTAGCCCAATTTCAGCCGAGACAGATATTTAGTGGACTCTTACTCTTGT 2760

2761 GTCCCATTGACGCACATCGTTGCATCAAACCTGCTTTTTATCGTCCCTCTTTGTAATTTG 2820

2821 TGTTGCTGTAATGTATCG                                          2838
```

FIG. 1F

```
   1 AAGCTTCGGCATGGATTGCATTTTGTATTGT                                    180

 181 AAACAAGTTACGAGAAAAACAATAGATCAGTTTTTGCCGAATCGGATGGCTTGAAACGGA      240

 241 AGTACCGATGGCCGATCCGAGTCGAATGAATTAACGCATCTGAAACGGGACCCTGAGTCG      300

 301 AGGCACCCGCCGGCCTTGGCCGTATAAGTCACTTGTCGCCAACTAGCACTTTTTCATTCC      360

 361 CCCTTTTCTTCTTCCTCGTCTTCTTCTTCTCTATGGCTCGGTCGACTACTTCACTCTTTG      420
   1                                   M  A  R  S  T  T  S  L  F       10

 421 CACTGTCTCTGGCCGCACCGGCCTTGGCTCGAGTCGTTGACTATGGGTTTGATGTGGCTA      480
  10 A  L  S  L  A  A  P  A  L  A  R  V  V  D  Y  G  F  D  V  A       30

 481 ATGGGGCAGTTGCTCCGGATGGTGTAACAAGGAACGCGGTTCTCGgtgagttagctgtaa      540
  30 N  G  A  V  A  P  D  G  V  T  R  N  A  V  L                     45

 541 gatggtgtatatgctggttgcctaacgggaatgtcagTCAATGGTCGCTTCCCTGGTCCA      600
  45                                       V  N  G  R  F  P  G  P       53

 601 TTGATCACCGCCAACAAGGGGGATACACTTAAAATCACCGTGCGGAATAAACTCTCCGAT      660
  53  L  I  T  A  N  K  G  D  T  L  K  I  T  V  R  N  K  L  S  D       73
```

FIG. 2A

```
 661 CCAACTATGCGAAGGAGCACGACCATCgttagtacttcccctcatctgtcttgaaacttt  720
  73  P  T  M  R  R  S  T  T  I                                      82

 721 ctcatctttttgaagCACTGGCACGGTCTGCTCCAACACAGGACGGCAGAAGAAGATGG  780
  82                 H  W  H  G  L  L  Q  H  R  T  A  E  E  D  G   97

 781 CCCGGCCTTTGTAACCCAGgtatgccttatcctatcgctgctctgtccccgcgtccttcc  840
  97   P  A  F  V  T  Q                                            103

 841 ctgactcgggcgattctagTGCCCGATTCCTCCGCAAGAATCGTACACCTATACGATGCC  900
 103                    C  P  I  P  P  Q  E  S  Y  T  Y  T  M  P  117

 901 GCTCGGCGAACAGACCGGCACGTATTGGTACCACAGCCACTTGAGCTCCCAGTATGTGGA  960
 117   L  G  E  Q  T  G  T  Y  W  Y  H  S  H  L  S  S  Q  Y  V  D  137

 961 CGGGTTGCGTGGGCCCATCGTTATTTgtaagtcttcatttaaccttattcttggctatgg 1020
 137   G  L  R  G  P  I  V  I                                      145

1021 ctgattgtgacgtcgtggttagATGgttcgtggcttccacaagaagtcagcagcccttga 1080
 145                       Y                                      145

1081 agctaactttattccagACCCCCACGACCCGTACAGAAACTACTATGATGTCGACGACGA 1140
 145                 D  P  H  D  P  Y  R  N  Y  Y  D  V  D  D  E  160

1141 GCGTACGGTCTTTACTTTAGCAGACTGGTACCACACGCCGTCGGAGGCTATCATTGCCAC 1200
 160   R  T  V  F  T  L  A  D  W  Y  H  T  P  S  E  A  I  I  A  T  180
```

FIG. 2B

18·03·96 96.1260

```
1201 CCACGATGTCTTGAAAACgtacgcgttaatccttctagctttctttccttgggtcacttt 1260
 180   H  D  V  L  K  T                                           185

