FI000112794B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 112794 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.01.2004**

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

C07K 14/43, C12P 21/02, C12N 15/29, 15/80, 1/15

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **951868**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **19.04.1995**

(24) Alkupäivä - Löpdag **19.04.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **22.10.1995**

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

21.04.1994 ES 9400836 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •Urquima, S.A., Decano Bahi 67, 08026 Barcelona, ESPANJA, (ES)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Uriach-Marsal,Juan, Dr. Fleming 18-20, 08017 Barcelona, ESPANJA, (ES)
2 •Rubio-Susan,Victor, Cuesta San Vicente, 20, 28008 Madrid, ESPANJA, (ES)
3 •Patino-Martin,Cristina, Sector Literatos 32, 28760 Tres Cantos, Madrid, ESPANJA, (ES)
4 •Iossif Kalo-Koenova,Eliza, Avenida Marques de Zafra, 28, 28028 Madrid, ESPANJA, (ES)
5 •del Moral-Juarez,Catalina, Avenida Santa Eugenia, 56, 28031 Madrid, ESPANJA, (ES)
6 •Faus-Santasusana,Ignacio, Arquitecto Moragas 18-A, 08035 Barcelona, ESPANJA, (ES)
7 •del Rio-Pericacho,José-Luis, Rambla d'Egara, 273, 08224 Terrasa, ESPANJA, (ES)
8 •Bladé-Piquié,Joan, Albert Llanas, 11, 08028 Barcelona, ESPANJA, (ES)

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

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä luonnollisen proteiinimakeuttamisaineen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett naturligt protein-sötningsmedel

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:2972 CECT

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 139501 A, GB 2200118 A, WO 8703007 A, WO 9005775 A

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Taumatiini II:ta tai taumatiini I:tä voidaan saada ilmentämällä, ei niiden alkuperäisiä geenejä vaan keinotekoisia, synteettisiä ja olennaisilta osiltaan spesifisiä sääntöjä noudattaen optimoituja geenejä . Tämä ilmentäminen suoritetaan edullisesti rihmasienillä, erityisesti GRAS-sienillä ja erityisesti sienillä *Penicillium roquefortii, Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksella. Olennaisilta osiltaan optimoitujen, keinotekoisten geenien valmistaminen rihmasieniä varten, mikä taumatiinin tapauksessa suoritetaan tässä ensimmäistä kertaa, mahdollistaa proteiinin runsaan ilmentymisen, mikä tekee prosessista hyödyllisen tämän arvokkaan makeutusaineen teolliseen tuotantoon. Taumatiineja voidaan saada ekstrasellulaarisesti käyttämällä erityssignaalilla varustettua plasmidia ja intrasellulaarisesti. Jälkimmäistä menetelmää voidaan käyttää eläinrehuissa ilman sienimyseelin erottamista etukäteen.

Taumatin II eller taumatin I kan erhållas genom att uttrycka, inte deras ursprungliga gener utan konstgjorda, syntetiska väsentligen optimerade gener enligt specifika regler. Denna uttryckning utförs företrädesvis med trådlika svampar, speciellt med GRAS-svampar och speciellt med svampar *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* eller *awamori*-variant av *Aspergillus niger*. Framställning av väsentligen optimerade konstgjorda gener för trådlika svampar, vilket i fall av taumatin utförs här för första gången, möjliggör riklig uttryckning av proteinet, som gör processen nyttig för industriell produktion av detta värdefulla sötningsmedel. Taumatiner kan produceras extracellulärt genom att använda en plasmid med en sekretionssignal, och intracellulärt. Det senare förfarandet kan användas vid djurfoder utan att avskilja svampmycelium på förhand.

MENETELMÄ LUONNOLLISEN PROTEIINIMAKEUTTAMISAINEEN VALMISTAMISEKSI

Tämä keksintö perustuu geeniteknologiaan eli yhdistelmä-DNA-tekniikkaan ja koskee menetelmää luontaisten proteiinisten taumatiinin tyyppisten makeutusaineiden valmistamiseksi, näitä proteiineja koodaavia uusia DNA-sekvenssejä, jotka on optimoitu ilmennettäviksi rihmasienissä, sekä näiden sekvenssien käyttöä rihmasienten transformoimisessa taumatiinien tuotantoon.

Tekniikan taso

Taumatiinit ovat proteiineja, joilla on hyvin makea maku ja kyky kohottaa ruoan maittavuutta (parantamalla muita aromeita); nykyisin niitä uutetaan teollisuudessa kasvin *Thaumatococcus daniellii* Benth hedelmien siemenvaipoista. Taumatiineja voidaan eristää näistä siemenvaipoista vähintään viidessä eri muodossa (I, II, III, b ja c), jotka voidaan erottaa käyttämällä ioninvaihtokromatografiaa. Kaikki nämä muodot ovat yksiketjuisia 207 aminohapon polypeptidejä, ja niiden molekyylipaino on noin 22 000 Da. Taumatiinit I ja II, joita siemenvaipoissa on enemmistönä ja joiden aminohapposekvenssit ovat hyvin samanlaiset, ovat paljon makeampia kuin sakkaroosi (erään arvion mukaan 100 000 kertaa makeampia). Sen lisäksi, että taumatiinit I ja II ovat luonnontuotteita, ne ovat myrkyttömiä, mikä tekee niistä hyvän korvikkeen tavallisille makeutusaineille eläinten ja ihmisten elintarviketeollisuudessa.

Kasviperäisten taumatiinien teollinen käyttö on niiden eduista huolimatta hyvin rajoittunutta, koska hedelmän, josta ne uutetaan, saamiseen liittyy erittäin suuria vaikeuksia. Tuotantokasvi, *T. daniellii*, ei vaadi ainoastaan trooppista ilmastoa ja hyönteispölytystä vaan sitä on myös viljeltävä muiden puiden joukossa ja silti 75 % sen kukista ei kanna hedelmää.

Vaikka taumatiineja on yritetty tuottaa geenitekniikan keinoin bakteereissa, kuten lajeissa *Escherichia coli* (vertaa EP 54.330, EP 54.331 ja WO 89/06283), *Bacillus subtilis* ja *Streptomyces lividans*, hiivoissa, kuten lajeissa *Saccharomyces cerevisiae* (vertaa WO 87/03007) ja *Kluyveromyces lactis* (EP 96.430 ja EP 96.910), sienessä *Aspergillus oryzae* (Hahm ja Batt, Agric. Biol. Chem. 1990, vol. 54, s. 2513-20) ja transgeenisissä kasveissa, kuten *Solanum tuberosumissa*, tuloksia on tähän asti pidetty masentavina; sen vuoksi taumatiinin saatavuus teollisuudelle on hyvin niukkaa ja kallista (vertaa M. Witty ja W.J. Harvey, "Sensory evaluation of transgenic *Solanum tuberosum* producing r-thaumatin II", New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1990, vol. 18, s. 77-80, ja siinä viitatut artikkelit).

Sopivaa ratkaisua ongelmaan kohtuuhintaisten taumatiinien saamiseksi teollisia määriä ei tekniikan tason mukaisesti vielä ole saatavilla.

Keksinnön kuvaus

Tämä keksintö ratkaisee taumatiinien II ja I valmistusongelman ilmentämällä niitä rihmasienissä ilman, että käytetään luontaista DNA:ta (tai siitä peräisin olevaa cDNA:ta) kuten on kuvattu sienelle *Aspergillus oryzae*. Pikemminkin rihmasienissä tapahtuvaan ilmentämiseen käytetään keinotekoisia, synteettisiä ja olennaisilta osiltaan optimoituja geenejä spesifisten sääntöjen mukaisesti. Olennaisilta osiltaan optimoitujen, keinotekoisten geenien saanti rihmasieniä varten, mikä on taumatiineille suoritettu ensimmäistä kertaa tässä, mahdollistaa proteiinin runsaan ilmentymisen, mikä tekee prosessista käyttökelpoisen teollisuudelle.

Spesifisessä keksinnön suoritustavassa käytetyt rihmasienet kuuluvat vaarattomina pidettyihin, erityisesti GRAS-listan (Generally Recognized as Safe) sisältämiin lajeihin. Edullisia GRAS-sieniä kuuluu *Penicillium*-sukuun, erityisesti laji *Penicillium roquefortii*, ja *Aspergillus*-sukuun, erityisesti laji *niger* ja *niger*-muunnos *awamori*.

Tämä keksintö sisältää taumatiinien I ja II saamisen eritettynä tai tuotettuna ekstrasellulaarisesti (mitä varten plasmidiin on vietävä sopiva erityssignaali) sekä taumatiinien I ja II saamisen intrasellulaarisesti, mikä mahdollistaa niiden käytön eläinrehuissa ilman myseelin ennalta suoritettavaa erottamista sienistä.

Jäljempänä käytetään muiden muassa seuraavia lyhenteitä:

A = adeniini
Amp = ampisilliini
ATP = adenosiinitrifosfaatti
BSA = naudan seerumin albumiini
C = sytosiini
CIP = vasikan suolen fosfataasi
dATP = 2'-deoksiadenosiinitrifosfaatti
dCTP = 2'-deoksisytidiinitrifosfaatti
dGTP = 2'-deoksiguanosiinitrifosfaatti
DNA = deoksiribonukleiinihappo
DTT = 1,4-ditiotreitoli
dTTP = 2'-deoksitymidiinitrifosfaatti
EDTA = etyleenidiamiinitetraetikkahappo (dinatriumsuola)
G = guaniini
GRAS = "Generally regarded as safe" (Yleisesti turvallisena pidetty)
KDa = kilodalton
MCS = monikloonauskohta
nt = nukleotidit
pb = emäsparit
PCR = polymeraasiketjureaktio
PEG = polyetyleeniglykoli

PMSF = fenyylimetyylisulfonyylifluoridi
rpm = kierrosta minuutissa
SDS = natriumdodekyylisulfaatti
SSC = natrium-natriumsitraatti (0,15 M NaCl; 0,015 M natriumsitraatti)
T = tymiini
TE = puskuri 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
U = yksikköä
X-gal = 5-bromi-4-kloori-3-indo-β-D-galaktoosi

Aminohappoja merkitään niiden normaalilyhenteillä. Plasmideilla käytetään kussakin tapauksessa julkaistua merkintää.

Yhtenä tämän keksinnön kohteena on taumatiini II:ta koodaava geeni, joka on keinotekoinen, synteettinen ja optimoitu yli 50%:isesti rihmasienissä ilmennettäväksi; tämä geeni koostuu DNA-sekvenssistä, joka koodaa sekvenssin ID NO:1 aminohapposekvenssiä (vastaa taumatiini II -proteiinin 207 aminohappoa, joita seuraa n lopetussekvenssiä, jossa kokonaisluku n on suurempi tai yhtä suuri kuin 1); tämä DNA-sekvenssi on tulos siitä, että luontaisen geenin (kirjallisuudessa kuvattu geeni, joka sisältyy myös sekvenssiin ID NO:1), joka koodaa taumatiini II:n 207 aminohappoa, DNA-sekvenssiin on tehty yli 50 % mahdollisista modifikaatioista lisäämällä yksi tai useampi (n Sekvenssissä ID NO:1) TAA-lopetuskodoni ja suorittamalla yli 50 % mahdollisista muutoksista nukleotidikodoneille, jotka vastaavat taumatiini II:n aminohappoja; nämä muutokset koostuvat tietyssä aminohapossa olevien alkuperäisten kodonien korvaamisesta kodonilla, joka on esitetty sulkeissa seuraavassa amino-happokodonien listassa:

Ala (GCC), Arg (CGC), Asn (AAC), Asp (GAC), Cys (TGC), Lys (AAG), Gln (CAG), Glu (GAG), Gly (GGC), Ile (ATC), Leu (CTC), Met (ATG), Phe (TTC), Pro (CCC), Ser (TCC), Thr (ACC), Trp (TGG), Tyr (TAC), Val (GTC).

Spesifinen edellä mainitun geenin tapaus, jossa suoritetaan yli 75 %:n optimointi, on edullinen. Optimoinnin maksimointi (100 %) on vielä edullisempaa, s.o. kun keinotekoisen geenin DNA-sekvenssi saadaan sekvenssistä SEKVENSSI ID NO:1 suorittamalla kaikista mahdollisista kodonimuutoksista 100 %, mikä vastaa sekvenssiä SEKVENSSI ID NO:3. Edullisia ovat myös edellä mainitut geenit, joissa n on välillä 1 ja 3.

Toisena tämän keksinnön kohteena on taumatiini I:tä koodaava geeni, joka on keinotekoinen, synteettinen ja optimoitu yli 50%:isesti rihmasienissä ilmennettäväksi; tämä geeni koostuu DNA-sekvenssistä, joka koodaa taumatiini I -proteiinin 207 aminohappoa vastaavaa aminohapposekvenssiä (207 aminohapon sekvenssi, joka eroaa SEKVENSSI ID NO:1:n sekvensseistä vain viidessä aminohapossa, s.o., 46-Asn, 63-Ser, 67-Lys, 76-Arg ja 113-Asn); tämä optimoitu DNA-sekvenssi saadaan jättämällä seuraavat viisi kodonia muuttamatta: AAC (46-Asn), TCC (63-Ser), AAG (67-Lys), CGC (76-Arg) ja AAC (113-Asn), modifioimalla muut kodonit, kuten edellä on kuvattu taumatiini II:n DNA-sekvenssille, ja lisäämällä yksi tai useampi TAA-lopetuskodoni. Erityisen edullinen on taumatiini I:tä koodaava geeni, joka on optimoitu yli 75%:isesti. Vielä edullisemmassa tapauksessa optimointi on maksimaalista (100 %). Keinotekoiset geenit, joihin on lisätty 1-3 TAA-lopetuskodonia, ovat edullisia.

Mitä tahansa yli 50 %, yli 75 % tai jopa 100 % optimoitua geeniä kutsutaan jäljempänä ilman erottelua "olennaisilta osiltaan optimoiduksi geeniksi".

Keksinnön kohteena ovat myös yhdistelmäplasmidit, jotka on muodostettu: (i) olennaisilta osiltaan optimoidusta geenistä taumatiinien I ja II saamiseksi, (ii) sellaisesta rihmasienten ekspressiokasetista, joka sisältää tämäntyyppisille sienille sopivan promoottorisekvenssin ja lopetussekvenssin, (iii) sopivasta valintamarkkerista, ja (iv)

valinnaisesta erityssignaali-DNA-sekvenssistä proteiinin tuottamiseksi ekstrasellulaarisesti.

Erityisen edullisia ovat yhdistelmäplasmidit, joille on luonteenomaista se, että ekspressiokasetin promoottorisekvenssi on peräisin *Aspergillus nidulansin* glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasientsyymin geenistä; ekspressiokasetin lopetussekvenssi on *Aspergillus nidulansin* tryptofaani C:n sekvenssi; ja valintamarkkerina on resistenssi sulfaniiliamidille. Myös sellaiset yhdistelmä-analogiplasmidit ovat edullisia, joissa ekspressiokasetin promoottorisekvenssi on peräisin *Aspergillus nigerin* glukoamylaasientsyymin geenistä.

Erityisessä keksinnön suoritustavassa käytettävät yhdistelmäplasmidit ilmentävät taumatiini-glukoamylaasifuusioproteiinia ja sisältävät niille tunnusomaisesti: (i) sopivan valintamarkkerin; (ii) DNA-sekvenssin, joka on muodostettu (a) taumatiinien I ja II ilmentämiseen olennaisilta osiltaan optimoidusta geenistä, (b) spacer-sekvenssistä, joka puolestaan sisältää KEX2-käsittelysekvenssin, ja (c) *Aspergillus nigerin* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksen glukoamylaasin täydellisestä geenistä (glaA); sekä (iii) glaA-geenin "pre"- ja "pro"-signaalisekvenssit.

Keksinnön kohteena ovat myös rihmasienten viljelmät, jotka pystyvät tuottamaan taumatiini I ja II -proteiineja, jotka viljelmät on transformoitu millä tahansa edellä mainituista plasmideista. Erityisen edullisia ovat rihmasienilajit *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* ja *Aspergillus nigerin* muunnos *awamori*.

Keksinnön kohteena ovat myös taumatiini I:n tai II:n tuotantomenetelmät, joissa:

a) sisällytetään taumatiini I:n tai II:n ilmentämiseksi olennaisilta osiltaan optimoitu geeni ilmentymisvektoriin,

joka on valikoitu edellä mainittuja plasmideja vastaavista plasmideista, käyttämällä yleisiä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmiä;

b) transformoidaan rihmasienikanta edellä mainitulla ilmentymisvektorilla;

c) viljellään tällä tavalla transformoitua rihmasienikantaa sopivissa ravinneolosuhteissa tuottamaan taumatiini I:tä tai II:ta joko intrasellulaarisesti, ekstrasellulaarisesti tai molemmilla tavoilla samanaikaisesti, tai fuusioproteiinin taumatiini-glukoamylaasi muodossa;

d) tapauksesta riippuen taumatiini II erotetaan ja puhdistetaan yksin tai taumatiini II erotetaan viljelyelatusaineesta yhdessä sienimyseelin kanssa.

Näiden menetelmien edullisessa suoritustavassa rihmasieni on laji *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin* muunnos *awamori*.

