(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

FI000119514B

(10) **FI 119514 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.12.2008**

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

C12N 15/55 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **963266**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **21.08.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **22.02.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **21.08.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/DK95/00079**

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

22.02.1994 DK 0217/94 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Novozymes A/S,** Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Svendsen,Allan,** c/o Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)
2 •**Clausen,Ib Groth,** c/o Novozymes A/S,Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)
3 •**Okkels,Jens Sigurd,** c/o Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)
4 •**Thellersen,Marianne,** c/o Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä lipolyyttisen entsyymin muunnoksen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en variant av en lipolytisk enzym

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 0525610 A, WO 92/05249 A, WO 94/14964 A, WO 94/25578 A,
ROLLENCE ML et al: " Engineering thermostability in subtilisin BPN' by in vitro mutagenesis", Critical reviews in biotechnology, 1988, vol.8, nro 3, p. 217-224

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää: (a) DNA-sekvenssin, joka koodaa lipolyyttistä lähtöentsyymiä, altistamisen satunnaismutageneesille, (b) vaiheessa (a) saadun mutagenisoidun DNA-sekvenssin ilmentämisen jossakin isäntäsolussa ja (c) isäntäsolujen, jotka ilmentävät mutagenisoidun lipolyyttisen entsyymin, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja/tai joka sietää paremmin jotakin pesuainetta tai pesuainekomponenttia lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna, seulonnan.

Förfarande för framställning av en variant av en lipolytisk moderenzym, vilket förfarande innefattar: (a) utsättning av en DNA-sekvens, som kodar för den lipolytiska moderenzymen, för en randommutagenes, (b) expression av den muterade, i steget (a) erhållna DNA-sekvensen i en värdcell och (c) siktning av värdceller, som uttrycker en muterad lipolytisk enzym, som är mindre beroende av calsium och/eller har bättre tolerans gentemot en detergent eller en detergentkomponent i jämförelse med den lipolytiska moderenzymen.

Menetelmä lipolyyttisen entsyymin muunnoksen valmistamiseksi – Förfarande för framställning av en variant av en lipolytisk enzym

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää erään lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen valmistamiseksi ja menetelmällä valmistettuja muunnoksia. Lisäksi keksintö koskee DNA-rakennetta, joka koodaa keksinnön mukaista muunnosta, ilmentämisvektoria ja isäntäsolua, jotka sisältävät DNA-rakenteen, ja pesuaineen lisäainetta tai pesuainekoostumusta, jotka sisältävät muunnoksen.

Keksinnön tausta

Lipolyyttisiä entsyymejä on käytetty muutamia vuosia pesuaineiden entsyymeinä, toisin sanoen poistamaan lipidejä tai rasvaista likaa vaatteista ja muista tekstiileistä.

Esimerkiksi erilaisia mikrobiperäisiä lipaaseja on ehdotettu pesuaine-entsyymeiksi. Esimerkkejä sellaisista lipaaseista ovat *Humicola lanuginosa* -lipaasi, jota kuvataan esimerkiksi julkaisuissa EP 258 068 ja EP 305 216, *Rhizomucor miehei* -lipaasi, jollaista kuvataan esimerkiksi julkaisussa EP 238 023, jokin *Candica*-lipaasi, kuten *C. antarctica* -lipaasi, esimerkiksi *C. antarctica* -lipaasi A tai B, joita kuvataan julkaisussa EP 214 761, jokin *Pseudomonas*-lipaasi, kuten *P. alcaligenes* ja *P. pseudoalcaligenes* -lipaasi, esimerkiksi kuten julkaisussa EP 218 272 kuvataan, *P. cepacia* -lipaasi, esimerkiksi kuten julkaisussa EP 331 376 kuvataan, *Bacillus*-lipaasi, esimerkiksi *B. subtilis* -lipaasi (Dartois et al., 1993), *B. stearothermophilus* -lipaasi (JP 64/744992) ja *B. pumilus* -lipaasi (EP 91 00664).

Lisäksi on kuvattu muutamia kloonattuja lipaaseja, mukaanluettuina *Penicillium camembertii* -lipaasi, jota ovat kuvanneet Yamaguchi S. et al., 1991, *Geotricum candidum* -lipaasi (Schimada, Y. et al., 1989) ja erilaisia *Rhizopus*-lipaaseja, kuten *R. delemar* -lipaasi (Hass, M.J. et al, 1991), *R. niveus* -lipaasi (Kugimiya, W., 1992) ja *R. oryzae* -lipaasi.

Toisentyyppisiä lipolyyttisiä entsyymejä, joita on ehdotettu pesuaineiden entsyymeiksi, ovat kutinaasit, esimerkiksi *Pseudomonas mendocinasta* johdettu, jollaista kuvataan julkaisussa WO 88/09367, tai eräs kutinaasi, joka on johdettu *Fusarium solani pisistä* (kuvataan esimerkiksi julkaisussa WO 90/09446).

Viime vuosina on yritetty valmistaa lipaasimuunnoksia, joilla on parempia ominaisuuksia pesuainetarkoituksiin. Esimerkiksi WO 92/05249 kuvaa lipaasimuunnoksia, joilla on parempia ominaisuuksia ja joissa eräitä villityypin lipaasientsyymien ominaisuuksia on muutettu muuntamalla spesifisesti, s.o. suunnatusti niiden aminohappposekvenssejä. Tarkemmin sanottuna kuvataan lipaasimuunnoksia, joissa lähtölipaasin niinkutsutun lipidikosketusalueen yksi tai useampia aminohappotähteitä on muunnettu.

PCT/DK93/00225 kuvaa ominaisuuksiltaan parannettuja lipaasimuunnoksia, joissa lipaasin eräs kriittisessä asemassa sijaitseva aminohappotähde on muunnettu.

EP 407 225 kuvaa lipaasimuunnoksia, jotka kestävät paremmin proteolyyttisiä entsyymejä ja jotka on valmistettu spesifisti määritellyillä aminohappomuutoksilla.

EP 260 105 kuvaa hydrolaaseja, joissa yksi aminohappotähde 15 Å:n etäisyydellä aktiivikohdasta on substituoitu.

Kaikki edellä mainitut lipaasimuunnokset on rakennettu käyttämällä paikkaspesifistä mutageneesia, jolloin tuloksena on spesifisten aminohappotähteiden, jotka on valittu niiden tyypin perusteella tai niiden sijainnin perusteella lähtölipaasin sekundaarisessa tai tertiaarisessa rakenteessa, muuntuminen.

Eräs vaihtoehtoinen lähestymistapa jonkin annetun proteiinin mutanttien tai muunnoksien valmistamiseksi on perustunut satunnaismutageneesiin. Esimerkiksi julkaisuissa US 4 898 331 ja WO 93/01285 selitetään sellaisia menetelmiä.

Uusista lipolyyttisistä entsyymeistä, joilla on parempia pesu- ja/tai astianpesuominaisuuksia, on tarvetta ja esillä olevan keksinnön tarkoituksena onkin valmistaa sellaisia entsyymejä.

Lyhyt selostus keksinnöstä

Tämän keksinnön tekijät ovat nyt kehittäneet uuden menetelmän lipolyyttisten entsyymien muunnosten, joilla on parempia pesu- ja/tai astianpesuominaisuuksia kuin niiden lähtöentsyymeillä, valmistamiseksi. Menetelmä perustuu lipolyyttistä entsyymiä koodaavien DNA-sekvenssien satunnais- tai paikkaspesifiseen satunnaismutageneesiin.

Tarkemmin sanottuna ensimmäisen aspektinsa mukaan keksintö koskee jonkin lipo-

lyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen valmistusmenetelmää, jossa
(a) lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaavalle DNA-sekvenssille suoritetaan satunnaismutageneesi,
(b) vaiheessa (a) saatu mutatoitu DNA-sekvenssi ilmennetään jossakin isäntäsolussa ja
(b) seulotaan esille isäntäsoluja, jotka ilmentävät mutatoitua lipolyyttistä entsyymiä, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja/tai joka sietää paremmin pesuainetta tai yhtä tai useampaa pesuainekomponenttia lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna.

Tässä yhteydessä termillä "lipolyyttinen entsyymi" tarkoitetaan entsyymiä, jolla on lipidien hajottamiskyky, kuten kyky hajottaa triglyseridejä tai fosfolipidejä. Lipolyyttinen entsyymi voi esimerkiksi olla jokin lipaasi, fosfolipaasi, esteraasi tai kutinaasi.

Termi "satunnaismutageneesi" on tarkoitettu ymmärrettäväksi konventionaalisella tavalla, s.o. tarkoittamaan yhden tai useamman mutaation viemistä lähtöentsyymin satunnaisiin asemiin (s.o. vastakohtana paikkaspesifiselle mutageneesille). Satunnaismutaatiot tehdään yleensä altistamalla suuri määrä muunnettavan DNA-sekvenssin kopioita jollekin mutageenille ja sitten seulomalla läsnäolevat muunnokset. Sopivia menetelmiä satunnaismutaatioiden toteuttamiseksi käsitellään yksityiskohtaisesti tuonnempana.

Vaiheen c) seulontakriteerien katsotaan olevan erityisen hyödyllisiä identifioitaessa lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksia, joilla on parempia pesu- ja/tai astianpesuominaisuuksia verrattuna niiden lähtöentsyymeihin.

Tässä yhteydessä termin "vähäisempi riippuvuus kalsiumista" on määrä tarkoittaa, että mutatoitu lipolyyttinen entsyymi tarvitsee pienempiä määriä kalsiumia osoittaakseen samanasteista aktiivisuutta kuin lähtöentsyymi, kun niitä testataan samoissa olosuhteissa. Edullisesti keksinnön mukainen mutatoitu lipolyyttinen entsyymi on olennaisesti riippumaton kalsiumin läsnäolosta osoittaakseen entsymaattista aktiivisuutta.

Termin "parempi pesuaineen tai pesuainekomponentin sieto" on määrä tarkoittaa, että mutatoitu lipolyyttinen entsyymi on aktiivinen suuremmissa pesuaine- tai pesuainekomponenttipitoisuuksissa kuin lipolyyttinen lähtöentsyymi.

Tässä yhteydessä termin "pesuaine" on määrä tarkoittaa pesuaineen aineosien seosta,

jolloista normaalisti käytetään pesuun tai astianpesuun. Analogisesti "pesuainekomponentin" on määrä tarkoittaa jotakin komponenttia tai aineosaa, joka normaalisti esiintyy pesuaine- tai astianpesuainekoostumuksissa, joista esimerkkejä esitetään seuraavassa selityksessä.

On selvää, että keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetulla muunnoksella sen lisäksi, että se on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja/tai se sietää paremmin pesuainetta tai yhtä tai useampaa pesuainekomponenttia, on lipolyyttinen aktiivisuus, joka on edullisesti suuruusluokkaa, joka on verrattavissa lipolyyttisen lähtöentsyymin aktiivisuuteen tai ylittää sen, kun niitä testataan pesu- ja/tai astianpesuolosuhteissa.

Keksinnön mukaisen menetelmän vaiheessa (c) määritellyt seulontakriteerit voidaan määrittää millä tahansa alan tuntemalla menetelmällä. Erästä sopivaa erityismääritystä tähän tarkoitukseen kuvataan tuonnempana kappaleessa Materiaaleja ja menetelmiä.

Erään toisen aspektinsa mukaan keksintö koskee DNA-rakennetta, joka käsittää mutatoidun DNA-sekvenssin, joka koodaa lipolyyttisen entsyymin muunnosta, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja/tai joka sietää paremmin pesuainetta tai pesuainekomponenttia lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna, ja joka DNA-sekvenssi on eristetty keksinnön mukaisen menetelmän vaiheessa (c) seulotusta isäntäsolusta.

Vielä erään aspektinsa mukaan keksintö koskee rekombinantti-ilmentämisvektoria, joka kantaa DNA-rakennetta, solua, joka on transformoitu DNA-rakenteella tai vektorilla, sekä menetelmää lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen valmistamiseksi viljelemällä mainittua solua olosuhteissa, jotka johtavat muunnoksen tuotantoon, minkä jälkeen muunnos otetaan talteen viljelystä.

Lopuksi vielä keksintö koskee lipolyyttisen entsyymin muunnosta ja mainitun muunnoksen käyttöä pesuaineen, erityisesti pyykinpesua tai astianpesua varten tarkoitetun pesuaineen entsyyminä, ja pesuaineen lisäainetta ja pesuainekoostumusta, jotka sisältävät muunnoksen.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaavan DNA-sekvenssin kloonaus

DNA-sekvenssi, joka koodaa jotakin lipolyyttistä lähtöentsyymiä ja jolle on tarkoitus tehdä satunnaismutageneesi esillä olevan keksinnön mukaisesti, voidaan eristää

mistä tahansa solusta tai mikro-organismista, joka tuottaa kysymyksessä olevaa lähtöentsyymiä, alalla tunnetuilla menetelmillä.

DNA-sekvenssi voidaan esimerkiksi eristää muodostamalla cDNA tai genominen kirjasto organismista, jonka odotetaan sisältävän sekvenssin, ja seulomalla positiivisia klooneja konventionaalisilla menettelytavoilla. Esimerkkejä sellaisista menettelytavoista ovat hybridisaatio oligonukleotidikoettimiin, jotka on valmistettu lähtöentsyymin (mikäli sekvenssi-informaatio on saatavissa) tai jonkin sitä läheisesti muistuttavan entsyymin (mikäli lähtöentsyymin sekvenssi-informaatio ei ole saatavissa) aminohappo- tai DNA-sekvenssin perusteella standardimenetelmillä (vrt. Sambrook et al., 1989), ja/tai seulomalla klooneja, joilla on lipolyyttistä aktiivisuutta, kuten lipaasiaktiivisuutta, ja/tai seulomalla klooneja, jotka tuottavat proteiinia, joka reagoi lipolyyttistä lähtöentsyymiä vastaan tuotetun vasta-aineen kanssa.

Eräs edullinen menetelmä keksinnön mukaisesti muunnettavan DNA-sekvenssin, joka koodaa lipolyyttistä lähtöentsyymiä, eristämiseksi cDNA:sta tai genomikirjastosta on käyttää polymeraasiketjureaktiota (PCR) käyttämällä degeneroituja oligonukleotidikoettimia, jotka on valmistettu lähtöentsyymin DNA- tai aminohapposekvenssin perusteella. PCR voidaan toteuttaa esimerkiksi käyttämällä menetelmiä, joita on kuvattu US-patentissa n:o 4 683 202 tai joita ovat kuvanneet R.K. Saiki et al. (1988).

Vaihtoehtoisesti lähtöentsyymiä koodaava DNA-sekvenssi voidaan valmistaa synteettisesti vakiintuneilla standardimenetelmillä, esimerkiksi fosfoamidiittimenetelmällä, jonka ovat kuvanneet Beaucage ja Caruthers (1981), tai menetelmällä, jota ovat kuvanneet Matthes et al. (1984). Fosfoamidiittimenetelmän mukaan oligonukleotidit syntetisoidaan, esimerkiksi automaattisessa DNA-syntetisaattorissa, puhdistetaan, lämpökäsitellään, ligoidaan ja kloonataan sopivissa vektoreissa.

Lopuksi vielä lähtöentsyymiä koodaava DNA-sekvenssi voidaan valmistaa DNA:sta, joka on sekä genomista että synteettistä alkuperää, sekä synteettistä että cDNA-alkuperää tai sekä genomista että cDNA-alkuperää ja valmistettu ligoimalla palasia synteettisestä, genomisesta tai cDNA-lähteestä (kuten kulloinkin on tarkoituksenmukaista), palasten vastatessa kokonaisen, lähtöentsyymiä koodaavan DNA-sekvenssin eri osia, standardinmukaisilla menetelmillä.

Satunnaismutageneesi

Lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaavan DNA-sekvenssin satunnaismutageneesi, joka on määrä suorittaa keksinnön mukaisen menetelmän vaiheen a) mukaisesti, voidaan

kätevästi toteuttaa käyttämällä mitä tahansa alalla tunnettua menetelmää.

Satunnaismutageneesi voidaan esimerkiksi suorittaa käyttämällä jotakin sopivaa fysikaalista tai kemiallista mutageenia, käyttämällä jotakin sopivaa oligonukleotidia tai altistamalla DNA-sekvenssi PRC:n synnyttämälle mutageneesille. Lisäksi satunnaismutageneesi voidaan toteuttaa käyttämällä näiden mutageenien minkälaista tahansa yhdistelmää.

Mutageeni voi olla esimerkiksi sellainen, joka aikaansaa transitioita, transversioita, inversioita, ryömintää, deleetioita ja/tai insertioita.

Esimerkkejä fysikaalisista tai kemiallisista mutageeneista, jotka ovat sopivia esillä olevaan tarkoitukseen, ovat ultravioletti(UV)säteilytys, hydroksyyliamiini, N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiini (MNNG), O-metyylihydroksyyliamiini, typpihapoke, etyylimetaanisulfonaatti (EMS), natriumbisulfiitti, muurahaishappo ja nukleotidianalogit.

Kun sellaisia aineita käytetään, mutageneesi toteutetaan inkuboimalla mutatoitavaa lähtöentsyymiä koodaavaa DNA-sekvenssiä valitun mutageenin läsnäollessa sopivissa olosuhteissa, jotta mutageneesi tapahtuu, ja seulomalla mutatoitu DNA, jolla on halutut ominaisuudet.

Kun mutageneesi suoritetaan käyttämällä jotakin oligonukleotidia, oligonukleotidiin voidaan istuttaa tai naulata kolme ei-lähtönukleotidia oligonukleotidin synteesin aikana kohtiin, joita halutaan muuttaa. Istuttaminen tai naulaaminen voidaan toteuttaa siten, että vältetään ei-haluttuja aminohappoja koodaavia kodoneita. Istutettu tai naulattu oligonukleotidi voidaan sisällyttää lipolyyttistä entsyymiä koodaavaan DNA:han millä tahansa julkaistulla menetelmällä käyttäen esimerkiksi PCR:ä, LCR:ä tai mitä tahansa DNA-polymeraasia tai ligaasia.

Kun käytetään PCR:llä tuotettua mutageneesia, joko jokin kemiallisesti käsitelty tai käsittelemätön geeni, joka koodaa lipolyyttistä lähtöentsyymiä, altistetaan PCR:lle olosuhteissa, jotka lisäävät nukleotidien asettumista vääriin kohtiin (Deshler 1992, Leung et al, 1989).

Lipolyyttistä entsyymiä koodaavan DNA:n satunnaismutageneesiin voidaan käyttää jotakin *E. colin* (Fowler et al. 1974), *S. cerevisiaen* tai minkä tahansa muun mikrobiorganismin mutaattorikantaa, esimerkiksi transformoimalla lähtöentsyymin sisältä-

vä plasmidi mutaattorikantaan, kasvattamalla mutaattorikantaa plasmidin kanssa ja eristämällä mutatoitu plasmidi mutaattorikannasta. Mutatoitu plasmidi voidaan sen jälkeen transformoida ilmentämisorganismiin.

Mutatoitava DNA-sekvenssi voi kätevästi olla läsnä genomi- tai cDNA-kirjastossa, joka on valmistettu jostakin lipolyyttistä lähtöentsyymiä ilmentävästä organismista. Vaihtoehtoisesti DNA-sekvenssi voi olla läsnä jollakin sopivalla vektorilla, kuten plasmidilla tai bakteriofagilla, jota voidaan sellaisenaan inkuboida mutageenin kanssa tai muulla tavoin altistaa se sille. Mutatoitava DNA voi olla myös jossakin isäntäsolussa joko niin, että se on integroitu mainitun solun genomiin tai se on läsnä soluun ankkuroidussa vektorissa. Lopuksi vielä mutatoitava DNA voi olla eristetyssä muodossa. On selvää, että satunnaismutageneesille altistettava DNA-sekvenssi on edullisesti jokin cDNA- tai genomi-DNA-sekvenssi.