1261 ctatcagGATCCCCGACTCGGGTACGATCAACGGCAAAGGCAAATACGATCCTGCTTCGG 1320
 185          I  P  D  S  G  T  I  N  G  K  G  K  Y  D  P  A  S   202

1321 CTAACACCAACAACACGACACTCGAGAACCTCTACACTCTCAAAGTCAAACGCGGCAAGC 1380
 202 A  N  T  N  N  T  T  L  E  N  L  Y  T  L  K  V  K  R  G  K   222

1381 GGTATCGCCTGAGGATTATCAACGCCTCGGCCATCGCTTCGTTCCGGTTCGGCGTGCAGG 1440
 222 R  Y  R  L  R  I  I  N  A  S  A  I  A  S  F  R  F  G  V  Q   242

1441 GCCACAAGTGCACGATCATCGAGGCTGATGGCGTCCTCACCAAACCGATCGAGGTCGATG 1500
 242 G  H  K  C  T  I  I  E  A  D  G  V  L  T  K  P  I  E  V  D   262

1501 CGTTTGATATTCTAGCAGGCCAGAGGTATAGCTGCATCgtaagtctacctatgccttgtt 1560
 262 A  F  D  I  L  A  G  Q  R  Y  S  C  I                       275

1561 gtggagataagaacctgactgaatgtatgcgctccaatagTTGAAGGCCGACCAAGATCC 1620
 275                                          L  K  A  D  Q  D  P   282

1621 TGATTCCTACTGGATAAATGCGCCAATCACAAACGTTCTCAACACCAACGTCCAGGCATT 1680
 282   D  S  Y  W  I  N  A  P  I  T  N  V  L  N  T  N  V  Q  A  L   302

1681 GCTAGTGTATGAAGATGACAAGCGTCCTACTCACTACCCCTGGAAGCCGTTTTTGACATG 1740
 302   L  V  Y  E  D  D  K  R  P  T  H  Y  P  W  K  P  F  L  T  W   322
```

FIG. 2C

19-03-96 96.1250

```
1741 GAAGATATCAAATGAAATCATTCAGTACTGGCAGCACAAGCACGGGTCGCACGGTCACAA 1800
 322   K  I  S  N  E  I  I  Q  Y  W  Q  H  K  H  G  S  H  G  H  K   342

1801 GGGAAAGGGGCATCATCATAAAGTCCGGGCCATTGGAGGTGTATCCGGGTTGAGCTCCAG 1860
 342   G  K  G  H  H  H  K  V  R  A  I  G  G  V  S  G  L  S  S  R   362

1861 GGTTAAGAGCCGGGCGAGTGACCTATCGAAGAAGGCTGTCGAGTTGGCTGCTGCACTCGT 1920
 349   V  K  S  R  A  S  D  L  S  K  K  A  V  E  L  A  A  A  L  V   349

1921 TGCGGGTGAGGCCGAGTTGGACAAGAGGCAGAATGAGGATAATTCGACTATTGTATTGGA 1980
 349   A  G  E  A  E  L  D  K  R  Q  N  E  D  N  S  T  I  V  L  D   361

1981 TGAGACCAAGCTTATTgtaagtcccttaatttttttcggtgtcacggaagctaacccgcg 2040
 361   E  T  K  L  I                                                361

2041 taatagCCGTTGGTTCAACCTGGTGCACCGGGCGGCTCCAGACCAGCTGACGTCGTGGTC 2100
 361         P  L  V  Q  P  G  A  P  G  G  S  R  P  A  D  V  V  V   379

2101 CCTCTGGACTTTGGCCTCgtatgtggcttcttgttattcgtccggaatgcaaactgattt 2160
 379   P  L  D  F  G  L                                            385

2161 gggtgggctatagAACTTTGCCAACGGACTGTGGACGATAAACAATGTCTCCTACTCCCC 2220
 385                  N  F  A  N  G  L  W  T  I  N  N  V  S  Y  S  P   401

2221 TCCGGATGTCCCTACTCTCCTCAAGATCTTGACCGACAAAGACAAAGTCGACGCTTCTGA 2280
 401   P  D  V  P  T  L  L  K  I  L  T  D  K  D  K  V  D  A  S  D   421
```

FIG. 2D

```
2281 CTTgtaggttcctcttcttcttttcaaactagctactgacattaagtgaacgtcagCACG 2340
 421   F                                                       T   423