Taumatiini II:n saamiseksi edullisia plasmideja ovat pThII-yhdistelmäplasmidit, joita voidaan saada kuvassa 6 havainnollistetulla ja esimerkeissä kuvatulla menetelmällä, josta voidaan tehdä seuraavanlainen yhteenveto: a) aloittamalla pTZ18RN(3/4)-plasmidilla saadaan olennaisilta osiltaan optimoidun, taumatiini II:ta koodaavan geenin DNA-sekvenssin fragmentti (3/4); b) tämä fragmentti liitetään pAN52-3-plasmidiin, jolloin muodostuu pTh(3/4)-plasmidi; c) aloittamalla pTZ18RN(1/2)-plasmidilla, saadaan olennaisilta osiltaan optimoidun, taumatiini II:ta koodaavan geenin DNA-sekvenssin jäljelle jäävä fragmentti (1/2); d) tämä fragmentti liitetään pTh(3/4)-plasmidiin, jolloin muodostuu pTh-plasmidi; e) DNA-fragmentti insertoidaan antamaan resistenttiys sulfaniiliamidille, Su^r, jolloin saadaan pThII-plasmidi (kuva 6). Tällä plasmidilla taumatiini II:ta saadaan enimmäkseen intrasellulaarisesti.

pThIII-plasmidit ovat edullisia taumatiini II:n tuottamiseen pohjimmiltaan ekstrasellulaarisella tavalla *Penicillium roquefortiissa*, joiden plasmidien valmistus kuvataan esimerkissä 2 ja esitetään pääpiirteittäin kuvassa 9. Sen valmistamiseen *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksessa käytetään esimerkissä 3 kuvattua menetelmää.

Taumatiini II:n tuottamiseen fuusioproteiinina glukoamylaasin kanssa voidaan käyttää pECThII- ja pThIX-plasmideja, joiden valmistus kuvataan esimerkeissä ja esitetään pääpiirteittäin kuvissa 12, 13A ja 13B.

Taumatiini I:n tuottamiseen käytetään yhdistelmäplasmideja, jotka on saatu noudattamalla samanlaisia menetelmiä kuin taumatiini II:n tuottamiseen on käytetty. Näin ollen esimerkiksi intrasellulaariseen tuotantoon *Penicillium roquefortiissa* käytetään pThI-plasmideja, jotka saadaan seuraavalla tavalla: a) aloittamalla pTZ18RN(1/2)-plasmidilla saadaan taumatiini II:ta koodaavan, olennaisilta osiltaan optimoidun geenisekvenssin fragmentti (1/2); b) tämä fragmentti liitetään pTZ18RN(3/4)-plasmidiin, joka on tehty lineaariseksi NcoI:llä, jolloin saadaan PTZ18RN(Th)-plasmidi; c) aloittamalla pTZ18RN(Th)-plasmidilla yksijuosteisessa muodossa ja käyttämällä kohdennetun mutageneesin tekniikoita taumatiini II:n synteettisen ja keinotekoisen geenin sekvenssille suoritetaan seuraavat muutokset, merkki → liittää korvatun (alkuperäisen) ja korvaavan (lopullisen) tässä järjestyksessä:

AAG → AAC (46-Lys → 46-Asn)
CGC → TCC (63-Arg → 63-Ser)
CGC → AAG (67-Arg → 67-Lys)
CAG → CGC (76-Gln → 76-Arg)
GAC → AAC (113-Asp → 113-Asn)

Tätä plasmidia kutsutaan plasmidiksi pTZ18RN(ThI); d) aloittamalla PTZ18RN(ThI)-plasmidilla saadaan taumatiini

I:tä koodaavan, olennaisilta osiltaan optimoidun geenin täydellisen sekvenssin DNA-fragmentti; e) tämä fragmentti liitetään pAN52-3-plasmidiin, jolloin saadaan pTh'-plasmidi; f) insertoidaan DNA-fragmentti, joka sisältää resistenssin sulfaniiliamidille, Su^R, jolloin saadaan pThI-plasmidi.

Keksinnön spesifisessä suoritustavassa plasmidit kopioidaan ja monistetaan *Escherichia colissa*.

Silloin kun rihmasieni on GRAS-tyyppiä, erityisen kiinnostavia ovat menetelmät taumatiini I:n tai II:n eristämiseksi yhdessä sienimyseelin kanssa. Näissä tapauksissa keksinnön kohteena on myös taumatiini I:n tai II:n ja tällä tavalla saadun sienimyseelin seosten käyttö parantamaan eläinruokien makeutta tai maittavuutta.

Kun on välttämätöntä saada puhdistettua taumatiini I:tä tai II:ta, ilmentymisvektorin on erityisen tärkeää olla plasmidi, joka sisältää myös erityssignaalisekvenssin DNA:ssa niin, että rihmasieni tuottaa taumatiini I:tä tai II:ta ekstrasellulaarisesti.

Joissain tapauksissa taumatiini I:n tai II:n tuotantoa voidaan kohottaa ottamalla käyttöön fuusioproteiini glukoamylaasin kanssa.

Keksinnön spesifisissä suoritustavoissa, kun käyttöön otetaan pThI- ja pThII-plasmidit, ekspressiokasetin promoottorisekvenssi voi olla peräisin mistä tahansa seuraavien rihmasienten entsyymien geenistä: glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi, β-glukoamylaasi, alkoholidehydrogenaasi, glukoamylaasi tai α-amylaasi. Sen lisäksi ekspressiokasetin lopetussekvenssi voi olla kyseistä promoottorisekvenssiä vastaava sekvenssi. Valintamarkkeri voi lopuksi olla tyyppiä, jota on resistenttiys oleomysiinille, hygromysiini B:lle, fleomysiinille tai asetamidille.

Kuten esimerkeissä esitetään, keksintö mahdollistaa taumatiini I:n tai II:n saamisen teollisuudelle tyydyttävillä fenotyypin ominaisuuksilla sekä korkealla tuottavuudella, mikä merkitsee huomattavaa etua tekniikan tasoon nähden.

Lisäksi taumatiinia voidaan sienen vaarattomuuden vuoksi antaa yhdessä myseelin kanssa, mikä säästää aikaa puhdistusprosessissa ja merkitsee sen vuoksi huomattavaa lisäetua etenkin eläinruoassa käytettäessä.

Seuraavat yksityiskohtaiset esimerkit valaisevat keksintöä olematta sitä rajoittavia. *Penicillium roquefortii* -sienen viljelmä, joka tuottaa esimerkissä 1 saatavaa taumatiini II:ta, on talletettu Valencian yliopiston tiedekunnan Facultad de Ciencias Biologicas osaston Departmento de Microbiologia talletuslaitokseen Spanish Collection of Standard Cultures (Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, CECT), numerolla CECT 2972.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuva 1: (A) Fragmentti, joka esittää kaupallisen pTZ18RN-plasmidin MCS:n sekvenssin osan 272-304.
(B) Edellisestä saadun pTZ18RN-plasmidin fragmentti, jossa esitetään sen ainoa restriktiokohta NcoI:lle.

Kuva 2: Suunnitelma, jota käytettiin synteettisen geenin kokoamiseksi kahdella oligonukleotidiparilla. Kummallakin oligonukleotidiparilla on komplementaarinen alue. A, B ja C tarkoittavat välttämättömiä restriktioentsyymejä oligonukleotidiparien kloonaamiseksi heti kun ne on pariutettu ja pidennetty pTZ18RN-vektorilla.

Kuva 3. Geenin kokoamiseen käytettyjen oligonukleotidien sekvenssit.

Kuva 4. Kaavakuva keinotekoisen ja synteettisen geenin (sekvenssi esitetty mustana) konstruoinnin eri vaiheista.

Kuva 5. Sangerin dideoksi-menetelmällä saadut geenin tyypilliset autoradiografit: (A) ensimmäiset 60 nukleotidia; (B) nukleotidit 70-170; (C) nukleotidit 330-370.

Kuva 6. Kaavakuva pThII-plasmidin saamiseksi suoritetuista käsittelyistä.

Kuva 7. Kahden transformoidun sienen, M0901 ja T0901, PCR-analyysin tulokset pThiII-plasmidiin ja transformoimattomaan kontrollisieneen verrattuna. Emästen lukumäärä x-akselilla on kahden yleisen vertailumarkkerin mukainen.

Kuva 8. Transformoitujen sienten kuvasta 7 immunoblottausanalyysin tulokset kaupalliseen taumatiini II:een (Sigma Inc.) ja transformoimattomaan kontrollisieneen (E= ekstrasellulaarinen proteiini; I= intrasellulaarinen proteiini) verrattuna. Y-akselilla olevat luvut vastaavat tunnetun molekyylipainon omaavia proteiinimarkkereita. Nuoli osoittaa kohdan, josta kaupallinen taumatiini (4) ja yhdistelmä-taumatiini (2, 3, 5 ja 6) siirtyvät.

Kuva 9: Kaavakuva pThIII-plasmidin saamiseksi suoritetuista käsittelyistä. Sulfaniiliamidiresistenssin (Su^R) geeniä vastaava sekvenssi esitetään tummana ristiviivoin varjostettuna alueena ja taumatiinin sekvenssi esitetään vaaleampana ristiviivoin varjostettuna alueena. Pystysuorin viivoin merkitty alue esittää eri sieniperäiset promoottori- ja lopetussekvenssit samoin kuin glukoamylaasigeenistä olevan 24 aminohappoa käsittävän "signaali"sekvenssin (kuvassa merkitty $SSGlaA_{24}$).

Kuva 10: A2 transformoidun sienen (taumatiinin erittäjä) PCR-analyysin tulokset. X-akselilla emästen lukumäärä on yleisten vertailumarkkereiden mukainen. Kaistat 1 ja 5

vastaavat markkereita, kaista 2 sisältää transformoimattoman sienen (kontrollin) DNA:ta ja kaista 3 sisältää DNA:ta sienestä a2. Kaista 4 on positiivinen kontrolli (DNA:ta plasmidista pThIII).

Kuva 11. Transformoitujen sienten T0901 ja a2 immunoblottaus-analyysin tulokset. Kaista 1 sisältää kaupallista taumatiinia yhtiöltä Sigma Inc. Kaista 7 vastaa tunnetun molekyylipainon omaavia proteiinimarkkereita (kunkin proteiinin molekyylipaino osoitetaan kunkin kaistan vieressä). Kaista 2 sisältää viljelyelatusainetta, jossa kasvatettiin T09011-sientä, joka on intrasellulaarisen taumatiinin tuottaja. Kaistat 3 ja 4 sisältävät viljelyalustan, jossa a2-sientä (ekstrasellulaarinen tuottaja) ja transformoimatonta sientä (kontrollia) kasvatettiin. Kaistat 5 ja 6 sisältävät myseeliä vastaavasti näistä kahdesta sienestä.

Kuva 12: Kaavakuva pECThII-plasmidin saamiseksi suoritetuista käsittelyistä. Tumma ristiviivoin varjostettu alue kuvaa taumatiini II:n synteettistä geeniä.

Kuvat 13A ja 13B: Kaavakuva pThIX-plasmidin saamiseksi suoritetuista käsittelyistä. Tumma ristiviivoin varjostettu alue on *Aspergillus nigerin* tai *Aspergillus niger* var. *awamorin* glukoamylaasin (glaA) sekvenssi. Aaltoviiva-alue kuvaa *Escherichia colin* glutationi-S-transferaasin sekvenssiä. Taumatiini II:ta koodaava synteettinen geeni ilmenee vaaleamman harmaana ristiviivoin varjostettuna alueena ja spacer-sekvenssi sijaitsee taumatiini- ja glukoamylaasi-geenien välissä poikkiviivoin merkityllä alueella.

Kuva 14: Glukoamylaasin ja taumatiinin välisen fuusioalueen sekvenssien yksityiskohdat.

ESIMERKIT

Esimerkki I: Taumatiini II:n intrasellulaarinen tuotanto *Penicillium roquefortiissa.*

(1.1) Taumatiini II:ta koodaavan synteettisen, keinotekoisen ja täysin optimoidun geenin konstruointi.

(1.1.1) Taumatiini II:n DNA-sekvenssin optimointi.

Aloittamalla sekvensseillä, joilla on kirjallisuudessa tunnetut aminohapot ja nukleotidit taumatiini II:lle ja vastaavalle luontaiselle geenille (vertaa esim. EP 54.330), joka on esitetty uudelleen sekvenssissä ID NO:1, suunniteltiin sekvenssin ID NO:3 optimoitu DNA-sekvenssi, joka koodaa samaa proteiinia ja jossa n = 3 (sillä on 3 TAA-lopetuskodonia). Sekvenssin ID NO:3 optimoitu sekvenssi saatiin suorittamalla suurin mahdollinen määrä muutoksia sekvenssin ID NO:1 kodoneille korvaamalla alkuperäiset kodonit seuraavassa aminohappolistassa sulkeissa osoitetuilla kodoneilla silloin kun jälkimmäinen poikkesi alkuperäisestä:

Ala (GCC), Arg (CGC), Asn (AAC), Asp (GAC), Cys (TGC), Lys (AAG), Gln (CAG), Glu (GAG), Gly (GGC), Ile (ATC), Leu (CTC), Met (ATG), Phe (TTC), Pro (CCC), Ser (TCC), Thr (ACC), Trp (TGG), Tyr (TAC), Val (GTC).

(1.1.2) pTZ18RN-yhdistelmäplasmidin konstruointi käyttämällä kohdennettua mutageneesiä

Ennen aloitusta taumatiini II:n synteettisen geenin ja yhden NcoI:n restriktiokohdan kokoonpano insertoitiin monitoimintaisen pTZ18R-plasmidin (Pharmacia Inc.) monikloonauskohtaan (MCS). Tällä tavalla muodostettiin pTZ18RN-plasmidi ("N" tulee NcoI:stä), jonka restriktiokohta esitetään kuvassa 1. NcoI:n restriktiokohdan insertio suoritettiin käyttämällä alla kuvattua kohdennetun mutageneesin tekniikkaa:

Oligonukleotidi p115 (5'-ACCCGGGGATCCTCTCCATGGGACCTGCAGG-CATGCA-3') hankittiin yhtiöltä Ingenasa S.A. (Madrid, Espanja). Tämä oligonukleotidi leimattiin 5'-päässä siirtämällä ^{32}P [gamma-^{32}P]ATP:stä polynukleotidikinaasilla käyttäen yleisiä menetelmiä (Maniatis et al., "Molecular cloning, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). pTZ18R, jonka DNA oli yksijuosteisessa muodossa, saatiin yleisillä menetelmillä ja hybridisoitiin yhden pikomoolin kanssa 5'-päässä ^{32}P:llä leimattua oligonukleotidia, puskurissa, joka sisälsi 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl ja 20 mM $MgCl_2$ (lopullinen tilavuus 5 µl). Seosta inkuboitiin 65 °C:ssa viiden minuutin ajan ja sen annettiin hitaasti jäähtyä (yli yön) huoneenlämpötilaan. Seuraavia entsyymejä ja reagensseja lisättiin sitten 5 µl:aan tätä seosta: 1,5 µl B 10X -liuosta (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT:tä); 1 µl 10 mM ATP:-tä; 4 µl seosta, joka sisälsi 2,5 mM kutakin neljästä dNTP:stä (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); 6,5 µl vettä; 1 µl T4-DNA-polymeraasia (3 yksikköä/µl); ja 1 µl DNA-ligaasia (6 yksikköä/µl). Reaktioita inkuboitiin 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa ja ajan loppupuolella lisättiin 1 µl T4-DNA-polymeraasia (3 yksikköä) ja 1 µl DNA-ligaasia (6 yksikköä). Reaktioita jatkettiin vielä 60 minuuttia 37 °C:ssa.

Jokaisesta reaktiosta käytettiin 1 µl:n erä transformoimaan *E. coli* -kanta JM103. Monia eri LB/ampisilliini (100 µg/ml) -maljoilla kasvatettuja pesäkkeitä maljattiin uudelleen maljoille, joissa oli uusi elatusaine, ja analysoitiin (LB= Luria-liemi, viljelyelatusaine, jolla on seuraava koostumus: 1 % bacto-tryptonia, 0,05 % hiivauutetta, 170 mM NaCl, pH 7,0). Jotta halutun mutaation sisältävät kloonit voitiin identifioida, pesäkkeet analysoitiin käyttämällä [gamma-^{32}P]ATP:llä leimattua p115-oligonukleotidia koettimena, kuten jäljempänä on kuvattu.

Ehdokaspesäkkeet maljattiin uudelleen nitroselluloosasuotimille (Schleicher & Schüll). Suodattimet pantiin LB/amp-maljoille ja niitä inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä solut hajotettiin pesemällä suodattimia peräkkäin kolmessa liuoksessa:

- viisi minuuttia 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl;
- viisi minuuttia 1 M Tris-HCl, pH 7,5;
- viisi minuuttia 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl.

Sen jälkeen suodattimia kuivatettiin 80 °C:ssa 90 minuuttia. Heti kun suodattimet olivat kuivia, niitä pestiin kolme kertaa 3X SSC:ssä, 0,1 % SDS:ää, esihybridisaatio tapahtui liuoksessa, joka sisälsi 6X SSC:tä, 5X Denhardtin liuosta, 0,05 % natriumpyrofosfaattia, 100 µg/ml keitettyä lohen maidin DNA:ta ja 0,5 % SDS:ää. Suodattimia esihybridisoitiin yhden tunnin ajan 37 °C:ssa. Hybridisaatio tapahtui yli yön 50 ml:ssa samaa liuosta, johon lisättiin 33 ng merkittyä p115-koetinta. Hybridisaatiolämpötila oli 50 °C. Seuraavana päivänä suodattimia pestiin seuraavasti:

- Ensimmäinen pesu: 15 minuuttia 2X SSC:tä, 0,1 % SDS:ää, huoneenlämpötilassa.
- Toinen pesu: samat olosuhteet, mutta 55 °C:ssa.
- Kolmas pesu: samat olosuhteet, mutta 65 °C:ssa.
- Neljäs pesu: 15 minuuttia 0,4X SSC:ssä, 0,1 % SDS:ää, 65 °C:ssa.

