(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 965031 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 965031

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/80
C12N 1/15
C07K 14/38
C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.06.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.12.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.12.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **19.06.1995 PCT/DK1995/000254**

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

17.06.1994 DK 0717/94

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Novo Nordisk A/S,** Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Christensen, Tove,** Danmark, TANSKA, (DK)
2 •**Hynes, Michael J.,** Parkville, VIC 3052, AUSTRALIA, (AU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Sieni, jossa AreA-geeni on muunnettu, ja Aspergillus oryzaesta peräisi n oleva areA-geeni

Svamp med en modifierad areA-gen och en areA-gen från Aspergillus oryz ae

Sieni, jossa *areA*-geeni on muunnettu, ja *Aspergillus oryzaesta* peräisin oleva *areA*-geeni – Svamp med en modifierad *areA*-gen och en *areA*-gen från *Aspergillus oryzae*

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee sieniä, jotka eivät tuota proteaaseja. Keksinnön mukaisia sieniä voidaan käyttää isäntinä proteiinien, joita tavallisesti tuotetut proteaasit voivat proteolyyttisesti hajottaa, tuottamiseksi, ja keksintö koskeekin menetelmiä kysymyksessä olevien proteiinien tuottamiseksi suurina saantoina käyttämällä keksinnön mukaisia sieniä. Keksintö koskee myös menetelmiä sellaisten sienien tuottamiseksi ja näissä menetelmissä käytettäviä DNA-rakenteita.

Keksinnön tausta

Sieniä, erityisesti rihmasieniä, käytetään laajalti kaupallisesti, koska ne kykenevät erittämään huomattavia määriä proteiineja.

Rihmasienistä *Aspergillus*-sukuun kuuluvia lajeja on käytetty kauan kaupallisesti endogeenisten ja hiljakkoin myös heterologisten proteiinien tuottamiseen.

Eräs haitta useimmissa mikro-organismeissa, joita käytetään proteiinien tuottamiseen, on niiden luontainen proteaasien tuotanto, joka saattaa altistaa kysymyksessä olevan proteiinituotteen proteolyysin vaikutuksesta tapahtuvalle hajoamiselle.

Tämän välttämiseksi on ajateltu erilaisia keinoja. Muiden ratkaisujen joukossa on ehdotettu eri proteaaseja koodaavien geenien poistamista tai katkaisemista. Valitettavasti sienet tuottavat suuren määrän proteaaseja, mikä tekee tällaisesta ratkaisusta jokseenkin epärealistisen.

Niinpä tarvitaan yhä rihmasienikantoja, jotka eivät tuota ollenkaan tai hyvin vähän proteaasia.

Muutamia vuosia on tiedetty, että säätelygeeni *areA*, joka välittää typen metaboliittien estoa *A. nidulansissa*, vaikuttaa solunulkoisten proteaasien tuotantoon [Arst & Cove, *Molec. Gen. Genet.* **126**, (1973) 111-141].

A. nidulansista peräisin oleva *areA*-geeni on kloonattu [Caddick *et al.*, *EMBO Jour-*

nal **5**, (1986) 1087-1090] ja siihen on tehty erilaisia muutoksia tämän geenin koodaaman aktivaattoriproteiinin eri alueiden toimintojen määrittämiseksi [Stankovitch *et al., Mol. Microbiol.* 7, (1993) 81-87]. Lisäksi äskettäin on ilmeisesti kloonattu geeni, joka koodaa vastaavaa toimintoa *A. fumigatuksessa* (Hensel *et al.*, 2nd European Conference on Fungal Genetics, April 28 to May 1, 1994, Book of Abstracts, E11).

Kirjallisuudesta tunnetaan myös ainoastaan yksi erään *A. nidulansin* kannan, jonka genotyyppi on *arg*B *areA*1, käyttö isäntänä t-PA:n tuottamiseksi [Upshall *et al.*, *Biotechnology* **5**, (1987) 1301-1304]. Tässä esimerkissä käytetään ainoastaan *arg*B-genotyyppiä valintamarkkerina sen arginiiniprototrofian avulla, kun taas *are*A-genotyyppi on pelkästään sattumaa.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on lievittää proteaasittomien rihmasienten tarvetta.

Yhteenveto keksinnöstä

Esillä oleva keksintö koskee siis sieniä, joissa *are*A-geeni on muunnettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla sellaiseksi, että se ei pysty ilmentymään siten, että muodostuu funktionaalista AreA-aktivaattoria.

Keksintö koskee vielä menetelmiä sellaisten sienten, jotka on saatu poistamalla *are*A-geeni, tuottamiseksi.

Tähän päästään menetelmällä, jossa

i) *are*A-geeni kloonataan kysymyksessä olevasta sienestä,

ii) tuotetaan DNA-rakenne, joka käsittää *are*A-geenin, jossa jokin sen sisäinen osa on substituoitu, deletoitu tai tai siihen on sijoitettu ylimääräistä DNA:ta,

iii) mainittu sieni transformoidaan rakenteella ja

iv) seulotaan transformantit, jotka ovat *areA*$^-$.

Edellä mainitusta *are*A-geenin kloonauksesta saatua informaatiota voidaan käyttää myös tunnetun antisense-tekniikan yhteydessä ilmentämisplasmidin rakentamiseksi, joka aikaansaa *are*A-geenistä transskriboidulle mRNA:lle komplementaarisen RNA-molekyylin synteesin, ja kysymyksessä olevan sienen transformoimiseksi sillä.

Keksintö koskee lisäksi DNA-rakenteita, jotka on tarkoitettu käytettäviksi edellä mainituissa menetelmissä.

Keksintö koskee vielä menetelmiä halutun proteiinin tai geenituotteen valmistamiseksi, erityisesti erittyneiden proteiinien, jolloin sieni-isäntää, joka on muunnettu ja valinnaisesti transformoitu DNA-rakenteella, joka käsittää ainakin yhden kysymyksessä olevaa proteiinia tai geenituotetta koodaavan DNA-sekvenssin, viljellään sopivassa kasvualustassa sopivissa olosuhteissa ja haluttu geenituote otetaan talteen ja puhdistetaan.

Keksintöä työstettäessä todettiin yllättävästi, että keksinnön mukaiset sienet tuottavat sellaisia erittyneitä proteiineja paljon parempina saantoina.

Samoin todettiin yllättävästi, että ainoa typenlähde, joka pystyi aikaansaamaan *A. oryzae areA* -kantojen hyvän kasvun, oli glutamiini.

Lopuksi vielä keksintö koskee proteiinituotteita, jotka on tuotettu edellä mainituilla menetelmillä.

Lyhyt piirustusten kuvaus

Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavissa selityksen osissa viitaten esimerkkeihin ja piirustuksiin, joissa

kuvio 1 esittää HowB101:n rakentamiseen käytettyjä vaiheita,
kuvio 2 esittää pSK5:n ja pSK9:n rakentamiseen käytettyjä vaiheita,
kuvio 3a ja kuvio 3b esittävät pToC266:n rakentamiseen käytettyjä vaiheita,
kuvio 4 esittää pMT1606:n rakentamiseen käytettyjä vaiheita ja
kuvio 5 esittää pToC56:n rakentamiseen käytettyjä vaiheita.

Määritelmät

Esillä olevassa selityksessä käytetään seuraavia määritelmiä.

Ilmaisu *areA*Δ tarkoittaa kantaa, josta *areA*-geeni on poistettu.

Ilmaisu *areA*$^-$ tarkoittaa kantaa, joka ei tuota funktionaalista AreA-aktivaattoria. Tätä tarkoittamaan käytetään myös usein myös termiä "funktion menetys".

Ilmaisu "antisense-tekniikka" kuvaa menetelmiä, joita selitetään US-patentissa n:o 5 190 931.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Kuten mainittiin, esillä oleva keksintö koskee ensimmäisen aspektinsa mukaan sieniä, joista *areA*-geeni on muunnettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla sellaiseksi, että se ei voi ilmentyä siten, että se tuottaa funktionaalista AreA-aktivaattoria.

Tähän tavoitteeseen voidaan päästä erityisesti poistamalla tai katkaisemalla *areA*-geeni.

areA-geenin kloonaus kuvataan esimerkeissä.

Muista sienistä peräisin olevia *areA*-homologeja voitaisiin kloonata joko ristihybridisoimalla jonkin jo tunnetun geenin kanssa tai komplementoimalla *areA*-mutantteja; esimerkiksi *A. nidulans areA*-18 tai *A. oryzaen areA*-deletoitu kanta, joka kuvataan tässä hakemuksessa.

Menetelmiä geenin poistamiseksi tai katkaisemiseksi kuvataan erityisesti julkaisussa WO 90/00192 (Genencor).

Menetelmiä DNA:n substituoimiseksi geenissä tunnetaan myös yleisesti ja se voidaan toteuttaa substituoimalla yksi tai useampi jatkuva osa geenistä, mutta se voidaan toteuttaa myös ohjatulla mutageneesilla luomalla DNA-sekvenssi, joka koodaa AreA-aktivaattorimuunnosta, joka ei ole funktionaalinen.

Toinen menetelmä, jolla sellaiseen tulokseen voidaan päästä, on käyttää antisense-tekniikkaa.

Antisense-tekniikkaa ja sen käyttöä kuvataan yksityiskohtaisesti edellä mainitussa US-patentissa n:o 5 190 931 (University of New York).

Vielä eräs menetelmä mainitun inaktivoinnin aikaansaamiseksi on sijoittaa ylimääräistä DNA:ta *areA*-geenin sisään, jolloin saadaan ilmentymään dysfunktionaalinen aktivaattoriproteiini.

Tämän menetelmän yhteydessä kloonaamalla saatua informaatiota voidaan käyttää sellaisten DNA-rakenteiden valmistamiseksi, joka voidaan integroida *areA*-geeniin ja jopa korvata se toisella geenillä, kuten *pyrG*-geenillä.

Vielä eräs menetelmä AreA-aktivaattorin läsnäolon välttämiseksi on puuttua *areA*-

geenin itsensä ilmentymistä säätelevien ekspressiosignaaleiden säätelyyn.

Keksinnön mukaan sieni kuuluu edullisesti sukuun, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Candida*, *Acremonium*, *Fusarium* ja *Penicillium*.

Näistä suvuista edullisia ovat lajit, jotka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. phoenicis*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. nidulans*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *H. insulens*, *H. lanuginosa*, *F. graminearum*, *F. solani*, *P. chrysogenum* ja vastaavat.

Kuten mainittiin, keksintö on tarkoitettu käsittämään myös menetelmän keksinnön ensimmäisen aspektin mukaisten sienien tuottamiseksi ja tässä menetelmässä mainittu inaktivointi on toteutettu poistamalla *areA*-geeni ja tässä menetelmässä

i) kloonataan *areA*-geenin homologeja kysymyksessä olevasta sienestä,
ii) tuotetaan DNA-rakenne, joka käsittää *areA*-geenin, josta jokin sen sisäinen osa on substituoitu, poistettu tai johon on sijoitettu ylimääräistä DNA:ta,
iii) mainittu sieni transformoidaan rakenteella ja
iv) seulotaan transformantit, jotka ovat *areA*$^-$.