Joissakin tapauksissa saattaa olla kätevää monistaa mutatoitu DNA-sekvenssi ennen suoritettavaa ilmentämisvaihetta (b) tai seulontavaihetta (c). Sellainen monistaminen voidaan suorittaa alalla tunnettujen menetelmien mukaan, tässä keksinnössä edullisimman muodon ollessa PCR:n avulla toteutettu monistaminen käyttämällä oligonukleotidialukkeita, jotka on valmistettu lähtöentsyymin DNA- tai aminohapposekvenssin perusteella.

Mutageenin kanssa inkuboinnin tai sille muuten altistuksen jälkeen mutatoitu DNA ilmennetään viljelemällä jotakin sopivaa, DNA-sekvenssiä kantavaa isäntäsolua olosuhteissa, jotka sallivat ilmentymisen tapahtuvan. Tähän tarkoitukseen käytetty isäntäsolu voi olla sellainen, joka on transformoitu mutatoidulla DNA-sekvenssillä ja on valinnaisesti läsnä jollakin vektorilla, tai sellainen, joka kantoi lähtöentsyymiä koodaavaa DNA-sekvenssiä mutageneesikäsittelyn aikana. Esimerkkejä sopivista isäntäsoluista annetaan tuonnempana. Mutatoitu DNA-sekvenssi voi lisäksi käsittää DNA-sekvenssin, joka koodaa funktioita, jotka tekevät mutatoidun DNA-sekvenssin ilmentymisen mahdolliseksi.

On selvää, että edellä vaiheessa (c) mainitut seulontakriteerit on valittu huolellisesti. Niinpä rajoittumatta mihinkään teoriaan, seulonnan vähäisemmän kalsiumista riippuvaisuuden suhteen uskotaan tuottavan tulokseksi muunnoksia, joilla on kaiken kaikkiaan parempi suorituskyky sikäli, että kalsiumin vaatimusta voidaan pitää rajoittavana tekijänä optimiaktiivisuuden kannalta, erityisesti olosuhteissa, joissa on läsnä vain pieniä määriä vapaata kalsiumia. Pesuainelipaasien yhteydessä vaaditut vapaat kalsiumionit saadaan tavallisesti pesuvedestä ja siten lipolyyttinen aktiivisuus riippuu

veden kalsiumpitoisuudesta.

Pesuaine tai pesuainekomponentti, jota muunnos paremmin sietää, voi olla mitä tahansa tyyppiä, esimerkiksi kuten tuonnempana kuvataan. Edullisesti pesuainekomponentti on ioniton, anioninen, kationinen, kahtaisioninen tai amfoteerinen pinta-aktiivinen aine. Esimerkkejä ionittomista pinta-aktiivisista aineista ovat alkoholietoksylaatti, esimerkkejä anionisista pinta-aktiivisista aineista ovat LAS, alkyylisulfaatti, alkoholietoksisulfaatti ja vastaavat.

Erityisesti ajatellaan, että parantunut sieto erästä ionitonta pinta-aktiivista alkoholietoksylaattia, josta eräs kaupallisesti saatavilla oleva esimerkki on Dobanol®, kohtaan saattaa olla osoitus paremmasta pesukyvystä.

Vaiheen (c) seulonta suoritetaan kätevästi käyttämällä suodatinmääritystä, joka perustuu seuraavan periaatteeseen:
mikro-organismia, joka kykenee ilmentämään kysymyksessä olevaa mutatoitua lipolyyttistä entsyymiä, inkuboidaan jollakin sopivalla kasvatusalustalla ja sopivissa olosuhteissa, jotta entsyymiä erittyy, kasvatusalustan ollessa varustettu kaksoissuodattimella, joka käsittää ensimmäisen proteiineja sitovan suodattimen ja sen päällä toisen suodattimen, jolla on heikko proteiinien sitomiskyky. Mikro-organismi sijaitsee toisella suodattimella. Inkuboinnin jälkeen ensimmäinen suodatin, joka käsittää mikro-organismista erittyneen entsyymin, erotetaan toisesta suodattimesta, joka sisältää mikro-organismin. Ensimmäinen suodatin seulotaan halutun entsymaattisen aktiivisuuden suhteen ja vastaavat toisella suodattimella olevat mikrobipesäkkeet identifioidaan.

Suodatin, jota käytetään entsymaattisen aktiivisuuden sitomiseen, voi olla mikä tahansa sitova suodatin, esimerkiksi nylon- tai nitroselluloosasuodatin. Yläsuodatin, joka kantaa ilmentämisorganismin pesäkkeitä, voi olla mikä tahansa suodatin, jolla ei ole lainkaan tai vain vähän affiniteettia proteiinien sitomiseen, esimerkiksi selluloosa-asetaatti- tai Durapore™-suodatin. Suodatin voidaan esikäsitellä mihin tahansa olosuhteista, joita seulontaan käytetään, tai se voidaan käsitellä entsymaattisen aktiivisuuden detektoinnin aikana.

Entsymaattinen aktiivisuus voidaan osoittaa jollakin väriaineella, fluoresenssilla, saostamalla, pH-indikaattorilla, IR-absorbanssilla tai millä tahansa muulla tunnetulla entsymaattisen aktiivisuuden havaitsemismenetelmällä.

Detektointiyhdiste voidaan immobilisoida millä tahansa immobilisointiaineella, esimerkiksi agaroosilla, agarilla, gelatiinilla, polyakryyliamidilla, tärkkelyksellä, suodatinpaperilla, kankaalla, tai millä tahansa immobilisointiaineiden yhdistelmällä.

Lipaasiaktiivisuus voidaan ilmaista kiiltovihreän, rodamiini B:n tai sudanimustan avulla yhdistettynä johonkin lipidiin, esimerkiksi oliiviöljyyn tai sianihraan. Seulontakriteerejä lipolyyttisten lähtöentsyymien muunnosten, joilla on parempi pesukyky, tunnistamiseksi voivat olla esimerkiksi EGTA, EDTA, ionittomat tai anioniset tensidit, alkalinen pH tai mikä tahansa pesuainekoostumus yhdessä yhden tai useamman edellä mainitun entsymaattisen aktiivisuuden ilmaisimen kanssa.

On selvää, että seulontakriteerit, joita käytetään keksinnön mukaisessa suodatinmäärityksessä, voidaan valita siten, että ne sopivat seulottavien entsyymien haluttuihin ominaisuuksiin tai käyttöihin. Esimerkiksi seulottaessa lipaaseja, jotka ovat tarkoitettut erityisesti käytettäviksi paperinvalmistusteollisuudessa, saattaa olla asianmukaista seuloa hapanta lipaasia, jolla on parempi lämmönkestävyys. Tämä voidaan suorittaa käyttämällä jotakin puskuria, jonka pH on hapan (esimerkiksi pH 4) ja/tai inkuboimalla korkeassa lämpötilassa ennen koetta tai sen aikana.

Vaiheessa (c) tuotetuille isäntäsoluille voidaan suorittaa useampia edellä vaiheissa (a) - (c) kuvattuja mutageneesikierroksia, sopivasti käyttämällä tiukempia seulontakriteerejä kuin mitä edellisessä mutatointikäsittelyssä käytettiin.

Vaiheeseen (c) valittuja isäntäsoluja voidaan käyttää suoraan lipolyyttisen entsyymin muunnoksen tuottamiseen. Vaihtoehtoisesti muunnosta koodaava DNA voidaan eristää isäntäsolusta ja insertoida se johonkin toiseen sopivaan isäntäsoluun, kätevästi käyttämällä alla kappaleessa, joka on otsikoitu "Keksinnön mukaisen muunnoksen ilmentäminen" ja jossa on myös lueteltu sopivia isäntäsoluja, kuvattua menettelyä.

Paikallinen satunnaismutageneesi

Keksinnön mukaisesti satunnaismutageneesi voidaan edullisesti paikallistaa johonkin kysymyksessä olevan lipolyyttisen lähtöentsyymin osaan. Tämä saattaa esimerkiksi olla edullista, kun entsyymin jonkin tietyn alueen on tunnistettu olevan erityisen tärkeä entsyymin jonkin annetun ominaisuuden kannalta ja kun tämän alueen muuttumisen odotetaan tuottavan tulokseksi muunnoksen, jolla on paremmat ominaisuudet. Sellainen alue voidaan tavallisesti identifioida, kun lähtöentsyymin tertiaarinen rakenne on selvitetty ja liitetty entsyymin toimintaan.

Paikallistettu satunnaismutageneesi suoritetaan sopivasti käyttämällä PCR:n avulla tapahtuvaa mutageneesimenetelmää tai mitä tahansa muuta sopivaa alalla tunnettua menetelmää.

Vaihtoehtoisesti muunnettavaa DNA-sekvenssin osaa koodaava DNA-sekvenssi voidaan eristää esimerkiksi sijoittamalla se johonkin sopivaan vektoriin, ja mainitulle osalle voidaan sitten suorittaa mutageneesi käyttämällä mitä tahansa edellä käsitellyistä mutageneesimenetelmistä.

Lipolyyttinen lähtöentsyymi

Keksinnön mukaisesti muunnettava lipolyyttinen lähtöentsyymi voi olla mikä tahansa entsyymi, jolla on edellä kuvattua lipolyyttistä aktiivisuutta. Esimerkkejä lipolyyttisistä entsyymeistä ovat lipaasi, esteraasi, kutinaasi tai fosfolipidi.

Edullisesti lipolyyttinen lähtöentsyymi muunnetaan paikallisella satunnaismutageneesilla, joka suoritetaan osaan lipidikosketusaluetta tai jotakin mainitun alueen osaa koodaavan DNA-sekvenssin osaan.

Kaikilla tähän mennessä kiteytetyillä lipaaseilla on todettu olevan vähintään yksi pintasilmukkarakenne (kutsutaan myös termillä kansi tai läppä), joka peittää aktiivisen kohdan, kun lipaasi on inaktiivisessa muodossa (erästä esimerkkiä sellaisesta lipaasista kuvaavat Brady et al., 1990). Kun lipaasi aktivoituu, silmukkarakenne siirtyy paljastaen aktiivisen kohdan tähteet, ja muodostuu hydrofobinen pinta, joka ympäröi aktiivisen kohdan Seriä, jonka pinnan hydrofobisuus on lisääntynyt ja joka on vuorovaikutuksessa lipidisubstraatin kanssa hydrolyysin alkaessa tai sen aikana. Tätä aktivoitumista kutsutaan termillä rajapintojen aktivoituminen ja sitä käsittelevät enemmän Tilbeurgh et al. (1993).

Esillä olevassa tarkoituksessa aktivoitumisen jälkeen muodostunutta pintaa kutsutaan termillä "lipidikosketusalue", jonka on määrä kattaa aminohappotähteet, jotka ovat tämän pinnan sisällä tai muodostavat osan siitä, mahdollisesti silmukkarakenteiden muodossa. Nämä tähteet voivat osallistua lipaasin vuorovaikutukseen substraatin kanssa hydrolyysin alkaessa tai sen aikana, jolloin lipaasi hydrolysoi triglyseridejä lipidifaasista, kun se on aktivoitunut koskettaessaan lipidipintaa.

Lipidikosketusalue sisältää lipidisubstraatin sitomisalueen, joka on se osa lipidikosketusaluetta, johon yksittäinen lipidisubstraattimolekyyli sitoutuu ennen hydrolyysiä.

Tämä sitomisalue vuorostaan sisältää asyyliä sitovan hydrofobisen halkeaman ja niin kutsutun hydrolyysitaskun, joka sijaitsee aktiivikohdan Serin ympärillä ja jossa lipidisubstraatin hydrolyysin uskotaan tapahtuvan. Kaikissa tällä hetkellä tunnetuissa lipaaseissa lipidikosketusalue tunnistetaan helposti, esimerkiksi lipaasin kolmiulotteisesta rakenteesta, joka luodaan sopivilla tietokoneohjelmilla. Epäaktiivisen ja aktiivisen lipaasin konformaatio on vastaavassa järjestyksessä esitetty julkaisun WO 92/05249 kuvioissa 1 ja 2.

Humicola lanuginosa -lipaasin lipidikosketusaluetta, jota esillä olevassa patenttihakemuksessa käsitellään yksityiskohtaisesti, rajaavat aminohappotähteet 21-25, 36-38, 56-62, 81-98, 110-116, 144-147, 172-174, 199-213 ja 248-269. Nämä tähteet on identifioitu lipaasin ja lipidisubstraatin vuorovaikutuksen tietokonemallisimulointien perusteella.

Muiden lipolyyttisten entsyymien lipidikosketusalue määritetään

a) laskemalla 3-D molekyylirakenteen hydrofobinen vektori,

b) katkaisemalla kohtisuoraan vektoriin nähden lineaarisessa sekvenssissä aktiivikohdan seriinin jälkeisen toisen aminohappotähteen Cα-atomin kohdalta, ja

c) ottamalla mukaan kaikki tähteet ja vähintään yhden atomin katkaisun sillä puolella, johon vektori osoittaa, ja

d) valitsemalla näistä tähteistä ne, joissa on vähintään yksi atomi proteiinin pinnan 5 ångströmin suuruisen alueen sisällä (kysymyksen ollessa lipaasista joko sen avoimessa tai suljetussa muodossa).

Hydrofobinen vektori lasketaan proteiinirakenteesta, kysymyksen ollessa lipaasista joko sen avoimessa tai suljetussa muodossa, laskemalla yhteen kaikki tähdevektorit tähteille, joiden pinnasta vähintään 10 % on tavoitettavissa (Lee, B. ja Richards, F.M., 1971, Mol. Biol. **55**:379-400). Tähdevektorin alkamiskohdaksi määritellään tähteen Cα-atomi ja sen suunta kulkee sivuketjun massakeskuksen kautta. Kunkin tähdevektorin suuruus määritellään tähteen suhteellisena siirtovapaana energiana.

Kunkin tähteen pinnan tavoitettavuus lasketaan käyttämällä Connollyn ohjelmaa.

Edullisesti paikallinen satunnaismutageneesi toteutetaan DNA-sekvenssin osaan, joka koodaa lähtöentsyymin kansialuetta ja/tai hydrofobista halkeamaa tai mainitun kansialueen ja/tai hydrofobisen halkeaman osaa.

Keksinnön mukaisesti muunnettavan lipolyyttisen lähtöentsyymin alkuperä voi olla

mikä tahansa. Entsyymi vois siis olla peräisin nisäkkäästä, kasvista, selkärankaisesta tai miltä tahansa muulta alueelta. Tässä on kuitenkin edullista, että entsyymi on peräisin mikrobeista siinä mielessä, että muutamien mikrobikantojen on todettu tuottavan entsyymejä, joita voidaan käyttää erityisesti pesuainetarkoituksiin.

Tarkemmin sanottuna DNA-sekvenssin lipolyyttinen lähtöentsyymi voi olla peräisin jostakin sienestä, s.o. jostakin hiivasta tai rihmasienestä. DNA-sekvenssi voi esimerkiksi olla sellainen, joka on johdettavissa jostakin *Humicola* sp. -kannasta, esimerkiksi *H. lanuginosa* -kannasta, jostakin *Rhizomucor* sp. -kannasta, esimerkiksi *R. miehei* -kannasta, jostakin *Rhizopus* sp. -kannasta, jostakin *Candida* sp. -kannasta, jostakin *Fusarium* sp., esim. *F. solani pisi* -kannasta, jostakin *Venturia* spp. -kannasta, esimerkiksi *V. inaequalis* -kannasta, jostakin *Colletotrichum* spp. -kannasta, esimerkiksi *C. gloeosporioides* -kannasta tai *C. lagenarium* -kannasta, tai jostakin *Penicillium* spp. -kannasta, esimerkiksi *P. spinulosum*- tai *P. camembertii* -kannasta.

Tässä yhteydessä sanonnan "on johdettavissa" ei ole määrä tarkoittaa ainoastaan entsyymiä, joka on tuotettu jostakin kysymyksessä olevan organismin kannasta, vaan myös entsyymiä, jota sellaisesta kannasta eristetty DNA-sekvenssi koodaa ja joka on tuotettu jossakin isäntäorganismissa, joka on transformoitu mainitulla DNA-sekvenssillä. Lisäksi termin on määrä tarkoittaa entsyymiä, jota koodaa synteettistä ja/tai cDNA-alkuperää oleva DNA-sekvenssi ja jolla on kysymyksessä olevan entsyymin identifiointitunnusmerkit.

Erityisen mielenkiintoinen lipolyyttisenä lähtöentsyyminä on lipaasi, joka on johdettavissa jostakin *H. lanuginosa* -kannasta, esimerkiksi *H. lanuginosa* -kannasta DSM 4109, tai jostakin mainitun lipaasin analogista, jostakin *Rh. mucor* -kannasta tai jostakin *C. antarctica* -kannasta.

Tässä yhteydessä termin "analogi" on määrä tarkoittaa polypeptidiä, joka käsittää aminohapposekvenssin, joka eroaa *H. lanuginosa* -lipaasin aminohapposekvenssistä yhden tai useamman aminohappotähteen osalta ja joka on vähintään 70-prosenttisesti homologinen mainitun lipaasin aminohapposekvenssin kanssa (määritettynä näiden kahden sekvenssin identtisyysasteena), kuten vähintään 75-prosenttisesti, 80-prosenttisesti, 90-prosenttisesti tai 95-prosenttisesti homologinen, on immunologisesti ristireagoiva mainitun lipaasin kanssa ja/tai jota koodaa DNA-sekvenssi, joka hybridisoituu oligonukleotidikoettimen kanssa, joka on valmistettu mainitun lipaasin aminohapposekvenssin tai mainittua lipaasia koodaavan DNA-sekvenssin perusteella.

Analogi voi olla jokin *H. lanuginosa* -lipaasin johdos, joka on esimerkiksi valmistettu muuntamalla lipaasia koodaavaa DNA-sekvenssiä siten, että tuloksena on yhden tai useamman aminohappotähteen additio lipaasin joko N- tai C-terminaaliseen päähän tai molempiin, yhden tai useamman aminohappotähteen substituutio aminohapposekvenssin yhdessä tai useammassa kohdassa, yhden tai useamman aminohappotähteen deleetio lipaasin toisessa tai toisessa tai molemmissa päissä tai aminohapposekvenssin yhdessä tai useammassa kohdassa, tai yhden tai useamman aminohappotähteen insertio yhdessä tai useammassa kohdassa aminohapposekvenssiä. DNA-sekvenssin muuntaminen voidaan suorittaa paikkaspesifisellä tai satunnaismutageneesilla tai näiden menetelmien yhdistelmällä hyvin tunnettujen menettelytapojen mukaisesti.

Lisäksi analogi voi olla jokin polypeptidi, joka on johdettu jostakin muusta organismista, kuten jostakin edellä kappaleessa "Keksinnön tausta" mainituista.

DNA-sekvenssin, joka koodaa *H. lanuginosa* -lähtölipaasin analogia, hybridisoiminen asianmukaiseen oligonukleotidikoettimeen (-koettimiin) voidaan toteuttaa missä tahansa sopivissa olosuhteissa, jotka sallivat DNA-sekvenssien hybridisoitua. Sellaisia olosuhteita ovat esimerkiksi hybridisaatio spesifeissä olosuhteissa, esimerkiksi sellaisissa, joihin kuuluu esiliotus 5xSSC:ssä ja esihybridisointi 1 tunnin ajan ~40 °C:ssa liuoksessa, joka sisältää 20 % formamidia, 5 x Denhardtin liuosta, 50 mM natriumfosfaattia, pH 6,8, ja 50 µg denaturoitua sonikoitua vasikan kateenkorvan DNA:ta, ja sen jälkeen hybridisointi samassa liuoksessa, johon on lisätty 100 µM ATP:tä, 18 tuntia ~40 °C:ssa, tai muilla menetelmillä, joita ovat kuvanneet esimerkiksi Sambrook et al., 1989.

H. lanuginosa -lipaasin analogin immunologista ristireaktiivisuutta voidaan tutkia käyttämällä vasta-ainetta, joka on tuotettu puhdistetun lipaasin vähintään yhtä epitooppia vastaan tai joka reagoi sen kanssa. Vasta-aine, joka voi olla joko monoklonaalinen tai polyklonaalinen, voidaan tuottaa alalla tunnetuilla menetelmillä, esim. kuten Hudson et al. ovat kuvanneet, 1989. Immunologinen ristireaktiivisuus voidaan määrittää käyttämällä alalla tunnettuja kokeita, joista esimerkkejä ovat Western blotting -menetelmä tai radiaali-immunodiffuusiomenetelmä, jollaista ovat kuvanneet esimerkiksi Hudson et al., 1989.