Neljännen pesun jälkeen suodattimia altistettiin röntgensädefilmille 2 tunnin ajan -20 °C:ssa. Monia eri pesäkkeitä, joiden DNA:t osoittivat ilmeistä hybridisoitumista koettimeen 115, identifioitiin ja kustakin uutettiin DNA:ta.

Kloonien lopullinen tunnistus varmistettiin testaamalla voitiinko DNA:ta pilkkoa NcoI:llä vai ei ja analysoimalla sen sekvenssi. Plasmidia, joka sisälsi NcoI-restriktiokoh-

dan BamHI- ja PstI-kohtien välissä (kuva 1), kutsuttiin pTZ18RN-plasmidiksi ja sitä käytettiin lähtövektorina keinotekoisen, synteettisen ja täysin optimoidun taumatiini II:n geenin konstruoimisessa.

(1.1.3) Taumatiini II:ta koodaavan synteettisen geenin rakentamissuunnitelma

Kuvassa 2 esitetään valittu menetelmä taumatiini II:n synteettisen geenin kokoamiseksi. Kahdeksan pitkää oligonukleotidia, joiden sekvenssit esitetään kuvassa 3, saatiin yhtiöltä Isogen Bioscience, Inc. (Alankomaat). Yksijuosteiset pareina esiintyvät oligonukleotidit voidaan pariuttaa sekvenssien komplementaarisen luonteen vuoksi. Ne nimettiin seuraavasti: 1a, 1b; 2a, 2b; 3a, 3b; ja 4a, 4b. Pariuttamisen jälkeen yksijuosteiset alueet täytettiin modifioidulla T7-DNA-polymeraasilla (Myös Taq-DNA-polymeraasia voidaan käyttää). Tuloksena saadut kaksijuosteiset fragmentit pilkottiin sopivilla restriktioentsyymeillä kohesiivisten päiden tai tylppien päiden saamiseksi ja liitettiin haluttuun vektoriin.

Kuva 4 esittää toimintatavan, jota käytettiin synteettisen geenin rakentamiseen 2 fragmentissa, jotka sitten liitettiin yhteen ilmentymisvektoriin.

(1.1.3.1) Synteettisen geenin, jolla on sekvenssi ID NO:3 (n = 3), 332 ensimmäisen emäsparin kokoaminen

Aikaisessa vaiheessa oligonukleotidit 1a, 1b, 2a ja 2b liitettiin yhteen 332 emäsparin DNA-fragmentin saamiseksi, joka voitiin insertoida pTZ18RN-plasmidiin.

Yksi mikrogramma oligonukleotidi 1a:ta ja 1 µg 1b:tä sekoitettiin puskuriliuoksessa, joka sisälsi 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT:tä, 50 mM NaCl ja 50 µg/ml naudan seerumin albumiinia (BSA). Seosta (17 µl) kuumen-

nettiin 5 minuutin ajan 70 °C:ssa ja jäähdytettiin sitten hitaasti 65 °C:seen noin kymmenen minuutin ajan (sopiva lämpötila oligonukleotidiparien hybridisointiin). Sen jälkeen lisättiin 2 µl neljän deoksinukleotidin seosta (2,5 mM kutakin dNTP:tä) ja 1 µl modifioitua T7-DNA-polymeraasientsyymiä (Sequenase-tavaramerkki yhtiöltä U.S. Biochemical Corp.), jolloin saatiin 20 µl:n lopullinen tilavuus. Reaktiot tapahtuivat 30 minuutin aikana 37 °C:ssa, jota seurasi lisäksi 10 minuuttia 70 °C:ssa (Sequenasen inaktivoimiseksi). Reaktiotuotteita pilkottiin BamHI:lla ja BglII:lla 37 °:ssa 3 tunnin ajan. DNA:ille suoritettiin seuraavat uutot: kerran fenolilla, kerran fenoli:kloroformilla ja kerran kloroformilla; sitten ne saostettiin etanolilla. Lopuksi ne pakastettiin TE-puskuriin -20 °C:seen myöhempää käyttöä varten.

2a- ja 2b-oligonukleotidit käsiteltiin samalla tavalla paitsi että lopputuotteita pilkottiin BglII:lla ja NcoI:llä.

Plasmidia pTZ18RN pilkottiin peräkkäin BamHI:lla ja NcoI:llä ja defosforyloitiin vasikan suolen fosfataasilla (CIP). Linearisoitu 2871 emäsparin fragmentti otettiin talteen 0,8%:isesta agaroosigeelistä ja puhdistettiin sen jälkeen.

Reaktioiden 1 ja 2 tuotteet liitettiin sitten yhteen linearisoidun pTZ18RN-plasmidin kanssa ja seosta käytettiin transformoimaan *E. coli* -kanta NM522. Insertin sisältävien kloonien tunnistamiseen käytettiin valkoinen/sininen-indikaattoritestiä, joka toimii pohjimmiltaan seuraavalla tavalla:

pTZ18R-plasmidi ja sen johdannainen pTZ18RN sisältävät bakteerigeenin LacZ'. Sen vuoksi tämän plasmidin sisältävät bakteeripesäkkeet ovat sinisiä LB/ampisilliini-mal-

joilla, jotka sisältävät myös kromogeenistä substraattia 5-bromi-4-kloori-3-indo-β-D-galaktoosia (X-gal). Kun vierasta DNA:ta oleva fragmentti insertoidaan pTZ18RN-plasmidin monikloonauskohtaan (MCS), LacZ'-geeni deaktivoituu, ja tuloksena saadut pesäkkeet ovat valkoisia eivätkä sinisiä. Sen vuoksi aluksi eristettiin valkoiset pesäkkeet otaksuen, että ne mahdollisesti sisältäisivät eri fragmentteja taumatiini II:n synteettisestä geenistä.

Monet eri pesäkkeet sopivan kokoisilla inserteillä sisälsivät taumatiini II:n synteettisen geenin 325 emäsparin täydelliset fragmentit. Tuloksena saatua plasmidia kutsuttiin plasmidiksi pTZ18RN(1/2).

(1.1.3.2) Toisen synteettisen geenin, jolla on sekvenssi ID NO:3 (n = 3), 305 emäsparin kokoaminen

Tässä tapauksessa käyttöön otettiin vaihtoehtoinen lähestymistapa, jossa käytettiin Taq-DNA-polymeraasia ja PCR-tekniikkaa.

Ennen sulkemisvaihetta 3b- ja 4a-nukleotidit merkittiin 5'-päissä fosfaattiryhmällä yleisiä menetelmiä käyttäen; 5'-fosfaattiryhmät saatiin näin liittämään yhteen tylpät päät. Oligonukleotidit nimettiin 3b*:ksi ja 4a*:ksi.

Yhtä mikrogrammaa 3a:ta ja 1 µg 3b*:tä inkuboitiin reaktioseoksessa (18 µl), joka sisälsi 10 mM Tris-HCl:ää, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ ja 0,1 mg/ml gelatiinia. Näytteitä inkuboitiin 5 minuutin ajan 70 °:ssa ja vielä 5 minuutin ajan 65 °C:ssa. Tässä vaiheessa lisättiin kutakin dNTP:tä (G, A, T, C) lopulliseen konsentraatioon 2 mM ja 2,5 yksikköä Ampli-Taq-DNA-polymeraasia (Perkin-Elmer Cetus). PCR:t olivat seuraavanlaisia: 1 minuutti 94 °C:ssa; 1 minuutti 55°C:ssa; ja 1 minuutti 72 °C:ssa 30 sykliä, jota seurasi lopullinen pidentäminen 72 °C:ssa 5 minuutin ajan. Sen jälkeen näytteitä uutettiin fenoli:kloroformilla

ja resuspendoitiin 10 µl:aan TE-puskuria sekä inkuboitiin NcoI:n kanssa 37 °C:ssa 3 tunnin ajan. Uuton ja etanolisaostuksen jälkeen DNA:t liuotettiin TE-puskuriin ja jäädytettiin -20 °C:seen myöhempää käyttöä varten.

4a*- ja 4b-oligonukleotidit käsiteltiin kuten edellä on kuvattu, paitsi että lopputuotteita pilkottiin PstI:llä.

Kolmen fragmentin liittäminen suoritettiin samalla menetelmällä kuin edellä, paitsi että käytettiin pTZ18RN:ää, jota pilkottiin NcoI:llä ja PstI:llä, käsiteltiin vasikan suolen fosfataasilla ja lopuksi puhdistettiin agaroosigeelistä. Liittämisreaktiot sisälsivät 15 % polyetyleeniglykolia (PEG), joka stimuloi ligaatioita tylpillä päillä. Ligaatiotuotteita käytettiin transformoimaan *E. coli* NM 522. Rekombinanttien valkoinen/sininen-valinta tehtiin uudelleen LB/amp-elatusainemaljoilla, joihin oli lisätty X-galia ja IPTG:tä. Transformanttien analysoinnin jälkeen eristettiin yksi klooni, joka sisälsi 305 pb fragmentin taumatiini II -geenin toisesta osasta. Tätä plasmidia kutsuttiin pTZ18RN(3/4)-plasmidiksi.

(1.1.3.3) Sekvenssianalyysi

Synteettisen geenin tunnistus varmistettiin analysoimalla sen sekvenssi Sangerin menetelmää käyttäen (Sanger, F., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1977, vol. 74, s. 5463-67). Käytettiin sekvensointipakkausta (versio 2,0) yhtiöltä United States Biochemical Corp. Synteettisen geenin sekvenssi määritettiin ilman epäselvyyttä: (1) sekvensoimalla kaksi geenijuostetta; ja (2) suorittamalla rinnakkaiset sekvensointireaktiot dITP:llä destabiloimaan mahdolliset sekundaarirakenteet, joita saattaisi muodostua GC-runsaille alueille. Vastaavat autoradiografit esitetään kuvassa 5.

(1.2) Geenin insertio rihmasienten ilmentymisvektoriin (kuva 6)

Tässä esimerkissä pAN52-3-plasmidi (kuvattu artikkelissa Punt, P.J., et al., Journal of Biotechnology, 1990, vol. 17, s. 19-34; kutsutaan jäljempänä "aloitusplasmidiksi") oli aloitusplasmidi sellaisen ilmentymisvektorin konstruoimiseksi rihmasienissä (pTHII), jota käytettiin transformoimaan *Penicillium roquefortii*. Synteettisen geenin liittäminen tähän aloitusplasmidiin tehtiin kolmessa vaiheessa, jotka kuvataan jäljempänä.

(1.2.1) 3/4-Fragmentin liittäminen

Kolmekymmentä mikrogrammaa pTZ18RN(3/4)-plasmidia pilkottiin peräkkäin NcoI:llä ja HindIII:lla, jolloin saatiin 2 fragmenttia. Pieni 310 pb:n fragmentti, joka sisälsi synteettisen geenin toisen osan, puhdistettiin 2%:isessa agaroosigeelissä. Samaan aikaan 5 µg aloitusplasmidia tarkastettiin peräkkäin NcoI:llä ja HindIII:lla. Tämän jälkeen sitä käsiteltiin alkalisella fosfafataasilla ja 5,8 kb:n fragmentti eristettiin 0,8%:isessa agaroosissa. Sitten aloitusplasmidi, joka oli pilkottu NcoI:llä ja HindIII:lla fosfatoitu ja puhdistettu, liitettiin pTZ18RN(3/4):stä peräisin olevan 310 pb:n fragmentin kanssa. Seosta käytettiin transformoimaan *E. coli* DH5αF', kuten kuvassa 6 pääpiirteittäin esitetään. Halutun konstruktion sisältävät kloonit identifioitiin pilkkomalla pTh(3/4)-yhdistelmäplasmidit NcoI:llä ja HindIII:lla.

(1.2.2) 1/2-Fragmentin liittäminen

Toisessa vaiheessa pTZ18RN(1/2)-plasmidi pilkottiin NcoI:llä ja ensimmäisen geenin osan sisältävä fragmentti, jossa oli NcoI-NcoI, puhdistettiin 4%:isessa agaroosigeelissä. pTh(3/4)-plasmidi linearisoitiin NcoI:llä ja käsiteltiin alkalisella fosfataasilla. Sitten se liitettiin

pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin olevan NcoI-NcoI-fragmentin kanssa. Tuloksena saatua plasmidia kutsuttiin plasmidiksi pTh.

Kloonien analysoimiseksi pTh-plasmidi pilkottiin, jolloin saatiin BalI ja HindIII. Sopivassa orientaatiossa olevissa klooneissa saatiin 625 bp:n fragmentti, kun taas epäsopivan orientaation omaavat tuottivat 300 bp:n fragmentin.

(1.2.3) Liittäminen sieniperäisellä markkerilla

Sitten pTh-plasmidi pilkottiin EcoRI:llä ja 5'-päät täytettiin polymeraasi I:stä peräisin olevalla Klenowin fragmentilla. Näin käsitelty fragmentti puhdistettiin sitten 0,8%:isessa agaroosissa.

Aloittamalla pEcoliR388-plasmidilla (N Datta, Saint Mary's Hospital, Lontoo), saatiin sulfaniiliamidille resistenssi sekvenssi ja konstruktio tehtiin poistamalla prokaryootin promoottori ja terminaattori; rakennegeeni pantiin sen jälkeen rihmasienistä (TrpC) peräisin olevien promoottorin ja terminaattorin säätelyn alaiseksi. Tällä tavalla saatu resistenssisekvenssi pilkottiin SmaI:llä ja XbaI:llä; 5'-päät täytettiin Klenowilla ja dNTP:llä ja 1,75 kb:n fragmentti eristettiin 4%:isessa akryyliamidissa. Sitten näin saatu fragmentti liitettiin yhteen pTh:n kanssa ja transformaatio suoritettiin *E. coli* -kannassa DH1. Tuloksena saatua plasmidia kutsuttiin pThII:ksi. Tämä plasmidi sisältää: (i) synteettisen geenin, joka koodaa taumatiini II:ta sieniperäisen promoottorin säätelyn alaisena, ja (ii) sulfaniiliamidiresistenssimarkkerin. Plasmidin lopullinen tunnistus varmistettiin sekvensoinnilla, kuten kappaleessa 1.3.3 on kuvattu.

(1.3) *Penicillium roquefortiin* transformointi ennen mainitulla sieniperäisellä ilmentymisvektorilla

(1.3.1) Protoplastin valmistus

Transformaatiokokeissa käytetyt *Penicillium roquefortiin* protoplastit valmistettiin seuraavan menetelmän mukaisesti aloittamalla kannalla MUCL 29148. Sen konidioita siirrostettiin 50 ml:aan nestemäistä MSDPM-elatusainetta (myseelin tuottamiseen puoliksi määritelty elatusaine, jonka koostumus kuvataan jäljempänä). Viljelmää inkuboitiin 44 tunnin ajan 28 °C:ssa mekaanisessa sekoittimessa 270 rpm:llä. Myseeli otettiin talteen suodattamalla, pestiin steriilillä vedellä ja resuspendoitiin 1,2 M KCl-liuokseen, joka sisälsi 40 mg Lysin Enzyme -valmistetta (Sigma) grammassa myseeliä. Protoplastit saatiin 4 tunnin inkuboinnin 28 °C:ssa jälkeen kohtuullisella sekoitusnopeudella. Solujäännös poistettiin lasivillasuodatuksella. Protoplastisuspensio pestiin ja sentrifugoitiin (2000 rpm, 10 min) kahdesti 1,2 M KCl-liuoksella (10 ml/g). Lopuksi protoplastit resuspendoitiin 1,2 M KCl-liuokseen (1 ml/g). Tätä protoplastisuspensiota (10^7-10^8 prot/ml) käytettiin transformaatiokokeisiin.

(1.3.2) Transformaatio

Protoplastit sentrifugoitiin (2000 rpm, 10 min) ja resuspendoitiin (5 x 10^8 protoplastia/ml) sitten I-liuokseen: 1,2 M KCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM $CaCl_2$ ja 20 % II-liuosta (katso jäljempänä). Niitä inkuboitiin 10 minuutin ajan 28 °C:ssa. 0,1 ml:n erät sekoitettiin ilmentymisplasmidista olevan, taumatiini II:n geenin sisältävän DNA:n (10 µg) kanssa. Välittömästi sen jälkeen lisättiin 2 ml II-liuosta [1,2 M KCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM $CaCl_2$ ja 30 % PEG 6000]. Tätä seosta inkuboitiin 5 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen kun protoplastit oli otettu talteen sentrifugoimalla (2000 rpm, 10 min), ne

resuspendoitiin 1 ml:aan 1,2 M KCl-liuosta. Lopuksi tällä tavalla käsitellyt protoplastierät maljattiin uudelleen petrimaljoille, jotka sisälsivät sopivaa elatusainetta soluseinän uudelleenmuodostamiseen ja sen jälkeen tapahtuvaan valintaan sulfaniiliamidia (750 µg/ml) käyttämällä. Tätä transformaatiomenetelmää käyttämällä eristettiin monia eri sulfaniiliamidille resistenttejä kantoja. Nämä kannat analysoitiin sen varmistamiseksi, oliko taumatiini II:n synteettinen geeni liittynyt niiden genomiin.