Keksintö koskee myös menetelmää sellaisten sienien valmistamiseksi, joissa inaktivointi on saatu aikaan käyttämällä antisense-tekniikkaa. Tällaisessa menetelmässä

i) rakennetaan ilmentämisplasmidi, joka aikaansaa *areA*-geenistä transskriboidulle mRNA:lle komplementaarisen RNA-molekyylin synteesin,
ii) isäntäsieni transformoidaan mainitulla ilmentämisplasmidilla ja jollakin sopivalla markkerilla, joko erillisillä plasmideilla tai samalla plasmidilla,
iii) valikoidaan transformantit mainittua markkeria käyttäen ja
iv) seulotaan transformantit sellaisten kantojen löytämiseksi, joissa AreA-tuotteen synteesi on vähentynyt, esimerkiksi analysoimalla kasvua erilaisilla typenlähteillä.

Keksintö koskee vielä erään aspektinsa mukaan DNA-rakenteita, jotka ovat tarkoitetut käytettäviksi edellä mainituissa menetelmissä.

Ensiksi mainitussa menetelmässä mainittu DNA-rakenne voi käsittää *areA*-geenin, jossa jokin sen sisäinen osa on substituoitu, poistettu tai siihen on sijoitettu ylimääräistä DNA:ta.

DNA-rakenne voi lisäksi käsittää myös DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat kysymyk-

sessä olevaa proteiinituotetta, kuten sekvenssejä, jotka kuvataan tuonnempana.

Viimeksi mainitussa antisense-menetelmässä DNA-rakenne voi sisältää *areA*-geenin käänteisen DNA-sekvenssin liitettynä johonkin funktionaaliseen promoottoriin, jolloin mRNA on ainakin osaksi komplementaarinen *areA*-geenistä tuotetulle mRNA:lle.

Keksinnön vielä eräs aspekti koskee menetelmää halutun geenituotteen, edullisesti eritetyn geenituotteen, tuottamiseksi, jossa menetelmässä keksinnön mukaista sientä kasvatetaan jossakin sopivassa kasvualustassa sopivissa olosuhteissa ja haluttu geenituote otetaan talteen ja puhdistetaan.

Kun kysymyksessä on jonkin heterologisen geenin ilmentämä geenituote, haluttua geenituotetta koodaava DNA-sekvenssi voi olla osa mainitun sienen tuottamiseen käytetystä DNA-rakenteesta.

Tavallisesti kuitenkin suoritetaan keksinnön mukaisen sienen erillinen transformointi, jotta sieni saadaan tuottamaan haluttua tuotetta.

Alalla tunnetaan hyvin menetelmiä sienten transformoimiseksi, vrt. esimerkiksi EP 0 184 438 A2 (Gist-Brocades N.V.) ja EP-patenttihakemus n:o 87103806 (Novo Nordisk A/S).

Endeemisille tuotteille tämä ei tietenkään ole tarpeen, mutta tuotannon lisäämiseksi saattaa olla eduksi tehdä paljon kopioita geenistä, joka koodaa kysymyksessä olevaa proteiinia, sisällytettäväksi isäntään.

Haluttu geenituote on yleensä peptidi tai proteiini, edullisesti entsyymi.

Entsyymeistä se on edullisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat proteaasit, kuten trypsiini ja kymosiini, lipaasit, kutinaasit, sellulaasit, ksylanaasit, lakkaasit, pektinaasit jne.

Toisentyyppinen haluttu geenituote on yleensä jokin terapeuttisesti aktiivinen peptidi tai proteiini.

Terapeuttisesti aktiivisista peptideistä tai proteiineista proteiini on edullisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat insuliini, kasvuhormoni, glukagoni, somatostatiini, in-

terferonit, PDGF, tekijä VII, tekijä VIII, urokinaasi, t-PA, CSF, laktoferriini, TPO jne.

Keksintöä selitetään yksityiskohtaisemmin alla esitetyissä esimerkeissä. Niitä ei tule kuitenkaan käsittää keksinnön suoja-alaa rajoittaviksi sellaisena kuin se määritellään liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa.

Esimerkit

Materiaalit ja menetelmät

Kannat

A. oryzae, IF04177: saatavissa laitoksesta Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-ku, Osaka, Japani.

ToC913: tämän kannan rakentaminen kuvataan esimerkeissä.

Geenit

areA: tämä geeni koodaa säätelyproteiinia, joka ohjaa typen kataboliaa.

pyrG: tämä geeni koodaa orotidiini-S'-fosfaattidekarboksylaasia, entsyymiä, joka on mukana uridiinin biosynteesissä.

bar: tämä geeni eristettiin alunperin *Streptomyces hygroscopicuksesta* ja se koodaa fosfinotrisiiniasetyylitransferaasia. Entsyymi muuttaa fosfinotrisiiniä (=glufosinaattia) ja siten inaktivoi tämän yhdisteen, joka on toksinen bakteereille, sienille ja kasveille.

Plasmidit

pUC118: Viera ja Mesing, *J. Meth. Entzymol.* 1987 **153** 3-11

pSO2: tämän plasmidin rakentaminen kuvataan esimerkeissä..

pJers4: pSO2:n 2,0 kb:n alaklooni pUC118:ssa. pJers4 sisältää funktionaalisen *A. oryzae pyrG* -geenin.

pSO5: tämän plasmidin rakentaminen pSO2:sta kuvataan esimerkeissä.

pToC56: tämän plasmidin rakentaminen kuvataan EP-patenttihakemuksessa n:o 87103806.

pToC266: tämän plasmidin rakentaminen kuvataan esimerkeissä.

pMT1606: tämän plasmidin rakentaminen pBP1T:stä (B. Staubinger *et al.*, Fungal Genetics Newsletter **39** (1992):82-83) ja p775:stä (EP-patenttihakemus n:o 87103806) kuvataan esimerkeissä.

p777: tämän plasmidin rakentaminen kuvataan EP-patenttihakemuksessa n:o 87103806.

pHW470: tämän plasmidin rakentaminen kuvataan esimerkeissä.

Esimerkki 1

Aspergillus oryzae areAΔ -kannan rakentaminen

areAΔ-kanta rakennettiin seuraavilla vaiheilla. *A. oryzae pyrG* -geeni kloonattiin ja *A. oryzae pyrG* -mutanttikanta eristettiin. *areA*-geeni *A. oryzaesta* kloonattiin. *pyrG*-mutantti transformoitiin plasmidilla, joka kantoi *pyrG*-geeniä insertoituna *areA*-geenin ylävirran ja alavirran puolella olevien DNA-fragmenttien väliin. *areA*-geeniä koodaava alue ei ollut läsnä plasmidissa. Transformantit valittiin sen perusteella, pystyivätkö ne kasvamaan ilman uridiinia ja kloraatin läsnäollessa. Tässä kaksoisvalinnassa valinta tapahtuu sekä funktionaalisen *pyrG*-geenin että *are*A miinuksen suhteen. Kannat, jotka saatiin tällä valintamenettelyllä, seulottiin lopuksi Southern-analyysillä niiden kantojen identifioimiseksi, joissa kromosomaalinen *areA*-geeni oli substituoitunut *pyrG*-geenillä.

A. oryzae pyrG -geenin kloonaus

A. oryzae pyrG -geeni kloonattiin ristihybridisoimalla *A. niger pyrG* -geenin kanssa [W. van Hartingsveldt *et al.*, Mol. Gen. Genet. 206:71-75 (1987)]. Osittain *Sau-IIIA:lla* digestoidun *A. oryzae* IFO4177 DNA:n lambdakirjasto tutkittiin väljästi käyttäen koettimena *A. niger pyrG* -geenin 1 kiloemäksen DNA-palasta. Positiivisesta kloonista alakloonattiin 3,8 kb:n *HindIII*-fragmentti pUC118-vektoriin. Saadun plasmidin, pSO2:n, osoitettiin sisältävän *pyrG*-geenin *A. niger pyrG* -mutantin komplementaatiotestin avulla.

A. oryzae pyrG miinus -kannan rakentaminen

pyrG-deleetioplasmidi, pSO5, joka sisälsi noin 1 kb:n *pyrG*:n viereiset sekvenssit kummassakin päässä, rakennettiin plasmidista pSO2. *A. oryzae* IFO4177 transformoitiin tällä rakenteella ja transformantit valikoitiin 5-fluoriorottihapporesistanssin, *pyrG*-mutanteille ominaisen fenotyypin, avulla. Yhden transformantin, HowB101:n osoitettiin Southern-menetelmällä sisältävän odotetun deleetion *pyrG*-lokuksessa. Koska HowB101 on *pyrG*-mutantti, se vaatii uridiinia kasvaakseen. HowB101 voidaan transformoida *wt pyrG* geenillä valikoimalla sen mukaan, kykeneekö se kasvamaan ilman uridiinia.

HowB101:n rakentamisessa käytetyt vaiheet on kuvattu kuviossa 1.

*are*A-geenin kloonaus

A. oryzae areA -geeni kloonattiin ristihybridisoimalla *A. nidulans areA* -geeniin [B. Kudla *et al.*, EMBO J. 9:1355-1364 (1990)]. *A. oryzae* IFO4177 genomikirjasto

valmistettiin kromosomi-DNA:n osittaisella digestiolla *Sau*IIIA:lla ja kloonaamalla saadut DNA-palaset vektoriin λGEM-II (saatiin Promegalta). Kirjaston ristihybridisoiminen *A. nidulans areA* -geenin kanssa suoritettiin 40-prosenttisessa formamidissa 37 °C:ssa. Hybridisoituvat λ-kloonit eristettiin ja näitä palasia alakloonattiin vektoriin pBluescript SK+ (saatiin Stratageneltä), jolloin muodostuivat plasmidit pSK5 ja pSK9, jotka on kuvattu kuviossa 2. Kloonattu geeni pystyi komplementoimaan *A. nidulans areA* -mutanttia osoittaen, että se todella on *A. oryzae areA* -homologi. Kloonin 5643 emäsparia sekvensoitiin ja *A. oryzaen* ja *A. nidulansin areA* -geenien sekvenssien vertailu osoittaa, että ne ovat erittäin homologisia. *A. oryzae areA* -geenin sekvenssi on esitetty SEQ ID No. 1:ssä.

areA-deleetioplasmidin rakentaminen

areA-geenin poistamiseksi *A. oryzae* -kromosomista rakennettiin plasmidi pToC266. pToC266 sisältää 2,1 kb:n DNA-palasen, joka on peräisin *areA*-geenin ylävirran puolelta (eristetty pSK5:stä), ja 1,4 kb:n DNA-palasen, joka on peräisin *areA*-geenin alavirran puolelta (eristetty pSK9:stä). Nämä kaksi palasta ovat noin 3,2 kb:n päässä toisistaan genomissa, koodaava alue sijaitsee geenin tässä osassa. *A. oryzae pyrG* -geeni pJers4:stä insertoitiin *areA*:n ylävirran ja alavirran DNA-palasten väliin. pToC266:n rakentaminen on esitetty kuvioissa 3a ja 3b. pToC266:lla on yksi *EcoRI*-kohta ja se linearisoitiin katkaisemalla tällä restriktioentsyymillä ennen käyttöä transformaatioissa.