Kun lipolyyttinen lähtöentsyymi on *H. lanuginosa* -lipaasi, joka voidaan johtaa kannasta DSM 4109, tai jokin sen analogi, on eduksi, että satunnaismutagenisoitava DNA-sekvenssi käsittää osan tai muodostaa osan DNA-sekvenssistä, joka koodaa

vähintään yhtä mainitun lipaasin aminohappotähteiden 21-27, 56-64, 81-99, 83-100, 108-116, 145-147, 174, 202-213, kuten esimerkiksi 205-211, 226-227, 246-259 tai 263-269, rajaamista alueista. Mainitun lipaasin DNA- ja aminohapposekvenssit käyvät selville SEQ ID -numeroista 1 ja 2, vastaavassa järjestyksessä.

Paikallistettu satunnaismutageneesi voidaan suorittaa yhdellä tai useammalla näistä alueista ja edullisesti se suoritetaan vähintään kahdella näistä alueista.

Tämän keksinnön mukaisesti muunnettava lipolyyttinen lähtöentsyymi voi olla johdettavissa jostakin bakteerista. Lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaava DNA-sekvenssi voi esimerkiksi olla johdettavissa jostakin *Pseudomonas* spp. -kannasta, kuten esimerkiksi *P. cepacia*-, *P. alcaligenes*-, *P. pseudoalcaligens*-, *P. mendocina*- (esiintyy myös nimellä *P. putida*), *P. syringae*-, *P. aeroginosa*- tai *P. fragi* -kannasta, jostakin *Bacillus* spp. -kannasta, esimerkiksi *B. subtilis*- tai *pumilus* -kannasta, tai jostakin *Streptomyces* sp. -kannasta, esimerkiksi *S. scabies* -kannasta.

Lipolyyttinen lähtöentsyymi voi olla lipaasi, joka on johdettu mistä tahansa edellä mainitusta lajista, esimerkiksi *Pseudomonas*-lipaasi, kuten kuvataan julkaisuissa EP 218 272, EP 331 376 ja EP 407 225, tai jokin kutinaasi, esimerkiksi kuten kuvataan julkaisussa WO 88/09367.

Keksinnön mukaisia muunnoksia

Jotta viittaaminen keksinnön mukaisiin eri muunnoksiin olisi helpompaa, ne kuvataan käyttämällä seuraavaa nimistöä:

Alkuperäinen aminohappo (-hapot):asema(t):substituoitu aminohappo (-hapot)

Tämän nimistön mukaan esimerkiksi valiinin korvaaminen asparagiinihapolla asemassa 96 esitetään:

Asp 96 Val tai D96V

asparagiinihapon deleetio samasta asemasta esitetään:

Asp 96 * tai D96*

ja jonkin lisäaminohappotähteen, kuten esimerkiksi lysiinin, insertio esitetään:

Asp 96 ValLys tai D96VK

useat mutaatiot erotetaan +-merkeillä, toisin sanoen:

Asp 96 Val + Glu 87 Lys tai D96V+E87K

mikä tarkoittaa mutaatioita asemissa 96 ja 87 korvaamalla asparagiinihappo ja glutamiinihappo valiinilla ja lysiinillä, vastaavassa järjestyksessä.

Kun yksi tai useampi vaihtoehtoinen aminohappotähde insertoidaan johonkin annettuun asemaan, se osoitetaan seuraavasti:
D96V, N tai
D96V tai D96N

Lisäksi kun tässä identifioidaan jokin muuntamiseen sopiva asema ehdottamatta mitään spesifistä muunnosta, se tulee käsittää niin, että asemassa oleva aminohappotähde voidaan korvata millä tahansa aminohappotähteellä. Niinpä esimerkiksi kun mainitaan asparagiinihapon muuntaminen asemassa 96, mutta sitä ei tarkenneta, se tulee ymmärtää niin, että asparagiinihappo voidaan poistaa tai korvata millä tahansa muulla aminohapolla, s.o. millä tahansa aminohapoista R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, tai jokin lisäaminohappotähde voidaan insertoida tähän asemaan.

Lopuksi vielä kun tässä identifioidaan jokin *H. lanuginosa* -lähtölipaasin mutaatio, se on tarkoitettu ymmärrettäväksi niin, että se käsittää myös mainitun lipaasin jonkin analogin (kuten edellä kuvattiin) samanlaisen mutaation.

Erään toisen aspektinsa mukaan keksintö koskee muunnosta, joka on rakennettu edellä kuvatulla keksinnön mukaisella menetelmällä.

Kun lipolyyttinen lähtöentsyymi on *H. lanuginosa* -lipaasi, joka on johdettavissa kannasta DSM 4109, tai jokin sen analogi, kuten edellä kuvattiin, on eduksi, että muunnos käsittää mutaation vähintään yhdessä seuraavista asemista: S58, T64, S83, N94, K98, I100, A121, E129, D167, R205, K237, I252, P256 tai G263. On selvää, että kun kysymyksessä on korvaus, mikä tahansa muu aminohappotähde kuin villityypin aminohappotähde voidaan insertoida, kuten esimerkiksi jokin seuraavista aminohappotähteistä R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, D.

Sikäli kuin tämän keksinnön tekijät tietävät, näissä asemissa ei ole aikaisemmin kuvattu spesifejä mutaatioita.

Lisäksi keksintö koskee kannasta DSM 4109 johdettavissa olevan *H. lanuginosa* -lipaasin tai jonkin mainitun lipaasin analogin muunnosta, jossa aminohappotähde L264 on korvattu jollakin aminohapolla, joka ei ole leusiini, s.o. millä tahansa aminohapoista R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, D.

Edullisesti keksinnön mukainen muunnos käsittää vähintään yhden seuraavista mutaatioista K46R, E57G, G61S, S83T, S58F, D62C, T64R, I90F, G91A, N92H, N94I, N94K, L97M, K98I, I100V, D102K, A121V, E129K, D167G, R205K, E210W, K237M, N259W, I252L, D254W, P256T, G263A, L264Q tai T267W.

Näiden asemien on todettu olevan tärkeitä tai niiden ajatellaan olevan tärkeitä entsymaattisen aktiivisuuden ja/tai detergentinsiedon kannalta. Aminohappotähteiden numerointi viittaa kypsän lipaasin aminohapposekvenssiin.

Edullisesti keksinnön tämän aspektin mukainen muunnos käsittää vähintään yhden seuraavista mutaatioista S83T, N94K, A121V, D167G, R205K.

On selvää, että esillä oleva keksintö kattaa *H. lanuginosa* -lähtölipaasin muunnokset, joissa on jokin kahden tai useamman tässä määritellyn mutaation yhdistelmä tai jokin yhden tai useamman tässä määritellyn mutaation yhdistelmä jonkin julkaisujen WO 92/05249, WO 94/25577 ja WO 94/01541 mukaisen mutaation kanssa.

Vielä erään aspektinsa mukaan esillä oleva keksintö koskee *H. lanuginosa* -lähtölipaasin, joka on johdettavissa DSM 4109:stä, tai jonkin sen analogin muunnosta, joka käsittää vähintään yhden seuraavista mutaatioista:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M

E210w
E56T+D57L+I90F+D96L+E99K
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+K96L+L97M
E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
K46R+E56R+G61S
D102K
D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
E210V
E210W
N251W+D254W+T267W
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+I90F+D96L+E99K
D57G+N94K+D96L+L97M

Näiden muunnosten on todettu olevan vähemmän riippuvaisia kalsiumista ja/tai sietävän paremmin pesuainekomponentteja, kuten esimerkiksi ionitonta pinta-aktiivista alkoholietoksylaattia, ja niiden katsotaan sen vuoksi olevan erityisen käyttökelpoisia pesuaine- tai astianpesuainetarkoituksiin. Muunnokset on rakennettu keksinnön mukaisella menetelmällä ja niille ovat sen vuoksi tunnusomaisia tehdyt mutaatiot ja niitä kuvataan enemmän tuonnempana olevissa esimerkeissä. On selvää, että vaihtoehtoinen menetelmä näiden muunnoksien rakentamiseksi perustuisi suunnattuun mutageneesiin, jossa käytetään sopivia oligonukleotidikoettimia. Tämä menetelmä on esitetty esimerkeissä 3 - 6.

Keksinnön mukaisen muunnoksen ilmentäminen

Keksinnön mukaan mutatoitu SNA-sekvenssi, joka koodaa lipolyyttisen entsyymin muunnosta, joka on valmistettu edellä kuvatuilla menetelmillä tai millä thansa alalla tunnetulla vaihtoehtoisella menetelmällä, voidaan ilmentää entsyymin muodossa käyttämällä jotakin ilmentämisvektoria, joka yleensä sisältää säätelysekvenssejä, jotka koodaavat jotakin promoottoria, operaattoria, ribosomisitomiskohtaa, translaation aloitussignaalia ja mahdollisesti jotakin repressorigeeniä tai erilaisia aktivaattorigeenejä.

Yhdistelmä-ekspressiovektori, joka kantaa keksinnön mukaista muunnosta koodaa-

vaa DNA-sekvenssiä, voi olla mikä tahansa vektori, jolle voidaan kätevästi suorittaa yhdistemä-DNA-menetelmiä, ja vektorin valinta riippuu usein isäntäsolusta, johon se on määrä viedä. Niinpä vektori voi olla jokin itsenäisesti replikoituva vektori, s.o. vektori, joka esiintyy kromosominulkoisena yksikkönä ja jonka replikoituminen on riippumatonta kromosomin replikoitumisesta, esimerkiksi plasmidi, bakteriofagi tai jokin kromosominulkoinen osa, minikromosomi tai keinotekoinen kromosomi. Vaihtoehtoisesti vektori voi olla sellainen, joka isäntäsoluun vietynä integroituu isäntäsolun genomiin ja replikoituu yhdessä kromosomi(e)n kanssa, johon (joihin) se on integroitunut.

Vektorissa DNA-sekvenssin tulisi olla operatiivisesti liittynyt johonkin sopivaan promoottorisekvenssiin. Promoottori voi olla mikä tahansa DNA-sekvenssi, jolla on transskriptionaalinen aktiivisuus valitussa isäntäsolussa ja joka voidaan johtaa geeneistä, jotka koodaavat proteiineja, jotka ovat joko homologisia tai heterologisia isäntäsolun kanssa. Esimerkkejä sopivista promoottoreista keksinnön mukaista muunnosta koodaavan DNA-sekvenssin transskription ohjaamiseksi, erityisesti bakteeri-isännässä, ovat *E. colin lac*-operonipromoottori, *Streptomyces licheniformisiksen* α-amylaasigeeni(*amy*L)promoottorit, esimerkiksi kuten kuvataan julkaisussa WO 93/10249, *Bacillus stearothermophilus* maltogeeninen amylaasigeeni(*amy*M)-promoottorit, *Bacillus amyloquefaciens* α-amylaasi(*amy*Q)promoottorit, *Bacillus subtilis* xylA- ja xylB-geenipromoottorit jne. Esimerkkejä käyttökelpoisista promoottoreista transskriptioon sieni-isännässä ovat sellaiset, jotka on johdettu geenistä, joka koodaa *A. oryzae* -Taka-amylaasia, *Rhizomucor miehei* -aspartiiniproteinaasia, *A. niger* -neutraalia α-amylaasia, *A. niger* -hapanta stabiilia α-amylaasia, *A. niger* -glukoamylaasia, *Rhizomucor miehei* -lipaasia, *A. oryzae* -alkalista proteaasia, *A. oryzae* -trioosifosfaattiisomeraasia tai *A. nidulans* -asetamidaasia.

Keksinnön mukainen ekspressiovektori voi myös käsittää jonkin sopivan transskription lopettajan ja eukaryooteissa polyadenylaatiosekvenssejä, jotka ovat toiminnallisesti liittyneet keksinnön mukaista muunnosta koodaavaan DNA-sekvenssiin. Lopetus- ja polyadenylaatiosekvenssit voivat sopivasti olla johdetut samoista lähteistä kuin promoottori.

Vektori voi lisäksi käsittää DNA-sekvenssin, joka tekee vektorin kykeneväksi replikoitumaan kysymyksessä olevassa isäntäsolussa. Esimerkkejä sellaisista sekvensseistä ovat plasmidien pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 ja pIJ702 replikaation aloituskohdat.

Vektori voi myös käsittää jonkin seulottavan markkerin, esimerkiksi geenin, jonka tuote täydentää jonkin puutteen isäntäsolussa, kuten esimerkiksi *dal*-geenit, jotka on johdettu *B. subtilisista* tai *B. licheniformiksesta*, tai sellainen, joka antaa antibioottista resistenssiä, kuten ampisilliini-, kanamysiini-, kloramfenikoli- tai tetrasykliiniresistenssiä. Lisäksi vektori voi käsittää *Aspergillus* -seulontamarkkereita, kuten amdS, argB, niaD ja sC, markkeri, joka synnyttää hygromysiiniresistenssiä, tai seulonta voidaan suorittaa rinnakkaistransformaation avulla, esimerkiksi kuten kuvataan julkaisussa WO 91/17243.

Vaikka solunsisäinen ilmentäminen saattaa olla joissakin suhteissa edullista, yleensä parempana pidetään solunulkoista ekspressiota. Lipolyyttinen lähtöentsyymi voi itse sisältää esialueen, joka mahdollistaa ekspressoidun entsyymin erittymisen viljelyalustaan. Haluttaessa tämä esialue voidaan korvata jollakin erilaisella esialueella tai signaalisekvenssillä, mikä tapahtuu kätevästi substituoimalla kysymyksessä olevia esialueita koodaavat DNA-sekvenssit.

Menettelytavat, joita käytetään keksinnön mukaisen DNA-rakenteen, joka koodaa jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnosta, promoottorin, terminaattorin ja muiden osien, vastaavassa järjestyksessä, ligoimiseksi ja niiden insertoimiseksi sopiviin vektoreihin, jotka sisältävät replikaatioon tarvittavan informaation, ovat alaan perehtyneiden hyvin tuntemia (vrt. esimerkiksi, Sambrook et al., 1989).

Keksinnön mukaista solua, joka käsittää joko keksinnön mukaisen DNA-rakenteen tai ilmentämisvektorin, kuten edellä kuvattiin, käytetään edullisesti isäntäsoluna jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin keksinnön mukaisen muunnoksen tuottamiseen yhdistelmätekniikalla. Solu voidaan transformoida keksinnön mukaisella DNA-rakenteella, kätevästi integroimalla DNA-rakenne isäntäkromosomiin. Tällainen integroiminen katsotaan yleensä edulliseksi, koska DNA-sekvenssi säilyy tällöin todennäköisemmin stabiilina solussa. DNA-rakenteiden integroiminen isäntäkromosomiin voidaan suorittaa konventionaalisilla menetelmillä, esimerkiksi homologisen tai heterologisen rekombinaation avulla. Vaihtoehtoisesti solu voidaan transformoida jollakin ekspressiovektorilla, kuten tuonnempana erityyppisten isäntäsolujen yhteydessä kuvataan.

Keksinnön mukainen solu voi olla jonkin korkeamman organismin, kuten nisäkkään tai hyönteisen, solu, mutta edullisesti se on jokin mikrobisolu, esimerkiksi bakteeri- tai sienisolu (hiivat mukaanlukien).

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 toteuttaa esimerkiksi protoplastitransformaatiolla tai käyttämällä kompetentteja soluja jollakin sinänsä tunnetulla tavalla.

Hiivaorganismiksi on suotuisaa valita jokin *Saccharomyces*- tai *Schizosaccharomyces*-laji, esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae*. Rihmasieni voi edullisesti kuulua johonkin *Aspergillus*-lajiin, esimerkkeinä *Arpergillus oryzae*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nidulans*. Sienisoluja voidaan transformoida menetelmällä, johon kuuluu protoplastin muodostaminen ja protoplastien transformoiminen ja sen jälkeen soluseinän regeneroiminen sinänsä tunnetulla tavalla. Erästä sopivaa menettelytapaa *Aspergillus*-isäntäsolujen transformoimiseksi kuvataan julkaisussa EP 238 023.

Vielä erään aspektinsa mukaan tämä keksintö koskee menetelmää jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin keksinnön mukaisen muunnoksen tuottamiseksi, jossa menetelmässä viljellään jotakin isäntäsolua, kuten edellä kuvattiin, olosuhteissa, jotka johtavat muunnoksen tuottamiseen, ja muunnos otetaan talteen soluista ja/tai viljelyalustasta.

Viljelyalusta solujen viljelemiseksi voi olla mikä tahansa konventionaalinen alusta, joka sopii kysymyksessä olevan isäntäsolun kasvattamiseen ja keksinnön mukaisen lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen ilmentämiseen. Sopivia kasvatusalustoja on saatavissa kaupallisilta toimittajilta tai niitä voidaan valmistaa julkaistujen reseptien mukaan (esimerkiksi American Type Culture Collectionin katalogeissa).

Keksinnön mukainen muunnos, joka on erittynyt isäntäsoluista, voidaan ottaa kätevästi talteen viljelyalustasta tunnetuilla menettelytavoilla, mukaanlukien solujen erottaminen alustasta sentrifugoimalla tai suodattamalla ja viljelyalustan proteiinipitoisten komponenttien saostaminen jonkin suolan, kuten ammoniumsulfaatin, avulla ja sen jälkeen kromatograafisilla menetelmillä, kuten ioninvaihtokromatografialla, affiniteettikromatografialla tai vastaavilla.

Pesuaineen lisäaine ja koostumus astianpesua ja pyykinpesua varten

Keksinnön mukaisen muunnoksen vähäisemmän kalsiumriippuvuuden ja/tai paremman pesuaineiden tai pesuainekomponenttien siedon vuoksi se soveltuu erityisen

hyvin käytettäväksi pesuainekoostumuksissa, esimerkiksi pesuainekoostumuksissa, jotka ovat tarkoitetut käytettäviksi pH-alueella 7 - 13, erityisesti pH-alueella 8 - 11.

Pesuainekoostumuksia

Keksinnön mukaisesti keksinnön mukainen lipaasimuunnos voi tyypillisesti olla jonkin pesuainekoostumuksen komponenttina. Sellaisena se voidaan sisällyttää pesuainekoostumukseen pölyämättömänä granulaattina, stabiloituna nesteenä tai suojattuna entsyyminä. Pölyämättömiä granulaatteja voidaan valmistaa esimerkiksi kuten kuvataan US-patenteissa 4 106 991 ja 4 661 452 (molemmat Novo Industri A/S:n) ja ne voidaan haluttaessa päällystää alalla tunnetuilla menetelmillä. Esimerkkejä vahamaisista päällystysaineista ovat polyeteenioksidi-tuotteet (polyeteeniglykoli, PEG), joiden keskimääräinen moolimassa on 1 000 - 20 000; etoksyloidut nonyylifenolit, joissa on 16 - 50 eteenioksidiyksikköä; etoksyloidut rasva-alkoholit, joissa alkoholi sisältää 12 - 20 hiiliatomia ja joissa on 15 - 80 eteenioksidiyksikköä; rasva-alkoholit; rasvahapot; ja rasvahappojen mono- ja di- ja triglyseridit. Esimerkkejä kalvoa muodostavista päällystysaineista, jotka sopivat leijupetimenetelmiin, annetaan GB-patentissa 1483591. Nestemäisiä entsyymivalmisteita voidaan esimerkiksi stabiloida lisäämällä jotakin polyolia, kuten esimerkiksi propeeniglykolia, jotakin sokeria tai sokerialkoholia, maitohappoa tai boorihappoa, vakiintuneilla menetelmillä. Alalla tunnetaan muitakin entsyymien stabilaattoreita. Suojattuja entsyymejä voidaan valmistaa menetelmällä, jota kuvataan julkaisussa EP 238 216.