(1.4) Transformanttien analysointi

(1.4.1) PCR-analyysi

Edellä kuvatulla tavalla saatujen transformanttien analysointi taumatiini II:n synteettisen geenin DNA-sekvenssien ja sulfaniiliamidiresistenssin toteamiseksi suoritettiin käyttämällä yleisiä PCR-tekniikoita sopivilla oligonukleotideilla. Erityisesti käytettiin T1- ja T2-oligonukleotideja, joiden sekvenssit sisältyvät kappaleeseen (1.4.1.2). T1 on komplementaarinen taumatiini II:n synteettisen geenin ylävirtaan sijaitseville nukleotideille 605-624, kun taas T2 on komplementaarinen alavirtaan oleville nukleotideille 21-46. Näillä kahdella oligonukleotidilla oli sen vuoksi mahdollista monistaa 604 emäsparin fragmentti, joka vastaa taumatiini II:n synteettisen geenin oligonukleotideja 21-624.

Kuva 7 esittää tulosten onnistumisen osoittamalla sen, että transformoimattomassa sienessä (kontrollissa) ei ilmene synteettistä geeniä vastaavaa kokoa (kaista 2), kun taas kahdessa transformoidussa geenissä (M0901 ja T0901) vyöhykkeet ilmenevät samalla emästen lukumäärällä kuin se vyöhyke, joka vastaa pThII-plasmidiin insertoitua synteettistä geeniä (kaistat 3-5).

(1.4.1.1) Nukleiinihappojen uutto

Lähtöaineena oli 5 g myseeliä, joka oli tyhjösuodatettu käyttämällä Büchnerin suppiloa ja joka oli peräisin 5 päivän ikäisestä MSDPM-viljelmästä (0,6 % $NaNO_3$; 0,052 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,052 KCl; 1 % glukoosia; 0,5 % hiivauutetta; 0,5 % kasaminohappoja; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ vähäisiä määriä; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ vähäisiä määriä).

Myseeli jauhettiin nestemäisessä typessä posliinihuhmarella. Myseeli resuspendoitiin uuttopuskuriin (10 mM Hepesiä, pH 6,9; 0,3 M sakkaroosia; 20 mM EDTA:ta, pH 8,0; 0,5 % SDS:ää) suhteessa 10 ml puskuria myseeligrammaa kohti. Sitä inkuboitiin 15 minuutin ajan 65 °C:ssa ja sentrifugoitiin 5 minuuttia kierrosnopeudella 7000 rpm (Beckman JA20 -roottori) huoneenlämpötilassa solujäännöksen poistamiseksi; supernatantti otettiin talteen ja käsiteltiin kahdesti fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholi- (49:49:2) -seoksella proteiinien eliminoimiseksi. Vesifaasi saostettiin 0,3 M natriumasetaatilla ja 2,5 tilavuusosalla etanolia 20 minuutin ajan -20 °C:ssa. Saostunutta osaa sentrifugoitiin kierrosnopeudella 7000 rpm 20 minuutin ajan. Sakka resuspendoitiin 1 ml:aan TE-puskuria, pH 8,0.

(1.4.1.2) PCR-reaktioseos

Sadan mikrolitran kokonaistilavuudessa sekoitettiin 20 ng DNA:ta ja 10 µl PEC 10X -puskuria (500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,01 % porsaan gelatiinia; dNTP-molekyylien seos, jossa kutakin on 200 µM konsentraationa; 2,5 yksikköä Amplitaqia ja 1 µM aluketta). Käytetyt synteettiset oligonukleotidit olivat T1 (26 nukleotidia) ja T2 (20 nukleotidia) sekä taumatiini II:n synteettisen geenin alkuun ja loppuun spesifiset alukkeet.

T1: 5'-CCGCTGCTCCTACACCGTCTGGGCCG-3'

T2: 5'-TTAGGCGGTGGGGCAGAAGG-3'

Seokseen lisättiin 20 µl mineraaliöljyä estämään näytettä haihtumasta.

(1.4.1.3) PCR

Näyte läpikävi syklin 94 °C:ssa 5 minuutin ajan kahden DNA-juosteen erottamiseksi. Sen jälkeen ajettiin 30 ketjureaktiota: ensin DNA:ta denaturoitiin 1 minuutin ajan 94 °C:ssa; lämpötila alennettiin 55 °C:seen 30 sekunniksi spesifisten alukkeiden yhteenliittymiseksi denaturoidun DNA-juosteen kanssa; sitten lämpötila kohotettiin jälleen 72 °C:seen 1 minuutiksi uuden juosteen (muodostumassa) pidentymiseksi. Kun kaikki syklit oli ajettu loppuun, suoritettiin lopullinen pidennys 5 minuutin ajan 72 °C:ssa. Kunkin PCR:n tuotteet analysoitiin 0,8%:isessa agaroosigeelissä (kuva 7). Tätä menetelmää käyttämällä identifioitiin kaksi kantaa, joita kutsuttiin M0901:ksi ja T0901:ksi, joiden genomit sisälsivät taumatiini II:n synteettisen geenin.

(1.4.2) Immunoblottaus-toteaminen (Western-Blot)

Kun transformantit, jotka olivat sisällyttäneet itseensä taumatiini II:n geenin, oli todettu oikein, ilmentymiselle suoritettiin proteiinin identifioimiseksi Western Blot -analyysi (Burnette W.N., Analytical Biochemistry, 1981, vol. 112, s. 195-203) käyttämällä polyklonaalisia vasta-aineita, jotka oli aiemmin saatu yleisillä kanin immunisointitekniikoilla. Kustakin kanista saatu seerumi saostettiin ammoniumsulfaatilla yleisiä menetelmiä käyttäen immunoglobuliinien saostumiseksi, jolloin saatiin IgG-vasta-aineilla rikastunut proteiinifraktio. Kuva 8 esittää saatujen tulosten seuraukset osoittaen, että transformoimattomassa sienessä (kontrollissa) ei ilmene taumatiini II:ta vastaavaa kokoa olevia vyöhykkeitä, kun taas kaksi transformoidun sienen vyöhykettä ilmenevät samoilla molekyylipainoilla kuin kaupallinen taumatiini II.

(1.4.2.1) Näytteiden valmistus

Lähtöaineena oli 2 g myseeliä, joka oli tyhjösuodatettu käyttämällä Büchnerin suppiloa ja joka oli peräisin 5 päivän ikäisestä viljelystä 28 °C:ssa MSDPM-elatusaineessa. Sekä suppiloon jäänyt myseeli (kiinteä fraktio) että viljelyelatusaine (nestemäinen fraktio) analysoitiin.

Kiinteä fraktio

Suppiloon jääneeseen myseeliin lisättiin 10 ml sonikointiliuosta (625 mM Tris-HCl, pH 6,5, 1 mM PMSF:ää, 5 % β-merkaptoetanolia) myseeligrammaa kohti. Myseeliä sonikoitiin 1 minuutin ajan 1 sekunnin pulsseilla (s.o. 1 sekunti sonikointia, 1 sekunti ei-sonikointia, ja niin edelleen). Käsittely toistettiin vielä kolme kertaa 3-5 minuutin välein. Sitä sentrifugoitiin kierrosnopeudella 7500 rpm (Beckman JA20 -roottori) 20 minuutin ajan 4 °C:ssa.

Nestemäinen fraktio

β-Merkaptoetanolia (lopullinen konsentraatio 5 %) ja PMSF:ää (lopullinen konsentraatio 1 mM) lisättiin 3 ml:aan ekstrasellulaarista väliainetta. Molemmista fraktioista käytettiin 3 ml aloitukseen ja konsentroitiin pylvässentrifugoinnilla (Bio-Rad-ultrasuodattimet), jotka pidättivät proteiinit, joiden molekyylipaino oli yli 10 000 daltonia. Tässä käsittelyssä 3 ml kolonnit läpäisevää ainetta väheni 200 µl:ksi.

Kahteenkymmeneen mikrolitraan konsentroituja liuoksia lisättiin 20 µl 2 x näytepuskuria (25 % glyserolia; 2,5 % SDS:ää, 0,25 M Tris-HCl, pH 7,0; 10 mM EDTA:ta, pH 8,0; 0,002 % bromifenolisinistä). Niitä keitettiin 5 minuutin ajan ja pantiin välittömästi proteiineja denaturoivaan geeliin (SDS-polyakryyliamidi).

Käytetyt proteiinigeelit olivat 14%:isesti polyakryyliamidia ja 18%:isesti ureaa. Elektroforeesi ajettiin 150 voltilla ja pysäytettiin, kun näyterintama oli 3 tai 5 mm:n päässä geelin lopusta.

(1.4.2.2) Siirto nitroselluloosalle

Kun elektroforeesi oli saatettu loppuun ja kerääntynyt osa (piled-up part) oli poistettu, geeli siirrettiin nitroselluloosapaperille (NC). Tämän tekemiseen käytettiin Bio-Rad Trans-blot SD Semidry Unit -yksikköä. Siirto kesti 30 minuuttia 15 voltilla.

Sitten kun vyöhykkeet oli siirretty NC-paperille, paperi jätettiin estoliuokseen (blocking solution) (3 % BSA:ta; 0,01 % natriumatsidia; 0,05 % Tween-20:ta TBS:ssä; TBS= 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) ja sekoitettiin yli yön. Tämän menettelyn jälkeen NC-paperia käsiteltiin seuraavalla tavalla.

NC-paperi otettiin suojaliuoksesta, pestiin TBS:llä ja sitä inkuboitiin seerumin kanssa; immuuni-IgG-fraktiota (0,37 mg/ml) oli laimennettu (1:500) estoliuoksessa (natriumatsidilla). Negatiivisena kontrollina käytettiin tavallista esi-immuuni-IgG-fraktiota (0,35 mg/ml), jota oli laimennettu (1:500) estoliuoksessa (natriumatsidilla). Liuosta sekoitettiin ja inkuboitiin 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa.

TBS-Tweenissä (TBS 1X + Tween-20, 0,05 %) tehtiin kolme 10 minuutin pesua. Sitä sekoitettiin ja inkuboitiin 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa sekundaarivasta-aineen kanssa: anti-kani-IgG-alkalinen fosfataasi -konjugaatti, jota oli laimennettu (1:500) estoliuoksessa (ilman natriumatsidia). TBS-Tweenissä tehtiin kolme 10 minuutin pesua.

Suoritettiin alkalinen fosfataasi -reaktio: a) NC tasapainotettiin alkalisella fosfataasipuskurilla (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$); b) NC pantiin kehitysreaktioseokseen (15 ml alkalista fosfataasi-puskuria, 66 µl nitro blue tetratsodiumia (NBT) (75 mg/ml 70%:isessa dimetyyliformamidissa), 99 µl 5-bromi-4-kloori-3-indoli-fosfaattia (BCIP) (25 mg/ml 100%:isessa dimetyyliformamidissa) kunnes vyöhykkeet mustuivat; c) reaktio pysäytettiin alkalisella fosfaattipysäytysliuoksella (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 ja 20 mM EDTA:ta, pH 8,0).

(1.4.2.3) Proteiinin geelivärjäys

Geelejä värjättiin tunnin ajan värjäysliuoksella ja sekoitettiin kevyesti (25 % etanolia; 10 % etikkahappoa; 0,1 % Coomassie-sinistä). Väri poistettiin niistä värinpoistoliuoksella (25 % metanolia; 7,5 % etikkahappoa), kunnes sininen väri hävisi geeliaineesta.

Esimerkki 2: Taumatiinin ekstrasellulaarinen tuotanto *Penicillium roquefortiissa*

Taumatiinin ekstrasellulaarista tuotantoa varten *Penicillium roquefortii* transformoitiin pThIII-plasmidilla, joka rakennettiin kuten jäljempänä on kuvattu ja kuvassa 9 pääpiirteittäin esitetty.

Edellä kuvattu (kappale 1.2.3) pThII-plasmidi puhdistettiin käyttämällä yleisiä tekniikoita ja resuspendoitiin TE-liuokseen lopullisen konsentraation ollessa 1 µg/µl. Restriktioentsyymeillä MscI ja HindIII pilkottiin 30 µg tätä plasmidia ja 646 emäsparin fragmentti, joka sisälsi taumatiini II:n täydellisen geenin, eristettiin 0,8%:isessa agaroosigeelissä. Fragmentin päät muutettiin tylpiksi päiksi DNA-polymeraasi I:n Klenowin fragmentilla.

Plasmidi pAN52-6B, joka sisältää noin 7,5 kb ja on johdettu plasmidista pAN52-6 NotI (vertaa Van den Hondel et al., "Heterologous Gene Expression in filamentous fungi"; teoksessa Bennett ja Lasvre, "More Gene Manipulation in Fungi"; Academic Press, 1991, luku 18, s. 396-428), pilkottiin BssHII:llä ja sen päät muutettiin tylpiksi päiksi DNA-polymeraasi I:stä peräisin olevan Klenowin fragmentin toiminnan avulla.

Nämä kaksi fragmenttia liitettiin käyttämällä DNA-ligaasia ja tuloksena saatua rakennetta käytettiin transformoimaan *E. colin* DH5αF'-kanta. Tuloksena saatu plasmidi, pThII-bis, eristettiin ja sen rakenne varmistettiin sekvensoimalla Sangerin dideoksi-menetelmää käyttäen.

Seuraava vaihe oli pThII-bis-plasmidin (8,1 kb) pilkkominen XbaI:llä ja sellaisen noin 5,5 kb:n fragmentin eristäminen, joka sisälsi taumatiini-geenin ja pro-moottorisekvenssin sekä *Aspergillus nigerin* glukoamylaasin signaalisekvenssin. Tähän fragmenttiin sisällytettiin myös *Aspergillus nidulansin* trpC-terminaattorisekvenssi.

Edellä mainittu 5,5 kb:n fragmentti liitettiin sulfaniiliamidiresistenssisekvenssin sisältävän plasmidin kanssa, joka oli aiemmin käsitelty XbaI:llä (plasmidin ainoa pilkkomiskohta). Ligaatioseosta käytettiin transformoimaan *E. colin* DH5αF'-kanta. Tuloksena saatua plasmidia kutsuttiin pThIII:ksi, kuten kuvassa 9 osoitetaan.

Plasmidi pThIII sisälsi: (i) synteettisen geenin, joka koodaa taumatiini II:ta *Aspergillus nigerin* glukoamylaasipromoottorin säätelyn alaisena; (ii) *Aspergillus nigerin* glukoamylaasi-geenin signaalisekvenssin ("pre"-) ja "pro"-sekvenssin; (iii) sulfaniiliamidiresistenssimarkkerin; ja (iv) *Aspergillus nidulansin* trpC-terminaattorin. Tämän rakenteen lopullinen tunnistus varmistettiin sekvensoimalla.

Penicillium roquefortiin kanta transformoitiin pThIII-plasmidilla saman menetelmän mukaisesti kuin esimerkissä 1 (kappaleet 1.3.1 ja 1.3.2) on kuvattu. Sulfaniiliamidille resistentit pesäkkeet testattiin sen havaitsemiseksi, sisältäisivätkö niiden genomit synteettisen geenin ja olisivatko ne pääkohdittain modifioitu koodatessaan taumatiini II:ta. Käytetyt menetelmät (PCR) olivat vastaavia kuin esimerkissä 1 (kappale 1.4.1) on kuvattu.

Kuva 10 esittää PCR-kokeen tuloksen. Taumatiini-geenin toteamiseen käytetyt kaksi oligonukleotidia olivat samat kuin aikaisemmin on käytetty (T1 ja T2). Näiden kahden oligonukleotidin avulla voidaan monistaa 604 emäsparin fragmentti, joka vastaa taumatiini II:n synteettisen geenin oligonukleotideja 21-624. Kuva 10 esittää, että käytettäessä DNA:ta transformoimattomasta sienestä ("kontrollista", kaista 2) yhtään synteettistä geeniä vastaavaa vyöhykettä ei monisteta, kun taas pThIII:lla transformoidusta sienestä olevaa DNA:ta käytettäessä monistetaan odotettavissa olevaa kokoa oleva vyöhyke (kaista 3). Tätä sientä kutsutaan transformantti a2:ksi. Myös reaktiotuotteet, joita pThIII-plasmidi käytti templaattina, ajettiin kontrollitarkoituksessa geelin läpi (kaista 4).

Kuva osoittaa a2-transformantin sisällyttäneen taumatiini II:n synteettisen geenin oikein genomiinsa. Se analysoitiin sen vuoksi yksityiskohtaisemmin sen havaitsemiseksi, ilmentäisikö ja erittäisikö se taumatiini II:ta oikein. Yhdistelmä-taumatiinin immunoblottaus-analyysiin (Western blot) käytettiin kappaleessa (1.4.2) kuvattuja menetelmiä seuraavin muutoksin.

Koe aloitettin 1 litralla *Penicillium roquefortiin* a2-kantaa, jota kasvatettiin 8 päivää 28 °C:ssa myseelin tuottamiseen puolittain rajoitetussa (semidefined) elatusaineessa (MSDPM). Büchnerin suppilolla suoritetun tyhjösuodatuksen jälkeen, mikä tuotti 45 g myseeliä litraa

viljelmää kohti, analysoitiin sekä viljelyelatusaine (nestemäinen fraktio) että pidättynyt myseeli (kiinteä fraktio, 4,5 g).

Kiinteä fraktio käsiteltiin käyttämällä menetelmiä, jotka on pääpiirteittäin kuvattu kappaleessa (1.4.2.1) mukaan lukien sonikaatio, jolloin sonikaatioliuoksessa saatiin 13,5 ml myseeliuutetta.