*A. oryzae areA*Δ -kantojen valinta

A. oryzae HowB101 transformoitiin linearisoidulla pToC266:lla. Transformantit valittiin minimilevyillä [Cove Biochem. Biophy. Acta (1966) **113** 51-56], jotka sisälsivät 5% natriumkloraattia ja 0,5 mM ammoniumsulfaattia ja 1% glukoosia. Transformantit valikoitiin siis kaksi kertaa, sekä sen suhteen, olivatko ne saaneet *pyrG*-geenin, sen mukaan, pystyvätkö ne kasvamaan ilman uridiinia, ja kloraattiresistanssin suhteen. Kloraattiresistanssi on eräs *A. nidulans areA* -mutanttien fenotyyppi [H.N. Arst ja D.J. Cove, MGG **126**:111-141 (1973)]. Heikosti kasvavat transformantit eristettiin uudelleen kahdesti samantyyppisillä levyillä. Kolmelle erilliselle transformantille, jotka nimettiin ToC913:ksi, ToC919:ksi ja ToC920:ksi, suoritettiin kasvukoe erilaisilla typenlähteillä. Ne kasvoivat hyvin glutamiinialustalla, mutta heikosti muilla kokeilluilla typenlähteillä, ammoniakki mukaanluettuna. Southern-analyysi osoitti, että nämä kolme kantaa olivat menettäneet *areA*-rakennegeenin, joka oli korvautunut *pyrG*-geenillä.

*are*AΔ-kantoja voidaan saada aikaan myös valikoimalla linearisoidun pToC266:n

transformantit minimilevyiltä, jotka sisältävät glutamiinia typen lähteenä. Eräässä sellaisessa kokeessa yksi 25 transformantista oli *areA*Δ-kanta.

Esimerkki 2

pMT1606:n rakentaminen

Rakennettiin plasmidi, joka sisälsi *Streptomyces hygroscopiuksesta* peräisin olevan *bar*-geenin [C.J. Thompson *et al.*, EMBO J. **6**:2519-2523 (1987)], joka oli insertoitu *A. oryzae* TAK-amylaasipromoottorin jälkeen ja jota seurasi fragmentti, joka sisälsi transskription lopettajan ja polyadenylaatiosignaalin *A. niger gla* -geenistä.

Plasmidia pMT1606 voidaan käyttää *A. oryzaen* glyfosinaattiresistanttien transformanttien valikoimiseen. pMT1606 rakennettiin eristämällä *bar*-geeni plasmidista pBP1T [B. Straubinder *et al.*, Fungal Genetics Newsletter **39**:82-83 (1992)] ja kloonaamalla se sieniperäiseen ekspressioplasmidiin p775, joka on kuvattu EP-patenttihakemuksessa n:o 87103806. Kuvio 4 esittää pMT1606:n rakentamista.

Esimerkki 3

Kymosiinin tuottaminen ToC913:ssa (*A. oryzae* IFO4177 *areA*Δ)

*A. oryzae areA*Δ -kanta ToC913 transformoitiin plasmidilla pToC56 (kuvio 5), joka on sieniperäinen ekspressioplasmidi nisäkkään entsyymikymosiiniä varten, keratransformoimalla pMT1606:lla. Plasmidin pToC56 rakentaminen kuvataan EP-patenttihakemuksessa no. 87103806.

Transformantit valikoitiin kasvun suhteen minimikasvualustassa, joka sisälsi 10 mM ammoniumia ja 1 mg/ml glufosinaattia, ja seulottiin pToC56:n läsnäolon suhteen kymosiinin tuottamiskyvyn avulla. Kolmea transformanttia kasvatettiin ravistelupulloissa minimikasvualustassa, joka sisälsi maltodekstriiniä ja glutamiinia, 4 päivää 30 °C:ssa. Kahta pToC56:n transformanttia IFO4177:ssä (saatu EP 87103806:ssa kuvatulla tavalla) samoin kuin transformoimatonta IFO4177:ä ja ToC913:a kasvatettiin yhdessä ToC913-transformanttien kanssa.

Fermentaatioliuoksesta otettiin näytteitä joka päivä ja niille suoritettiin SDS-PAGE ja Western blotting. Blottauskalvoa inkuboitiin kymosiinispesifisen kaniinin vasta-aineen kanssa ja sen jälkeen vuohen kaniini-vasta-aineen kanssa, joka oli kytketty peroksidaasiin. Kalvon värjäytyminen osoitti, että IFO4177:n transformanteista saadut supernatantit sisälsivät pieniä määriä kymosiiniä tai sen hajoamistuotteita ensimmäisenä ja toisena fermentaatiopäivänä eikä mitään myöhemmin fermentaation aikana.

ToC913:n transformantit sisälsivät vähintään kymmenen kertaa enemmän täysikokoista kymosiiniä. Kymosiinin määrä supernatanteissa kasvoi ensimmäisen kahden - kolmen päivän aikana ja pysyi sitten muuttumattomana.

Supernatantteja IFO4177:n, ToC913:n, pToC56:n transformantin ToC913:ssa ja transformantin IFO4177:ssä ensimmäisen ja neljännen päivän fermentaatiosta siirrettiin isoelektriselle geelille ja niille suoritettiin elektroforeesi. pH-gradientti oli 3,5:stä 9,5:een. Elektroforeesin jälkeen geeli huuhdottiin puskurilla, jonka pH = 7,0 ja joka sisälsi 2 mM Zn^{2+}, ja se päällystettiin agarilla, joka sisälsi 0,5% kaseiinia. Geeliä inkuboitiin 45 °C:ssa, kunnes proteaasiaktiivisuus oli nähtävissä.

IFO4177:stä peräisin olevissa näytteissä voitiin havaita kolme nauhaa, jotka osoittivat proteaasiaktiivisuutta; yksi alkalisella pI:llä ja kaksi happamilla pI:llä.

Näytteissä, jotka olivat peräisin IFO4177:n pToC56-transformantista, oli havaittavissa heikko reaktio kymosiinistä ja se meni osittain päällekkäin yhden happamista nauhoista kanssa, jotka todettiin transformoimattomassa IFO4177:ssä, proteaasi useimmilla happamilla pI:llä oli tuskin havaittavissa, kun sen sijaan proteaasi alkalisella pI:llä oli selvästi nähtävissä samoin kuin yksi tai useampi nauha lähes neutraalilla pI:llä.

ToC913:sta peräisin olevissa näytteissä ei todettu proteaasiaktiivisuutta, kun sen sijaan näyte ToC913:n pToC56-transformantista antoi voimakkaan kymosiinisignaalin. Muita proteaaseja ei todettu tästä transformantista peräisin olevissa näytteissä.

Esimerkki 4

Ihmisen trypsiini I:n tuottaminen ToC913:ssa (*A. oryzae* IFO4177 *areA*Δ)

cDNA, joka koodasi ihmisen haiman trypsinogeeni I:tä (TRYI), eristettiin käyttämällä standardimenetelmiä ja sekvenssiä, jonka ovat julkaisseet M. Emi *et al.*, Gene (1986) 41:305-310 (vrt. tanskalainen patenttihakemus n:o 693/95). *BamH1*-kohta (GGATCC) vietiin heti aloituskodonin [ATG(Met)] ylävirran puolelle ja väliin sijoitettiin lyhyt sekvenssi ACC.

Tätä *BamH1*-kohtaa käytettiin cDNA:n fuusioimiseen *BamH1*-linkkeriin Taka-amylaasipromoottorissa sieniperäisessä ekspressioplasmidissa p777, joka on kuvattu EP-patenttihakemuksessa n:o 87103806. cDNA:n 3'-pää fuusioitiin 41 emäsparin päähän aloituskodonista *Nru1*-kohtaan p777:ssä. Näin saadaan TRYI cDNA inser-

toiduksi *A. oryzaen* Taka-amylaasipromoottorin ja *A. niger*in glukoamylaasitranskriptioterminaattorin väliin. Tuloksena oleva plasmidi nimettiin pHW470:ksi (vrt. tanskalainen patenttihakemus n:o 693/95).

pHW470 transformoitiin ToC913:een kotransformoimalla plasmidilla pMT1606. BASTA-resistantit transformantit eristettiin uudelleen kahdesti konidioitiöitä käyttämällä. Kahdeksaa transformanttia kasvatettiin neljä päivää 30 °C:ssa YPM:ssä [YPD (Sherman, F *et al.*, (1981) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)], jossa glukoosi korvattiin 2% maltoosilla. Supernatanteista tutkittiin niiden ihmisen trypsiinipitoisuus SDS-PAGE:lla ja sen jälkeen Western blottauksella ja inkuboimalla kaniinin vasta-aineella, joka oli kehitetty sian trypsiiniä vastaan. Blottauskalvoa inkuboitiin sitten vuohen anti-kaniini-vasta-aineella, joka oli kytketty peroksidaasiin ja sen annettiin reagoida 3-amino-9-etyylikarbatsolin kanssa. Kolmesta transformantista peräisin olevat supernatantit sisälsivät odotetun kokoisen värjäytyneen nauhan. Trypsiinipitoisuus näissä kolmessa positiivisessa supernatantissa oli 2 - 5 mg/l.

Trypsiinin läsnäolo tarkistettiin edelleen inkuboimalla supernatanttinäytteitä L-bentsoyyliarginyyliparanitroanilidin (L-BAPNA) kanssa. Kolmesta immunopositiivisesta kannasta peräisin olevat näytteet pilkkoivat substraatin, jolloin kehittyi keltainen väri. ToC913:sta ja IFO4177:stä peräisin olevat näytteet eivät osoittaneet minkäänlaista aktiivisuutta tätä substraattia kohtaan. Ihmisen trypsiinin spesifistä aktiivisuutta tässä kokeessa ei tunneta, joten näiden tulosten perusteella ei ole mahdollista laskea trypsiinipitoisuutta supernatanteissa.