2341 GCCGATGAACACACGTATATTCTTCCAAAGAACCAAGTTGTCGAGTTGCACATCAAGGGA 2400
 423  A  D  E  H  T  Y  I  L  P  K  N  Q  V  V  E  L  H  I  K  G   453

2401 CAGGCTTTGGGAATCGTACACCCCCTTCATCTGCATGGCgtacgtctttctcacactgtt 2460
 453  Q  A  L  G  I  V  H  P  L  H  L  H  G                       466

2461 ccagctcctattctctaacacactcctgcgatagCATGCGTTCGACGTCGTCCAATTCGG 2520
 466                                   H  A  F  D  V  V  Q  F  G   475

2521 CGACAACGCTCCAAACTACGTGAACCCTCCGCGTAGGGATGTAGTAGGCGTAACTGATGC 2580
 475   D  N  A  P  N  Y  V  N  P  P  R  R  D  V  V  G  V  T  D  A   495

2581 TGGAGTCCGTATCCAGTTCAGAACCGATAACCCGGGCCCTTGGTTCCTCCATTGgtatgc 2640
 495   G  V  R  I  Q  F  R  T  D  N  P  G  P  W  F  L  H  C         513

2641 tcttcatctcccaccgcttgttctttacttatggtttaccttgcgatttagCCACATTGA 2700
 513                                                   H  I  D   516

2701 TTGGCACTTGGAAGAAGGATTTGCTAgtaagttattattcctattccgaagcatcgggga 2760
 516   W  H  L  E  E  G  F  A                                     524

2761 gatgctaaccaagggtgtgttttaagTGGTATTCGCCGAAGCGCCTGAAGATATCAAGAA 2820
 524                          M  V  F  A  E  A  P  E  D  I  K  K   536
```

FIG. 2E

```
2821 AGGCTCTCAGAGTGTCAAGCCTGACGGACAATGGAAGAAACTATGCGAGAAGTATGAGAA 2880
 536   G  S  Q  S  V  K  P  D  G  Q  W  K  K  L  C  E  K  Y  E  K  556

2881 GTTGCCTGAAGCACTGCAGTGAAGTTGCAGTTGTTTCCCATTCGGGAACTGGCTCACTAT 2940
 556   L  P  E  A  L  Q  *                                        562