Nämä 13,5 ml myseeliuutetta ja 10 ml viljelyelatusainetta saostettiin 10%:isella trikloorietikkahapolla ja saostunut aine resuspendoitiin lopulliseen sonikaatioliuoksen 200 µl:n tilavuuteen. Sitten nämä näytteet analysoitiin proteiinielektroforeeseilla ja immunoblottaus-tekniikalla, kuten esimerkissä 1 kappaleessa (1.4.2) on yksityiskohtaisesti kuvattu.

Tämän kokeen tulokset esitetään kuvassa 11 14%:isesta elektroforeesigeelistä. Tässä kuvassa oleva kaista 7 sisältää tunnetun molekyylipainon omaavia proteiineja (markkereita). Kutakin proteiinia vastaava molekyylipaino luetellaan kuvan oikealla puolella. Kaista 2 sisältää viljelyelatusainenäytteen, jossa T0901-sientä kasvatettiin. Kuten esimerkissä 1 on kuvattu, tämä sieni on intrasellulaarisen taumatiinin tuottaja. Kaistat 3 ja 5 sisältävät a2-transformanttia vastaavat viljelyelatusainenäytteet (E tarkoittaa ekstrasellulaarista) ja myseeliä (I tarkoittaa intrasellulaarista). Kaistat 4 ja 6 sisältävät samat näytteet (E ja I), jotka vastaavat transformoimatonta *Penicillium roquefortiita*. Kuten kuvassa 11 on selvästi nähtävissä, a2-transformantti osoittautui olevan hyvä taumatiinin tuottaja ja erittäjä. Erityksen tehokkuus ei ollut kuitenkaan täydellistä siitä syystä, että osaa tuotetusta taumatiinista ei eritetty, kuten kaistojen 3 ja 5 vertailussa nähdään. Viljelyliemellä suoritettiin aistinvaraisia kokeita ja taumatiinin tyypillinen makea maku todettiin.

Esimerkki 3: Taumatiinin ekstrasellulaarinen tuotanto *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksessa

Aspergillus nigerin awamori-muunnoksen kanta NRRL312 transformoitiin polyetyleeniglykolin läsnäollessa, kuten kirjallisuudessa on kuvattu (Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, vol. 81, s. 1470-4), muutamilla muunnoksilla.

Kahden litran pulloon siirrostettiin 400 ml CM-elatusainetta (5 g/l mallasuutetta, 5 g/l hiivauutetta, 5 g/l glukoosia) maljalta peräisin olevien *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksen itiöiden kanssa. Sientä kasvatettiin 16 tuntia. Myseeli otettiin talteen suodattamalla steriilin harson läpi ja pestiin 100 ml:lla pesupuskuria (0,6 M $MgSO_4$, 10 mM Na_3PO_4, pH 5,8). Myseeli puristettiin steriileissä paperipyyhkeissä, ja se tuotti 2,5 g.

Myseeli resuspendoitiin 15 ml/g kylmää protoplastipuskuria (1,2 M $MgSO_4$, 10 mM Na_3PO_4, pH 5,8) protoplastien muodostumiseksi. Tässä vaiheessa lisättiin 40 mg Lysiinientsyymiä (Sigma) myseeligrammaa kohti ja seos pantiin jäähän viideksi minuutiksi. Tämän inkubaation jälkeen lisättiin 1 ml BSA-liuosta (12 mg/ml protoplastipuskurissa) ja liuosta inkuboitiin 3 tai 4 tuntia 30 °C:ssa. Protoplastien muodostumista seurattiin mikroskoopilla. Seos suodatettiin nailonin tai lasikalvon läpi ja pestiin protoplastipuskurilla. Protoplasteja sentrifugoitiin kierrosnopeudella 2000 rpm 4 °C:ssa 15 minuuttia kelluvalla (floating) roottorilla (Beckman GPR -sentrifugi). Protoplastit resuspendoitiin 15 ml:aan ST-liuosta (1 M sorbitolia, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), sentrifugoitiin uudelleen ja resuspendoitiin 1 ml:aan ST:tä. Liuos sentrifugoitiin jälleen ja pestiin kahdesti 1 ml:lla STC:tä (ST plus 0,01 M $CaCl_2$). Protoplastit laskettiin mikroskoopin alla, sentrifugoitiin jälleen ja resuspendoitiin riittävään tilavuuteen STC:tä, konsentraation 10^8 protoplastia/ml saamiseksi. Jokainen

400 ml:n viljelmä tuotti tavallisesti 10^8 protoplastia. Tässä vaiheessa protoplastit maljattiin suoraan regeneraatioelatusaineelle 5 ml:n putkiin, joissa oli 0,7%:ista soft agaria sakkaroosin osmoottisen stabilisaattorin (1 M) kanssa, ja maljattiin perusalustalle 1,5%:iselle agarille.

Transformaatiokokeiden aloittamiseen käytettiin 200 µl protoplastiliuosta 10^8 protoplastia/ml. Protoplasteihin lisättiin 10 µg transformantti-DNA:ta (tässä tapauksessa pThIII-plasmidia) ja 50 µl PTC:tä (60 % PEG 6000; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM $CaCl_2$) ja liuosta inkuboitiin jäässä 20 minuutin ajan. Sitten lisättiin 1 ml PTC:tä ja liuosta sekoitettiin hyvin ja pidettiin huoneenlämpötilassa 5 minuuttia. Protoplastit sentrifugoitiin ja resuspendoitiin 200 µl:aan STC-elatusainetta. Seos maljattiin regeneraatioelatusaineelle, jossa oli sulfaniiliamidia 1 mg/ml. Maljoja inkuboitiin ylösalaisin 30 °C:ssa. Lisääntymistä tarkkailtiin kolmen tai neljän päivän inkuboinnin jälkeen.

(3.1) Regeneraatioelatusaineen valmistus

1. Hivenaineliuos: 400 mg/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 800 mg/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 800 mg/l $MnSO_4 \cdot 2H_2O$; 800 mg/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 40 mg/l $Na_2BrO_7 \cdot 10H_2O$; 8 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

2. Suolaliuos (50X): 26 g/l KCl; 26 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 76 g/l KH_2PO_4; 50 ml/l hivenaineliuosta.

3. Ammoniumtartraatti: 30 grammaa litrassa.

4. MMA (*Aspergilluksen* minimialusta): 10 tai 15 g glukoosia tai 7 g agaria lisättiin 970 ml:aan tislattua vettä (lopulliset konsentraatiot 1,5 % tai vastaavasti 0,7 %). Seos höyrysteriloitiin ja sen jälkeen siihen lisättiin 10 ml steriiliä ammoniumtartraattiliuosta ja 20 ml steriiliä suolaliuosta. Lopuksi valmistettiin regeneraatioelatusaine

lisäämällä MMA-elatusaineeseen sakkaroosia, kunnes saavutettiin 1 M konsentraatio.

Esimerkki IV: Glukoamylaasi-taumatiinifuusioproteiinin tuotanto, eritys ja käsittely

Kuten kuvassa 12 on pääpiirteittäin esitetty, pGEX-KG-plasmidi (5,0 kb) (Pharmacia Biotech) tarkastettiin peräkkäin NcoI:llä ja HindIII:lla, jolloin saatiin noin 4900 pb:n fragmentti. Tämä fragmentti, joka ei enää sisältänyt pGEX-KG:n polylinkkerin SalI-restriktiokohtaa, puhdistettiin 0,8%:isessa agaroosigeelissä.

Edellä mainittu fragmentti liitettiin pTZ18RN(3/4)-plasmidista peräisin olevaan NcoI-HindIII-fragmenttiin, joka sisälsi taumatiinin synteettisen geenin toisen osan, jolloin saatiin noin 5,3 kb:n pECThI-plasmidi. Tämä uusi plasmidi tarkastettiin NcoI:llä ja linearisoitu fragmentti liitettiin pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin olevaan NcoI-NcoI-fragmenttiin, joka sisälsi taumatiinin synteettisen geenin ensimmäisen osan, jolloin saatiin pECThII-plasmidi (noin 5,6 kb). pECThII-plasmidi sisälsi taumatiinin synteettisen geenin, jota sääteli *Escherichia colin* tac-promoottori. Tämä konstruktio mahdollisti yhdistelmä-taumatiinin intrasellulaarisen tuotannon säätelyn *Escherichia colissa*.

Aloituskohta pThIX:n konstruoimiselle oli pECThI-plasmidi (noin 5,3 kb). Ainoan tässä plasmidissa olevan MscI-restriktiokohdan poistamiseksi pECThI käytiin läpi peräkkäin MscI:llä ja EcoRV:llä (tylppiä päitä tuottavia entsyymejä), jolloin vapautettiin kaksi fragmenttia, 4,1 kb ja 1,2 kb. Kooltaan 4,1 kb:n fragmentti puhdistettiin 0,8%:isessa agaroosigeelissä ja liitettiin uudelleen yhteen DNA-ligaasin vaikutuksesta. Tuloksena oli pThIV-plasmidi. Tämä plasmidi linearisoitiin NcoI:llä ja lineaarinen fragmentti liitettiin yhteen pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin olevan sellaisen NcoI-NcoI-fragmentin kanssa, joka sisälsi tauma-

tiinin synteettisen geenin ensimmäisen puolikkaan, jolloin saatiin pThV-plasmidi.

Yksijuosteiset oligonukleotidit, GLA1 ja GLA2, ostettiin kaupallisesti (Ingenasa S.A) ja niillä oli seuraavat sekvenssit (jotka on sisällytetty kuvassa 14 oleviin):

GLA1: 5'-AATTCTGCGGAACGTCGACCGCGACGGTGACTGACACCTGGCGGC-GAATGGATAAAAGGG-3'
GLA2: 5'-CCCTTTTATCCATTCGCCGCCAGGTGTCAGTCACCGTCGCGGTC-GACGTTCCGCAG-3'

Nämä kaksi oligonukleotidia emäspariutettiin seuraavalla tavalla: 10 µg kumpaakin oligonukleotidia sekoitettiin ligaatiopuskurissa (40 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl) lopullisessa 25 µl:n tilavuudessa. Seosta kuumennettiin 5 minuutin ajan 65 °C:ssa ja lämpötilan annettiin laskea hitaasti (puolen tunnin aikana) 30 °C:seen. Tällä tavalla suljettu kaksijuosteinen DNA puhdistettiin 8%:isessa polyakryyliamidigeelissä. Tällä kaksijuosteisella synteettisellä nukleotidilla, jota kutsuttiin GLA(1/2):ksi, oli yksi tylppä pää ja yksi EcoRI-pää. pThV-plasmidia pilkottiin MscI:llä ja EcoRI:llä ja liitettiin yhteen synteettisen fragmentin GLA(1/2) kanssa, jolloin saatiin pThVI. Kuva 14 osoittaa *Aspergillus nigerin* glukoamylaasi-geenin viimeisten sekvenssien, spacer-sekvenssin ja taumatiini II:n synteettisen geenin välisen yhteyden.

Seuraavana vaiheena oli *Aspergillus nigerin* tai vastaavasti *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksen glukoamylaasin täydellisen geenin (glaA) insertoiminen taumatiini II:n täydellisen geenin kanssa siten sovitettuna, että glukoamylaasi-taumatiinifuusioproteiini voi muodostua.

Belgian viljelmäkokoelmasta ja LMBP-plasmideista (Ghent, Belgia, numero 1728) saatu pFGA2-plasmidi sisälsi *Aspergillus nigerin* glukoamylaasin täydellisen geenin (glaA).

Plasmidi pilkottiin EcoRI:llä ja SalI:llä ja noin 2,3 kb:n fragmentti, joka sisälsi glukoamylaasin täydellisen geenin proteiinin 10 viimeistä aminohappoa lukuunottamatta, eristettiin. Tämä fragmentti liitettiin yhteen pThVI-plasmidin kanssa, joka oli aikaisemmin pilkottu EcoRI:llä ja SalI:llä, jolloin saatiin pThVII-plasmidi (silmikointiliitokset esitetään kuvassa 14).

Aspergillus nigerin awamori-muunnoksen glukoamylaasi-geenin saamiseksi noudatettiin seuraavaa menetelmää: tämän sienen NRRL312-kannan täydellinen DNA valmistettiin kappaleen (1.4.1.1) menettelyn mukaisesti. Glukoamylaasi-geenin 5'- ja 3'-päässä olevaa kahta komplementaarista oligonukleotidia käytettiin täydellisen geenin monistamiseen. Näin monistettu fragmentti puhdistettiin 0,8%:isessa agaroosigeelissä ja pilkottiin EcoRI:llä ja SalI:llä. Tämä 2,3 kb:n fragmentti, EcoRI-SalI, alikloonattiin EcoRI:llä ja SalI:llä aikaisemmin käsiteltyyn pBluescript SK -plasmidiin (hankittu yhtiöltä Stratagene Inc.), jolloin saatiin pGLA-Aw-plasmidi.

Glukoamylaasi-spacer-taumatiinikasetin panemiseksi *Aspergillus nigerin gla*-promoottorin säätelyn alaiseksi, pThVII-plasmidi pilkottiin restriktioentsyymeillä BssHII (osittainen pilkkominen) ja HindIII, ja noin 3,0 kb:n fragmentti eristettiin. Tämä fragmentti liitettiin BssHII:llä ja HindIII:lla aikaisemmin pilkottuun pAN52-6B-plasmidiin, jolloin saatiin pThVIII-plasmidi. Lopuksi insertoitiin sulfaniiliamidiresistenssin geeni (Su^R), kuten esimerkissä 2 on kuvattu, jolloin saatiin pThIX.

pThIX-plasmidi sisälsi: (i) sulfaniiliamidiresistenssin markkerin; (ii) DNA-sekvenssin, joka koodaa fuusioproteiinia, joka muodostui (a) taumatiini II:n synteettisestä geenistä, (b) spacer-sekvenssistä, joka puolestaan sisältää KEX2-käsittelysekvenssin, ja (c) *Aspergillus nigerin* täydellisestä glukoamylaasi-geenistä; sekä lopuksi, (iii)

Aspergillus nigerin glukoamylaasi-geenin (glaA) signaali-sekvenssin ("pre") ja "pro"-sekvenssin.

pThIX-plasmidia käytettiin transformoimaan *Aspergillus nigerin awamori*-muunnos samoin kuin esimerkissä 3 määritellyissä menetelmissä. Saatiin transformantteja, jotka erittivät ja käsittelivät taumatiinia oikealla tavalla, ja proteiinin määritettiin olevan makea.

Samalla tavoin, mutta käyttämällä pThVII-plasmidin sijasta pGLA-Aw-plasmidia, saatiin pThIX:n vastaava plasmidi, joka sisälsi *A. awamorin* eikä *A. nigerin* gla:n. Samalla tavoin tätä plasmidia käytettiin transformoimaan *A. awamorin* kanta samanlaisin seurauksin.

SEQUENCE LISTING

<110> URQUIMA S.A.