Keksinnön mukainen pesuainekoostumus voi olla missä tahansa sopivassa muodossa, esimerkiksi jauheena, granulaattina, pastana tai nesteenä. Nestemäinen pesuaine voi olla vesipitoinen, sisältäen tyypillisesti enintään 70 % vettä ja 0 - 30 % orgaanista liuotetta, tai vedetön.

Pesuainekoostumus käsittää yhden tai useamman pinta-aktiivisen aineen, joista kukin voi olla anioninen, ioniton, kationinen tai kahtaisioninen. Pesuaine sisältää tavallisesti 0 - 50 % anionista pinta-aktiivista ainetta, kuten esimerkiksi lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (LAS), alfaolefiinisulfonaattia (AOS), alkyylisulfaattia (rasva-alkoholisulfaattia) (AS), alkoholietoksisulfaattia (AEOS tai AES), sekundaarisia alkaanisulfonaatteja (SAS), alfa-sulforasvahappometyyliestereitä, alkyyli- tai alkenyylimeripihkahappoa tai saippuaa. Se voi sisältää myös 0 - 40 % ionitonta pinta-aktiivista ainetta, kuten alkoholietoksylaattia (AEO tai AE), karboksyloituja alkoholietoksylaatteja, nonyylifenolietoksylaatteja, alkyylipolyglykosidia, alkyylidimetyyliamiinioksidia, etoksyloitua rasvahappomonoetanoliamidia, rasvahappomonoetanoliamidia tai polyhydroksialkyylirasvahappoamidia (esimerkiksi kuten kuvataan jul-

kaisussa WO 92/06154).

Pesuainekoostumus voi lisäksi sisältää yhtä tai useampaa muuta entsyymiä, kuten jotakin amylaasia, pullulanaasia, kutinaasia, proteaasia, sellulaasia, peroksidaasia, oksidaasia (esimerkiksi lakkaasia) ja/tai muuta lipaasia.

Pesuaine voi sisältää 1 - 65 % jotakin pesutehostetta tai kompleksointiainetta, kuten zeoliittia, difosfaattia, trifosfaattia, fosfonaattia, sitraattia, nitriloetikkahappoa (NTA) eteenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA), dieteenitriamiinipentaetikkahappoa (DTMPA), alkyyli- tai alkenyylimeripihkahappoa, liukoisia silikaatteja tai kerrossilikaatteja (esim. SKS-6 Hoechstiltä). Pesuaine voi myös olla tehostamaton, s.o. olennaisesti pesutehosteeton.

Pesuaine voi sisältää yhtä tai useampaa polymeeriä. Esimerkkejä ovat karboksimetyyliselluloosa (CMC), polyvinyylipyrrolidoni (PVP), polyeteeniglykoli (PEG), polyvinyylialkoholi (PVA), polykarboksylaatteja, kuten polyakrylaatteja, maleiinihappo/akryylihappokopolymeerejä ja lauryylimetakrylaatti/akryylihappokopolymeerejä.

Pesuaine voi sisältää jonkin valkaisusysteemin, joka voi käsittää jonkin H_2O_2-lähteen, kuten perboraatin tai perkarbonaatin, johon voi olla yhdistettynä jokin perhappoa muodostava valkaisun aktivaattori, kuten tetra-asetyylieteenidiamiini (TAED) tai nonanyylioksibentseenisulfonaatti (NOBS). Vaihtoehtoisesti valkaisu-systeemi voi käsittää peroksihappoja, esimerkiksi amidi-, imidi- tai sulfonityyppistä.

Keksinnön mukaisen pesuainekoostumuksen entsyymit voidaan stabiloida käyttämällä konventionaalisia stabilointiaineita, esimerkiksi jotakin polyolia, kuten propeeniglykolia tai glyserolia, jotakin sokeria tai sokerialkoholia, maitohappoa, boorihappoa tai jotakin boorihapon johdosta, kuten esimerkiksi jotakin aromaattista boraattiesteriä, ja koostumus voidaan formuloida kuten kuvataan esimerkiksi julkaisuissa WO 92/19709 ja WO 92/19708.

Pesuaine voi myös sisältää muita konventionaalisia pesuaineen aineosia, kuten esimerkiksi kankaiden hoitoaineita, savet mukaanlukien, vaahtoamisen tehosteita, saippuavaahdon estoaineita, korroosionestoaineita, lian suspendointiaineita, aineita, jotka estävät likaa kerrostumasta takaisin vaatteisiin, väriaineita, bakteereja tuhoavia aineita, optisia kirkasteita tai hajustetta.

pH (mitattuna vesiliuoksessa käyttöpitoisuudella) on tavallisesti neutraali tai alkali-

nen, esimerkiksi alueella pH 7 - 11.

Keksinnön alaan sisältyvien pesuainekoostumusten erityismuotoja ovat:

(1) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	7 - 12 %
Alkoholietoksisulfaatti (esim. C_{12-18}-alkoholi, 1-2 EO) tai alkyylisulfaatti (esim. C_{16-18})	1 - 4 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{14-15}-alkoholi, 7 EO)	5 - 9 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	14 - 20 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	2 - 6 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	15 - 22 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	0 - 6 %
Natriumsitraatti/sitruunahappo ($C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$:na)	0 - 15 %
Natriumperboraatti ($NaBO_3.H_2O$:na)	11 - 18 %
TAED	2 - 6 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, PVP, PEG)	0 - 3 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta, optista kirkastetta, valovalkaisuaineita)	0 - 5 %

(2) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	6 - 11 %
Alkoholietoksisulfaatti (esim. C_{12-18}-alkoholi, 1-2 EO tai alkyylisulfaatti (esim. C_{16-18})	1 - 3 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{14-15}-alkoholi, 7 EO)	5 - 9 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	15 - 21 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	1 - 4 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	24 - 34 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	4 - 10 %
Natriumsitraatti/sitruunahappo ($C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$:na)	0 - 15 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, PVP, PEG)	1 - 6 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. saippuavaahdon vaimentimia, hajustetta)	0 - 5 %

(3) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	5 - 9 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{14-15}-alkoholi, 7 EO)	7 - 14 %
Saippua rasvahappona (esim. C_{16-22}-rasvahappo)	1 - 3 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	10 - 17 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	3 - 9 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	23 - 33 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	0 - 4 %
Natriumperboraatti ($NaBO_3.H_2O$:na)	8 - 16 %
TAED	2 - 8 %
Fosfonaatti (esim. EDTMPA)	0 -1 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, PVP, PEG)	0 - 3 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Pienempiä aineosia (esim. saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

(4) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	8 - 12 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{14-15}-alkoholi, 7 EO)	10 - 25 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	14 - 22 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	1 - 5 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	25 - 35 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	0 - 10 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, PVP, PEG)	0 - 3 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta)	0 - 5 %

(5) Vesipitoinen nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	15 - 21 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{12-15}-alkoholi, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholi, 5 EO)	12 - 18 %
Saippua rasvahappona (esim. oleiinihappo)	3 - 13 %
Alkenyylimeripihkahappo (C_{12-14})	0 - 13 %
Aminoetanoli	8 - 18 %
Sitruunahappo	2 - 8 %
Fosfonaatti	0 - 3 %
Polymeerejä (esim. PVP, PEG)	0 - 3 %
Boraatti (B_4O_7:na)	0 - 2 %
Etanoli	0 - 3 %
Propeeniglykoli	8 - 14 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. dispergointiaineita, saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta, optista kirkastetta)	0 - 5 %

(6) Vesipitoinen strukturoitu nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	15 - 21 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{12-15}-alkoholi, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholi, 5 EO)	3 - 9 %
Saippua rasvahappona (esim. oleiinihappo)	3 - 10 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	14 - 22 %
Kaliumsitraatti	9 - 18 %
Boraatti (B_4O_7:na)	0 - 2 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. PVP, PEG)	0 - 3 %
Ankkurointipolymeerejä, kuten esim. lauryylimetakrylaatti/akryylihappokopolymeeri; moolisuhde 25:1; MW 3800	0 - 3 %
Glyseroli	0 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. dispergointiaineita, saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

(7) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Rasva-alkoholisulfaatti	5 - 10 %
Etoksyloitu rasvahappomonoetanoliamidi	3 - 9 %
Saippua rasvahappona	0 - 3 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	5 - 10 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	1 - 4 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	20 - 40 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	2 - 8 %
Natriumperboraatti ($NaBO_3.H_2O$:na)	12 - 18 %
TAED	2 - 7 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, PVP, PEG)	0 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. optista kirkastetta, saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta)	0 - 5 %

(8) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	8 - 14 %
Etoksyloitu rasvahappomonoetanoliamidi	5 - 11 %
Saippua rasvahappona	0 - 3 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	4 - 10 %
Liukoinen silikaatti (Na_2O, $2SiO_2$:na)	1 - 4 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	30 - 50 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	3 - 11 %
Natriumsitraatti ($C_6H_5Na_3O_7$:na)	5 - 12 %
Polymeerejä (esim. PVP, maleiinihappo/akryylihappokopolymeeri, PEG)	1 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. saippuavaahdon vaimentajia, hajustetta)	0 - 5 %

(9) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, joka käsittää:

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	6 - 12 %
Ioniton pinta-aktiivinen aine	1 - 4 %
Saippua rasvahappona	2 - 6 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	14 - 22 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	18 - 32 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	5 - 20 %
Natriumsitraatti ($C_6H_5Na_3O_7$:na)	3 - 8 %
Natriumperboraatti ($NaBO_3.H_2O$)	4 - 9 %
Valkaisun aktivaattori (esim. NOBS tai TAED)	1 - 5 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 2 %
Polymeerejä (esim. polykarboksylaatti tai PEG)	1 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. optista kirkastetta, hajustetta)	0 - 5 %

(10) Vesipitoinen nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	15 - 23 %
Alkoholietoksisulfaatti (esim. C_{12-15}-alkoholi, 2-3 EO)	8 - 15 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{12-15}-alkoholi, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholi, 5 EO)	3 - 9 %
Saippua rasvahappona (esim. lauriinihappo)	0 - 3 %
Aminoetanoli	1 - 5 %
Natriumsitraatti	5 - 10 %
Hydrotrooppinen aine (esim. natriumtolueenisulfonaatti)	2 - 6 %
Boraatti (B_4O_7:na)	0 - 2 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 1 %
Etanoli	1 - 3 %
Propeeniglykoli	2 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. polymeerejä, dispergointiaineita, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

(11) Vesipitoinen nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

Lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti (happona laskettuna)	20 - 32 %
Alkoholietoksylaatti (esim. C_{12-15}-alkoholi, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholi, 5 EO)	6 - 12 %
Aminoetanoli	2 - 6 %
Sitruunahappo	8 - 14 %
Boraatti (B_4O_7:na)	0 - 3 %
Polymeerejä (esim. maleiinihappo/akryylihappo-kopolymeeri, ankkurointipolymeeri, kuten esim. lauryylimetakrylaatti/akryylihappokopolymeeri)	0 - 3 %
Glyseroli	3 - 8 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. hydrotrooppisia aineita, dispergointiaineita, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

(12) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

Anioninen pinta-aktiivinen aine (lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia, alkyylisulfaattia, alfa-olefiinisulfaattia, alfa-sulforasvahappometyyliestereitä, alkaanisulfonaatteja, saippuaa)	25 - 40 %
Ioniton pinta-aktiivinen aine (esim. alkoholietoksylaattia)	1 - 10 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	8 - 25 %
Liukoisia silikaatteja (Na_2CO_3:na)	5 - 15 %
Natriumsulfaatti (Na_2SO_4:na)	0 - 5 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	15 - 28 %
Natriumperboraatti ($NaBO_3.H_2O$)	0 - 20 %
Valkaisun aktivaattori (esim. NOBS tai TAED)	0 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 3 %

(13) Kohdissa (1) - (12) kuvattuja pesuaineformulaatioita, joissa koko lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti tai osa siitä on korvattu (C_{12}-C_{18})-alkyylisulfaatilla.

(14) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää:

(C_{12}-C_{18})-alkyylisulfaatti	9 - 15 %
Alkoholietoksylaatti	3 - 6 %
Polyhydroksialkyylirasvahappoamidi	1 - 5 %
Zeoliitti ($NaAlSiO_4$:na)	10 - 20 %
Kerrostettu disilikaatti (esim. SK56 Hoechstiltä)	10 - 20 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	3 - 12 %
Liukoisia silikaatteja (Na_2CO_3:na)	0 - 6 %
Natriumsitraatti	4 - 8 %
Natriumperkarbonaatti	13 - 22 %
TAED	3 - 8 %
Polymeerejä (esim. polykarboksylaatteja ja PVP)	0 - 5 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. optista kirkastetta, valovalkaisuainetta, hajustetta, saippuavaahdon vaimentajia)	0 - 5 %

(15) Granulaatiksi formuloitu pesuainekoostumus, jonka irtotiheys on vähintään 600 g/l ja joka käsittää

(C_{12}-C_{18})-alkyylisulfaatti	4 - 8 %
Alkoholietoksylaatti	11 - 15 %
Saippua	1 - 4 %
Zeoliitti MAP tai zeoliitti A	35 - 45 %
Natriumkarbonaatti (Na_2CO_3:na)	2 - 8 %
Liukoinen silikaatti (Na_2CO_3:na)	0 - 4 %
Natriumperkarbonaatti	13 - 22 %
TAED	1 - 8 %
Karboksimetyyliselluloosa	0 - 3 %
Polymeerejä (esim. polykarboksylaatteja ja PVP)	0 - 3 %
Entsyymejä (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna)	0,0001 - 0,1 %
Vähäisempiä aineosia (esim. optista kirkastetta, fosfonaattia, hajustetta)	0 - 3 %

(16) Kohdissa (1) - (15) kuvattuja pesuainekoostumuksia, jotka sisältävät jotakin stabiloitua tai kapseloitua perhappoa, joko lisäkomponenttina tai korvaamassa jo spesifioituja valkaisusysteemejä.

(17) Kohdissa (1), (3), (7), (9) ja (12) kuvattuja pesuainekoostumuksia, joissa perboraatti on korvattu perkarbonaatilla.

(18) Kohdissa (1), (3), (7), (9), (12), (14) ja (15) kuvattuja pesuainekoostumuksia, jotka lisäksi sisältävät jotakin mangaanikatalyyttiä. Mangaanikatalyytti voi esimerkiksi olla jokin yhdisteistä, joita kuvataan artikkelissa "Efficient manganese catalysts

for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, ss. 637-639.

(19) Pesuainekoostumus, joka on formuloitu vettä sisältämättömäksi pesunesteeksi, joka sisältää jotakin nestemäistä ionitonta pinta-aktiivista ainetta, kuten esimerkiksi lineaarista alkoksyloitua primaarista alkoholia, jonkin tehostesysteemin (esimerkiksi fosfaattia), entsyymiä ja alkalia. Pesuaine voi sisältää myös anionista pinta-aktiivista ainetta ja/tai jonkin valkaisusysteemin.

Jokin keksinnön mukainen lipaasimuunnos voidaan sisällyttää pitoisuuksina, joita konventionaalisesti käytetään pesuaineissa. Tällä hetkellä ajatellaan, että keksinnön mukaiseen pesuainekoostumukseen keksinnön mukaista lipaasimuunnosta voidaan lisätä määränä, joka vastaa 0,00001 - 1 mg (puhtaana entsyymiproteiinina laskettuna) lipaasimuunnosta/litra pesunestettä.

Astianpesuainekoostumuksia

Astianpesuainekoostumus käsittää jonkin pinta-aktiivisen aineen, joka voi olla anioniton, ioniton, kationinen, amfoteerinen tai jokin näiden tyyppien seos. Pesuaine sisältää 0 - 90 % ionitonta pinta-aktiivista ainetta, kuten matalavaahtoisia tai vaahtoamattomia etoksyloituja propoksyloituja suoraketjuisia alkoholeja.

Pesuainekoostumus voi sisältää pesuaineen tehostesuoloja, jotka tyypiltään ovat epäorgaanisia ja/tai orgaanisia. Pesuaineiden tehosteet voidaan jakaa fosforia sisältäviin ja fosforittomiin tyyppeihin. Pesuainekoostumus sisältää tavallisesti 1 - 90 % pesuaineen tehosteita.

Esimerkkejä fosforia sisältävistä epäorgaanisista emäksisistä pesutehosteista, kun niitä on läsnä, ovat vesiliukoiset suolat, erityisesti alkalimetallipyrofosfaatit, -ortofosfaatit, polyfosfaatit ja fosfonaatit. Esimerkkejä fosforittomista epäorgaanisista tehosteista, kun niitä on läsnä, ovat vesiliukoiset alkalimetallikarbonaatit, -boraatit ja -silikaatit samoin kuin erityyppiset vesiliukoiset kiteiset tai amorfiset alumiinisilikaatit, joista silikaatit ovat tunnetuimpia edustajia.

Esimerkkejä sopivista orgaanisista tehostesuoloista ovat alkalimetalli-, ammonium- ja substituoidut ammoniumsitraatit, -sukkinaatit, -malonaatit, rasvahapposulfonaatit, karboksimetoksisukkinaatit, ammoniumpolyasetaatit, karboksylaatit, polykarboksylaatit, aminopolykarboksylaatit, polyasetyylikarboksylaatit ja polyhydroksisulfonaatit.

Muita sopivia orgaanisia tehosteita ovat moolimassaltaan suuremmat polymeerit ja

kopolymeerit, joilla tiedetään olevan tehostavia ominaisuuksia, esimerkiksi sopivat polyakryylihappo-, polymaleiinihappo- ja akryylihappo/polymaleiinihappokopolymeerit ja niiden suolat.

Astianpesuainekoostumus voi sisältää kloriini/bromiinityyppisiä tai happityyppisiä valkaisuaineita. Esimerkkejä epäorgaanisista kloriini/bromiinityyppisistä valkaisuaineista ovat litium-, natrium- tai kalsiumhypokloriitti ja -hypobromiitti sekä kloorattu trinatriumfosfaatti. Esimerkkejä orgaanisista kloriini/bromiinityyppisistä valkaisuaineista ovat heterosykliset N-bromi- ja N-kloori-imidit, kuten trikloori-isosyanuurihappo, tribromi-isosyanuurihappo, dibromi-isosyanuurihappo ja dikloori-isosyanuurihappo ja niiden suolat vesiliukoisten kationien, kuten kaliumin ja natriumin, kanssa. Hydantoiiniyhdisteet ovat nekin sopivia.

Happivalkaisuaineet ovat edullisia, esimerkiksi jonkin epäorgaanisen persuolan muodossa, edullisesti jonkin valkaisuaineen prekursorin kanssa tai peroksihappoyhdisteenä. Tyypillisiä esimerkkejä peroksivalkaisuaineista ovat alkalimetalliperboraatit, sekä tetrahydraatit että monohydraatit, alkalimetalliperkarbonaatit, -persilikaatit ja -perfosfaatit. Parhaiksi katsottuja aktivaattoriaineita ovat TAED ja glyserolitriasetaatti.

Keksinnön mukainen astianpesuainekoostumus voidaan stabiloida käyttämällä konventionaalisia entsyym(e)ille tarkoitettuja stabilaattoreita, esimerkiksi jotakin polyolia, kuten esimerkiksi propeeniglykolia, jotakin sokeria tai sokerialkoholia, maitohappoa, boorihappoa tai jotakin boorihapon johdosta, esimerkiksi jotakin aromaattista boraattiesteriä.

Astianpesuainekoostumus voi sisältää myös muita entsyymejä, erityisesti jotakin amylaasia, proteaasia ja/tai sellulaasia.

Keksinnön mukainen astianpesuainekoostumus voi sisältää myös muita konventionaalisia pesuaineen lisäaineita, esimerkiksi flokkulaationestoaineita, täyteaineita, vaahdonestoaineita, korroosionestoaineita, lian suspendointiaineita, sekvestrausaineita, aineita, jotka estävät likaa kerrostumasta takaisin astioihin, vedenpoistoaineita, väriaineita, bakteereja tuhoavia aineita, fluoresoivia aineita, sakeutusaineita ja hajusteita.