Villityypin kannassa IFO4177 tehtiin myös pHW470:n transformantteja. Yli 20 L-BAPNA positiivista transformanttia tarkastettiin, mutta näistä transformanteista peräisin olevista supernatanteista ei voitu todeta immunoreaktiivisia nauhoja. Detektioraja tässä kokeessa oli noin 0,5 mg/l.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISINFORMAATIO:

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: Novo Nordisk A/S
(B) KATUOSOITE: Novo Alle
(C) KAUPUNKI: Bagsvaerd
(E) MAA: Tanska
(F) POSTINUMERO (ZIP): DK-2880
(G) PUHELIN: +45 4442 2668
(H) TELEFAX: +45 4449 3256

(ii) KEKSINNÖN NIMI: Uusia mikro-organismeja

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 2

(iv) TIETOKONEELLA LUETTAVA MUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Levyke
(B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1:TÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 5643 emäsparia
(B) TYPPI: nukleiinihappo
(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iii) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄISLÄHDE:
(A) ORGANISMI: *Aspergillus oryzae*
(B) KANTA: IFO4177

(ix) TUNNUSMERKIT:
(A) NIMI/AVAIN: introni
(B) SIJAINTI: 2701..2769

(ix) TUNNUSMERKIT:
(A) NIMI/AVAIN: CDS
(B) SIJAINTI: liitos(2282..2700, 2770..4949)

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

AAGCTTCGTC CTCGCATCTC GGCCGGGTGA GTAAGGTATG GTATTATTCA TGAAGGGATC 60

TCGTTGGTTA CCGTTGTCTA TCCCTAAACA AAGGATTCAA GAGAACAACT CGGAATGCTC 120

CCTCCGCTTA AACCCCTTGA CTCACTGATG GTGTATGTAC TATGGGTACG ACGTTCGGGA 180

TGTGGACTAC CAACCAGAGA GTGATTAGAG AGTCCGGGTT CTCAGTCCAT GATTTTTGCA 240

TCTTTGAAAC AGACGATGCG GAGCGGTCAT TGGCGGAGTT TACTCCCAAA TACGGCCGAA 300

CGGGGTACTT TAAGTGGAAT CTCCGATTTT GGATCTAAGC TCATGAAGGA AAAGTACTAC 360

TAATGCGTAC CTGTGCCTAA TGTTAGTGCT AGTTCGTCTG TTGCATTTTA CCCGTCGGTT 420

AAGACGAATG GATCCGTTCA GGTTTTAAAA TAACTATCTA TGAAATATTT TAGATTTCCC 480

GACATAGTGG TTGGGATGTC TCGATTAACA CTAGGTACAT CAGGCTCAAT TGATTTTGGT 540

TTTAACGAAA CATGATATAG GTCAGGGTCG TGGACCACCC TCCGCCAGGG ATCAGGGGAC 600

GGTTACATGC GAAGGATTCT GATTATATTC ATGATTATGT CAAGCCTTTT CTCTCGTGTG 660

AAGAGGAGCA GAGAATCCGT ACGGGTTTAA TTTAATTTAG CGCCCTGCAG CTTCGAGAAC 720

ATCCCCAGCA ACGTTAAAAA CCACGAGCTA AAATGGGTCG CCACCGGAAG CACTCGAGTC 780

GAGAGATCGG TCGGCTCAGT ATTCGTAATA CCTGCGTTCC AGACGGTTTT GGTCGTTGGT 840

TTCACTCAGG GAACTTAATT CCAGCGGGAC CCAATATAAT TTGAATGATT CATGATACAT 900

CCATTCGTTT GAACCGATCC TGCAAGAGTT CTGTCTGATT TGGTCAACAT AGTTTTCCTC 960

TGGGGGAGAC TGGGGAAGAG TCAACACAAT GGTCAGGGAG AGAAGAATGA AAGCTCTCGC 1020

AAGTGGATGA TCATGCTACG TACTGTAGGA ATAAAATTAA TTAATGCGAG GCTGCAAGTA 1080

TCCCTGCGCC GATTTTCTCT TCTTACGGCG GGAACCAAAA AATGTGACGC TGTGATTTTC 1140

TGGAAAAGGT AAGGATGTTT AGTTTCCCAG GATTATTACT GGTTCCGTAT GTGTATGTGT 1200

ATGGATATCA TTCCGTATGG ATACGCCCGT TTCCTCCGCC CAGAACCAGT CCGTCATCCA 1260

TCCTCCACTC TTTCTTCTCT TAGAGCCTTT CCACCTCTCT TCACTTTCTT TTTCTTTCCC 1320

CCCTCCCTCT TTGCTTTCCC TCTCCCAGTA TTATTCTTAT ATTATCGGTT TGACCGTCGC 1380

CTCAGTATCG GCCCCCCGTG AATCACTTTT CGTTTCTCTT GTATTTTACT TTCCTATCTG 1440

GGATTGCTCC TCGATTAGCA GCTCTACTTC ATTCGGCCAT GTGCGTCTAG AGGGTCTAGC 1500

CCCTCTCTCT CTTTGCACTG ACTGTCAGCC ATACCATAGT ATCATCCCGG AATTAAGAAA 1560

AAAAAAGAAA TTATTCTACC TCCGATCTGG ACAAATTATA ACCAGGAGAA AATCAAGCGA 1620

AAGAGGGGCA AAGGAGGAGA CACCATTAAA ACTGGGTCTG GTTTGATTCA TGACATACAT 1680

TCGTCGTCTT GAATTTCAAT AGGTACGGAC TGATGCATTC CACTCGAGCC TTTTTAGCTG 1740

CGTGTCCGTC TCCAATCGCA CTTCTTTTCT TATTTCCTTG TGGGATAAAT TGATTATTTA 1800

CCGTTTCGTT TTCTCTATAT TGCGGTGGTG GTGCGACCCA TCCAACTATT ATTATTATAA 1860

TTGGAATTTG ATTTGGATTT TGATTCCTGT GACGGATCTC AGACCAAGTG CCTAAACTAT 1920

AACTGACTTG GACCCCCTTC AGATCCTAGC TTCCCGATTC TTTTCCACCA CTGCTGCATC 1980

CTCTTCCTGC ACGCAGCGTT CGTTTAGGGC GGGTAGACTG GAATTTATTC CTTGCGCCAC 2040

GGACCAATCG CTCCCTCGAC GCTCTCATTC CTGCGTCGAG CTCTTTTTCC CTCGACTCTC 2100

ATTGCTTGCT GGGCTGGTTC TTGAACCTCT TCAATCGTCC TTATCTCTTT CCCCCCATCC 2160

GGCCTGTGAT TCCTATCTTT CCTTTTTTTC TTCCCTTTCT TGTTTGATCC CCCCTCCTCC 2220

CCGTCTTATC GCCTACTATC GTGATCCCCG CCCTTCCCAA TAAAGAGTAG GGCGTGTGAA 2280

C ATG TCC GGG TTA ACC CTC GGG CGA GGC CCT GGG GGC GTG CGA CCG 2326
Met Ser Gly Leu Thr Leu Gly Arg Gly Pro Gly Gly Val Arg Pro
1 5 10 15

ACT CAA ACC GCA ACT TTT ACC ACC CAC CAC CCG TCC GCC GAT GCT GAC 2374
Thr Gln Thr Ala Thr Phe Thr Thr His His Pro Ser Ala Asp Ala Asp
20 25 30

CGC TCC TCC AAC AAC CTC CCC CCT ACC TCC TCG CAG CTG TCC GAT GAC 2422
Arg Ser Ser Asn Asn Leu Pro Pro Thr Ser Ser Gln Leu Ser Asp Asp
35 40 45

TTT TCT TTC GGT TCC CCT CTG AGC CCC GCC GAC TCA CAG GCC CAT GAC 2470
Phe Ser Phe Gly Ser Pro Leu Ser Pro Ala Asp Ser Gln Ala His Asp
50 55 60

GGC CTA CTT CAG GAC TCC CTC TTC CCT GAA TGG GGG TCT GGT GCG CCT 2518
Gly Leu Leu Gln Asp Ser Leu Phe Pro Glu Trp Gly Ser Gly Ala Pro
65 70 75

CGA CCC GGC ATT GAC AGT CCG GAT GAG ATG CAG AGG CAA GAT CCG CTA 2566
Arg Pro Gly Ile Asp Ser Pro Asp Glu Met Gln Arg Gln Asp Pro Leu
80 85 90 95

GCG ACT CAA ATA TGG AAG CTC TAT TCT AGG ACC AAG GCC CAG TTG CCC 2614
Ala Thr Gln Ile Trp Lys Leu Tyr Ser Arg Thr Lys Ala Gln Leu Pro
100 105 110

AAC CAG GAG CGT ATG GAA AAC CTG ACC TGG CGG ATG ATG GCG ATG AGT 2662
Asn Gln Glu Arg Met Glu Asn Leu Thr Trp Arg Met Met Ala Met Ser
115 120 125

TTG AAA CGT AAG GAG CGG GAA CGT GCT CAA CAG TCC AT GTAGGTGTTC 2710
Leu Lys Arg Lys Glu Arg Glu Arg Ala Gln Gln Ser Met
130 135 140

TCCCTCTGTA GAGGAACGGC TGGACCCGCT CATCATTAAT TTTTTTTTTG TCTGTGAAG G 2770

TTT CCT GCG AGA CGC GGT AGC GCT GGC CCC AGT GGT ATC GCT CAA CTG 2818
Phe Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Gly Pro Ser Gly Ile Ala Gln Leu
145 150 155

CGC ATT TCC GAC CCG CCC GTT GCC ACC GGT AAC CCT CAG TCA ACC GAC 2866
Arg Ile Ser Asp Pro Pro Val Ala Thr Gly Asn Pro Gln Ser Thr Asp
160 165 170

CTG ACC GCC GAC CCT ATG AAC CTC GAC GAT TTC ATC GTG CCC TTC GAA 2914
Leu Thr Ala Asp Pro Met Asn Leu Asp Asp Phe Ile Val Pro Phe Glu
175 180 185

TCT CCT TCG GAC CAC CCC TCG CCC AGT GCC GTC AAG ATT TCC GAC TCC 2962
Ser Pro Ser Asp His Pro Ser Pro Ser Ala Val Lys Ile Ser Asp Ser
190 195 200

ACG GCG TCC GCG GCC ATT CCC ATC AAG TCC CGG AAA GAC CAG CTG AGA 3010
Thr Ala Ser Ala Ala Ile Pro Ile Lys Ser Arg Lys Asp Gln Leu Arg
205 210 215 220

GAT TCT ACC CCG GTG CCG GCC TCG TTC CAC CAT CCG GCT CAG GAT CAA 3058
Asp Ser Thr Pro Val Pro Ala Ser Phe His His Pro Ala Gln Asp Gln
225 230 235

CGG AAG AAC AGT GAA TTT GGC TAC GTC CCC CGT CGC GTG CGC AAG ACG 3106
Arg Lys Asn Ser Glu Phe Gly Tyr Val Pro Arg Arg Val Arg Lys Thr
240 245 250

AGT ATC GAC GAG CGT CAA TTT TTC TCA CTG CAG GTG CCG ACC CGA AAG 3154
Ser Ile Asp Glu Arg Gln Phe Phe Ser Leu Gln Val Pro Thr Arg Lys
255 260 265

CGA CCG GCC GAA TCC TCG CCC CAG GTA CCC CCC GTT TCC AAC TCG ATG 3202
Arg Pro Ala Glu Ser Ser Pro Gln Val Pro Pro Val Ser Asn Ser Met
270 275 280

TTG GCC CAC GAT CCG GAC CTC GCT TCC GGC GTG CCC GAT TAT GCC TTG 3250
Leu Ala His Asp Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Tyr Ala Leu
285 290 295 300

GAC GCC CCG TCC TCG GCC TTT GGC TTC CAT CAG GGT AAC CAC CAT CCG 3298
Asp Ala Pro Ser Ser Ala Phe Gly Phe His Gln Gly Asn His His Pro
305 310 315