<120> Preparation of a natural protein sweetener

<130> Thaumatin

<140> EP 95 105 973.2
<141> 1995-04-21

<150> ES 9400836
<151> 1994-04-21

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 624
<212> DNA
<213> Thaumatococcus daniellii

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(621)
<223> ThII natural gene

<400> 1

```
gcc acc ttc gag atc gtc aac cgc tgc tcc tac acc gtg tgg gcg gcc   48
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

gcc tcc aaa ggc gac gcc gcc ctg gac gcc ggc ggc cgc cag ctc aac   96
Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
             20                  25                  30

tcg gga gag tcc tgg acc atc aac gta gaa ccc ggc acc aag ggt ggc   144
Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Lys Gly Gly
         35                  40                  45

aaa atc tgg gcc cgc acc gac tgc tat ttc gac gac agc ggc cgc ggc   192
Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Arg Gly
     50                  55                  60

atc tgc cgg acc ggc gac tgc ggc ggc ctc ctc cag tgc aag cgc ttc   240
Ile Cys Arg Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Gln Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

ggc cgg ccg ccc acc acg ctg gcg gag ttc tcg ctc aac cag tac ggc   288
Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                 85                  90                  95

aag gac tac atc gac atc tcc aac atc aaa ggc ttc aac gtg ccg atg   336
Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

gac ttc agc ccg acc acg cgc ggc tgc cgc ggg gtg cgg tgc gcc gcc   384
Asp Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125
```

```
gac atc gtg ggg cag tgc ccg gcg aag ctg aag gcg ccg ggg ggt ggt   432
Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

tgc aac gat gcg tgc acc gtg ttc cag acg agc gag tac tgc tgc acc   480
Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

acg ggg aag tgc ggg ccg acg gag tac tcg cgc ttc ttc aag agg ctt   528
Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175

tgc ccg gac gcg ttc agt tat gtc ctg gac aag cca acc acc gtc acc   576
Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

tgc ccc ggc agc tcc aac tac agg gtc act ttc tgc cct act gcc taa   624
Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 2
<211> 207
<212> PRT
<213> Thaumatococcus daniellii

<400> 2

```
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
            20                  25                  30

Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Lys Gly Gly
        35                  40                  45

Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Arg Gly
    50                  55                  60

Ile Cys Arg Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Gln Cys Lys Arg Phe
65                  70                  75                  80

Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                85                  90                  95

Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

Asp Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175
```

```
Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205


<210> 3
<211> 624
<212> DNA
<213> Thaumatococcus daniellii

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(621)
<223> ThII synthetic and fully optimized gene

<400> 3
gcc acc ttc gag atc gtc aac cgc tgc tcc tac acc gtc tgg gcc gcc   48
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

gcc tcc aag ggc gac gcc gcc ctc gac gcc ggc ggc cgc cag ctc aac   96
Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
             20                  25                  30

tcc ggc gag tcc tgg acc atc aac gtc gag ccc ggc acc aag ggc ggc   144
Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Lys Gly Gly
         35                  40                  45

aag atc tgg gcc cgc acc gac tgc tac ttc gac gac tcc ggc cgc ggc   192
Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Arg Gly
     50                  55                  60

atc tgc cgc acc ggc gac tgc ggc ggc ctc ctc cag tgc aag cgc ttc   240
Ile Cys Arg Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Gln Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

ggc cgc ccc ccc acc acc ctc gcc gag ttc tcc ctc aac cag tac ggc   288
Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                 85                  90                  95

aag gac tac atc gac atc tcc aac atc aag ggc ttc aac gtc ccc atg   336
Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

gac ttc tcc ccc acc acc cgc ggc tgc cgc ggc gtc cgc tgc gcc gcc   384
Asp Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

gac atc gtc ggc cag tgc ccc gcc aag ctc aag gcc ccc ggc ggc ggc   432
Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

tgc aac gac gcc tgc acc gtc ttc cag acc tcc gag tac tgc tgc acc   480
Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

acc ggc aag tgc ggc ccc acc gag tac tcc cgc ttc ttc aag cgc ctc   528
Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175
```

```
tgc ccc gac gcc ttc tcc tac gtc ctc gac aag ccc acc acc gtc acc   576
Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

tgc ccc ggc tcc tcc aac tac cgc gtc acc ttc tgc ccc acc gcc taa   624
Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 4
<211> 207
<212> PRT
<213> Thaumatococcus daniellii

<400> 4

```
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
             20                  25                  30

Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Lys Gly Gly
         35                  40                  45

Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Arg Gly
     50                  55                  60

Ile Cys Arg Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Gln Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                85                  90                  95

Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

Asp Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175

Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 5
<211> 624
<212> DNA
<213> Thaumatococcus daniellii

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(621)
<223> ThI natural gene

<400> 5

```
gcc acc ttc gag atc gtc aac cgc tgc tcc tac acc gtg tgg gcg gcc   48
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

gcc tcc aaa ggc gac gcc gcc ctg gac gcc ggc ggc cgc cag ctc aac   96
Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
             20                  25                  30

tcg gga gag tcc tgg acc atc aac gta gaa ccc ggc acc aac ggt ggc   144
Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Asn Gly Gly
         35                  40                  45

aaa atc tgg gcc cgc acc gac tgc tat ttc gac gac agc ggc tcc ggc   192
Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Ser Gly
     50                  55                  60

atc tgc aag acc ggc gac tgc ggc ggc ctc ctc cgc tgc aag cgc ttc   240
Ile Cys Lys Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Arg Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

ggc cgg ccg ccc acc acg ctg gcg gag ttc tcg ctc aac cag tac ggc   288
Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                 85                  90                  95

aag gac tac atc gac atc tcc aac atc aaa ggc ttc aac gtg ccg atg   336
Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

aac ttc agc ccg acc acg cgc ggc tgc cgc ggg gtg cgg tgc gcc gcc   384
Asn Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

gac atc gtg ggg cag tgc ccg gcg aag ctg aag gcg ccg ggg ggt ggt   432
Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

tgc aac gat gcg tgc acc gtg ttc cag acg agc gag tac tgc tgc acc   480
Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

acg ggg aag tgc ggg ccg acg gag tac tcg cgc ttc ttc aag agg ctt   528
Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175

tgc ccg gac gcg ttc agt tat gtc ctg gac aag cca acc acc gtc acc   576
Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

tgc ccc ggc agc tcc aac tac agg gtc act ttc tgc cct act gcc taa   624
Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 6
<211> 207
<212> PRT
<213> Thaumatococcus daniellii

<400> 6
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
20 25 30

Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Asn Gly Gly
35 40 45

Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Ser Gly
50 55 60

Ile Cys Lys Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Arg Cys Lys Arg Phe
65 70 75 80

Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
85 90 95

Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
100 105 110

Asn Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
115 120 125

Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
130 135 140

Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145 150 155 160

Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
165 170 175

Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
180 185 190

Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
195 200 205

<210> 7
<211> 624
<212> DNA
<213> Thaumatococcus daniellii

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(621)
<223> ThI synthetic and fully optimized gene

<400> 7
gcc acc ttc gag atc gtc aac cgc tgc tcc tac acc gtc tgg gcc gcc 48
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
1 5 10 15

gcc tcc aag ggc gac gcc gcc ctc gac gcc ggc ggc cgc cag ctc aac 96
Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
20 25 30

```
tcc ggc gag tcc tgg acc atc aac gtc gag ccc ggc acc aac ggc ggc   144
Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Asn Gly Gly
         35                  40                  45

aag atc tgg gcc cgc acc gac tgc tac ttc gac gac tcc ggc tcc ggc   192
Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Ser Gly
     50                  55                  60

atc tgc aag acc ggc gac tgc ggc ggc ctc ctc cgc tgc aag cgc ttc   240
Ile Cys Lys Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Arg Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

ggc cgc ccc ccc acc acc ctc gcc gag ttc tcc ctc aac cag tac ggc   288
Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                85                  90                  95

aag gac tac atc gac atc tcc aac atc aag ggc ttc aac gtc ccc atg   336
Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

aac ttc tcc ccc acc acc cgc ggc tgc cgc ggc gtc cgc tgc gcc gcc   384
Asn Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

gac atc gtc ggc cag tgc ccc gcc aag ctc aag gcc ccc ggc ggc ggc   432
Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

tgc aac gac gcc tgc acc gtc ttc cag acc tcc gag tac tgc tgc acc   480
Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

acc ggc aag tgc ggc ccc acc gag tac tcc cgc ttc ttc aag cgc ctc   528
Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175

tgc ccc gac gcc ttc tcc tac gtc ctc gac aag ccc acc acc gtc acc   576
Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

tgc ccc ggc tcc tcc aac tac cgc gtc acc ttc tgc ccc acc gcc taa   624
Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 8
<211> 207
<212> PRT
<213> Thaumatococcus daniellii

<400> 8

```
Ala Thr Phe Glu Ile Val Asn Arg Cys Ser Tyr Thr Val Trp Ala Ala
  1               5                  10                  15

Ala Ser Lys Gly Asp Ala Ala Leu Asp Ala Gly Gly Arg Gln Leu Asn
             20                  25                  30

Ser Gly Glu Ser Trp Thr Ile Asn Val Glu Pro Gly Thr Asn Gly Gly
         35                  40                  45
```

```
Lys Ile Trp Ala Arg Thr Asp Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Ser Gly
     50                  55                  60

Ile Cys Lys Thr Gly Asp Cys Gly Gly Leu Leu Arg Cys Lys Arg Phe
 65                  70                  75                  80

Gly Arg Pro Pro Thr Thr Leu Ala Glu Phe Ser Leu Asn Gln Tyr Gly
                 85                  90                  95

Lys Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Asn Ile Lys Gly Phe Asn Val Pro Met
            100                 105                 110

Asn Phe Ser Pro Thr Thr Arg Gly Cys Arg Gly Val Arg Cys Ala Ala
        115                 120                 125

Asp Ile Val Gly Gln Cys Pro Ala Lys Leu Lys Ala Pro Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Cys Asn Asp Ala Cys Thr Val Phe Gln Thr Ser Glu Tyr Cys Cys Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Lys Cys Gly Pro Thr Glu Tyr Ser Arg Phe Phe Lys Arg Leu
                165                 170                 175

Cys Pro Asp Ala Phe Ser Tyr Val Leu Asp Lys Pro Thr Thr Val Thr
            180                 185                 190