Lopuksi vielä keksinnön mukaista muunnosta voidaan käyttää konventionaalisissa astianpesuaineissa, esimerkiksi missä tahansa pesuaineista, joita kuvataan missä tahansa seuraavista julkaisuista: EP 551670, EP533239, WO 9303129, EP 507404,

US 5141664, GB 2247025, EP 414285, GB 2234980, EP 408278, GB 2228945, GB 2228944, EP 387063, EP 385521, EP 373851, EP 364260, EP 349314, EP331370, EP318279, EP 318204, GB 2204319, EP 266904, US 5213706, EP 530870, CA 2006687, EP 481547, EP 337760, WO 93/14183, US 5223179, WO 93/06202, WO 93/05132, WO 92/19707, WO 92/09680, WO 92/08777, WO 92/06161, WO 92/06157, WO 92/06156, WO 91/13959, EP 399752, US 4941988, US 4908148.

Lisäksi keksinnön mukaisia lipaasimuunnoksia voidaan käyttää pehmennyskoostumuksissa:

Lipaasimuunnosta voidaan käyttää kankaiden pehmennysaineissa, esimerkiksi sellaisissa, joita kuvataan julkaisussa Surfactant and Consumer Products, toim. J. Falbe, 1987, ss. 295-296; Tenside Surfactants Detergents, 30, (1993), 6, ss. 394-399; JAOCS, Vol. 61 (1984), 2, ss. 367-376; EP 517 762; EP 123 400; WO 92/19714; WO 93/19147; US 5 082 578; EP 494 769; EP 544 493; EP 543 562; US 5 235 082; EP 568 297; EP 570 237.

Keksintöä kuvataan edelleen liitteenä olevissa piirustuksissa, joissa

kuvio 1 on pYESHL:n restriktiokartta,
kuvio 2 on plasmidin pA01 restriktiokartta,
kuvio 3 on plasmidin pAHL restriktiokartta ja
kuviot 4 ja 5 kuvaavat keksinnön mukaista muunnosta koodaavien geenien rakentamista.

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavissa esimerkeissä, joita ei ole tarkoitettu rajoittamaan millään tavoin patenttivaatimuksissa esitetyn keksinnön suoja-alaa.

Materiaaleja ja menetelmiä

Humicola lanuginosa DSM 4109, joka on saatavissa laitoksesta Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300, Braunschweig, Saksan liittotasavalta.

pYESHL on hiiva/*E. coli* -sukkulavektori, joka ilmentää ja erittää vähän *H. lanuginosa* -lipaasia hiivassa. Tarkemmin määriteltynä pYESHL on johdos pYES2:sta (ostettu Invitrogen Corp.:lta, UK), josta GAL1-promoottori katkaistiin pois ja *Humicola lanuginosa* -lipaasigeeni ja TPI (trioosifosfaatti-isomeraasi)-promoottori *S. cerevisiaesta* (Alber, T. ja Kawasaki, G., J. Mol. Appln. Genet. 1, 419-434, 1982)

kloonattiin SphI- ja XbaI-kohtien väliin. pYESHL:n restriktiokartta on esitetty kuviossa 1.

Matalakalsiumsuodatinmenetelmä

Menettelytapa

1) Varustetaan SC Ura replikointimaljoja (käyttökelpoisia ekspressiovektoria kantavien kantojen seulomiseen) ensimmäisellä proteiinia sitovalla suodattimella (nylonkalvoa) ja toisella heikosti proteiinia sitovalla suodattimella (selluloosa-asetaattia) päällimmäiseksi.

2) Levitetään hiivasoluja, jotka sisältävät lähtölipaasigeenin tai mutagenisoidun lipaasigeenin, kaksoissuodattimelle ja inkuboidaan 2 tai 3 vuorokautta 30 °C:ssa.

3) Pesäkkeet pidetään ylemmällä suodattimella siirtämällä yläsuodatin uudelle maljalle.

4) Siirretään proteiinia sitova suodatin tyhjälle petrimaljalle.

5) Kaadetaan agaroosiliuos, joka sisältää oliiviöljyemulsion (2 % P.V.A.:oliiviöljy = 3:1), kiiltovihreää (indikaattori, 0,004 %), 100 mM tris-puskuria pH 9 ja EGTA (lopullinen konsentraatio 5 mM) alasuodattimelle pesäkkeiden, jotka ilmentävät lipaasiaktiivisuutta sinivihreinä pilkkuina, identifioimiseksi.

6) Identifioidaan vaiheessa 5) todetut pesäkkeet, joilla on vähäisempi riippuvuus kalsiumista lähtölipaasiin verrattuna.

Dobanol™25-7 -suodatinmenetelmä:

Seulonta paremman pesuainekomponentin siedon suhteen suoritetaan käyttämällä suodatinkoetta, joka vastaa edellä kuvattua lukuunottamatta sitä seikkaa, että kohdassa 5) määritelty liuos sisältää lisäksi 0,02 % Dobanol™25-7.

Satunnaismutagenisoitujen kirjastojen rakentaminen

a) Kokonaista lipaasia koodaavan geenin käyttö

Plasmidia pYESHL käsitellään 12 M muurahaishapolla 20 minuuttia huoneenlämpötilassa. Saatu lipaasia koodaava geeni monistetaan muurahaishapolla käsitellystä plasmidista käyttämällä PCR:ä mutageenisissa olosuhteissa (0,5 mM $MnCl_2$ ja 1/5 ATP:n normaalista määrästä, katso esim. Leung et al., 1989.

Tämän käsittelyn odotetaan tuottavan laajan valikoiman mutaatioita, koska muura-

haishappo tuottaa pääasiassa transversioita ja PCR:n avulla synnytetyt mutaatiot pääasiassa transitioita.

Saadut PCR-fragmentit kloonataan joko kaksoisrekombinaation avulla (Muhlrad et al., 1992) *in vivo* sukkulavektoriin tai digeroidaan ja ligoidaan sukkulavektoriin ja transformoidaan *E. coli*.

Kahdeksan satunnaisesti poimittua kloonia sekvensoitiin ja niiden todettiin sisältävän keskimäärin 2 - 3 mutaatiota - sekä transversioita että transitioita.

Tätä menetelmää käyttäen tehtiin seitsemän kirjastoa, jotka sisälsivät 10 000 - 140 000 kloonia.

b) Paikallisen satunnaismutageneesin suorittaminen

Syntetisoidaan mutageeninen aluke (oligonukleotidi), joka vastaa DNA-sekvenssin mutagenisoitavaa osaa lukuunottamatta nukleotidia (nukleotideja), joka vastaa mutagenisoitavaa aminohappokodonia (jotka vastaavat mutagenisoitavia amino-happokodoneja).

Sen jälkeen saatua mutageenista aluketta käytetään PCR-reaktiossa sopivan vastinalukkeen kanssa. Saatu PCR-fragmentti puhdistetaan ja digeroidaan ja kloonataan sukkulavektoriin. Vaihtoehtoisesti ja mikäli on tarpeen, saatua PCR-fragmenttia käytetään toisessa PCR-reaktiossa alukkeena toisen sopivan vastinalukkeen kanssa mutagenisoidun alueen digestion ja kloonauksen mahdollistamiseksi sukkulavektoriin. PCR-reaktiot toteutetaan normaaleissa olosuhteissa.

DNA-sekvensointi suoritettiin käyttämällä Applied Biosystems ABI:n DNA-sekvens-simallia 373A ABI Dye Terminator Cycle Sequencing -pakkauksen ohjeiden mukaisesti.

Esimerkit

Esimerkki 1

Satunnaislipaasimuunnosten rakentaminen

Koko *H. lanuginosa* -lipaasigeenin ja sen aminohappojen (aa) 91-97 ja 206-211 satunnaismutagenisoituja kirjastoja valmistettiin, kuten edellä kappaleessa Materiaaleja ja menetelmiä kuvattiin.

Aminohappoalueet 91-97 ja 206-211 valittiin paikallisen mutageneesin ensimmäiseen kierrokseen, koska näiden alueiden on todettu olevan tärkeitä pesukyvyn kan-

nalta. Alue 91-97 on osa lipaasin kansialuetta ja alue 206-211 muodostaa osan lipaasin hydrofobista halkeamaa.

Kumpaakin aluetta kohti syntetisoitiin yksi oligonukleotidi, joka käsitti 93 % villityypin nukleotideja ja 2,33 % kutakin kolmesta muusta nukleotidista aminohappokodoneissa, jotka haluttiin mutagenisoida. Kolmas nukleotidi (huojuva emäs) kodoneissa syntetisoitiin käyttäen 50%G/50%C, milloin se oli mahdollista aminohappoa muuttamatta, jotta saatiin suurempi todennäköisyys aminohappomuutoksiin yhdessä tai kahdessa kodonissa. Alueen 91-97 mutageenisen nukleotidin koostumus on esitetty taulukossa 1.

Käyttämällä tätä oligonukleotidia kirjastoon saadaan noin 65 - 70 %:n laskettu mutaatiofrekvenssi yhtä lähtölipaasiin tehtyä aminohappomuutosta kohti. Mutaatiofrekvenssi kahta tai useampaa tehtyä aminohappomuutosta kohti on alle 35 %. Tämä pieni mutaatiofrekvenssi valitaan sen takaamiseksi, että havaitut aminohappomuutokset positiivisissa klooneissa ovat mukana parantamassa entsyymiä eivätkä ole vain "neutraaleja" muutoksia, jotka johtuvat tiheästä mutaatiofrekvenssistä.

Mutageenista aluketta käytettiin PCR-reaktiossa sopivan vastinalukkeen kanssa. Saatu PCR-fragmentti puhdistettiin ja kysymyksen ollessa alueesta 206-211 digeroitiin ja kloonattiin sukkulavektoriin. Kun kysymyksessä oli alue 91-97, saatua PCR-fragmenttia käytettiin toiseen PCR-reaktioon alukkeena toisen sopivan vastinalukkeen kanssa. Tämä vaihe oli tarpeen, jotta mutagenisoitu alue voitiin digeroida ja kloonata sukkulavektoriin.

Valmistettiin alueen 91-97 ja alueen 206-211 kirjastoja, jotka sisälsivät 10 000 - 80 000 kloonia/kirjasto. Useimmat pesäkkeet olivat positiivisia (yli 90 %), kun ne tarkastettiin olosuhteissa, joissa lähtölipaasi on positiivinen, s.o. osoittaa lipaasiaktiivisuutta. Positiivinen reaktio määritettiin suodatinkokeessa käyttäen 2,5 mM Ca (5 mM EGTA:a asemesta).

Eri kirjastoista seulottiin 450 000 pesäkettä käyttämällä edellä kappaleessa Materiaaleja ja menetelmiä kuvattuja Dobanol™25-7- ja matalakalsiumkokeita. aa 91-97 -kirjastosta (kansialue) eristettiin 25 matalakalsiumpositiivista ja kokogeenikirjastoista eristettiin 12 Dobanol™25-7 -positiivista. Matalakalsiumpositiivisista, jotka olivat aa 91-97 -mutageneesista, sekvensoitiin 14 kappaletta.

Kolme muuta mutaatiota (kodoneissa 83, 103, 145), mutagenisoidun alueen ulkopuolella, voidaan selittää PCR:ssä tapahtuneella liittämisvirheellä, vaikka S83T-

mutaatio onkin transversio, joka on melko epätavallinen PCR-virheliitynnöissä.

Taulukko 1

Sekvenssi:			
5'	5	C	G
T	5	C	**3'**
T	7	A	
A	8	G	Pullo 5: 93% A; 2,33% C; 2,33% G ja 2,33% T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	Pullo 6: 93% C; 2,33% A; 2,33% G ja 2,33% T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	Pullo 7: 93% G; 2,33%A; 2,33% C ja 2,33% T
5	6	G	
7	G	A	
8	A	A	
6	T	C	Pullo 8: 93% T; 2,33% A; 2,33% C ja 2,33% G
7			

Taulukko 1: Nukleotidien, joita käytettiin *H. lanuginosen* lipaasia aminohappojen 91-97 paikalliseen satunnaismutageneesiin, rakenteen kuvaus. Sekvenssissä esiintyvät numerot viittaavat pulloihin, joiden koostumus näkyy sekvenssin oikealla puolella.

Taulukko 2

Kannan numero	Muunnos-tyyppi						
59	I			G91A	N94K		D96A
60	II	S83T			N94K		D96N
61	II	S83T			N94K		D96N
62	III		E87K				D96V
63	IV		E87K	G91A			D96V
64	II	S83T			N94K		D96N
65	III		E87K				D96V
67	V				N94K	F95L	D96H
69	V				N94K	F95L	D96H
71	III		E87K				D96V
72	II	S83T			N94K		D96N

Taulukko 2: Kannan numero viittaa alunperin poimittuihin klooneihin, jotka kloonattiin Aspergillus-ekspressiovektoriin pAHL. Muunnostyyppi viittaa samanlaisiin klooneihin, jotka luultavasti ovat muodostuneet satunnaismutagenisoidun kirjaston monistuksen aikana. Muunnostyypit I ja II ovat aktiivisia 0,01 % Dobanol™25-7:ssä, kun sen sijaan muut ovat inaktiivisia kuten villityyppi.

Taulukko 3

Kannan numero	Muunnos-tyyppi	DNA-sekvenssi (Aminohapon numero sekvenssin yläpuolella)										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
wt		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

Kannan numero	Muunnos-tyyppi	93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
wt		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C					C	C
64	II	G	G		A						
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A		?				

Taulukko 3: Villityypin (wt) sekvenssi on esitetty ylärivillä. Muunnossekvensseihin on kirjoitettu ainoastaan nukleotidit, jotka eroavat villityypistä. Kodonin 91 ja 93 emäkseen lisättiin 1:1 C/T ja T/G, vastaavassa järjestyksessä. Muutoin nukleotidit kodonissa 91-97 seostettiin käyttämällä 93 % villityyppiä ja 2,33 % kolmea muuta nukleotidia.

Esimerkki 2

Samanlaisella menetelmällä kuin esimerkissä 1 kuvattiin rakennettiin seuraavat muunnokset satunnaismutageneesin avulla. Alla kuvataan myös seulontakriteerit, joita tässä käytettiin joidenkin muunnosten valikoimiseen.

D167G+E210V

5mM EGTA, 0.01% Dobanol™25-7, 0.006% LAS

E87K+G91A+L93I+N94K+D96A

5mM EGTA, 0.02% Dobanol™25-7

N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D96A

S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V

E87K+G91A+D96R+I100V

S83T+E87K+Q249R

E87K+G91A

Esimerkki 3

Humicola lanuginosa* -lipaasin ilmentäminen *Aspergillus oryzaessa

Humicola lanuginosa -lipaasin kloonausta kuvataan julkaisussa EP 305 216. Siinä kuvataan myös lipaasin ilmentämistä ja karakterisointia *Aspergillus oryzaessa*. Käytetyn ekspressioplasmidin nimi on p960.

Tässä hakemuksessa käytetty ekspressioplasmidi on samanlainen kuin p960 lukuunottamatta vähäisiä muutoksia ainoastaan 3'-päästä lipaasia koodaavalle alueelle. Muutokset tehtiin seuraavalla tavalla: p960 digeroitiin NruI- ja BamHI-restriktioentsyymeillä. Näiden kahden kohdan väliin kloonattiin BamHI/NheI-palanen plasmidista pBR322, jossa NheI-fragmentti oli täytetty Klenowin polymeraasin avulla, jolloin muodostui plasmidi pAO1 (kuvio 2), joka sisältää uniikit BamHI- ja NheI-kohdat. Näiden kahden uniikin kohdan väliin kloonattiin BamHI/XbaI-palaset p960:stä, jolloin saatiin pAHL (kuvio 3).

Lipaasigeenin ohjattu *in vitro* -mutageneesi

Ratkaisumalli, jota käytettiin mutaatioiden tekemiseksi lipaasigeeniin, on kuvattu teoksessa Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Siinä muodostetaan kolmessa vaiheessa PCR(polymeraasiketjureaktio)fragmentti, joka sisältää halutun mutaation, joka tehdään käyttämällä kemiallisesti syntetisoitua DNA-säiettä yhtenä alukkeena PCR-reaktioissa. PCR:stä syntynyt fragmentti, DNA-

fragmentti, joka kantaa mutaatiota, voidaan eristää pilkkomalla restriktioentsyymeillä ja insertoida uudelleen ekspressioplasmidiin. Tämä menetelmä kuvataan perusteellisesti esimerkissä 5. Menetelmää hahmotellaan vielä kuvioissa 4 ja 5.

Plasmidin, joka ekspressoi *Humicola lanuginosa* -lipaasin N94K/D96A-analogia, rakentaminen

Plasmidi pAHL:n linearisointi

Rengasmainen plasmidi pAHL linearisoidaan restriktioentsyymillä SphI 50 µl:ssa seuraavaa reaktioseosta: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ditiotreitolia, 1 µg plasmidia ja 2 yksikköä SphI:tä. Digestio suoritetaan 2 tunnissa 37 °C:ssa. Reaktioseos uutetaan fenolilla (tasapainotettu Tris-HCl:llä, pH 7,5) ja saostetaan lisäämällä 2 tilavuutta jääkylmää 96% etanolia. Sentrifugoinnin ja pelletin kuivaamisen jälkeen linearisoitu DNA liuotettiin 50 µl:aan H_2O ja konsentraatio määritettiin agaroosigeelillä.

3-vaiheinen PCR-mutageneesi

Kuten kuviossa 5 on esitetty, 3-vaiheisessa mutagenisoinnissa käytetään neljää aluketta:

Mutagenisointialuke (=A): 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTC-CCGAT-3'

PCR-auttaja 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAA-ATCGGC-3'

PCR-auttaja 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

PCR-kahva (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Auttaja 1 ja auttaja 2 ovat komplementaarisia koodaavan alueen sekvensseille ja niitä voidaan siten käyttää yhdessä minkä tahansa mutagenisointialukkeen kanssa muunnossekvenssin rakentamisessa.

Kaikki 3 vaihetta suoritetaan seuraavassa puskurissa, joka sisältää: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001% gelatiinia, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 yksikköä Taq-polymeraasia.

Vaiheessa 1 100 pmol aluketta A, 100 pmol aluketta B ja 1 fmol linearisoitua plas-

midia lisätään kaikkiaan 100 µl:aan reaktioseosta ja suoritetaan 15 sykliä, jotka muodostuvat 2 minuutista 95 °C:ssa, 2 minuutista 37 °C:ssa ja 3 minuutista 72 °C:ssa.

PCR-tuotteen konsentraatio määritetään agaroosigeelillä. Sitten suoritetaan vaihe 2. 0,6 pmol vaiheen 1 tuotetta ja 1 fmol linearisoitua plasmidia sisällytetään kaikkiaan 100 µl:aan edellä mainittua puskuria ja suoritetaan 1 sykli, joka muodostuu 5 minuutista 95 °C:ssa, 2 minuutista 37 °C:ssa ja 10 minuutista 72 °C:ssa.

Vaiheen 2 reaktioseokseen lisätään 100 pmol aluketta C ja 100 pmol aluketta D (1 µl kutakin) ja suoritetaan 20 sykliä, jotka muodostuvat 2 minuutista 95 °C:ssa, 2 minuutista 37 °C:ssa ja 3 minuutista 72 °C:ssa. Tämä muokkaaminen käsitti 3 vaihetta mutagenisointiprosessissa.

Mutagenisoidun restriktiofragmentin eristäminen

Vaiheesta 3 saatu tuote erotetaan agaroosigeelistä ja liuotetaan uudelleen 20 µl:aan H_2O. Sitten sitä digeroidaan restriktioentsyymeillä BamHI ja BstXI kaikkiaan 50 µl:ssa seuraavaa koostumusta: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, 10 yksikköä BamHI ja 10 yksikköä BstXI. Inkuboidaan 2 tuntia 37 °C:ssa. 733 emäsparin BamHI/BstXI-fragmentti eristetään agaroosigeelistä.