GTC AAT CAT CAC AAC CAC ACC TCC CCC GGG GCA CCG TTT GGC TTG GAT 3346
Val Asn His His Asn His Thr Ser Pro Gly Ala Pro Phe Gly Leu Asp
320 325 330

ACG TTC GGC CTG GGA GAT GAT CCA ATC TTG CCC TCC GCG GGC CCC TAC 3394
Thr Phe Gly Leu Gly Asp Asp Pro Ile Leu Pro Ser Ala Gly Pro Tyr
335 340 345

CAG TCG CAA TTC ACC TTC TCA CCC AGC GAG TCT CCG ATG GCC TCC GGT 3442
Gln Ser Gln Phe Thr Phe Ser Pro Ser Glu Ser Pro Met Ala Ser Gly
350 355 360

CAT CCG TTT GCG AAC CTC TAT TCG CAT ACC CCG GTG GCT TCG TCC CTC 3490
His Pro Phe Ala Asn Leu Tyr Ser His Thr Pro Val Ala Ser Ser Leu
365 370 375 380

AAC TCG ACG GAT TTC TTC TCT CCA CCG CCA TCA GGC TAC CAG TCC ACG 3538
Asn Ser Thr Asp Phe Phe Ser Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gln Ser Thr
385 390 395

GCA TCC ACG CCG CAG CCC ACC TAC GAC GGG GAC CAT TCC GTT TAT TTC 3586
Ala Ser Thr Pro Gln Pro Thr Tyr Asp Gly Asp His Ser Val Tyr Phe
400 405 410

GAT ATG CCG TCG GGC GAC GCG CGC ACC CAG CGC CGC ATT CCG AAC TAT 3634
Asp Met Pro Ser Gly Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Ile Pro Asn Tyr
415 420 425

ATT TCG CAT CGG TCC AAC TTG TCT GCT TCG CTG CAG CCT CGG TAT ATG 3682
Ile Ser His Arg Ser Asn Leu Ser Ala Ser Leu Gln Pro Arg Tyr Met
430 435 440

TTC AAC CAG AAC AAC CAT GAA CAG GCC AGT TCG TCG ACG GTG CAT TCG 3730
Phe Asn Gln Asn Asn His Glu Gln Ala Ser Ser Ser Thr Val His Ser
445 450 455 460

CCG AGC TAC CCC ATT CCC CAG CCG CAA CAT GTG GAC CCC ACT CAG GTG 3778
Pro Ser Tyr Pro Ile Pro Gln Pro Gln His Val Asp Pro Thr Gln Val
465 470 475

TTG AAC GCC ACC AAT TAC TCG ACC GGC AAC TCC CAC CAT ACC GGC GCC 3826
Leu Asn Ala Thr Asn Tyr Ser Thr Gly Asn Ser His His Thr Gly Ala
480 485 490

ATG TTT TCA TTT GGA GCC GAT TCA GAT AAC GAG GAT GAC GAT GGT CAT 3874
Met Phe Ser Phe Gly Ala Asp Ser Asp Asn Glu Asp Asp Asp Gly His
495 500 505

CAG CTG TCC GAG CGG GCT GGT CTG GCG ATG CCG ACT GAA TAT GGG GAC 3922
Gln Leu Ser Glu Arg Ala Gly Leu Ala Met Pro Thr Glu Tyr Gly Asp
510 515 520

GAG GAC GGG TTC TCG TCG GGC ATG CAG TGG GAT GGG CAG TTC CCG GGC 3970
Glu Asp Gly Phe Ser Ser Gly Met Gln Trp Asp Gly Gln Phe Pro Gly
525 530 535 540

TCC TTC CAT TCG CTG CCG GGC TTT GGC CCT CAA CAT CGC AAG CAT GTT 4018
Ser Phe His Ser Leu Pro Gly Phe Gly Pro Gln His Arg Lys His Val
545 550 555

ACC ATC GGG TCC ACG GAC ATG ATG GAC ACC CCC GAG GAG TGG AAT CAC 4066
Thr Ile Gly Ser Thr Asp Met Met Asp Thr Pro Glu Glu Trp Asn His
560 565 570

GGT GGC AGT TTG GGT CGG ACT CAT GGG TCG GTG GCT TCG GTC AGT GAG 4114
Gly Gly Ser Leu Gly Arg Thr His Gly Ser Val Ala Ser Val Ser Glu
575 580 585

GTG CGC AAC CGA GAG CAG GAC CCT CGC CGG CAG AAG ATT GCC CGC ACC 4162
Val Arg Asn Arg Glu Gln Asp Pro Arg Arg Gln Lys Ile Ala Arg Thr
590 595 600

ACG TCC ACC CCC AAT ACG GCC CAG CTG TTG CGC CAA AGC ATG CAC TCT 4210
Thr Ser Thr Pro Asn Thr Ala Gln Leu Leu Arg Gln Ser Met His Ser
605 610 615 620

AAT AAC AAT ACG TCT CAT ACC TCC CCT AAT ACG CCG CCC GAG TCC GCC 4258
Asn Asn Asn Thr Ser His Thr Ser Pro Asn Thr Pro Pro Glu Ser Ala
625 630 635

CTG AGC AGC GCA GTT CCG TCC CGC CCG GCC AGT CCC GGG GGC AGC AAG 4306
Leu Ser Ser Ala Val Pro Ser Arg Pro Ala Ser Pro Gly Gly Ser Lys
640 645 650

AAC GGC GAC CAA GGC AGC AAC GGA CCG ACC ACC TGC ACG AAC TGC TTC 4354
Asn Gly Asp Gln Gly Ser Asn Gly Pro Thr Thr Cys Thr Asn Cys Phe
655 660 665

ACT CAA ACC ACT CCG CTG TGG CGT CGG AAC CCA GAG GGC CAG CCA CTG 4402
Thr Gln Thr Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asn Pro Glu Gly Gln Pro Leu
670 675 680

TGC AAT GCC TGC GGG TTG TTT TTG AAA TTG CAC GGT GTC GTG CGC CCT 4450
Cys Asn Ala Cys Gly Leu Phe Leu Lys Leu His Gly Val Val Arg Pro
685 690 695 700

CTG TCC CTG AAA ACG GAC GTT ATC AAA AAG CGC AAC CGT AGC AGT GCC 4498
Leu Ser Leu Lys Thr Asp Val Ile Lys Lys Arg Asn Arg Ser Ser Ala
705 710 715

AAC AGC TTG GCG GTT GGG ACC TCC CGT GCG TCG AAG AAG ACA GCC CGC 4546
Asn Ser Leu Ala Val Gly Thr Ser Arg Ala Ser Lys Lys Thr Ala Arg
720 725 730

AAG AAC TCG GTG CAG CAA GCA TCC GTC ACG ACT CCG ACA TCA AGC CGC 4594
Lys Asn Ser Val Gln Gln Ala Ser Val Thr Thr Pro Thr Ser Ser Arg
735 740 745

GCT CAG AAT GGG ACT TCC TTC GAA TCC CCG CCC GCC GGC TTT AGT GCT 4642
Ala Gln Asn Gly Thr Ser Phe Glu Ser Pro Pro Ala Gly Phe Ser Ala
750 755 760

GCC GCG GGA CGG TCG AAT GGG GTG GTA CCC ATT GCC GCC GCT CCT CCG 4690
Ala Ala Gly Arg Ser Asn Gly Val Val Pro Ile Ala Ala Ala Pro Pro
765 770 775 780

AAG GCA GCT CCC TCC GCA GCC GCC TCC CCT AGC ACG GGC CAG ACC CGC 4738
Lys Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Ser Pro Ser Thr Gly Gln Thr Arg
785 790 795

AAC CCG ATC CAG GCT GCC CCG AAA CGT CAA CGA CGG CTG GAA AAG GCC 4 786
Asn Pro Ile Gln Ala Ala Pro Lys Arg Gln Arg Arg Leu Glu Lys Ala
800 805 810

ACG GAG ATG GAA ACG GAC GAG GCT AAC AAG TCC GCG GGA GGC CGA TCC 4834
Thr Glu Met Glu Thr Asp Glu Ala Asn Lys Ser Ala Gly Gly Arg Ser
815 820 825

AAG GTG GTG CCT CTG GCA CCC GCC ATG CCA CCG GCA GCA GCC AAT CCG 4882
Lys Val Val Pro Leu Ala Pro Ala Met Pro Pro Ala Ala Ala Asn Pro
830 835 840

GCG AAC CAT AGT ATT GCC GGA GGC CAA GGG GCT AGT CAG GAA TGG GAG 4930
Ala Asn His Ser Ile Ala Gly Gly Gln Gly Ala Ser Gln Glu Trp Glu
845 850 855 860

TGG TTG ACG ATG AGT CTGTAATGGC CGCGCTTACC TCTCTACTTC TCTACACTCG 4985
Trp Leu Thr Met Ser Leu
865

TTTCTTAATA TCTTTCTTGA ACCCCCCCTT ATATTTTCCC ACCGTTGATG CTACGCCATG 5045

ACCGATAGAG ATGATGAATA CTGCAACCAA TGGAATCTCG CTAGACGAGA GGTGTTAGAT 5105

GACGTGGCCC GCGATGCACT TAATGAGATA CGAGGAGGTG CAATGCGTTG GTTACGCTAG 5165

TTTAATGGTA ACATGACGAG GGATATTCGC TCTGTTATTT CGGGCTTTGA TCTGTTTCAG 5225

TCTGCGATTT AACAGCGACT GATCCTCTGC TGTGACAATA CACAGCTTGT CTTGTGGTTC 5285

TGTTGTGGCT TTCTGTTTGT TTGGCTGATT TGATTTATGC TTGATACAAT CGCGTCTGTC 5345

CGGACCCCGG CCTTTGTTTT GTTTTCAGTT CTGATTCTTC ACTGTTTCTG ATTCTCTTGT 5405

TCATGTTTTT GATTTGTTCA AGGCTTGGGG CCGGGCAGAA GTGCGCATCT CTGCTTTGTG 5465

TTTTCCGTCA CCGTGCATAG ACGCTGTATG TATATGCTAC AGCAAGATTC TACTTATCCA 5525

GTCTGAGCCT GTATTCATTG AAGTGTAGCC AGCTGTCGAA TGAGCTTTTT AACGATATTG 5585

TTTTGTTGAG TAGTCAACAA GTAGTATCTG TATATTCCGG AGTCTAAGTA AGACACTT 5643

(2) SEQ ID NO: 2:TA KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUUS: 866 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