2941 TCCTTTTGCATAATTCGGACTTTTATTTTGGGACATTATTGGACTATGCATTTGTTTGTC 3000


3001 ACACCGCGGAACTAAGCCGAATTC
```

FIG. 2F

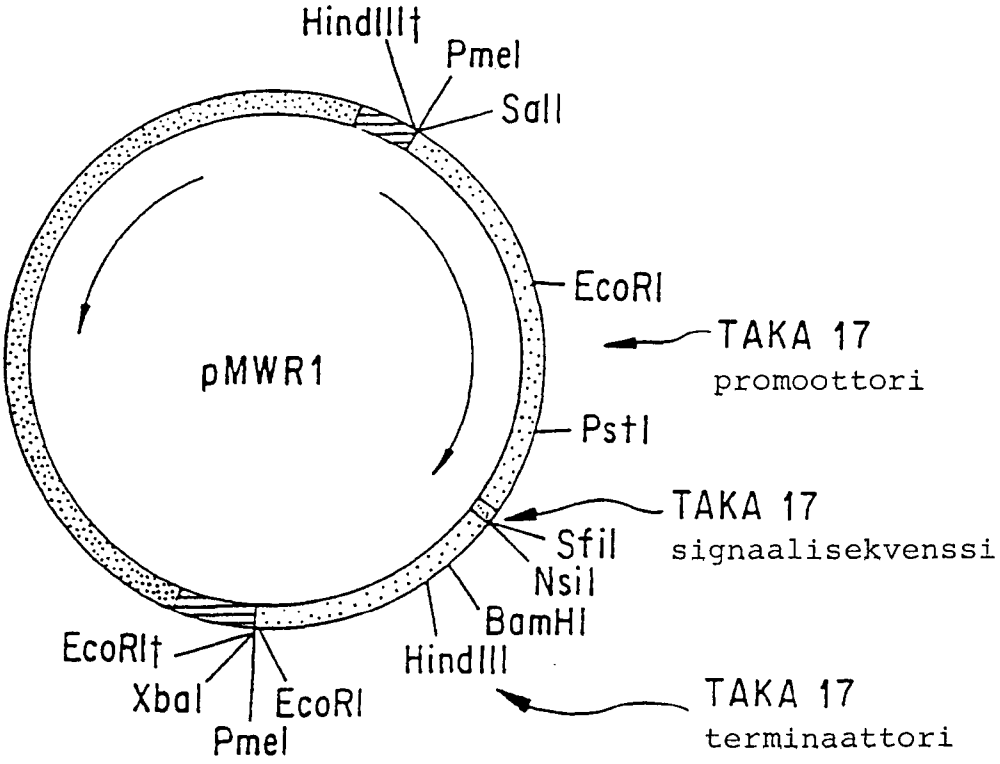
HindIII†
PmeI
SalI
EcoRI
TAKA 17
promoottori
pMWR1
PstI
TAKA 17
signaalisekvenssi
SfiI
NsiI
BamHI
HindIII
EcoRI†
XbaI
EcoRI
PmeI
TAKA 17
terminaattori

FIG. 3

			87			96			105			114			123			132
5'	ATG	CTT	TCT	AGC	ATT	ACC	CTC	CTA	CCT	TTG	CTC	GCT	GCG	GTC	TCA	ACC	CCC	GCC
	M	L	S	S	I	T	L	L	P	L	L	A	A	V	S	T	P	A
			141			150			159			168			177			186
	TTT	GCT	GCC	GTC	CGC	AAC	TAT	AAG	TTC	GAC	ATC	AAG	AAC	GTC	AAT	GTC	GCT	CCC
	F	A	A	V	R	N	Y	K	F	D	I	K	N	V	N	V	A	P
			195			204			213			222			231			240
	GAT	GGC	TTT	CAG	CGC	TCT	ATC	GTC	TCC	GTC	AAC	GGT	TTA	GTT	CCT	GGC	ACG	TTG
	D	G	F	Q	R	S	I	V	S	V	N	G	L	V	P	G	T	L
			249			258			267			276			285			294
	ATC	ACG	GCC	AAC	AAG	GGT	GAC	ACC	TTG	CGC	ATT	AAT	GTC	ACG	AAT	CAA	CTC	ACG
	I	T	A	N	K	G	D	T	L	R	I	N	V	T	N	Q	L	T
			303			312			321			330			339			348
	GAC	CCT	AGT	ATG	CGT	CGT	GCC	ACA	ACG	ATT	CAT	TGG	CAT	GGA	TTG	TTC	CAA	GCT
	D	P	S	M	R	R	A	T	T	I	H	W	H	G	L	F	Q	A

FIG. 4A

		357			366			375			384			393			402
ACT	ACC	GCC	GAC	GAG	GAT	GGC	CCC	GCA	TTC	GTC	ACG	CAA	TGC	CCT	ATT	GCG	CAA
T	T	A	D	E	D	G	P	A	F	V	T	Q	C	P	I	A	Q
		411			420			429			438			447			456
AAT	TTG	TCC	TAT	ACA	TAC	GAG	ATC	CCA	TTG	CGC	GGC	CAA	ACA	GGA	ACC	ATG	TGG
N	L	S	Y	T	Y	E	I	P	L	R	G	Q	T	G	T	M	W
		465			474			483			492			501			510
TAT	CAC	GCC	CAT	CTT	GCG	AGT	CAA	TAT	GTC	GAT	GGA	TTG	CGA	GGC	CCT	TTG	GTC
Y	H	A	H	L	A	S	Q	Y	V	D	G	L	R	G	P	L	V
		519			528			537			546			555			564
ATC	TAT	GAT	CCA	AAC	GAC	CCA	CAC	AAG	TCG	CGC	TAC	GAC	GTG	GAT	GAT	GCG	AGC
I	Y	D	P	N	D	P	H	K	S	R	Y	D	V	D	D	A	S
		573			582			591			600			609			618
ACA	GTA	GTC	ATG	CTT	GAG	GAC	TGG	TAC	CAT	ACT	CCG	GCA	CCC	GTT	CTA	GAA	AAG
T	V	V	M	L	E	D	W	Y	H	T	P	A	P	V	L	E	K

FIG. 4B

		627			636			645			654			663			672
CAA	ATG	TTC	TCG	ACT	AAT	AAC	ACC	GCT	CTG	CTC	TCT	CCT	GTT	CCG	GAC	TCG	GGT
Q	M	F	S	T	N	N	T	A	L	L	S	P	V	P	D	S	G
		681			690			699			708			717			726
CTT	ATC	AAT	GGC	AAA	GGG	CGC	TAT	GTG	GGC	GGT	CCC	GCA	GTT	CCC	CGG	TCA	GTA
L	I	N	G	K	G	R	Y	V	G	G	P	A	V	P	R	S	V
		735			744			753			762			771			780
ATC	AAC	GTA	AAA	CGT	GGG	AAA	CGA	TAT	CGC	TTG	CGC	GTA	ATC	AAC	GCT	TCT	GCT
I	N	V	K	R	G	K	R	Y	R	L	R	V	I	N	A	S	A
		789			798			807			816			825			834
ATC	GGG	TCG	TTT	ACC	TTT	TCG	ATC	GAA	GGA	CAT	AGT	CTG	ACT	GTC	ATT	GAG	GCC
I	G	S	F	T	F	S	I	E	G	H	S	L	T	V	I	E	A
		843			852			861			870			879			888
GAT	GGG	ATC	CTG	CAC	CAG	CCC	TTG	GCT	GTT	GAC	AGC	TTC	CAG	ATT	TAC	GCT	GGA
D	G	I	L	H	Q	P	L	A	V	D	S	F	Q	I	Y	A	G

FIG. 4C