Ligaatio ekspressiovektoriin pAHL

Ekspressioplasmidi pAHL pilkotaan BamHI:llä ja BstXI:llä edellä mainituissa olosuhteissa ja suuri fragmentti eristetään agaroosigeelistä. Tähän vektoriin ligoidaan edellä eristetty mutagenisoitu fragmentti ja ligaatioseosta käytetään *E. colin* transformoimiseen. Fragmentin läsnäolo ja orientaatio todennetaan pilkkomalla jokin plasmidivalmiste transformantista restriktioentsyymeillä. Sekvenssianalyysi suoritetaan kaksisäikeisellä plasmidilla käyttäen DyeDeoxy™ Terminater Cycle Sequencing Kit:iä (Applied Biosystems) ABI DNA-sekvenaattorilla, malli 373A. Plasmidi nimetään pAHLG91A/N94K/D96A:ksi ja se on identtinen pAHL:n kanssa substituoituja kodoneja lukuunottamatta.

Esimerkki 4

Muita *Humicola*-lipaasin muunnoksia ilmentävien plasmidien rakentaminen

Rakennetaan seuraavat muunnokset käyttäen samaa menetelmää, jota kuvattiin esimerkissä 3. Plasmidin nimi ja muuntamiseen käytetty aluke luetellaan alla.

Plasmidin nimi	Aluke A:n sekvenssi
pAHLS83T/N94K/D96A	5′-ATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTCCCGA-TCCAGTTCTCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
pAHLE87K/D96V	5-TATTTCTTTCAAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCC-AGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLE87K/G91A/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLN94K/F95L/D96H	5'-TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3'
pAHLF95C/D96N	5'-TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3'
pAHLG91S/L93V/F95C	5′-TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCC-AGTTCTC-3'
pAHLE87K/G91A/L93I/N94K/D96A	5′-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATC-CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLD167G	5'-ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3'
pAHLA121V	5'-CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3'
pAHLR205K/E210Q	5'-GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGGAGCTTAGGG-ACAATATC-3'
pAHLN73D/S85T/E87K/G91A/N94K/D96A	5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATC-CAGTTCTTTATAGTACGAGAGCCACGGAA-AGAGAGGACGATCAATTTGTCCGTGTTGTCGAG-3'
pAHLS83T/E87K/W89G/G91A/N94K/D96V	5'-TATTTCTTTCAAAACGAACTTAAGATTAGCGATA-CCGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
pAHLE87K/G91A/D96R/I100V	5'-GCAAATGTCATTAACTTCTTTCAATCTGAAGTTAA-GATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
pAHLS83T/E87K	5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3'
pAHLE87K/G91A	5'-GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAA-CGAGA-3'
pAHLS83T/E87K	5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-AAAGA-3'
pAHLQ249R	5'-CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

Esimerkki 5

Humicola-lipaasin yhdistelmäanalogeja ilmentävien plasmidien rakentaminen

Plasmidit **pAHLD167G/E210V**
pAHLA121V/R205K/E210Q
ja **pAHLS83T/E87K/Q249R**
rakennetaan suorittamalla kaksi peräkkäistä mutagenisointivaihetta sopivia alukkeita käyttäen.

Esimerkki 6

Lipaasianalogien ilmentäminen _Aspergilluksessa_

***Aspergillus oryzaen* transformointi (yleismenettely)**

100 ml:aan YPD:tä (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) siirrostetaan *A. oryzaen* itiöitä ja inkuboidaan ravistellen noin 24 tuntia. Myseeli kootaan suodattamalla mirakudoksen läpi ja pestään 200 ml:lla 0,6 M $MgSO_4$. Myseeli lietetään 15 ml:aan 1,2 M $MgSO_4$, 10 mM:iin NaH_2PO_4, pH = 5,8. Suspensio jäähdytetään jäällä ja siihen lisätään 1 ml puskuria, joka sisältää 120 mg Novozym*234, erä 1687. 5 minuutin kuluttua lisätään 1 ml 12 mg/ml BSA (Sigma tyyppi H25) ja inkubointi jatketaan varovasti sekoittaen 1,5 - 2,5 tuntia 37 °C:ssa, kunnes suuri määrä protoplasteja on havaittavissa mikroskoopilla tutkitussa näytteessä.

Suspensio suodatetaan mirakudoksen läpi, suodos siirretään steriiliin putkeen ja sen päälle pannaan 5 ml 0,6 M sorbitolia, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0. Sentrifugoidaan 15 minuuttia kiihtyvyydellä 1 000 g ja protoplastit kerätään talteen $MgSO_4$-patjan päältä. Protoplastisuspensioon lisätään 2 tilavuutta STC:tä (1,2 M sorbitolia, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM $CaCl_2$) ja seosta sentrifugoidaan 5 minuuttia kiihtyvyydellä 1 000 g. Protoplastipelletti lietetään takaisin 3 ml:aan STC:tä ja pelletoidaan uudelleen. Tämä toistetaan. Lopuksi protoplastit lietetään takaisin 0,2 - 1 ml:aan STC:tä.

100 µl:aan protoplastisuspensiota sekoitetaan 5 - 25 µg p3SR2:ta (*A. nidulans* -geeni, joka kantaa plasmidia, jota kuvaavat Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, elokuu 1983) 10 µl:ssa STC:tä. Seoksen annetaan olla huoneenlämpötilassa 25 minuuttia. Siihen lisätään 0,2 ml 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM $CaCl_2$ ja 10 mM Tris-HCl, pH = 7,6, ja sekoitetaan huolellisesti (kaksi kertaa) ja lopuksi lisätään 0,85 ml samaa liuosta ja sekoitetaan huolellisesti. Seoksen annetaan olla huoneenlämpötilassa 25 minuuttia, lingotaan kiihtyvyydellä 2 500 g 15 minuuttia ja pelletti lietetään takaisin 2 ml:aan 1,2 M sorbitolia. Vielä yhden sedimentaation

jälkeen protoplastit levitetään minimaljoille [Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-66], jotka sisältävät 1,0 M sukroosia, pH = 7,0, 10 mM asetamidia typen lähteenä ja 20 mM CsCl taustakasvun estämiseksi. 4 - 7 vuorokauden 37 °C:ssa inkuboinnin jälkeen itiöt poimitaan, lietetään steriiliin veteen ja levitetään yksittäisiksi pesäkkeiksi. Tämä menettely toistetaan ja yhden pesäkkeen itiöt toisen uudelleeneristämisen jälkeen varastoidaan määriteltynä transformanttina.

Lipaasianalogien ilmentäminen *A. oryzaessa*

Edellä kuvatut plasmidit transformoidaan *A. oryzae* IFO 4177:ään keratransformaatiolla p3SR2:n kanssa, joka sisältää amdS-geenin *A. nidulansista*, kuten edellä olevassa esimerkissä kuvattiin. Kuvatulla tavalla valmistettuja protoplasteja inkuboidaan seoksen kanssa, jossa on yhtä suuret määrät ilmentämisplasmidia ja p3SR2:ta, kutakin käytetään noin 5 µg. Transformantit, jotka pystyivät käyttämään asetamidia ainoana typen lähteenä, eristetään uudelleen kahdesti. YPD:llä kolmen vuorokauden kasvatuksen jälkeen viljelyn supernatantit analysoidaan käyttäen lipaasiaktiivisuuskoetta. Paras transformantti valitaan lisätutkimuksiin ja sitä kasvatetaan 1 litran ravistelupullossa 200 ml:ssa FG4-kasvatusliuosta (3 % soijajauhoa, 3 % meltodekstriiniä, 1 % peptonia, pH säädetty 7,0:aan 4 M NaOH:lla) 4 vuorokautta 30 °C:ssa.

Esimerkki 7

Keksinnön mukaisten lipaasimuunnosten puhdistaminen

Lipaasiaktiivisuuskoe:

Valmistettiin substraatti lipaasia varten emulgoimalla glyseriinitributyraattia (MERCK) käyttäen arabikumia emulgaattorina.

Lipaasiaktiivisuus tutkittiin pH 7:ssä käyttäen pH stat -menetelmää. Yksi yksikkö lipaasiaktiivisuutta (LU/mg) määriteltiin määräksi, joka tarvitaan vapauttamaan yksi mikromoolia rasvahappoa minuutissa.

Vaihe 1: Fermentoinnin supernatantti sentrifugoidaan, sakka heitetään pois. Supernatantin pH säädetään 7:ään ja lisätään vähitellen yhtä suuri tilavuusmäärä kylmää 96% etanolia. Seoksen annetaan seistä 30 minuuttia jäähauteessa. Sentrifugoidaan ja sakka heitetään pois.

Vaihe 2: Ioninvaihtokromatografia. Suodatetaan supernatantti ja pannaan se DEAE-fast flow (Pharmacia TM) -pylvääseen, joka on tasapainotettu 50 mM:lla Tris-asetaattipuskuria, pH 7. Pylvästä pestään samalla puskurilla, kunnes absorptio 280 nm:ssä on alhaisempi kuin 0,05 OD. Eluoidaan sitoutunut entsymaattinen aktii-

visuus lineaarisella suolagradientilla samassa puskurissa (0 - 0,5 M NaCl) käyttäen viittä pylvääntilavuutta. Kootaan fraktiot, jotka sisältävät entsymaattista aktiivisuutta.

Vaihe 3: Hydrofobinen kromatografia. Entsymaattista aktiivisuutta sisältävän poolin molaarisuus säädetään arvoon 0,8 M lisäämällä kiinteää ammoniumasetaattia. Entsyymi pannaan TSK gel Butyl-Toyopearl 650 C -pylvääseen (saatavissa Tosoh Corporationilta, Japani), joka on edeltäkäsin tasapainotettu 0,8 M ammoniumasetaatilla. Sitoutumaton materiaali pestään 0,8 M ammoniumasetaatilla ja sitoutunut materiaali eluoidaan tislatulla vedellä.

Vaihe 4: Lipaasiaktiivisuutta sisältävä pooli laimennetaan vedellä johtokyvyn säätämiseksi arvoon 2 mS ja pH 7:ään. Pooli pannaan High performance Q Sepharose (Pharmacia) -pylvääseen, joka on etukäteen tasapainotettu 50 mM:lla tris-asetaattipuskuria pH 7. Sitoutunut entsyymi eluoidaan lineaarisella suolagradientilla.

Esimerkki 8

Keksinnön mukaisten lipaasimuunnosten pesukyky

Keksinnön mukaisten *Humicola lanuginosa* -lipaasimuunnosten pesukyky määritettiin käyttäen perusteena proteiinin entsyymiannosta mg:ina per litra OD_{280}:n mukaan verrattuna villityypin *H. lanuginosa* -lipaasiin.

Pesukokeita suoritettiin 150 ml:n keittolaseissa, jotka asetettiin lämmönsäätelyllä varustettuun vesihauteeseen. Keittopulloja sekoitettiin kolmion muotoisilla magneettisauvoilla.

Koeolosuhteet olivat seuraavat:

Menetelmä: 3 jaksoa ja kunkin jakson välillä yön yli kuivaus

Pesuliuos: 100 ml/keittolasi

Tilkut: 6 tilkkua (3,5 x 3,5 cm)/keittolasi

Kangas: 100% puuvilla, Test Fabrics style #400

Tahra: Sudanipunaisella värjätty sianihra (0,75 mg väriä/g sianihraa). 6 µl sianihraa, joka oli kuumennettu 70 °C:seen, levitettiin kunkin tilkun keskelle. Tahran tekemisen jälkeen tilkkuja kuumennettiin uunissa 75 °C:ssa 30 minuuttia. Sitten tilkkuja pidettiin yön yli huoneenlämpötilassa ennen ensimmäistä pesua.

Pesuaine:		
	LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.)	1,17 g/l
	AEO (Dobanol™25-7)	0,15 g/l
	Natriumtrifosfaatti	1,25 g/l
	Natriumsulfaatti	1,00 g/l

	Natriumkarbonaatti	0,45 g/l
	Natriumsilikaatti	0,15 g/l
pH:	10,2	
Lipaasipit.:	0,075, 0,188, 0,375, 0,75 ja 2,5 mg lipaasiproteiinia/litra	
Aika:	20 minuuttia	
Lämpötila:	30 °C	
Huuhtelu:	15 minuuttia juoksevalla vesijohtovedellä	
Kuivaus:	yön yli huoneenlämpötilassa (~20 °C, 30-50 % RH)	
Arvostelu:	3. pesun jälkeen mitattiin heijastuskyky 460 nm:ssä.	

Tulokset

Verrattiin lipaasimuunnosten ja natiivin *H. lanuginosa* -lipaasin annosvastekäyriä. Annosvastekäyrät laskettiin sovittamalla mitatut tulokset seuraavaan yhtälöön:

$$\Delta R = \Delta R_{max} \frac{C^{0,5}}{K + C^{0,5}} \qquad (I)$$

jossa ΔR on teho ilmaistuna heijastusyksikköinä, C on entsyymikonsentraatio (mg/l), ΔR_{max} on vakio, joka ilmaisee maksimitehon, K on vakio; K^2 ilmaisee entsyymikonsentraation, jolla saadaan puolet maksimitehosta.

Kunkin lipaasimuunnoksen sekä villityypin lipaasin karakterististen vakioiden ΔR_{max} ja K perusteella lasketaan paranemiskerroin. Paranemiskerroin, joka määritellään seuraavasti

$$f_{paran} = C_{VT}/C \qquad (II)$$

ilmaisee lipaasimuunnosproteiinimäärän, joka tarvitaan aikaansaamaan sama vaikutus kuin mikä saadaan 0,25 mg:lla/l verrokkina olevaa villityypin proteiinia (C_{VT}).

Menettelytapa paranemiskertoimen laskemiseksi oli siis seuraava:

1) villityypin proteiinin vaikutus konsentraatiolla 0,25 mg/l ($\Delta R_{villityyppi}$) laskettiin yhtälön (I) avulla

2) lipaasimuunnoksen konsentraatio, joka johti samaan vaikutukseen kuin villityyppi pitoisuudella 0,25 mg/l, laskettiin seuraavan yhtälön avulla:

$$C = (K_{(analogi)} \frac{(\Delta R_{villityyppi})}{\Delta R_{max(analogi)} - (\Delta R_{villityyppi})})^2 \quad \text{(III)}$$

3) paranemiskerroin laskettiin yhtälön (II) avulla.

Tulokset esitetään alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1

Muunnos	Paranemis-kerroin
E87K+D96V	1,2
S83T+N94K+D96N	2,3
N94K+D96A	2,7
E87K+G91A+D96A	2,6
N94K+F95L+D96H	3,3
D167G+E210V	5,0
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A	1,3
E87K+G91A+D96R+I100V	5,2
E87K+G91A	5,0
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G	1,3
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3,8
K46R+E56R+G61S	1,9
D102K	0,2
D167G	1
N73D+E87K+G91A+N941+D96G	1,3
E210R	2,7
E210K	5,5
E210W	1
N251W+D254W+T267W	0,8
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M	3,8
E56R+I90F+D96L+E99K	4,8
D57G+N94K+D96L+L97M	1,9

Hakemuksessa mainitut viitteet

Muhrad et al., 1992, Yeast, Vol. 8, 79-82

Shimada, Y. et al., (1989). cDNA Molecular Cloning of Geotrichum candidum Lipase. J. Biol. Chem., 106, 383-388.

Yamaguchi, S. et al., (1991). Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from Penicillium camembertii U-150. Gene 103, 61-67.

Hass, M.J. et al. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from Rhizopus delemar. Gene 109, 107-113.

Kugimiya, W. et al. (1992). Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding Rhizopus niveus Lipase. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719.

Dartois, V. et al., (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260.

Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor, 1989.

R.K. Saiki et al., Science 239, ss. 487-491, 1988.

Beaucage ja Caruthers, Tetrahedron Letters 22, ss. 1859-1869, 1981.

Matthes et al., The EMBO J. 3, ss. 801-805, 1984.

J.O. Deshler, (1992). A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. GATA 9(4): 103-106.

Leung et al., Technique, Vol. 1, n:o 1, ss. 11-15, 1989.

Fowler et al., Molec. gen. Genet., 133. ss. 179-191, 1974.

Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglyce-

rol Lipase", Nature 343, 1990, ss. 767-770, 1990.

Tilbeyrgh, H. van, Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. ja Cambillau (1993), Nature 362, s. 814-820. Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.

Hudson et al., Practical Immunology, Third Edition, Blackwell Scientific Publications, 1989.

Alber, T. ja Kawasaki, G., J. Mol. Appl. Genet 1, 419-434 (1982).

Sekvenssiluettelo

(1) YLEISINFORMAATIO:

(i) HAKIJA: Novo Nordisk A/S

(ii) KEKSINNÖN NIMI: Menetelmä lipolyyttisen entsyymin muunnoksen valmistamiseksi

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 2

(iv) POSTIOSOITE:
(A) VASTAANOTTAJA: Novo Nordisk A/S
(B) KATUOSOITE: Novo Alle
(C) KAUPUNKI: Bagsvaerd
(E) MAA: Tanska
(F) ZIP: 2880

(v) 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

(vi) ASIAMIESTÄ KOSKEVAT TIEDOT:
(A) NIMI: Sørensen, Lise Abildgaard
(C) VIITE/ASIAKIRJAN NUMERO: 4153.204-WO

(ix) TELEKOMMUNIKAATIOTIEDOT:
(A) PUHELIN: +45 4444 8888
(B) TELEFAX: +45 4449 3256
(C) TELEX: 37304

(2) SEQ ID NO:1:tä KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:
(A) PITUUS: 918 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola lanuginosa

(ix) TUNNUSMERKIT:
(A) NIMI/AVAIN: CDS
(B) SIJAINTI: 1..873
(C) NIMI/AVAIN: mat_peptidi
(D) SIJAINTI: 67..873

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:1:

```
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG   48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
       -20                 -15                 -10

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC   96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
   -5                  1                   5                  10

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT  144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
                15                  20                  25

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC  192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
            30                  35                  40

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT  240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
        45                  50                  55

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA  288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
    60                  65                  70

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC  336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75                  80                  85                  90

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC  384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
                95                  100                 105

TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT  432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
            110                 115                 120
ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT  480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
        125                 130                 135

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT  528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
    140                 145                 150
```

```
GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA  576
Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155                 160                 165                 170

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC  624
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
                175                 180                 185

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT  672
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
            190                 195                 200

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA  720
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
        205                 210                 215

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT  768
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
    220                 225                 230

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT  816
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235                 240                 245                 250

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG  864

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
                255                 260                 265

ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT    918
Thr Cys Leu
```

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

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 291 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:2:

```
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
-20                 -15                 -10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
-5                  1                   5                   10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
                15                  20                  25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
            30                  35                  40
```

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
75 80 85 90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
95 100 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
110 115 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
140 145 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
175 180 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
220 225 230

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
255 260 265

Thr Cys Leu

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaavalle DNA-sekvenssille suoritetaan satunnaismutageneesi,

(b) vaiheessa (a) saatu mutagenisoitu DNA-sekvenssi ilmennetään jossakin isäntäsolussa ja

(c) seulotaan isäntäsolut, jotka ilmentävät mutagenisoidun lipolyyttisen entsyymin, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe (c) käsittää myös seulonnan paremman pesuaineen- tai pesuainekomponentinsietokyvyn suhteen lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että satunnaismutageneesi suoritetaan käyttämällä jotakin fysikaalista tai kemiallista mutageenia, käyttämällä jotakin oligonukleotidia tai käyttämällä PCR:n avulla suoritettua mutageneesia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mutageeni valitaan muurahaishapon, UV-säteilytyksen, hydroksyyliamiinin, N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinin (MNNG), O-metyylihydroksyyliamiinin, typpihapokkeen, etyylimetaanisulfonaatin (EMS), natriumbisulfiitin ja nukleotidianalogien joukosta.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mutatoidun DNA-sekvenssin ilmentäminen suoritetaan transformoimalla jokin sopiva isäntäsolu mutatoidulla DNA-sekvenssillä, mutatoidun DNA-sekvenssin käsittäessä mahdollisesti lisäksi DNA-sekvenssin, joka koodaa toimintoja, jotka mahdollistavat mutatoidun DNA-sekvenssin ilmentämisen, ja viljelemällä vaiheessa (b) saatua isäntäsolua sopivissa olosuhteissa mutatoidun DNA-sekvenssin ilmentämiseksi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mutagenisoidun DNA-sekvenssin ilmentämiseen käytetty isäntäsolu on jokin mikrobisolu.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on jostakin sienikannasta tai bakteerikannasta peräisin oleva solu.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on jostakin *Aspergillus*-suvusta, kuten *A. nigeristä, A. oryzaesta* ja *A. nidulansista* peräisin oleva solu tai jokin *Saccharomyces*-suvusta, esimerkiksi *S. cereviciaesta*, peräisin oleva solu.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on jokin gramposiitivisen bakteerikannan solu, esimerkiksi *Bacillus*-suvun solu, kuten *Bacillus subtilis-, Bacillus licheniformis-, Bacillus lentus-, Bacillus brevis-, Bacillus stearothermophilus-, Bacillus alkalophilus-, Bacillus amyloliquefaciens-, Bacillus coagulans-, Bacillus circulans-, Bacillus lautus-, Bacillus thuringiensis-* tai *Streptomyces lividans-* tai *Streptomyces murinus* -solu tai jonkin gramnegatiivisen bakteerikannan solu, kuten *E. coli* -solu.

10. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mutagenisoitu lipolyyttinen entsyymi kestää paremmin ionitonta, anionista, kationista, kahtais-ionista tai amfoteerista pinta-aktiivista ainetta.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ioniton pinta-aktiivinen aine on jokin alkoholietoksylaatti ja/tai anioninen pinta-aktiivinen aine on LAS tai jokin alkyylisulfaatti.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (c) seulotuille isäntäsoluille suoritetaan toinen mutageneesikäsittely, uudelleenseulonta, uudelleeneristäminen ja/tai uudelleenkloonaus.

13. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että satunnaismutageneesi paikannetaan siihen osaan DNA-sekvenssiä, joka koodaa lipolyyttistä lähtöentsyymiä.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on jokin lipaasi, esteraasi, kutinaasi tai fosfolipaasi.

15. Patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on jokin lipaasi ja paikannettu satunnaismutageneesi suoritetaan DNA-sekvenssin siihen osaan, joka koodaa lähtölipaasin lipidikosketusaluetta tai osaa siitä.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että paikannettu satunnaismutageneesi suoritetaan DNA-sekvenssin siihen osaan, joka koodaa lähtölipaasin kansialuetta ja/tai hydrofobista halkeamaa tai osaa mainitusta kansialueesta ja/tai hydrofobisesta sitovasta halkeamasta.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on johdettavissa jostakin mikroorganismista.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on johdettavissa jostakin sienestä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-sekvenssi, joka koodaa lipolyyttistä lähtöentsyymiä, on johdettavissa jostakin *Humicola* sp.-, *Rhizomucor* sp.-, *Rhizopus* sp.-, *Candida* sp. -kannasta.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on jokin lipaasi ja DNA-sekvenssi, joka koodaa lähtölipaasia, on johdettavissa jostakin *H. lanuginosa* -kannasta, esimerkiksi *H. lanuginosa* -kannasta DSM 4109, jostakin *Rh. mucor* -kannasta tai jostakin *C. antarctica* -kannasta.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että satunnaismutageneesille altistettu DNA-sekvenssi koodaa vähintään yhtä *H. lanuginosa* -lipaasia, joka on johdettavissa DSM 4109:stä, aminohappotähteiden 21-27, 56-64, 81-99, 108-116, 145-147, 174, 202-213, 226-227, 246-259 tai 263-269 rajaamista alueista.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että paikannettu satunnaismutageneesi suoritetaan vähintään kahdella mainituista alueista.

23. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttinen lähtöentsyymi on johdettavissa jostakin bakteerista.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipolyyttistä lähtöentsyymiä koodaava DNA-sekvenssi on johdettavissa jostakin *Pseudomonas* spp. -kannasta, kuten *P. cepacia-*, *P. alcaligenes-*, *P. pseudoalcaligenes-* tai

P. fragi -kannasta tai jostakin *Bacillus*-kannasta.

25. *H. lanuginosa* -lipaasin muunnos, joka on saatavissa DSM 4109:stä:, joka käsittää mutaation vähintään yhdessä seuraavista asemista:
S83T, G91A, I100V, D167G,

ja joka valinnaisesti lisäksi käsittää yhden tai useamman aminohapon lisäyksen lipaasin joko toiseen tai molempiin N- ja C-terminaalisiin päihin, yhden tai useamman aminohapon substituution yhdessä tai useammassa paikassa aminohapposekvenssissä, yhden tai useamman aminohapon deleetion joko toisessa tai molemmissa lipaasin päissä tai yhdessä tai useammassa aminohapposekvenssin kohdassa, tai yhden tai useamman aminohapon insertion yhdessä tai useammassa aminohapposekvenssin kohdassa, sillä edellytyksellä, että muunnos säilyttää lipaasiaktiivisuuden.

26. Kannasta DSM 4109 saatavan *H. lanuginosa* -lipaasin tai mainitun lipaasin jonkin analogin muunnos, t u n n e t t u siitä, se käsittää vähintään yhden seuraavista mutaatioista:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
F95C+D96N
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+D96L+L97M
E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M

D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
G91A+N94K+D96A,

ja joka valinnaisesti lisäksi käsittää yhden tai useamman aminohapon lisäyksen lipaasin joko toiseen tai molempiin N- ja C-terminaalisiin päihin, yhden tai useamman aminohapon substituution yhdessä tai useammassa paikassa aminohapposekvenssissä, yhden tai useamman aminohapon deleetion joko toisessa tai molemmissa lipaasin päissä tai yhdessä tai useammassa aminohapposekvenssin kohdassa, tai yhden tai useamman aminohapon insertion yhdessä tai useammassa aminohapposekvenssin kohdassa, sillä edellytyksellä, että muunnos säilyttää lipaasiaktiivisuuden.

27. DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se koodaa minkä tahansa patenttivaatimuksista 25 tai 26 mukaista *H. lanuginosa* -lipaasin muunnosta.

28. Vektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 27 mukaisen DNA-rakenteen.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on jokin plasmidi tai bakteriofagi.

30. Patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on jokin ilmentämisvektori, joka käsittää lisäksi DNA-sekvenssejä, jotka mahdollistavat lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen ilmentämisen.

31. Isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 27 mukaisen DNA-rakenteen tai minkä tahansa patenttivaatimuksista 28 - 30 mukaisen vektorin.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se on jokin mikrobisolu.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se on johonkin sieni- tai bakteerikantaan kuuluva solu.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se on jokin *Aspergillus* -suvun solu, kuten *A. niger*-, *A. oryzae*- tai *A. nidulans* -solu tai jokin *Saccharomyces*-suvun solu, esimerkiksi *S. cereviciae* -solu.

35. Patenttivaatimuksen 33 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se on jonkin grampositiivisen bakteerikannan solu, esimerkiksi *Bacillus*-suvun solu, kuten *Bacillus subtilis-, Bacillus licheniformis-, Bacillus lentus-, Bacillus brevis-, Bacillus stearothermophilus-, Bacillus alkalophilus-, Bacillus amyloliquefaciens-, Bacillus coagulans-, Bacillus circulans-, Bacillus lautus-, Bacillus thuringiensis-* tai *Streptomyces lividans-* tai *Streptomyces murinus* -solu tai jonkin gramnegatiivisen bakteerikannan solu, kuten *E. coli* -solu.

36. Menetelmä jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja joka sietää paremmin jotakin pesuainetta tai pesuainekomponenttia lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna, valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä valmistetaan lipolyyttinen entsyymimuunnos minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 24 mukaisella menetelmällä ja lipolyyttinen entsyymimuunnos otetaan talteen vaiheessa (c) seulotusta isäntäsolusta.

37. Menetelmä jonkin lipolyyttisen lähtöentsyymin muunnoksen, joka on vähemmän riippuvainen kalsiumista ja joka valinnaisesti sietää paremmin jotakin pesuainetta tai pesuainekomponenttia lipolyyttiseen lähtöentsyymiin verrattuna, valmistamiseksi,
t u n n e t t u siitä, että menetelmässä viljellään jotakin minkä tahansa patenttivaatimuksista 31 - 35 mukaista isäntäsolua sopivissa olosuhteissa, jotta se ilmentää muunnoksen, ja ilmennetty muunnos otetaan talteen viljelystä.

38. Pesuaineen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksista 25 tai 26 mukaisen lipolyyttisen entsyymin muunnoksen, valinnaisesti pölyämättömän granulaatin, stabiloidun liuoksen tai suojatun entsyymin muodossa.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen pesuaineen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että se sisältää 0,02 - 200 mg entsyymiproteiinia/g lisäainetta.

40. Patenttivaatimuksen 38 tai 39 mukainen pesuaineen lisäaine, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi jonkin toisen entsyymin, kuten jonkin proteaasin, amylaasin, peroksidaasin, kutinaasin ja/tai sellulaasin.

41. Pesuainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksista 25 tai 26 mukaisen lipolyyttisen entsyymin muunnoksen.

42. Patenttivaatimuksen 41 mukainen pesuainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi jonkin toisen entsyymin, kuten jonkin proteaasin, amylaasin, peroksidaasin, kutinaasin ja/tai sellulaasin.

Patentkrav

1. Förfarande för att framställa en transformation av ett lipolytiskt initialenzym, k ä n n e t e c k n a t av att
(a) på DNA-sekvensen som kodar det lipolytiska initialenzymet utförs en slumpmässig mutagenes och
(b) den muterade DNA-sekvensen som erhållits i skede (a) uttrycks i någon värdcell och
(c) de värdceller sållas, vilka uttrycker ett muterat lipolytiskt enzym som är mindre beroende av kalcium.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att skede (c) dessutom innefattar en sållning med avseende på en bättre tvättmedels- eller tvättmedelskomponentstolerans jämfört med det lipolytiska initialenzymet.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att den slumpmässiga mutagenesen utförs genom användning av en fysikalisk eller kemikalisk mutagen, genom att använda en oligonukleotid eller genom att använda en mutagenes utförd med hjälp av PCR.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t av att mutagenen väljs ur en grupp bestående av myrsyra, UV-strålning, hydroxylamin, N-metyl-N′-nitro-N-nitrosoguanid (MNNG), O-metylhydroxylamin, salpetersyrlighet, etylmetansulfonat (EMS), natriumbisulfit och nukleotidanaloger.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att expressionen av en muterad DNA-sekvens utförs genom att transformera en lämplig värdcell med en muterad DNA-sekvens, då DNA-sekvensen eventuellt innefattar dessutom en DNA-sekvens som kodar funktioner vilka möjliggör expression av en muterad DNA-sekvens, och genom att odla värdcellen som erhållits i skede (b) under lämpliga förhållanden för att uttrycka en muterad DNA-sekvens.

6. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att värdcellen som används vid expressionen av den muterade DNA-sekvensen är en mikrobcell.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e t e c k n a t av att värdcellen är en cell som härstammar från en svampstam eller en bakteriestam.

8. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t av att värdcellen är en cell som härstammar från släktet *Aspergillus*, såsom *A. niger*, *A. oryzae* och *A. nidulansis* eller en cell som härstammar från släktet *Saccharomyces*, t.ex. från *S. cereviciae.*

9. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t av att värdcellen är en cell från en grampositiv bakteriestam, t.ex. en cell av släktet *Bacillus*, såsom en *Bacillus subtilis-*, *bacillus licheniformis-*, *Bacillus lentus-*, *bacillus brevis-*, *Bacillus stearothermophilus-*, *Bacillus alkalophilus-*, *Bacillus amyloliquefaciens-*, *Bacillus coagulans-*, *Bacillus circulans-*, *Bacillus lautus-*, *Bacillus thuringiensis-* eller *Streptomyces lividans-* eller *Streptomyces murinus* -cell eller en cell av en gramnegativ bakteriestam, såsom en *E. coli* -cell.

10. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t av att det muterade lipolytiska enzymet bättre tål ett icke-joniskt, anjoniskt, katjoniskt, zwitterjoniskt eller amfotärt ytaktivt ämne.

11. Förfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t av att det icke-joniska ytaktiva ämnet är ett alkoholetoxylat och/eller det anjoniska ytaktiva ämnet är LAS eller ett alkylsulfat.

12. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att i skede (c) utförs på de sållade värdcellerna en andra mutagenesbehandling, en återsållning, en återisolering och/eller en återkloning.

13. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1 - 12, k ä n n e t e c k n a t av att den slumpmässiga mutagenesen lokaliseras till den delen av DNA-sekvensen som kodar det lipolytiska initialenzymet.

14. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1 - 13, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet är en lipas, esteras, kutinas eller fosfolipas.

15. Förfarande enligt patentkrav 13 eller 14, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet är en lipas och den lokaliserade slumpmässiga mutagenesen utförs i den delen av DNA-sekvensen som kodar initiallipasens lipidberöringsområde eller en del av det.

16. Förfarande enligt patentkrav 15, k ä n n e t e c k n a t av att den lokaliserade slumpmässiga mutagenesen utförs i den del av DNA-sekvensen som kodar initiallipasens däckområde och/eller hydrofoba spricka eller en del av nämnda däckområde och/eller av en hydrofob bindande spricka.

17. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1 - 16, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet kan härledas från en mikroorganism.

18. Förfarande enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet kan härledas från en svamp.

19. Förfarande enligt patentkrav 18, k ä n n e t e c k n a t av att DNA-sekvensen som kodar det lipolytiska initialenzymet kan härledas från en *Humicola* sp.-, *Rhizomucor* sp.-, *Rhizopus* sp.-, *Candida* sp. -stam.

20. Förfarande enligt patentkrav 19, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet är en lipas och DNA-sekvensen som kodar initiallipasen kan härledas från en *H. lanuginosa* -stam, t.ex. en *H. lanuginosa* -stam DSM 4109, en *Rh. mucor* -stam eller från en *C. antarctica* -stam.

21. Förfarande enligt patentkrav 20, k ä n n e t e c k n a t av att DNA-sekvensen som underkastats den slumpmässiga mutagenesen kodar åtminstone en *H. lanuginosa* -lipas som kan härledas från DSM 4109, från områden som avgränsas av aminosyraresterna 21-27, 56-64, 81-99, 108-116, 145-147, 174, 202-213, 226-227, 246-259 eller 263-269.

22. Förfarande enligt patentkrav 21, k ä n n e t e c k n a t av att den lokaliserade slumpmässiga mutagenesen utförs på åtminstone två av nämnda områden.

23. Förfarande enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a t av att det lipolytiska initialenzymet kan härledas från en bakterie.

24. Förfarande enligt patentkrav 23, k ä n n e t e c k n a t av att DNA-sekvensen som kodar det lipolytiska initialenzymet kan härledas från en *Pseudomonas* spp.-stam, såsom en *P. cepacia*-, *P. alcaligenes*-, *P. pseudoalcaligenes*- eller *P. fragi* -stam eller från en *Bacillus*-stam.

25. Transformation av en *H .lanuginosa* -lipas som kan erhållas från DSM 4109, som innefattar en mutation i åtminstone en av följande positioner: S83T, G91A, I100V, D167G,

och som valbart dessutom innefattar en tillsats av en eller flera aminosyror i lipasens ena eller bägge N- och C-terminala änder, substitution av en eller flera aminosyror på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, deletion av en eller flera aminosyror antingen i ena eller bägge änderna av lipasen eller på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, eller insertion av en eller flera aminosyror på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, under förutsättning att transformationen behåller sin lipasaktivitet.

26. Transformation av en *H. lanuginosa* -lipas som erhålls ur stammen DSM 4109 eller någon analog av nämnda lipas, k ä n n e t e c k n a d av att den innefattar åtminstone en av följande mutationer:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
F95C+D96N
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
D57G+N94K+D96L+L97M

E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
D167G
N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
G91A+N94K+D96A,

och som valbart dessutom innefattar tillsats av en eller flera aminosyror i lipasens antingen ena eller bägge N- och C-terminala änder, substitution av en eller flera aminosyror på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, deletion av en eller flera aminosyror antingen i ena eller bägge änderna av lipasen eller på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, eller insertion av en eller flera aminosyror på ett eller flera ställen av aminosyrasekvensen, under förutsättning att transformationen behåller sin lipasaktivitet.

27. DNA-struktur, k ä n n e t e c k n a d av att den kodar en transformation av en *H. lanuginosa* -lipas enligt vilket som helst av patentkraven 25 eller 26.

28. Vektor, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en DNA-struktur enligt patentkrav 27.

29. Vektor enligt patentkrav 28, k ä n n e t e c k n a d av att den är en plasmid eller bakteriofag.

30. Vektor enligt patentkrav 28 eller 29, k ä n n e t e c k n a d av att den är en expressionsvektor, innefattande dessutom DNA-sekvenser som möjliggör expression av en transformation av ett lipolytiskt initialenzym.

31. Värdcell, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en DNA-struktur enligt patentkrav 27 eller en vektor enligt vilket som helst av patentkraven 28-30.

32. Cell enligt patentkrav 31, k ä n n e t e c k n a d av att den är en mikrobcell.

33. Cell enligt patentkrav 32, k ä n n e t e c k n a d av att den är en cell som tillhör en svamp- eller bakteriestam.

34. Cell enligt patentkrav 33, k ä n n e t e c k n a d av att den är en cell av släktet *Aspergillus*, såsom en *A. niger-*, *A. oryzae-* eller *A. nidulans* -cell eller en cell av släktet *Saccharomyces*, t.ex. en *S. cerviciae*-cell.

35. Cell enligt patentkrav 33, k ä n n e t e c k n a d av att den är en cell från en grampositiv bakteriestam, t.ex. en cell av släktet *Bacillus*, såsom en *Bacillus subtilis-*, *Bacillus licheniformis-*, *Bacillus lentus-*, *Bacillus brevis-*, *Bacillus stearothermophilus-*, *Bacillus alkalophilus-*, *Bacillus amyloliquefaciens-*, *Bacillus coagulans-*, *Bacillus circulans-*, *Bacillus lautus-*, *Bacillus thuringiensis-* eller *Streptomyces lividans-* eller *Streptomyces murinus* -cell eller en cell av en gramnegativ bakteriestam, såsom en *E. coli* -cell.

36. Förfarande för att framställa en transformation av ett lipolytiskt initialenzym som är mindre beroende av kalcium och som bättre tål ett tvättmedel eller en tvättmedelskomponent i jämförelse med ett lipolytiskt initialenzym, k ä n n e t e c k n a t av att vid förfarandet framställs en lipolytisk enzymtransformation med ett förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1 - 24 och den lipolytiska enzymtransformationen tas till vara från en värdcell som sållats i skede (c).

37. Förfarande för att framställa en transformation av ett lipolytiskt initialenzym som är mindre beroende av kalcium och som valbart bättre tål ett tvättmedel eller en tvättmedelskomponent i jämförelse med ett lipolytiskt initialenzym, k ä n n e t e c k n a t av att vid förfarandet odlas en värdcell enligt vilket som helst av patentkraven 31 - 35 under lämpliga förhållanden för att uttrycka en transformation, och den uttryckta transformationen tas till vara från odlingen.

38. Tillsatsmedel för tvättmedel, k ä n n e t e c k n a t av att det innefattar en transformation av ett lipolytiskt enzym enligt vilket som helst av patentkraven 25 eller 26, valbart i form av ett icke-dammande granulat, en stabiliserad lösning eller ett skyddat enzym.

39. Tillsatsmedel för tvättmedel enligt patentkrav 38, k ä n n e t e c k n a t av att det innehåller 0,02 – 200 mg entzymprotein/g av tillsatsmedel.

40. Tillsatsmedel för tvättmedel enligt patentkrav 38 eller 39, k ä n n e t e c k n a t av att det dessutom innefattar ett andra enzym, såsom en proteas, amylas, peroxidas, kutinas och/eller cellulas.

41. Tvättmedelskomposition, k ä n n e t e c k n a d av att den innefattar en transformation av ett lipolytisk enzym enligt vilket som helst av patentkraven 25 eller 26.

42. Tvättmedelskomposition enligt patentkrav 41, k ä n n e t e c k n a d av att den dessutom innefattar ett andra enzym, såsom en proteas, amylas, peroxidas, kutinas och/eller cellulas.