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

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

Ala Ile Pro Ile Lys Ser Arg Lys Asp Gln Leu Arg Asp Ser Thr Pro
210 215 220

Val Pro Ala Ser Phe His His Pro Ala Gln Asp Gln Arg Lys Asn Ser
225 230 235 240

Glu Phe Gly Tyr Val Pro Arg Arg Val Arg Lys Thr Ser Ile Asp Glu
245 250 255

Arg Gln Phe Phe Ser Leu Gln Val Pro Thr Arg Lys Arg Pro Ala Glu
260 265 270

Ser Ser Pro Gln Val Pro Pro Val Ser Asn Ser Met Leu Ala His Asp
275 280 285

Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Ala Pro Ser
290 295 300

Ser Ala Phe Gly Phe His Gln Gly Asn His His Pro Val Asn His His
305 310 315 320

Asn His Thr Ser Pro Gly Ala Pro Phe Gly Leu Asp Thr Phe Gly Leu
325 330 335

Gly Asp Asp Pro Ile Leu Pro Ser Ala Gly Pro Tyr Gln Ser Gln Phe
340 345 350

Thr Phe Ser Pro Ser Glu Ser Pro Met Ala Ser Gly His Pro Phe Ala
355 360 365

Asn Leu Tyr Ser His Thr Pro Val Ala Ser Ser Leu Asn Ser Thr Asp
370 375 380

Phe Phe Ser Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gln Ser Thr Ala Ser Thr Pro
385 390 395 400

Gln Pro Thr Tyr Asp Gly Asp His Ser Val Tyr Phe Asp Met Pro Ser
405 410 415

Gly Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Ile Pro Asn Tyr Ile Ser His Arg
420 425 430

Ser Asn Leu Ser Ala Ser Leu Gln Pro Arg Tyr Met Phe Asn Gln Asn
435 440 445

Asn His Glu Gln Ala Ser Ser Ser Thr Val His Ser Pro Ser Tyr Pro
450 455 460

Ile Pro Gln Pro Gln His Val Asp Pro Thr Gln Val Leu Asn Ala Thr
465 470 475 480

Asn Tyr Ser Thr Gly Asn Ser His His Thr Gly Ala Met Phe Ser Phe
485 490 495

Gly Ala Asp Ser Asp Asn Glu Asp Asp Asp Gly His Gln Leu Ser Glu
500 505 510

Arg Ala Gly Leu Ala Met Pro Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Asp Gly Phe
515 520 525
Ser Ser Gly Met Gln Trp Asp Gly Gln Phe Pro Gly Ser Phe His Ser
530 535 540
Leu Pro Gly Phe Gly Pro Gln His Arg Lys His Val Thr Ile Gly Ser
545 550 555 560
Thr Asp Met Met Asp Thr Pro Glu Glu Trp Asn His Gly Gly Ser Leu
565 570 575
Gly Arg Thr His Gly Ser Val Ala Ser Val Ser Glu Val Arg Asn Arg
580 585 590
Glu Gln Asp Pro Arg Arg Gln Lys Ile Ala Arg Thr Thr Ser Thr Pro
595 600 605
Asn Thr Ala Gln Leu Leu Arg Gln Ser Met His Ser Asn Asn Asn Thr
610 615 620
Ser His Thr Ser Pro Asn Thr Pro Pro Glu Ser Ala Leu Ser Ser Ala
625 630 635 640
Val Pro Ser Arg Pro Ala Ser Pro Gly Gly Ser Lys Asn Gly Asp Gln
645 650 655
Gly Ser Asn Gly Pro Thr Thr Cys Thr Asn Cys Phe Thr Gln Thr Thr
660 665 670
Pro Leu Trp Arg Arg Asn Pro Glu Gly Gln Pro Leu Cys Asn Ala Cys
675 680 685
Gly Leu Phe Leu Lys Leu His Gly Val Val Arg Pro Leu Ser Leu Lys
690 695 700
Thr Asp Val Ile Lys Lys Arg Asn Arg Ser Ser Ala Asn Ser Leu Ala
705 710 715 720
Val Gly Thr Ser Arg Ala Ser Lys Lys Thr Ala Arg Lys Asn Ser Val
725 730 735
Gln Gln Ala Ser Val Thr Thr Pro Thr Ser Ser Arg Ala Gln Asn Gly
740 745 750
Thr Ser Phe Glu Ser Pro Pro Ala Gly Phe Ser Ala Ala Ala Gly Arg
755 760 765
Ser Asn Gly Val Val Pro Ile Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Ala Pro
770 775 780
Ser Ala Ala Ala Ser Pro Ser Thr Gly Gln Thr Arg Asn Pro Ile Gln
785 790 795 800
Ala Ala Pro Lys Arg Gln Arg Arg Leu Glu Lys Ala Thr Glu Met Glu
805 810 815

Thr Asp Glu Ala Asn Lys Ser Ala Gly Gly Arg Ser Lys Val Val Pro
820 825 830

Leu Ala Pro Ala Met Pro Pro Ala Ala Ala Asn Pro Ala Asn His Ser
835 840 845

Ile Ala Gly Gly Gln Gly Ala Ser Gln Glu Trp Glu Trp Leu Thr Met
850 855 860

Ser Leu
865

Patenttivaatimukset

1. Sieni, t u n n e t t u siitä, että siinä *areA*-geeni on yhdistelmä-DNA-tekniikalla muunnettu siten, että se ei voi ilmentyä niin, että se tuottaa funktionaalista AreA-aktivaattoria.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että mainittu inaktivointi on saatu aikaan deletoimalla koko *areA*-geeni tai osia siitä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että mainittu inaktivointi on saatu aikaan vaikuttamalla *areA*-geenin itsensä ilmentymistä säätelevien ekspressiosignaalien säätelyyn.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että mainittu inaktivointi on saatu aikaan käyttämällä antisense-tekniikkaa.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että mainittu inaktivointi on saatu aikaan sijoittamalla ylimääräistä DNA:ta *areA*-geenin sisään.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että se on rihmasieni, joka edullisesti kuuluu sukuun, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Candica*, *Acremonium*, *Fusarium* ja *Penicillium*.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen sieni, t u n n e t t u siitä, että se kuuluu lajiin, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. phoenicis*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. nidulans*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *H. insulens*, *H. lanuginosa*, *F. graminearum*, *F. solani*, *P. chrysogenum* ja muut.

8. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen sienen, jossa mainittu inaktivointi on saatu aikaan poistamalla *areA*-geeni, tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
i) kloonataan *areA*-geeni kysymyksessä olevasta sienestä,
ii) tuotetaan DNA-rakenne, joka käsittää *areA*-geenin, jossa jokin sen sisäinen osa on substituoitu, deletoitu tai siihen on sijoitettu ylimääräistä DNA:ta,
iii) mainittu sieni transformoidaan rakenteella ja
iv) valikoidaan transformantit, jotka ovat *areA*$^-$.

9. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen sienen tuottamiseksi, jossa sienessä mainittu inaktivointi on saatu aikaan käyttämällä antisense-tekniikkaa, t u n n e t t u

siitä, että

i) rakennetaan ilmentämisplasmidi, joka saa aikaan *areA*-geenistä transskriboidulle mRNA:lle komplementaarisen RNA-molekyylin synteesin,

ii) transformoidaan isäntäsieni mainitulla ilmentämisplasmidilla ja jollakin sopivalla markkerilla, joko erillisillä plasmideilla tai samalla plasmidilla,

iii) valikoidaan transformantit mainittua markkeria käyttäen ja

iv) seulotaan valikoidut transformantit kantojen, jotka vähentävät AreA-tuotteen synteesiä, löytämiseksi.

10. Menetelmä jonkin halutun geenituotteen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukaista sientä viljellään jossakin sopivassa kasvualustassa sopivissa olosuhteissa ja haluttu geenituote otetaan talteen ja puhdistetaan.

11. Menetelmä jonkin halutun geenituotteen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 7 mukaista sientä, joka on transformoitu siten, että haluttua geenituotetta koodaava DNA-sekvenssi on sijoitettu sienen genomiin funktionaalisesti, viljellään jossakin sopivassa kasvualustassa sopivissa olosuhteissa ja haluttu geenituote otetaan talteen ja puhdistetaan.

12. Menetelmä jonkin halutun polypeptidin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä viljellään jotakin sientä sopivassa kasvualustassa ja mainittu polypeptidi otetaan talteen mainitusta viljelystä, mainitun sienen kantaessa yhdistelmä-DNA-rakennetta, joka pystyy aikaansaamaan mainitun polypeptidin tai jonkin sen prekursorin ilmentymisen mainitussa sienessä, mainitun sienen ollessa vielä tunnettu siitä, että se tuottaa pienempiä määriä funktionaalista AreA:a kuin mainitun sienen villityyppi.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu sieni on muunnettu siten, että se tuottaa pienempiä määriä AreA:a kuin villityyppi, menetelmällä, jossa mainitun sienen emäsieni transformoidaan DNA-rakenteella, joka kykenee aikaansaamaan funktionaalisen AreA:n vähentyneen tuotannon, kun se on sijoitettu mainitun sienen genomiin.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu sieni erittää mainittua polypeptidiä solunulkoiseen väliaineeseen.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu

sieni tuottaa suurempia määriä mainittua polypeptidiä kuin samankaltainen sieni, jossa mainittu samankaltainen sieni tuottaa AreA:a määrinä, jotka ovat samankaltaisia kuin mainitun sienen villityypin tuottamat määrät, mainitun samankaltaisen sienen ollessa identtinen mainitun sienen kanssa kaikissa muissa suhteissa.

16. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 tai 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu geenituote on eritetty proteiini.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 10 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu haluttu geenituote on jokin teollinen peptidi tai proteiini, edullisesti entsyymi.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu entsyymi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat proteaasi, lipaasi, kutinaasi, sellulaasi, kymosiini.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 10 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu haluttu geenituote on jokin terapeuttisesti aktiivinen peptidi tai proteiini.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu terapeuttisesti aktiivinen peptidi tai proteiini on valittu ryhmästä, jonka muodostavat insuliini, kasvuhormoni, glukagoni, somatostatiini, interferoni, PDGF, tekijä VII, tekijä VIII, urokinaasi, tPA, EPO tai TPO.

21. Geenituote, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksista 10 - 20 mukaisella menetelmällä.

22. DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa *A. oryzaestä* peräisin olevaa *areA*-geeniä (SEQ ID No. 1) tai sen funktionaalisia alleeleja.