```
          897         906         915         924         933         942
CAA CGC TAC TCT GTC ATC GTT GAA GCC AAC CAA ACC GCC GCC AAC TAC TGG ATT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Q   R   Y   S   V   I   V   E   A   N   Q   T   A   A   N   Y   W   I

          951         960         969         978         987         996
CGT GCA CCA ATG ACC GTT GCA GGA GCC GGA ACC AAT GCA AAC TTG GAC CCC ACC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 R   A   P   M   T   V   A   G   A   G   T   N   A   N   L   D   P   T

         1005        1014        1023        1032        1041        1050
AAT GTC TTT GCC GTA TTG CAC TAC GAG GGA GCG CCC AAC GCC GAA CCC ACG ACG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 N   V   F   A   V   L   H   Y   E   G   A   P   N   A   E   P   T   T

         1059        1068        1077        1086        1095        1104
GAA CAA GGC AGT GCT ATC GGT ACT GCA CTC GTT GAA GAG AAC CTC CAT GCG CTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 E   Q   G   S   A   I   G   T   A   L   V   E   E   N   L   H   A   L

         1113        1122        1131        1140        1149        1158
ATC AAC CCT GGC GCT CCG GGC GGC TCC GCT CCC GCA GAC GTT TCC CTC AAT CTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 I   N   P   G   A   P   G   G   S   A   P   A   D   V   S   L   N   L
```

FIG. 4D

```
        1167         1176         1185         1194         1203         1212
GCA ATT GGG CGC AGC ACA GTT GAT GGG ATT CTT AGG TTC ACA TTT AAT AAC ATC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 A   I   G   R   S   T   V   D   G   I   L   R   F   T   F   N   N   I

        1221         1230         1239         1248         1257         1266
AAG TAC GAG GCT CCT TCG TTG CCC ACG CTC TTG AAG ATT TTG GCA AAC AAT GCG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 K   Y   E   A   P   S   L   P   T   L   L   K   I   L   A   N   N   A

        1275         1284         1293         1302         1311         1320
AGC AAT GAC GCC GAT TTC ACG CCA AAT GAG CAC ACT ATC GTA TTG CCA CAC AAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 S   N   D   A   D   F   T   P   N   E   H   T   I   V   L   P   H   N

        1329         1338         1347         1356         1365         1374
AAA GTT ATC GAG CTC AAT ATC ACC GGA GGT GCA GAC CAC CCT ATC CAT CTC CAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 K   V   I   E   L   N   I   T   G   G   A   D   H   P   I   H   L   H

        1383         1392         1401         1410         1419         1428
GGC CAT GTG TTT GAT ATC GTC AAA TCA CTC GGT GGT ACC CCG AAC TAT GTC AAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 G   H   V   F   D   I   V   K   S   L   G   G   T   P   N   Y   V   N
```

FIG. 4E