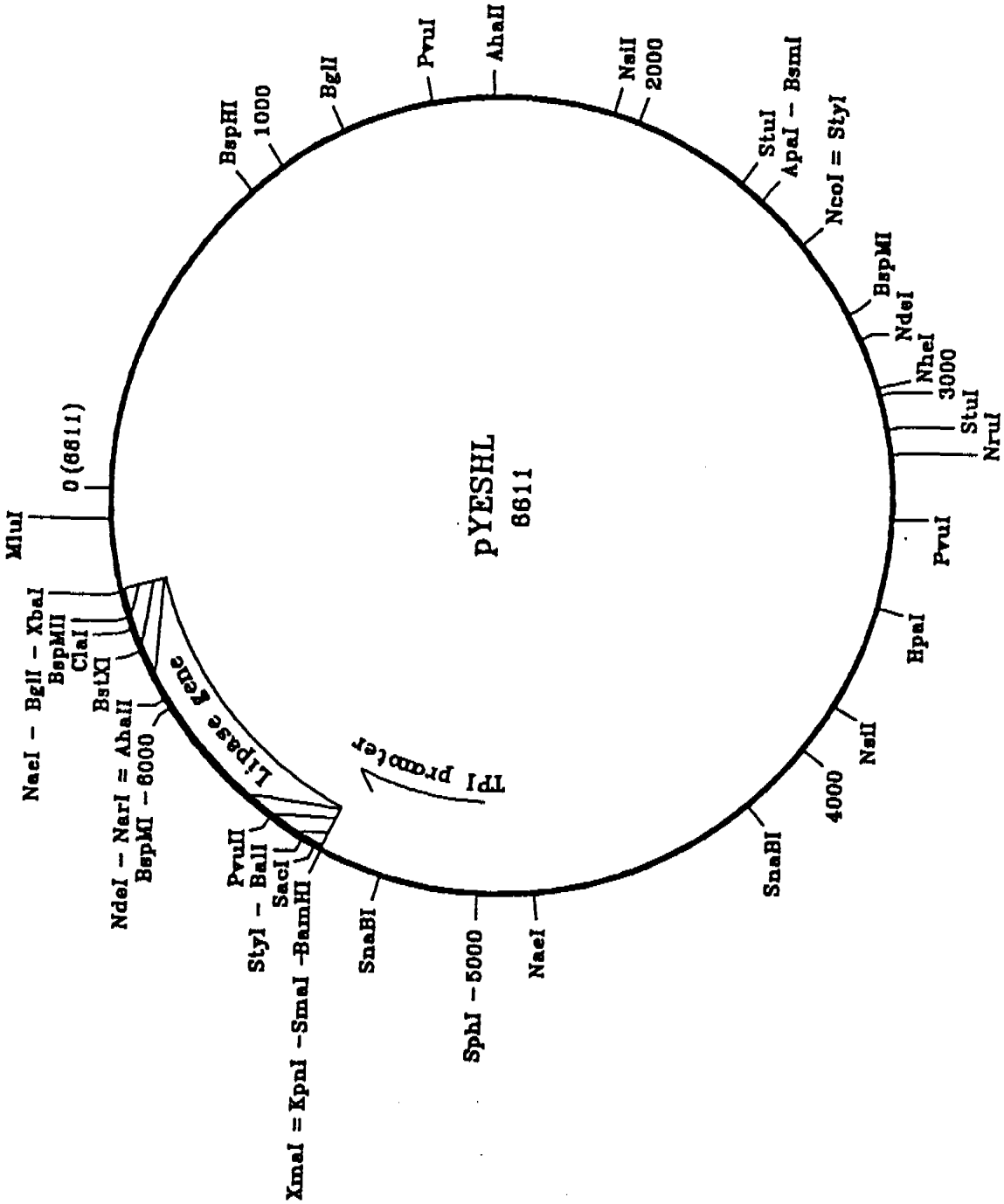
pYESHL
6611
0 (6611)
MluI
NaeI – BglII – XbaI
BspMII
ClaI
BstXI
NdeI – NarI = AhaII
BspMI – 6000
Lipase gene
TPI promoter
PvuII
StyI – BalI
SacI
XmaI = KpnI –SmaI –BamHI
SnaBI
SphI – 5000
NaeI
SnaBI
4000
NsiI
EpaI
PvuI
NruI
StuI
NheI
3000
NdeI
BspMI
NcoI = StyI
ApaI – BsmI
StuI
NsiI
2000
AhaII
PvuI
BglI
BspHI
1000

Fig. 1

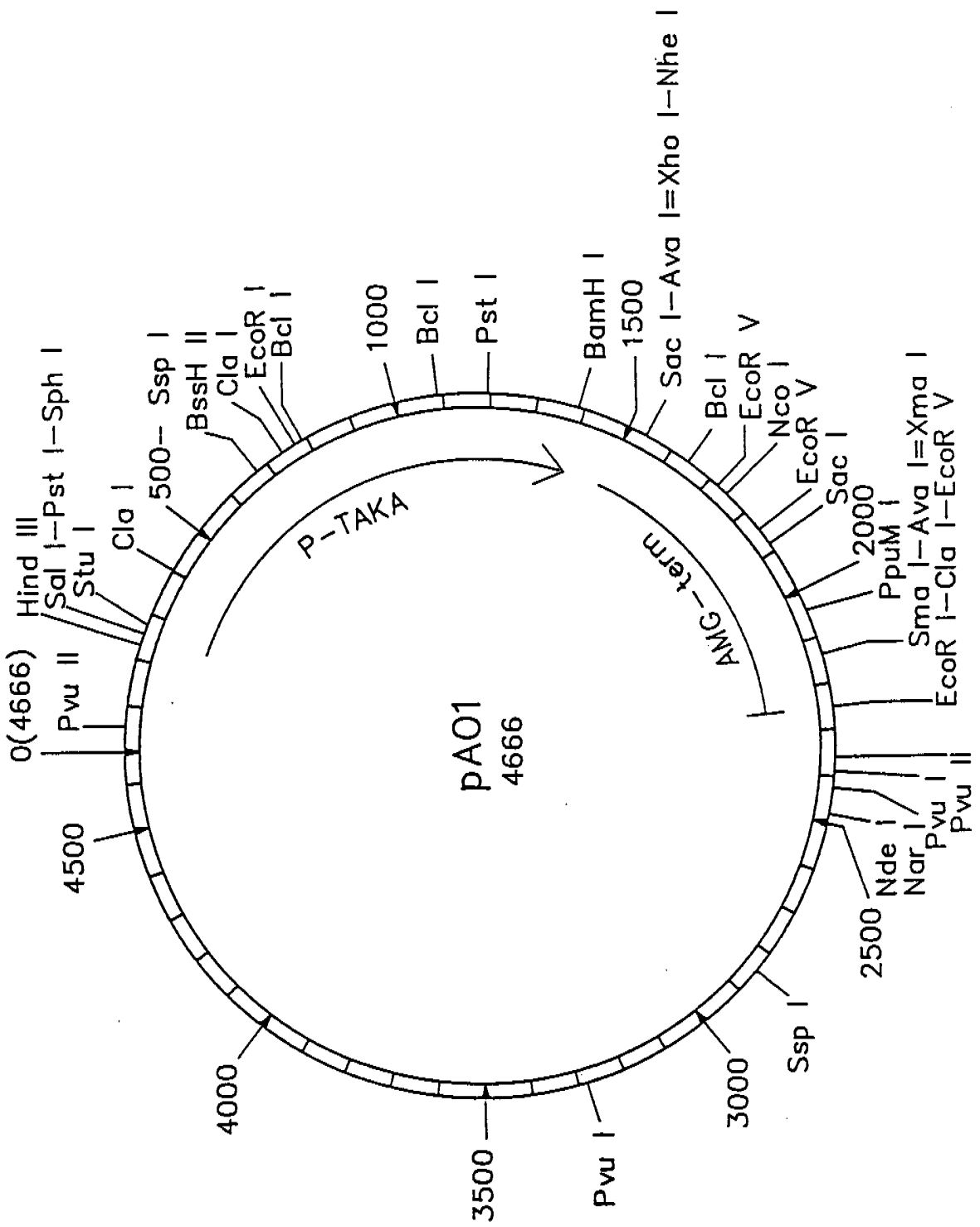
pAO1
4666
P-TAKA
AMG-term
0(4666)
Hind III
Sal I–Pst I–Sph I
Stu I
Pvu II
Cla I
500– Ssp I
BssH II
Cla I
EcoR I
Bcl I
1000
Bcl I
Pst I
BamH I
1500
Sac I–Ava I=Xho I–Nhe I
Bcl I
EcoR V
Nco I
EcoR V
Sac I
2000
PpuM I
Sma I–Ava I=Xma I
EcoR I–Cla I–EcoR V
Pvu II
Pvu I
Nde I
Nar I
2500
Ssp I
3000
Pvu I
3500
4000
4500

Fig. 2

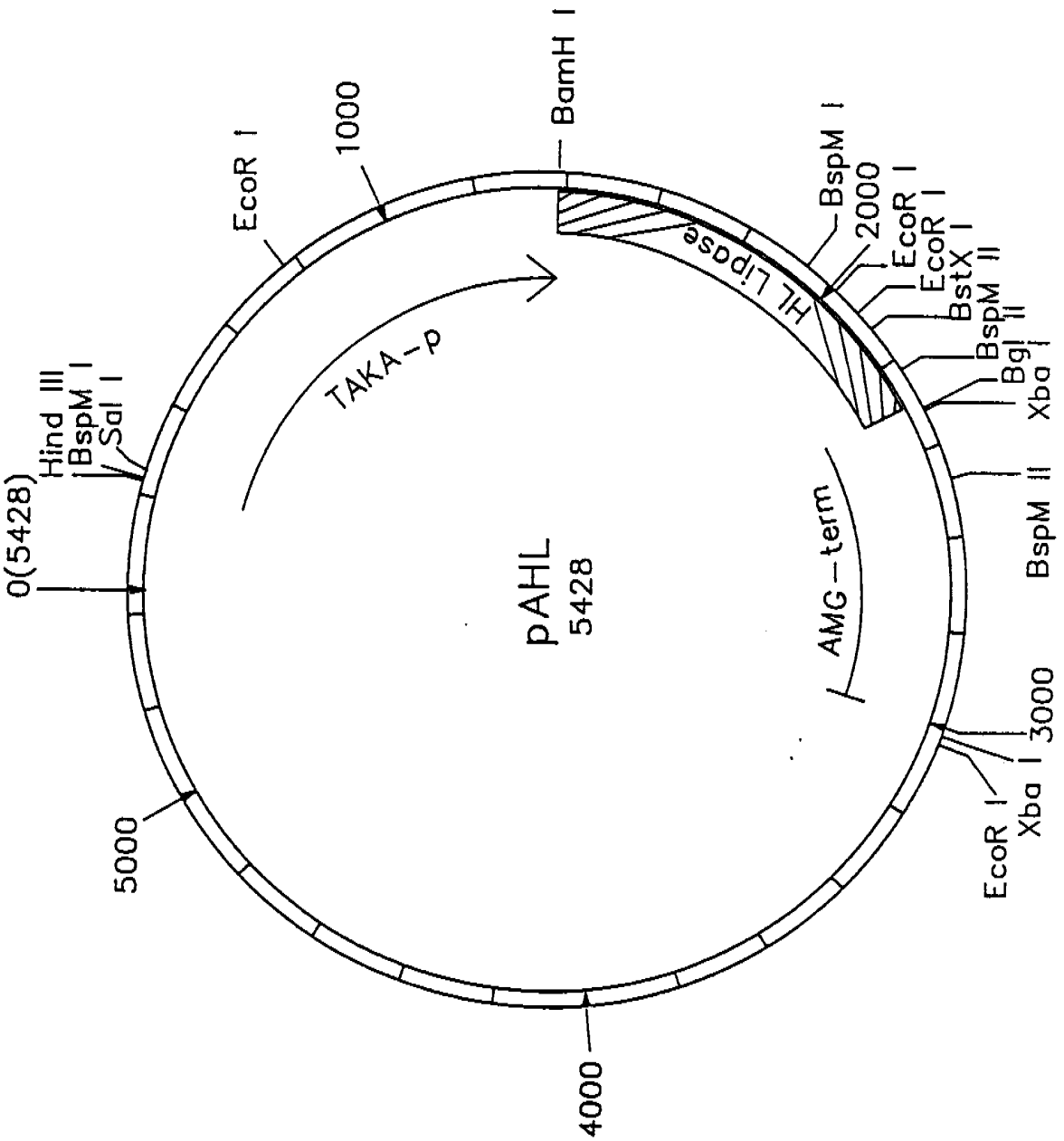
BamH I
1000
EcoR I
Hind III
BspM I
Sal I
0(5428)
5000
4000
3000
EcoR I
Xba I
BspM II
Xba I
Bgl II
BspM II
BstX I
EcoR I
2000
BspM I
HL Lipase
TAKA-P
AMG-term
pAHL
5428

Fig. 3

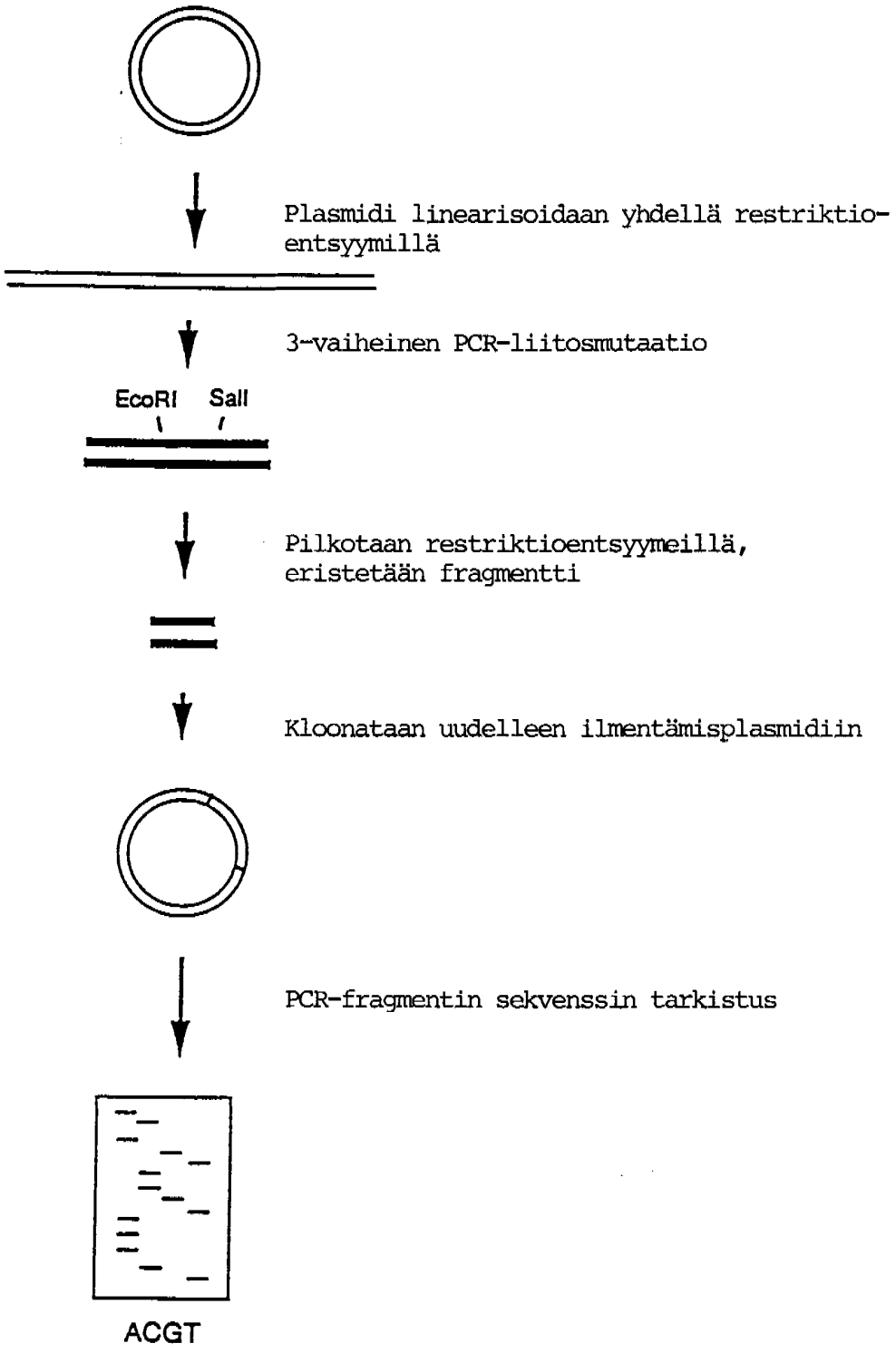
Plasmidi linearisoidaan yhdellä restriktio-entsyymillä
3-vaiheinen PCR-liitosmutaatio
EcoRI
SalI
Pilkotaan restriktioentsyymeillä, eristetään fragmentti
Kloonataan uudelleen ilmentämisplasmidiin
PCR-fragmentin sekvenssin tarkistus
ACGT

Fig. 4

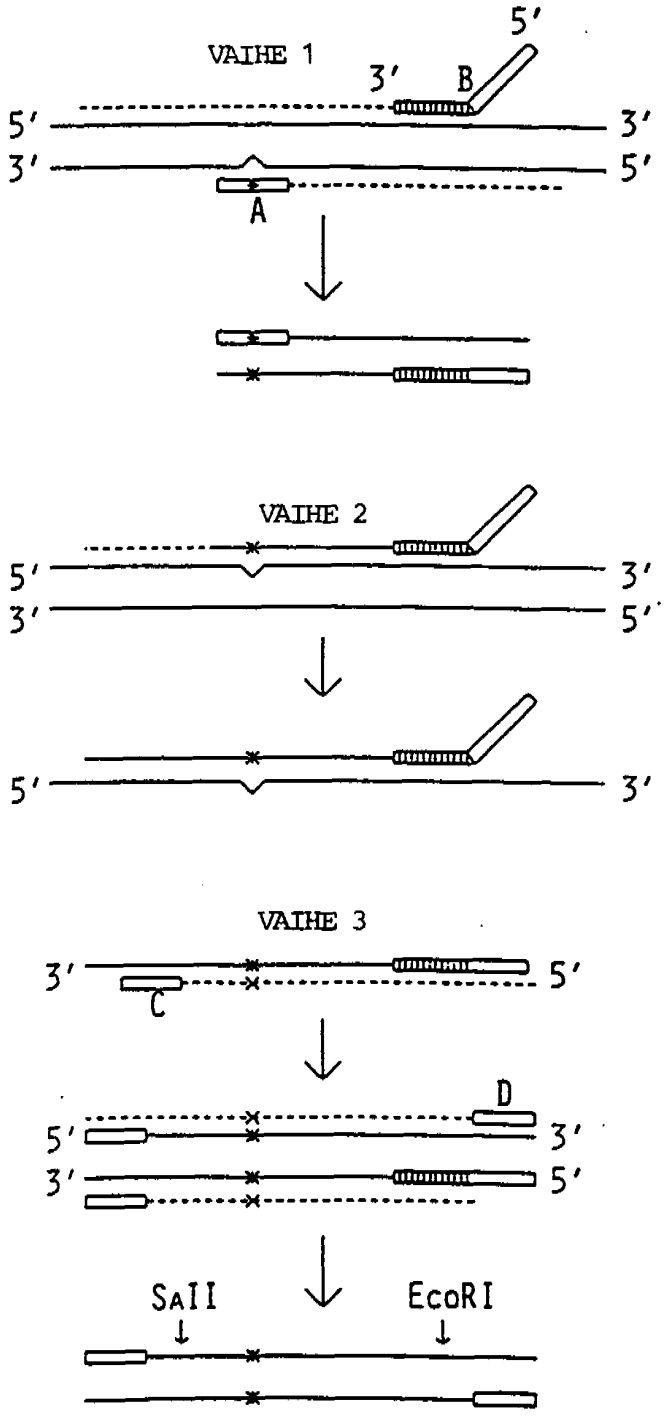

Fig. 5