23. AreA-aktivaattori, t u n n e t t u siitä, että se on peräisin *A. oryzaestä* (SEQ ID No. 2).

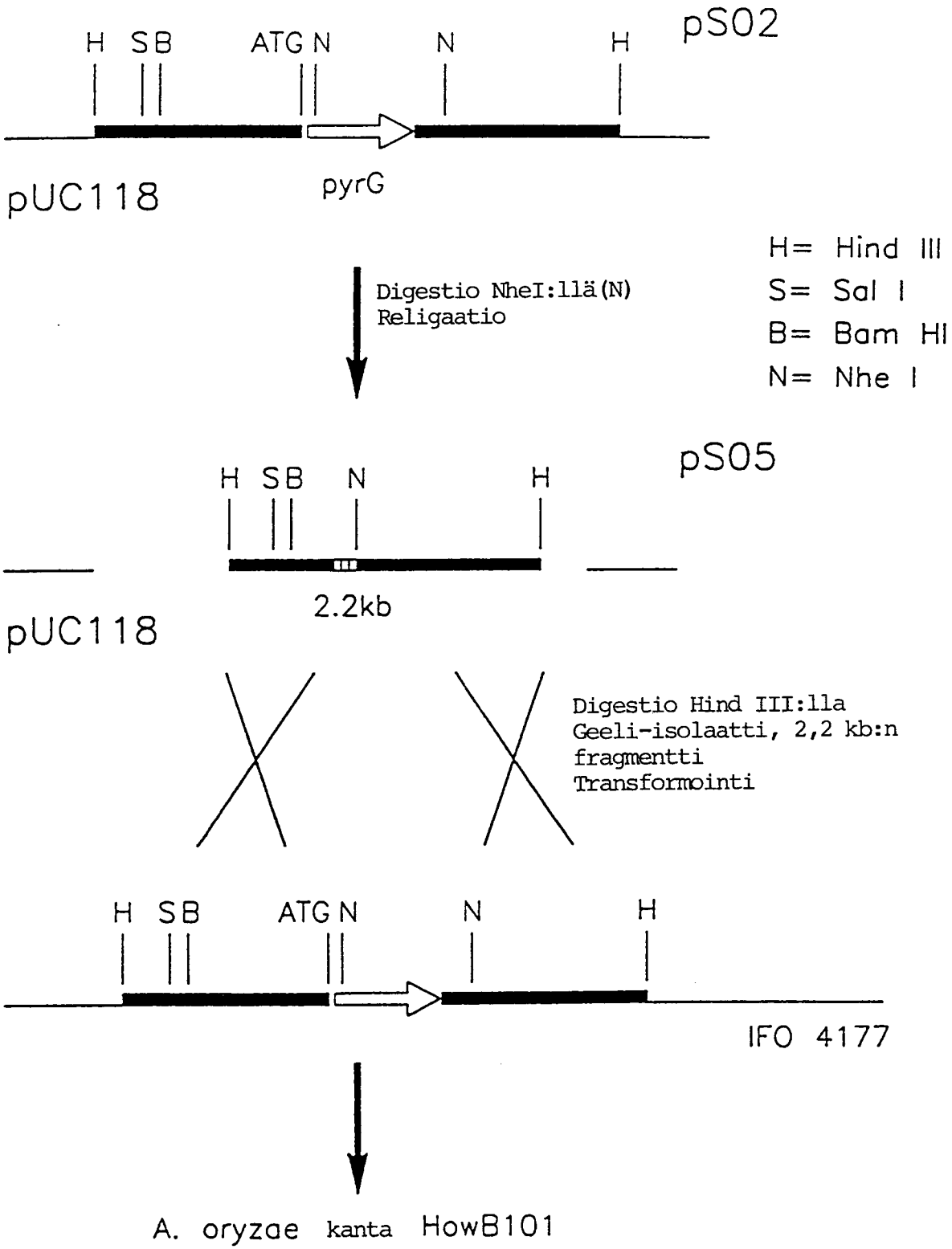
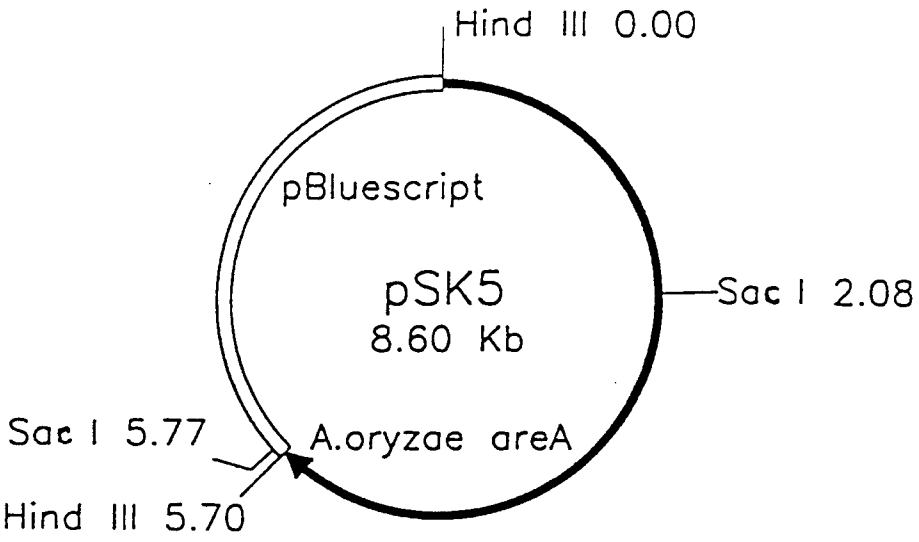

pS02
H SB ATG N N H
pUC118
pyrG
H= Hind III
S= Sal I
B= Bam HI
N= Nhe I
Digestio NheI:llä(N)
Religaatio
pS05
H SB N H
2.2kb
pUC118
Digestio Hind III:lla
Geeli-isolaatti, 2,2 kb:n
fragmentti
Transformointi
H SB ATG N N H
IFO 4177
A. oryzae kanta HowB101

Fig. 1


Hind III 0.00
pBluescript
pSK5
8.60 Kb
Sac I 2.08
Sac I 5.77
A.oryzae areA
Hind III 5.70

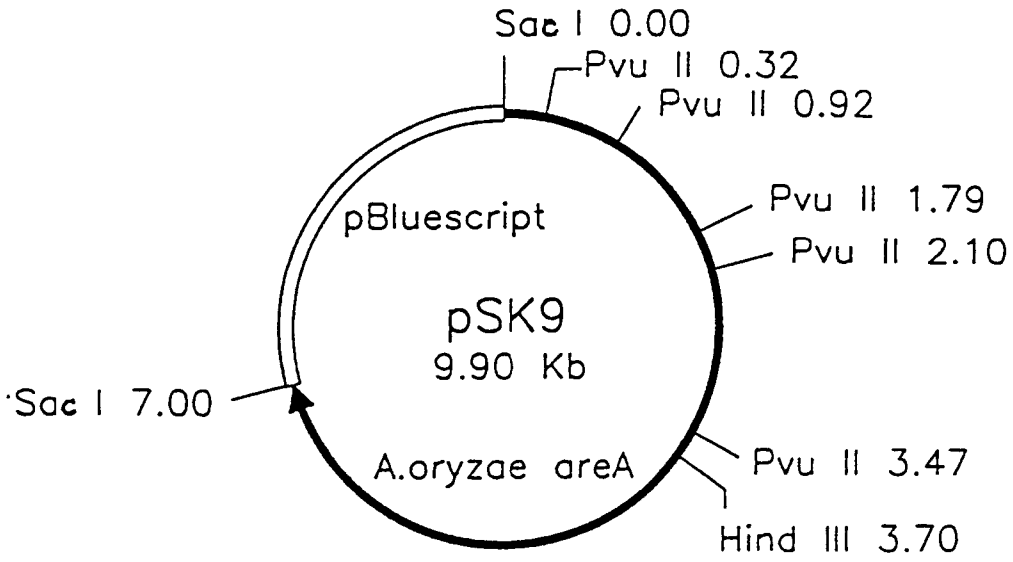

Sac I 0.00
Pvu II 0.32
Pvu II 0.92
Pvu II 1.79
Pvu II 2.10
pBluescript
pSK9
9.90 Kb
Sac I 7.00
A.oryzae areA
Pvu II 3.47
Hind III 3.70

Fig. 2

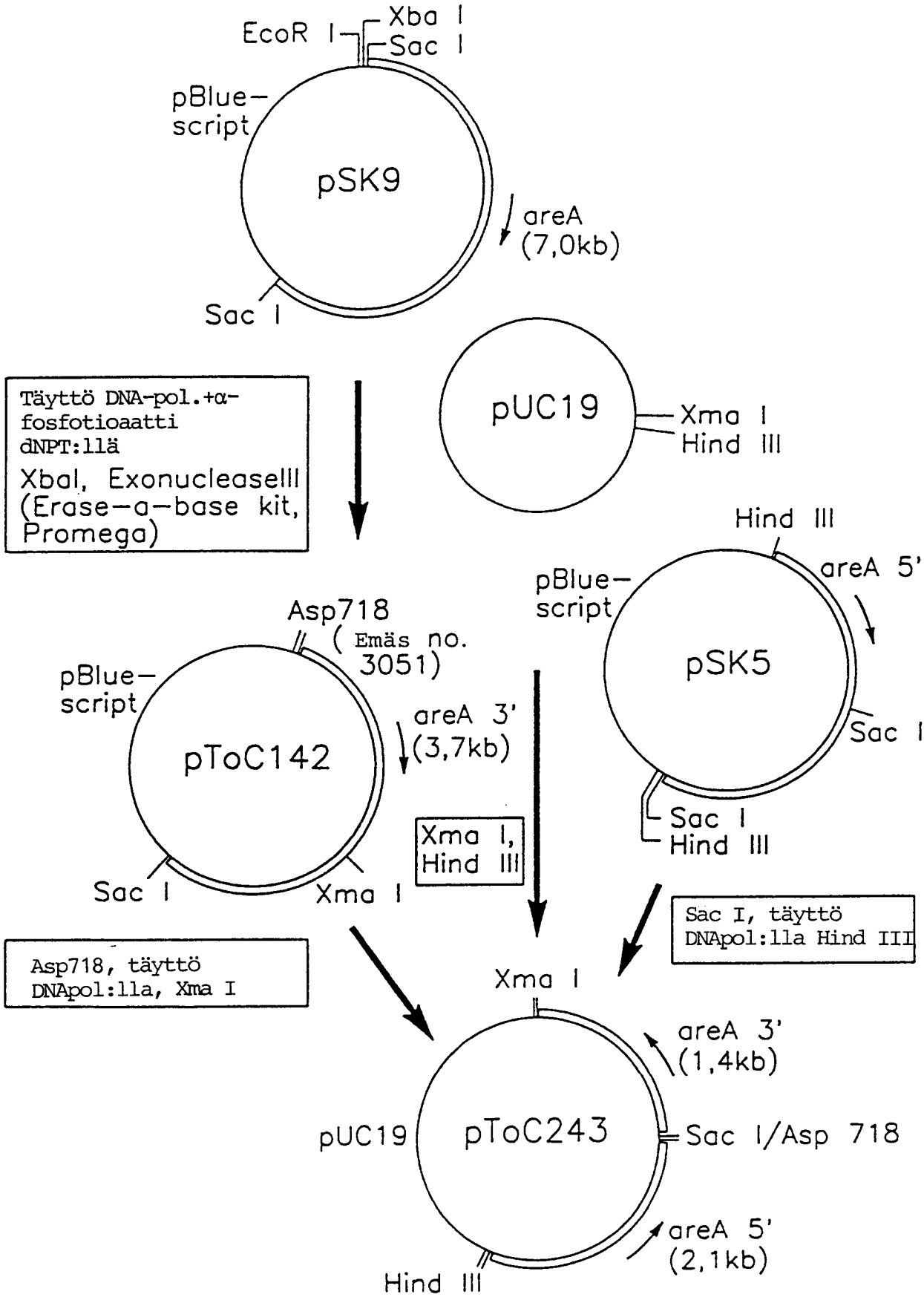

EcoR I
Xba I
Sac I
pBlue-
script
pSK9
areA
(7,0kb)
Sac I
Täyttö DNA-pol.+α-
fosfotioaatti
dNPT:llä
XbaI, ExonucleaseIII
(Erase-a-base kit,
Promega)
pUC19
Xma I
Hind III
Hind III
areA 5'
pBlue-
script
pSK5
Sac I
Sac I
Hind III
Asp718
(Emäs no.
3051)
pBlue-
script
areA 3'
(3,7kb)
pToC142
Sac I
Xma I
Xma I,
Hind III
Sac I, täyttö
DNApol:lla Hind III
Asp718, täyttö
DNApol:lla, Xma I
Xma I
areA 3'
(1,4kb)
pUC19
pToC243
Sac I/Asp 718
areA 5'
(2,1kb)
Hind III