```
      1437        1446        1455        1464        1473        1482
CCG CCA CGC AGG GAC GTA GTT CGT GTC GGA GGC ACC GGT GTG GTA CTC CGA TTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 P   P   R   R   D   V   V   R   V   G   G   T   G   V   V   L   R   F

      1491        1500        1509        1518        1527        1536
AAG ACC GAT AAC CCA GGC CCA TGG TTT GTT CAC TGC CAC ATT GAC TGG CAC TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 K   T   D   N   P   G   P   W   F   V   H   C   H   I   D   W   H   L

      1545        1554        1563        1572        1581        1590
GAG GCT GGG CTC GCA CTT GTC TTT GCC GAG GCC CCC AGC CAG ATT CGC CAG GGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 E   A   G   L   A   L   V   F   A   E   A   P   S   Q   I   R   Q   G

      1599        1608        1617        1626        1635        1644
GTC CAG TCG GTC CAG CCC AAC AAT GCC TGG AAC CAG CTC TGC CCC AAG TAC GCG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 V   Q   S   V   Q   P   N   N   A   W   N   Q   L   C   P   K   Y   A

      1653        1662
GCT CTT CCT CCC GAT TTG CAG T 3'
--- --- --- --- --- --- --- -
 A   L   P   P   D   L   Q
```

FIG. 4F

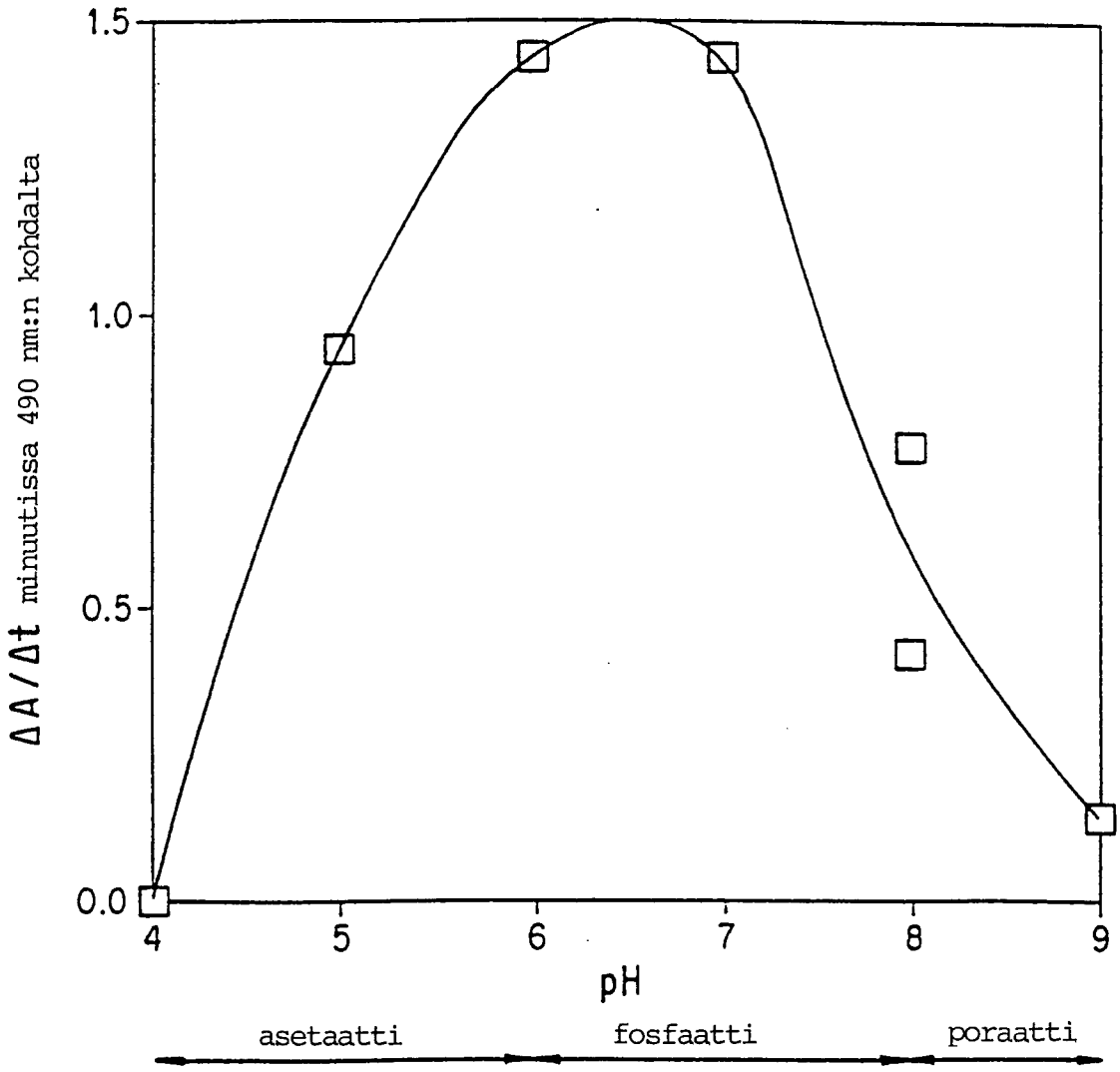
1.5
1.0
0.5
0.0
ΔA/Δt minuutissa 490 nm:n kohdalta
4
5
6
7
8
9
pH
asetaatti
fosfaatti
poraatti

FIG. 5

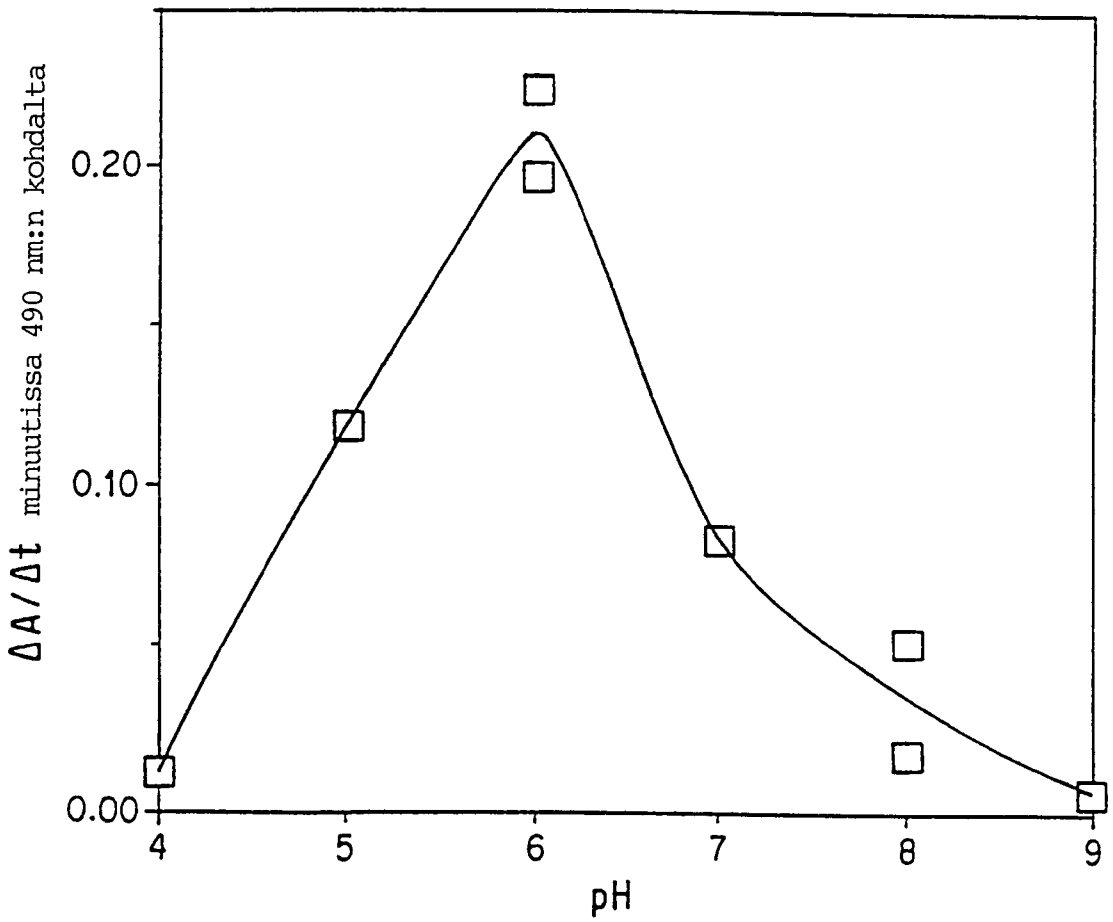

FIG. 6