Fig. 3a

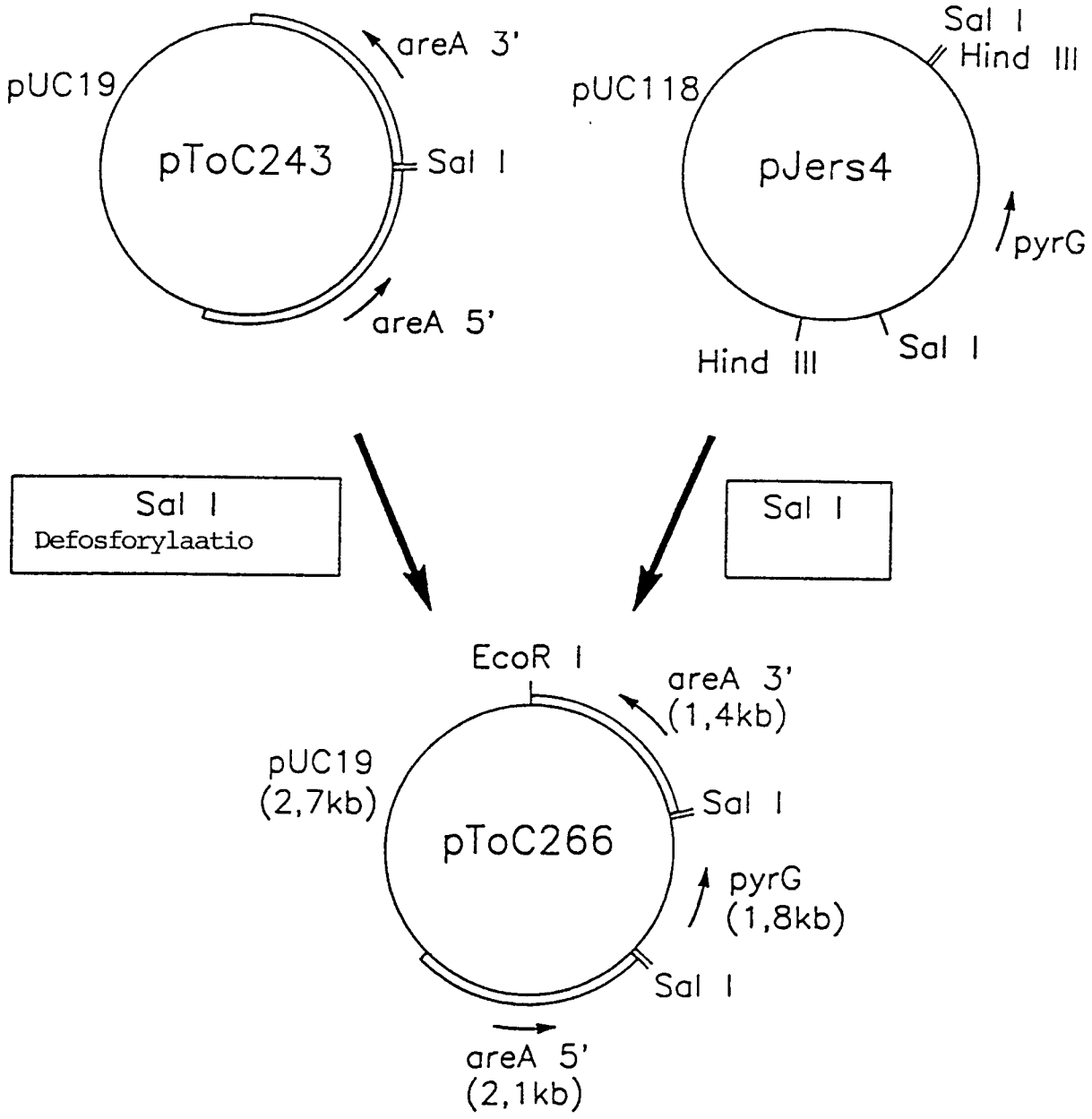

pUC19
areA 3'
pToC243
Sal I
areA 5'
pUC118
Sal I
Hind III
pJers4
pyrG
Hind III
Sal I
Sal I
Defosforylaatio
Sal I
EcoR I
areA 3'
(1,4kb)
pUC19
(2,7kb)
Sal I
pToC266
pyrG
(1,8kb)
Sal I
areA 5'
(2,1kb)

Fig. 3b

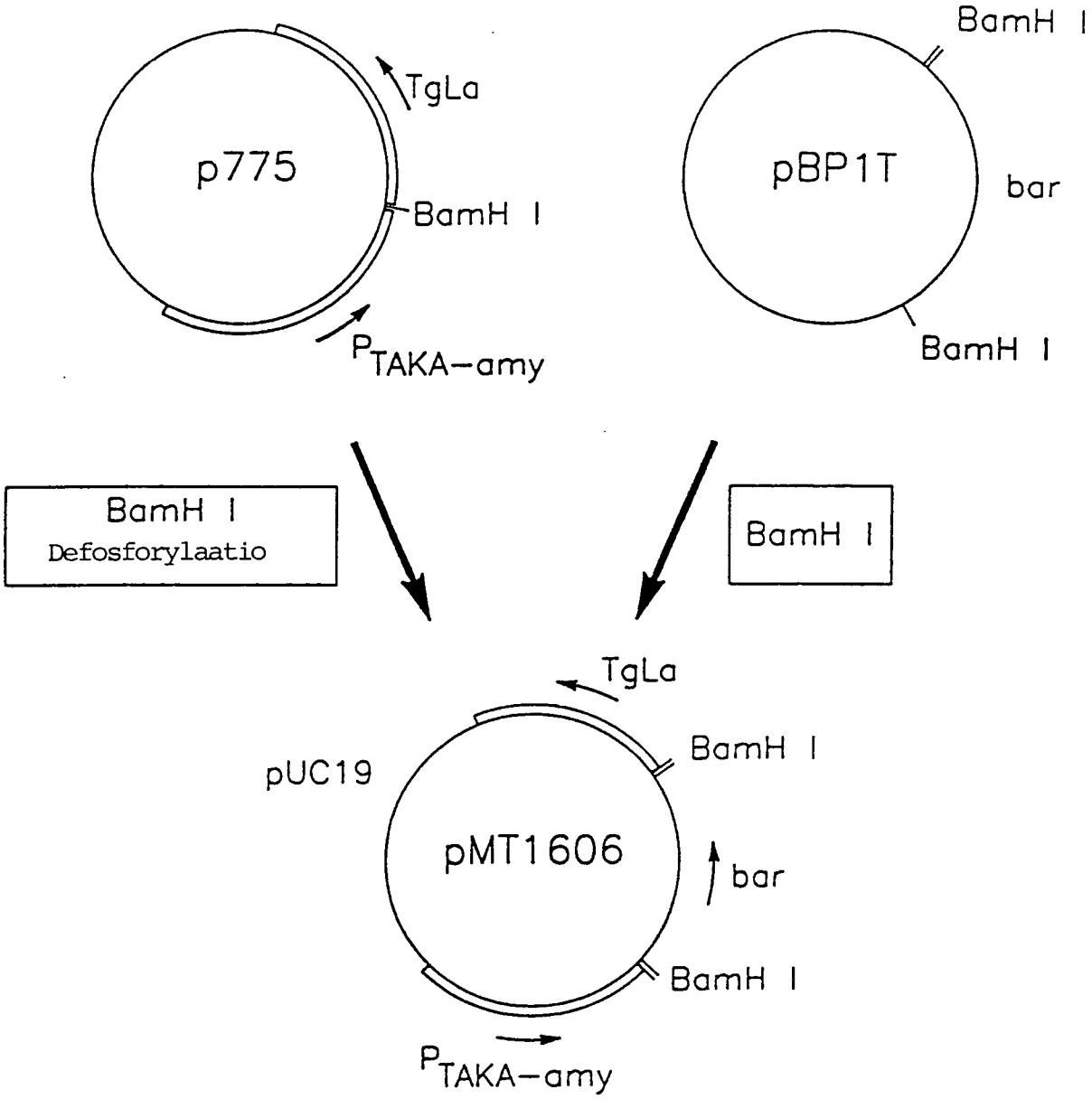

p775
TgLa
BamH I
P TAKA-amy
pBP1T
BamH I
bar
BamH I
BamH I
Defosforylaatio
BamH I
pUC19
pMT1606
TgLa
BamH I
bar
BamH I
P TAKA-amy

Fig. 4

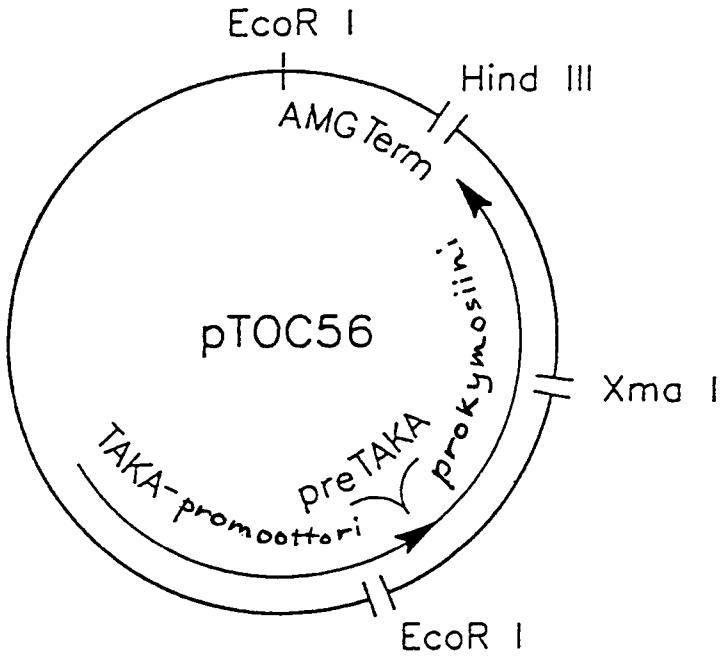

EcoR I
Hind III
AMG Term
pTOC56
prokymosiini
Xma I
preTAKA
TAKA-promoottori
EcoR I

Fig. 5