Cys Pro Gly Ser Ser Asn Tyr Arg Val Thr Phe Cys Pro Thr Ala
        195                 200                 205
```

<210> 9
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide p115

<400> 9
acccggggat cctctccatg ggacctgcag gcatgca 37

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Nucleotides in pTZ18R that have been modified as per the patent application

<400> 10
cccggggatc ctctccatgg gacctgcagg cat 33

<210> 11
<211> 106
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 1a

<400> 11
aaatggagga tccatggcca ccttcgagat cgcaaccgct tgctcctaca ccgtctgggc 60

cgccgcctcc aagggcgacg ccgccctcga cgccggcggc cgccag 106

<210> 12
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 1b

<400> 12
gcgggcccag atcttgccgc ccttggtgcc gggctcgacg ttgatggtcc aggactcgcc 60

ggagttgagc tggcggccgc cggcgtc 87

<210> 13
<211> 117
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 2a

<400> 13
ggcggcaaga tctgggcccg caccgactgc tacttcgacg atcccggccg cggcatctgc 60

cgcaccggcg actgcggcgg cctcctccag tgcaagcgct tcggccgccc ccccacc 117

<210> 14
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 2b

<400> 14
agtccatggg gacgttgaag cccttgatgt tggagatgtc gatgtagtcc ttgccgtact 60

ggttgaggga gaactcggcg agggtggtgg gggggcggcc gaa 103

<210> 15
<211> 84
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 3a

<400> 15
aacgtcccca tggacttctc ccccaccacc cgcggctgcc gcggcgtccg ctgcgccgcc 60

gacatcgtcg gccagtgccc cgcc 84

<210> 16
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 3b

<400> 16
agacggtgca ggcgtcgttg cagccgccgc cgggggcctt gagcttggcg gggcactggc 60

cgac 64

<210> 17
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 4a

<400> 17
tccagacctc cgagtcctgc tgcaccaccg gcaagtgcgg ccccaccgag tactcccgct 60

tcttcaagcg cctctgcccc gacgcctttc ctacgtcctc c 101

<210> 18
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 4b

<400> 18
gcttgcctgc agttattatt aggcggtggg gcagaaggtg acgcggtagt tggaggagcc 60

ggggcaggtg acggtggtgg gcttgtcgag gacgtaggag aaggcgt 107

<210> 19
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide T1

<400> 19
ccgctgctcc tacaccgtct gggccg 26

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide T2

<400> 20
ttaggcggtg gggcagaagg 20

<210> 21
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide gla1

<400> 21
aattctgcgg aacgtcgacc gcgacggtga ctgacacctg gcggcgaatg 50

<210> 22
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide gla2

<400> 22
ccctttatc cattcgccgc caggtgtcag tcaccgtcgc ggtcgacgtt ccgcag 56

PATENTTIVAATIMUKSET:

1. DNA-sekvenssi, joka koodaa taumatiini II -proteiinin 207 aminohappoa (sisältyy sekvenssiin ID NO:1) vastaavaa aminohapposekvenssiä, jota seuraa n lopetussekvenssiä, jossa kokonaisluku n on suurempi tai yhtä suuri kuin 1; joka DNA-sekvenssi on **tunnettu** siitä, että se on tulos taumatiini II:n 207 aminohappoa koodaavan luontaisen geenin DNA-sekvenssin (myös luontainen geeni esitetään sekvenssissä ID NO:1) modifioimisesta yli 50 %:ssa mahdollisista modifikaatioista; jolloin mainittu modifikaatio koostuu n:n TAA-lopetuskodonin lisäämisestä, jossa kokonaisluku n on suurempi tai yhtä suuri kuin yksi, ja suorittamalla enemmän kuin 50 % mahdollisista muutoksista nukleotidikodoneissa, jotka vastaavat taumatiini II:n aminohappoja; jotka mainitut muutokset koostuvat alkuperäisten kodonien korvaamisesta kaikissa mahdollisissa aminohapoissa niillä kodoneilla, jotka osoitetaan sulkeissa seuraavassa aminohappokodonien listassa:

Ala (GCC), Arg (CGC), Asn (AAC), Asp (GAC), Cys (TGC), Lys (AAG), Gln (CAG), Glu (GAG), Gly (GGC), Ile (ATC), Leu (CTC), Met (ATG), Phe (TTC), Pro (CCC), Ser (TCC), Thr (ACC), Trp (TGG), Tyr (TAC), Val (GTC).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että modifikaatiossa lisätään 1-3 TAA-lopetuskodonia (n = 1, 2 tai 3) ja suoritetaan yli 75 % mahdollisista kodonimuutoksista.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että kaikki mahdolliset kodonimuutokset (100 %) on tehty siten, että DNA-sekvenssi on sekvenssissä ID NO:3 esitetty sekvenssi.

4. Yhdistelmäplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää: (i) jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukaisen DNA-sekvens-

sin; (ii) rihmasienten ekspressiokasetin, joka sisältää yhden promoottorisekvenssin ja yhden terminaattorisekvenssin tämäntyyppisiä sieniä varten; (iii) sopivan valintamarkkerin; ja valinnaisesti (iv) erityssignaali-DNA-sekvenssin proteiinin ekstrasellulaarista tuotantoa varten.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmäplasmidi, **tunnettu** siitä, että ekspressiokasetin promoottorisekvenssi on peräisin *Aspergillus nigerin* glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasientsyymin geenistä tai saman sienen glukoamylaasi-geenistä; ekspressiokasetin lopetussekvenssi on *Aspergillus nidulansin* tryptofaani C:stä; ja valintamarkkeri on sulfaniiliamidin resistenssimarkkeri.

6. Yhdistelmäplasmidi, joka ilmentää taumatiini-glukoamylaasifuusioproteiinia, **tunnettu** siitä, että yhdistelmäplasmidi sisältää: (i) sopivan valintamarkkerin; (ii) DNA-sekvenssin, joka on muodostettu (a) jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukaisesta DNA-sekvenssistä, (b) spacer-sekvenssistä, joka puolestaan sisältää KEX2-käsittelysekvenssin, ja (c) *Aspergillus nigerin* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksen täydellisestä glukoamylaasi-geenistä (glaA); ja (iii) glaA-geenin "pre"-signaalisekvenssin ja "pro"-sekvenssin.

7. Rihmasienen viljelmä, joka pystyy tuottamaan taumatiini II -proteiinia, **tunnettu** siitä, että viljelmä on transformoitu jonkin patenttivaatimuksista 4-6 mukaisella plasmidilla.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen viljelmä, **tunnettu** siitä, että rihmasieni on *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnos.

9. Menetelmä taumatiini II:n tuottamiseksi, jossa:

a) insertoidaan jonkin patenttivaatimuksista 1, 2 tai 3 mukainen DNA-sekvenssi jonkin patenttivaatimuksista 4, 5 tai 6 mukaiseen ilmentymisvektoriin käyttämällä yleisiä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmiä;

b) transformoidaan rihmasienikanta tällä ilmentymisvektorilla;

c) viljellään tällä tavalla transformoitua rihmasienikantaa sopivissa ravinneolosuhteissa, jolloin taumatiini II:-ta tuotetaan joko intrasellulaarisesti, ekstrasellulaarisesti tai molemmilla tavoilla yhtä aikaa, tai fuusioproteiinin taumatiini-glukoamylaasi muodossa;

d) erotetaan ja puhdistetaan tapauksesta riippuen taumatiini II yksin, tai taumatiini II erotetaan viljelyelatusaineesta yhdessä sienimyseelin kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että rihmasieni on *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnos.

11. DNA-sekvenssi, joka koodaa taumatiini I -proteiinin 207 aminohappoa (207 aminohappoa, jotka eroavat sekvenssissä ID NO:1 esitetyistä vain viidessä aminohapossa, nimittäin 46-Asn, 63-Ser, 67-Lys, 76-Arg ja 113-Asn) vastaavaa aminohapposekvenssiä, joka sekvenssi on **tunnettu** siitä, että sillä on seuraavat viisi pysyvää kodonia: AAC (46-Asn), TCC (63-Ser), AAG (67-Lys), CGC (76-Arg) ja AAC (113-Asn), ja muut kodonit ovat kuten patenttivaatimuksessa 1 olevassa DNA-sekvenssissä.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että siinä on yhdestä kolmeen TAA-lopetuskodonia (n = 1, 2 tai 3), ja muut kodonit, jotka eroavat viidestä pysyvästä kodonista, ovat kuten patenttivaatimuksessa 2 esitetyssä DNA-sekvenssissä.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että kodonit, jotka eroavat viidestä pysyvästä kodonista, ovat kuten patenttivaatimuksessa 3 esitetyssä DNA-sekvenssissä.

14. Yhdistelmäplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää: (i) jonkin patenttivaatimuksista 11, 12 tai 13 mukaisen DNA-sekvenssin; (ii) rihmasienten ekspressiokasetin, joka sisältää sopivat promoottorisekvenssin ja lopetussekvenssin tämäntyyppisiä sieniä varten; (iii) sopivan valintamarkkerin; ja valinnaisesti (iv) erityssignaali-DNA-sekvenssin proteiinin ekstrasellulaarista tuotantoa varten.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen yhdistelmäplasmidi, **tunnettu** siitä, että ekspressiokasetin promoottorisekvenssi on peräisin *Aspergillus nigerin* glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasientsyymin geenistä tai saman sienen glukoamylaasi-geenistä; ekspressiokasetin lopetussekvenssi on *Aspergillus nidulansin* tryptofaani C:stä; ja valintamarkkeri on sulfaniiliamidin resistenssimarkkeri.

16. Yhdistelmäplasmidi, joka ilmentää taumatiini-glukoamylaasifuusioproteiinia, **tunnettu** siitä, että se sisältää: (i) sopivan valintamarkkerin; (ii) DNA-sekvenssin, joka on muodostettu (a) jonkin patenttivaatimuksista 11, 12 tai 13 mukaisesta DNA-sekvenssistä, (b) spacer-sekvenssistä, joka puolestaan sisältää KEX2-käsittelysekvenssin, ja (c) *Aspergillus nigerin* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnoksen täydellisestä glukoamylaasi-geenistä (glaA); ja (iii) glaA-geenin "pre"-signaalisekvenssin ja "pro"-sekvenssin.

17. Rihmasienen viljelmä, joka pystyy tuottamaan taumatiini I -proteiinia, **tunnettu** siitä, että se on transformoitu jonkin patenttivaatimuksista 14-16 mukaisella plasmidilla.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen viljelmä, **tunnettu** siitä, että rihmasieni on *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnos.

19. Menetelmä taumatiini I:n tuottamiseksi, jossa:

a) insertoidaan jonkin patenttivaatimuksista 11, 12 tai 13 mukainen DNA-sekvenssi jonkin patenttivaatimuksista 14, 15 tai 16 mukaiseen ilmentymisvektoriin käyttämällä yleisiä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmiä;

b) transformoidaan rihmasienikanta tällä ilmentymisvektorilla;

c) viljellään tällä tavalla transformoitua rihmasienikantaa sopivissa ravinneolosuhteissa, jolloin taumatiini I:tä tuotetaan joko intrasellulaarisesti, ekstrasellulaarisesti tai molemmilla tavoilla yhtä aikaa, tai fuusioproteiinin taumatiini-glukoamylaasi muodossa;

d) erotetaan ja puhdistetaan tapauksesta riippuen taumatiini I yksin, tai taumatiini I erotetaan viljelyelatusaineesta yhdessä sienimyseelin kanssa.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että rihmasieni on *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* tai *Aspergillus nigerin awamori*-muunnos.

PATENTKRAV:

1. DNA-sekvens, som kodar för en aminosyrasekvens som motsvarar de 207 aminosyrorna (ingår i SEQ ID NO:1) av proteinet taumatin II, som följs av n terminationssekvenser, vari heltalet n är större än eller lika stor som 1; vilken DNA-sekvens är **kännetecknad** därav, att den är ett resultat av modifiering av DNA-sekvensen av den naturliga genen (också den naturliga genen anges i SEQ ID NO:1) som kodar för de 207 aminosyrorna av taumatin II, i över 50 % av de möjliga modifikationerna; varvid nämnda modifikation består av tillsats av n TAA-terminationskodoner, vari heltalet n är större än eller lika stor som 1, och genom att utföra flera än 50 % av de möjliga modifikationerna i de nukleotidkodoner, som motsvarar aminosyrorna av taumatin II; vilka nämnda modifikationer består av ersättning av de ursprungliga kodonerna i alla möjliga aminosyror med de kodoner, som anges inom parentes i den följande aminosyrakodonlistan:

Ala (GCC), Arg (CGC), Asn (AAC), Asp (GAC), Cys (TGC), Lys (AAG), Gln (CAG), Glu (GAG), Gly (GGC), Ile (ATC), Leu (CTC), Met (ATG), Phe (TTC), Pro (CCC), Ser (TCC), Thr (ACC), Trp (TGG), Tyr (TAC), Val (GTC).

2. DNA-sekvens enligt patentkravet 1, **kännetecknad** därav, att i modifikationen tillsätts 1-3 TAA-terminationskodoner (n = 1, 2 eller 3) och utförs över 75 % av möjliga kodonmodifikationer.

3. DNA-sekvens enligt patentkravet 2, **kännetecknad** därav, att alla möjliga kodonmodifikationer (100 %) utförts så, att DNA-sekvensen är sekvensen angiven i SEQ ID NO:3.

4. Hybridplasmid, **kännetecknad** därav, att den innehåller: (i) en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1-3; (ii) en uttryckningskassett för filamentsvampar, som innehåller

en promotorsekvens och en terminationssekvens för svampar av denna typ; (iii) en lämplig selektionsmarkör; och valfritt (iv) en utsöndringssignal-DNA-sekvens för extracellulär produktion av proteinet.

5. Hybridplasmid enligt patentkravet 4, **kännetecknad** därav, att uttryckningskassettens promotorsekvens härstammar från genen av glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenasenzymet av *Aspergillus niger* eller glukoamylasgenen av samma svamp; uttryckningskassettens terminationssekvens är från tryptofan C av *Aspergillus nidulans*; och selektionsmarkören är en resistensmarkör av sulfanilamid.

6. Hybridplasmid, som uttrycker ett taumatin-glukoamylas-fusionsprotein, **kännetecknad** därav, att hybridplasmiden innehåller: (i) en lämplig selektionsmarkör; (ii) en DNA-sekvens, som bildats av (a) en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1-3, (b) en spacer-sekvens, som för sin del innehåller en KEX2-processeringssekvens, och (c) den fullständiga glukoamylasgenen (glaA) av *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*; och (iii) glaA-genens "pre"-signalsekvens och "pro"-sekvens.

7. Filamentsvampodling, som förmår att producera proteinet taumatin II, **kännetecknad** därav, att odlingen transformerats med en plasmid enligt något av patentkraven 4-6.

8. Odling enligt patentkravet 7, **kännetecknad** därav, att filamentsvampen är *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*.

9. Förfarande för att producera taumatin II, i vilket man:

a) inför en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1, 2 eller 3 i uttryckningsvektorn enligt något av patentkraven 4, 5 eller 6 genom att använda allmänna metoder av hybrid-DNA-tekniken;

b) transformerar filamentsvampstammen med denna uttryckningsvektor;

c) odlar den så transformerade filamentsvampstammen i lämpliga näringsförhållanden, varvid taumatin II produceras antingen intracellulärt eller extracellulärt eller på båda sätten samtidigt, eller i form av fusionsproteinet taumatin-glukoamylas;

d) beroende på fallet separerar och renar enbart taumatin II, eller separerar taumatin II från odlingsmediet tillsammans med svampmycel.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, **kännetecknat** därav, att filamentsvampen är *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*.

11. DNA-sekvens, som kodar för en aminosyrasekvens, som motsvarar de 207 aminosyrorna av proteinet taumatin I (207 aminosyror, som skiljer sig från de som anges i SEQ ID NO:1 endast i fem aminosyror, nämligen 46-Asn, 63-Ser, 67-Lys, 76-Arg och 113-Asn), vilken sekvens **kännetecknas** av att den har följande fem fasta kodoner: AAC (46-Asn), TCC (63-Ser), AAG (67-Lys), CGC (76-Arg) och AAC (113-Asn), och de andra kodonerna är som i DNA-sekvensen angiven i patentkravet 1.

12. DNA-sekvens enligt patentkravet 11, **kännetecknad** därav, att den har från en till tre TAA-terminationskodoner (n = 1, 2 eller 3), och de andra kodonerna, som skiljer sig från de fem fasta kodonerna är som i DNA-sekvensen angiven i patentkravet 2.

13. DNA-sekvens enligt patentkravet 12, **kännetecknad** därav, att kodonerna, som skiljer sig från de fem fasta kodonerna är som i DNA-sekvensen angiven i patentkravet 3.

14. Hybridplasmid, **kännetecknad** därav, att den innehåller: (i) en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 11, 12 eller 13; (ii) en uttryckningskassett för filamentsvampar, som innehåller en lämplig promotorsekvens och en lämplig terminationssekvens för svampar av denna typ; (iii) en lämplig selektionsmarkör; och valfritt (iv) en utsöndringssignal-DNA-sekvens för extracellulär produktion av proteinet.

15. Hybridplasmid enligt patentkravet 14, **kännetecknad** därav, att uttryckningskassettens promotorsekvens härstammar sig från genen av glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenasenzymet av *Aspergillus niger* eller glukoamylasgenen av samma svamp; uttryckningskassettens terminationssekvens är från tryptofan C av *Aspergillus nidulans*; och selektionsmarkören är en resistensmarkör av sulfanilamid.

16. Hybridplasmid, som uttrycker ett taumatin-glukoamylas-fusionsprotein, **kännetecknad** därav, att den innehåller: (i) en lämplig selektionsmarkör; (ii) en DNA-sekvens, som bildats av (a) en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 11, 12 eller 13, (b) en spacer-sekvens, som för sin del innehåller en KEX2-processeringssekvens, och (c) den fullständiga glukoamylasgenen (glaA) av *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*; och (iii) glaA-genens "pre"-signalsekvens och "pro"-sekvens.

17. Filamentsvampodling, som förmår producera proteinet taumatin I, **kännetecknad** därav, att den transformerats med en plasmid enligt något av patentkraven 14-16.

18. Odling enligt patentkravet 17, **kännetecknad** därav, att filamentsvampen är *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*.

19. Förfarande för att producera taumatin I, i vilket man:

a) inför en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 11, 12 eller 13 i uttryckningsvektorn enligt något av patentkraven 14, 15 eller 16 genom att använda allmänna metoder av hybrid-DNA-tekniken;

b) transformerar filamentsvampstammen med denna uttryckningsvektor;

c) odlar den på detta sätt transformerade filamentsvampstammen i lämpliga näringsförhållanden, varvid taumatin I produceras antingen intracellulärt eller extracellulärt eller på båda sätt samtidigt, eller i form av fusionsproteinet taumatin-glukoamylas;

d) beroende på fallet separerar och renar enbart taumatin I, eller separerar taumatin I från odlingsmediet tillsammans med svampmycel.

20. Förfarande enligt patentkravet 19, **kännetecknat** därav, att filamentsvampen är *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* eller *awamori*-varianten av *Aspergillus niger*.

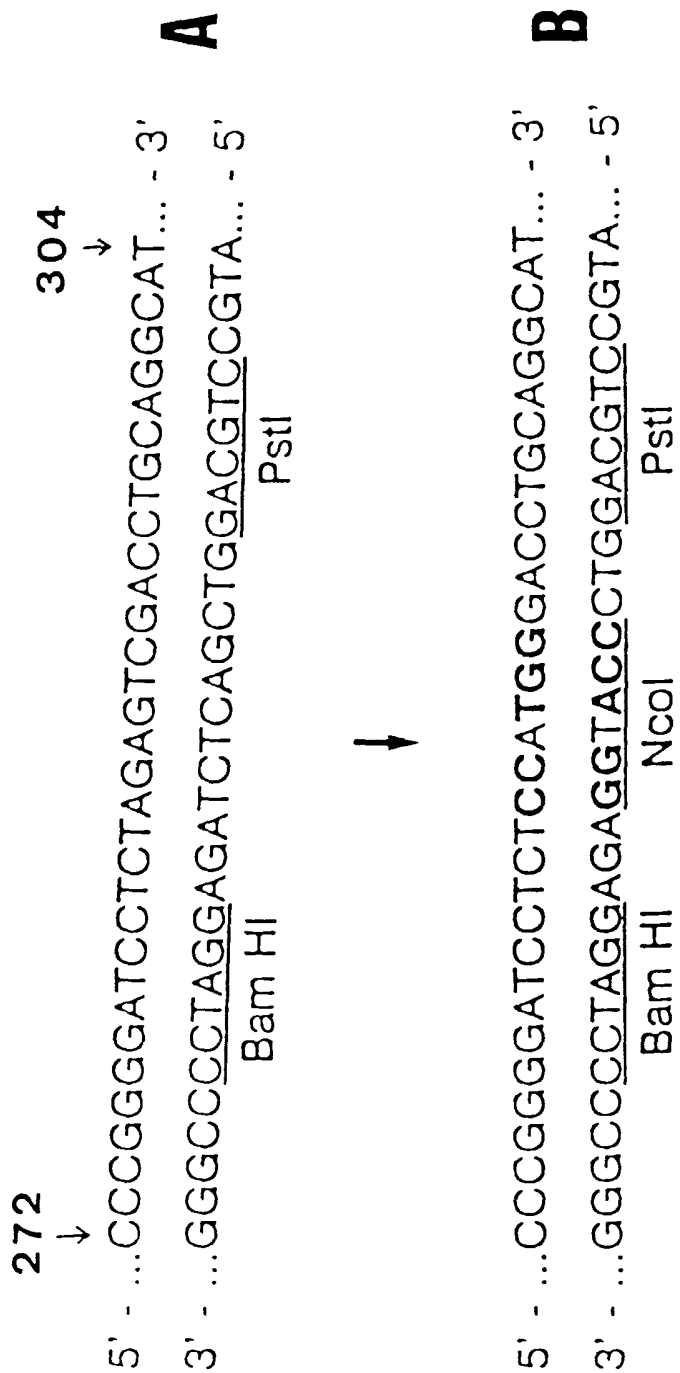

272
304
5' - ...CCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT... - 3'
3' - ...GGGCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTA... - 5'
Bam HI
PstI
A
5' - ...CCCGGGGATCCTCTCCATGGGACCTGCAGGCAT... - 3'
3' - ...GGGCCCCTAGGAGAGGTACCCTGGACGTCCGTA... - 5'
Bam HI
NcoI
PstI
B

Fig. 1

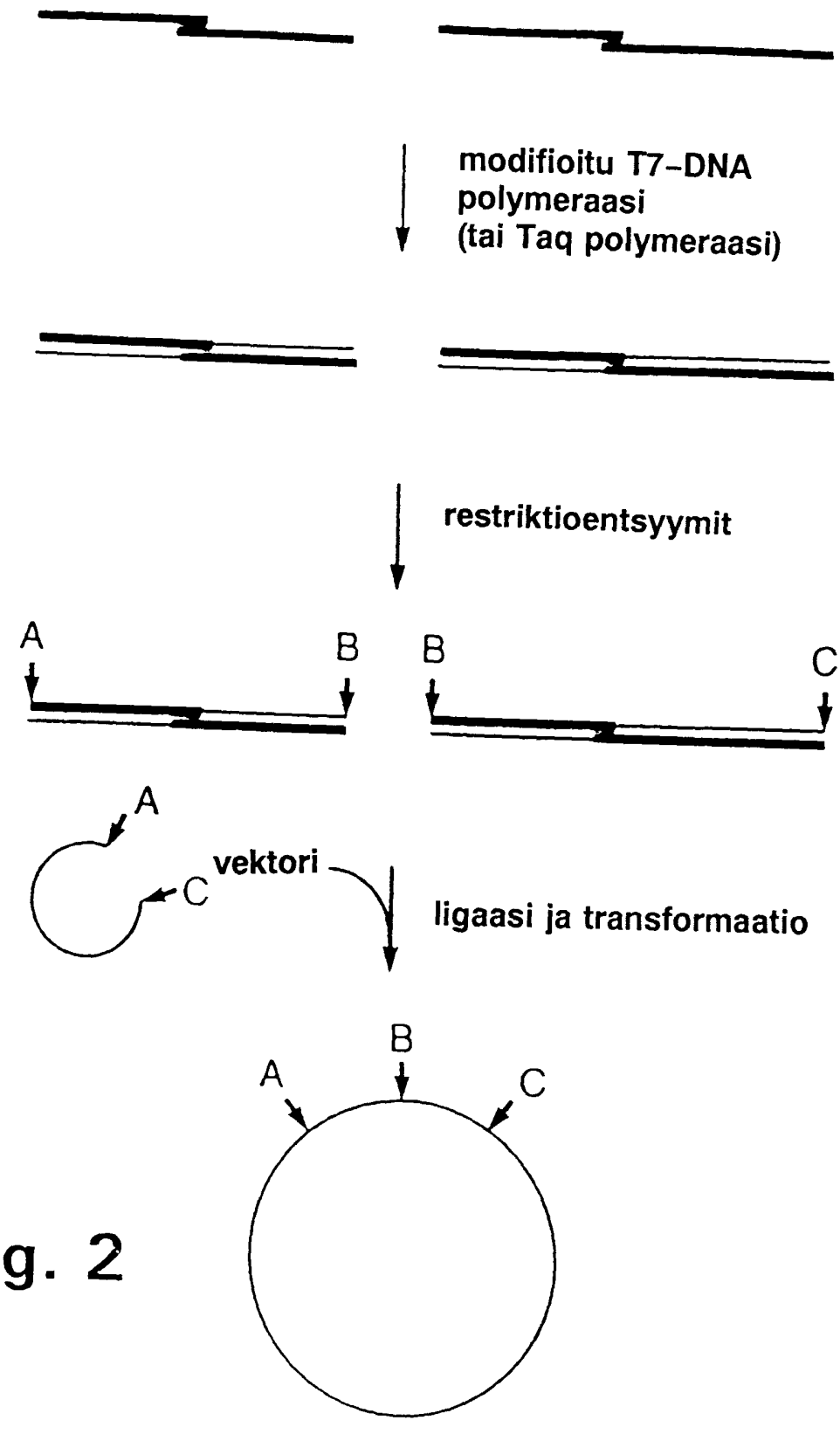

modifioitu T7-DNA
polymeraasi
(tai Taq polymeraasi)
restriktioentsyymit
A
B
B
C
A
C
vektori
ligaasi ja transformaatio
B
A
C

Fig. 2

1a (106 **nukleotidia).**

5'- AAATGGAGGATCCATGGCCACCTTCGAGATCGTCAACCGC
TGCTCCTACACCGTCTGGGCCGCCGCCTCCAAGGGCGACGC
CGCCCTCGACGCCGGCGGCCGCCAG - 3'

1b (87 **nukleotidia).**

5'- GCGGGCCCAGATCTTGCCGCCCTTGGTGCCGGGCTCGAC
GTTGATGGTCCAGGACTCGCCGGAGTTGAGCTGGCGGCCGC
CGGCGTC - 3'

2a (117 **nukleotidia).**

5'- GGCGGCAAGATCTGGGCCCGCACCGACTGCTACTTCGACG
ACTCCGGCCGCGGCATCTGCCGCACCGGCGACTGCGGCGGC
CTCCTCCAGTGCAAGCGCTTCGGCCGCCCCCCCACC - 3'

2b (103 **nukleotidia).**

5'- AGTCCATGGGGACGTTGAAGCCCTTGATGTTGGAGATGTCG
ATGTAGTCCTTGCCGTACTGGTTGAGGGAGAACTCGGCGAGGG
TGGTGGGGGGGCGGCCGAA - 3'

3a (84 **nukleotidia).**

5'- AACGTCCCCATGGACTTCTCCCCCACCACCCGCGGCTGCCGCGGC
GTCCGCTGCGCCGCCGACATCGTCGGCCAGTGCCCCGCC - 3'

3b (64 **nukleotidia).**

5'- AGACGGTGCAGGCGTCGTTGCAGCCGCCGCCGGGGGCCTTGAGCT
TGGCGGGGCACTGGCCGAC - 3'

4a (101 **nukleotidia).**

5'- TCCAGACCTCCGAGTACTGCTGCACCACCGGCAAGTGCGGCCCCA
CCGAGTACTCCCGCTTCTTCAAGCGCCTCTGCCCCGACGCCTTCTCCT
ACGTCCTC - 3'

4b (107 **nukleotidia).**

5'- GCTTGCCTGCAGTTATTATTAGGCGGTGGGGCAGAAGGTGACGCGG
TAGTTGGAGGAGCCGGGGCAGGTGACGGTGGTGGGCTTGTCGAGGAC
GTAGGAGAAGGCGT - 3'

Fig. 3

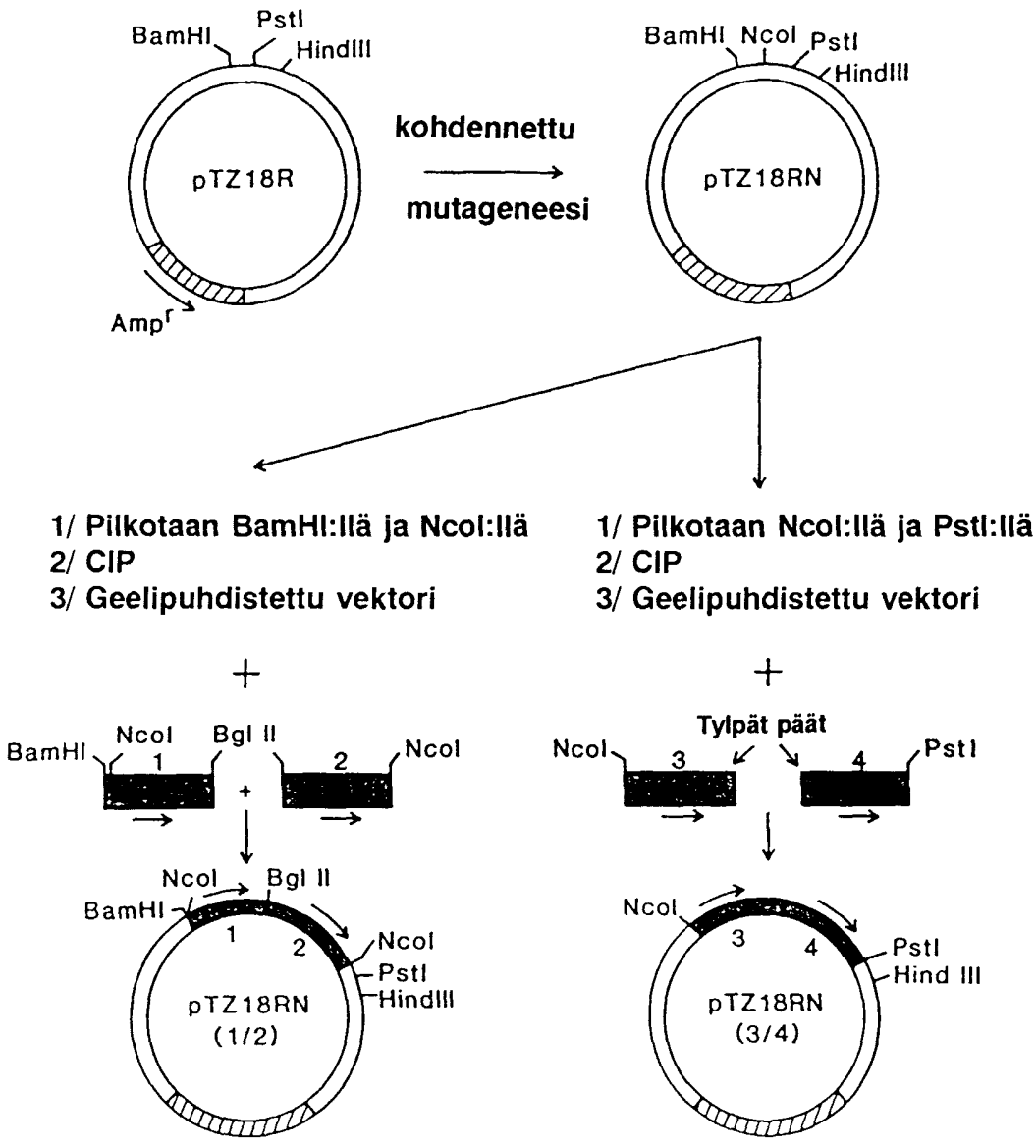

BamHI
PstI
HindIII
pTZ18R
Amp^r
kohdennettu
mutageneesi
BamHI NcoI PstI
HindIII
pTZ18RN
1/ Pilkotaan BamHI:llä ja NcoI:llä
2/ CIP
3/ Geelipuhdistettu vektori
1/ Pilkotaan NcoI:llä ja PstI:llä
2/ CIP
3/ Geelipuhdistettu vektori
+
BamHI
NcoI
Bgl II
1
2
NcoI
+
NcoI
Bgl II
BamHI
1
2
NcoI
PstI
HindIII
pTZ18RN
(1/2)
Tylpät päät
NcoI
3
4
PstI
+
NcoI
3
4
PstI
Hind III
pTZ18RN
(3/4)

Fig. 4

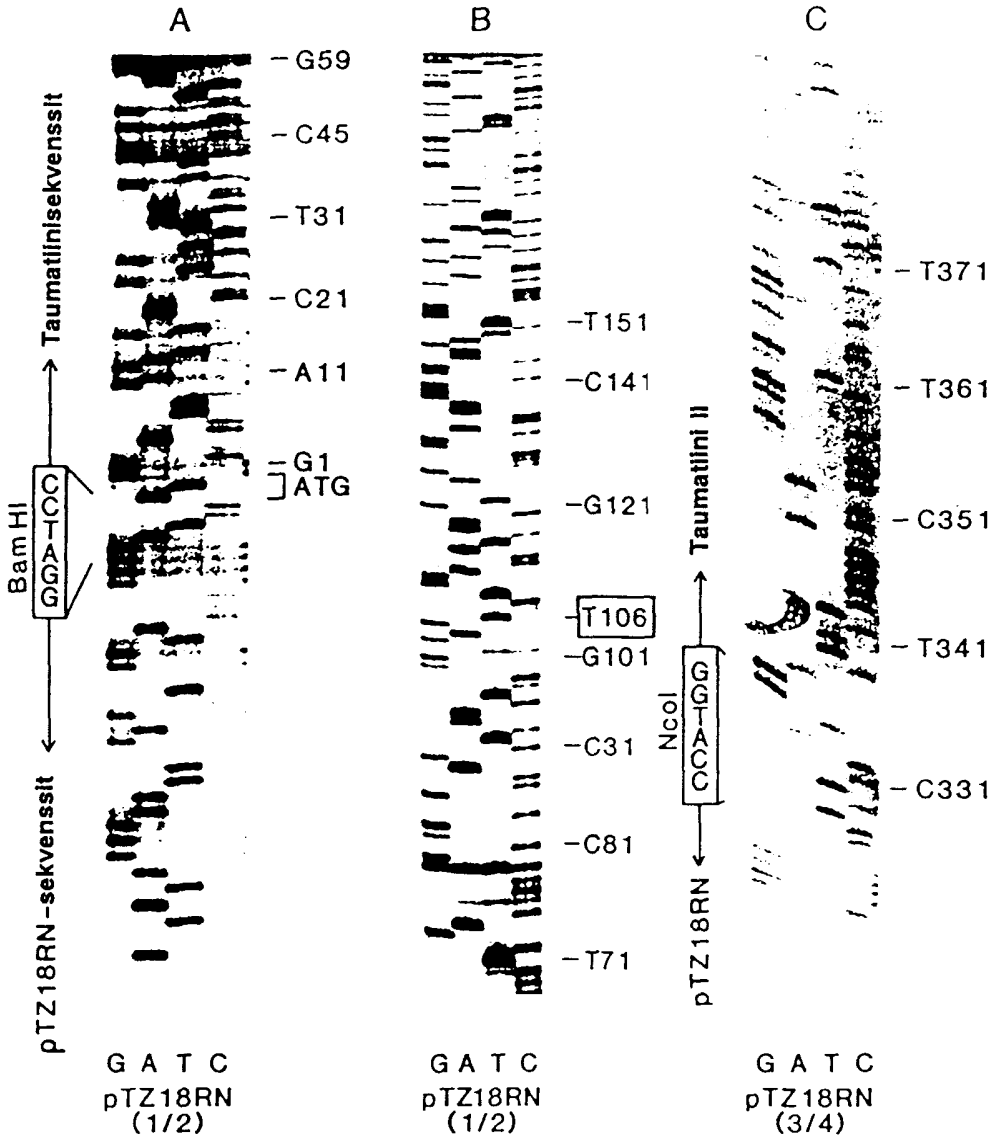

A
B
C
Taumatiinisekvenssit
pTZ18RN-sekvenssit
BamHI
G59
C45
T31
C21
A11
G1
ATG
T151
C141
G121
T106
G101
C31
C81
T71
NcoI
Taumatiini II
pTZ18RN
T371
T361
C351
T341
C331
G A T C
pTZ18RN
(1/2)
G A T C
pTZ18RN
(1/2)
G A T C
pTZ18RN
(3/4)

Fig. 5

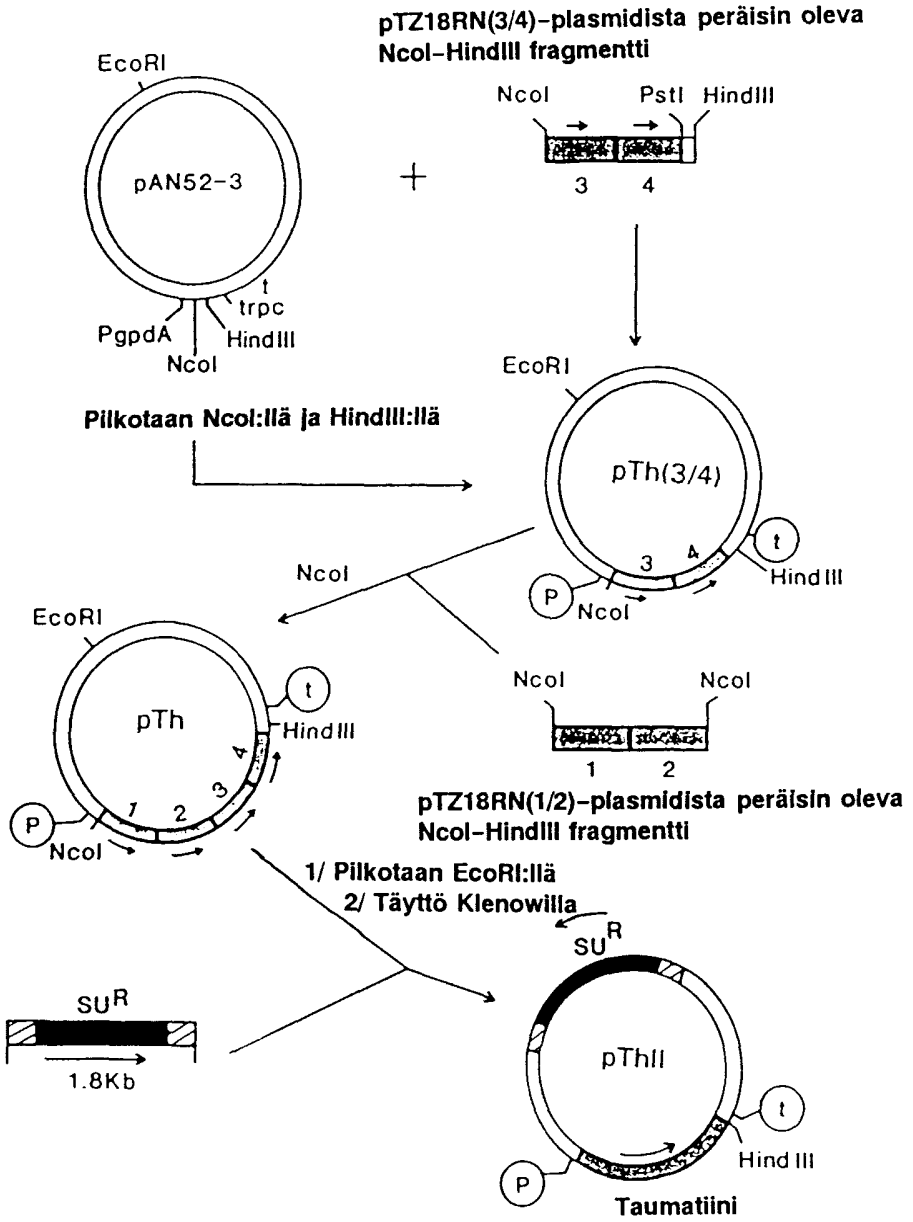

pTZ18RN(3/4)-plasmidista peräisin oleva
NcoI-HindIII fragmentti
EcoRI
pAN52-3
PgpdA
NcoI
trpc
HindIII
NcoI
PstI
HindIII
3
4
Pilkotaan NcoI:llä ja HindIII:llä
EcoRI
pTh(3/4)
3
A
t
HindIII
P
NcoI
NcoI
EcoRI
pTh
t
HindIII
4
3
2
1
P
NcoI
NcoI
NcoI
1
2
pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin oleva
NcoI-HindIII fragmentti
1/ Pilkotaan EcoRI:llä
2/ Täyttö Klenowilla
SUR
1.8Kb
SUR
pThII
t
HindIII
P
Taumatiini

Fig. 6

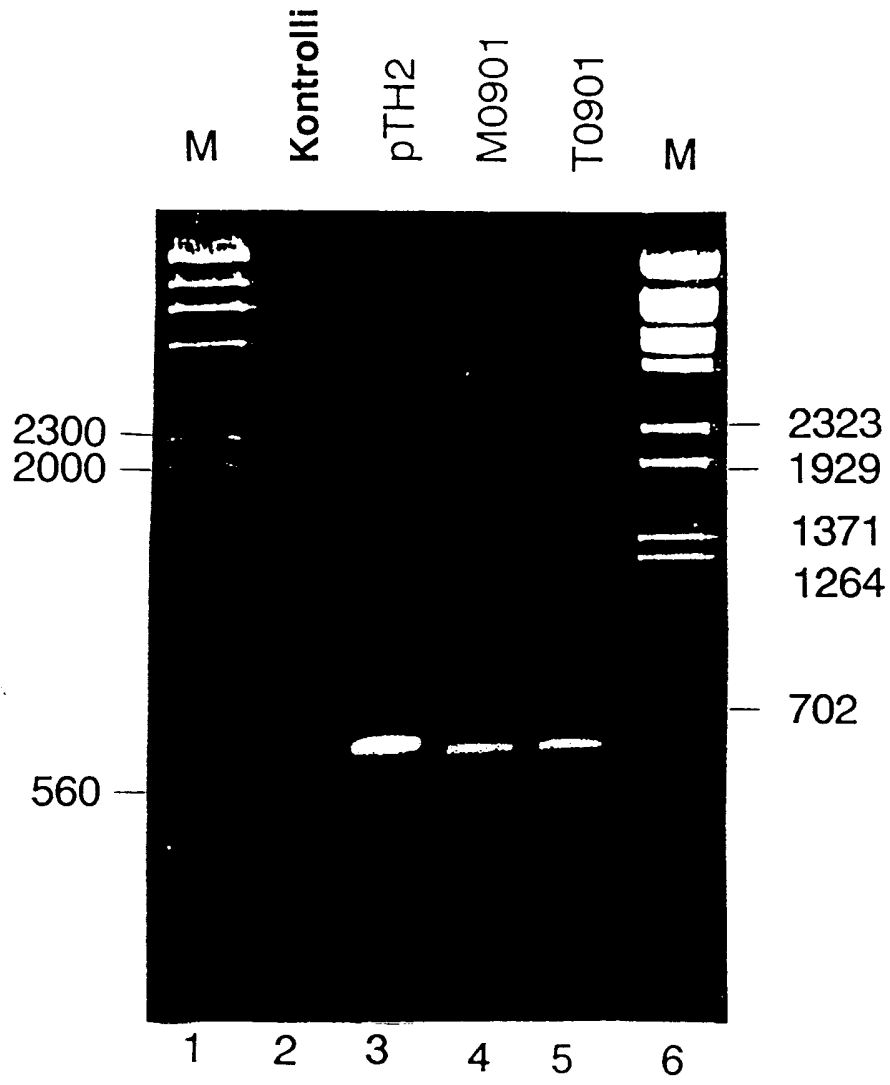

M
Kontrolli
pTH2
M0901
T0901
M
2300
2000
560
2323
1929
1371
1264
702
1
2
3
4
5
6

Fig. 7

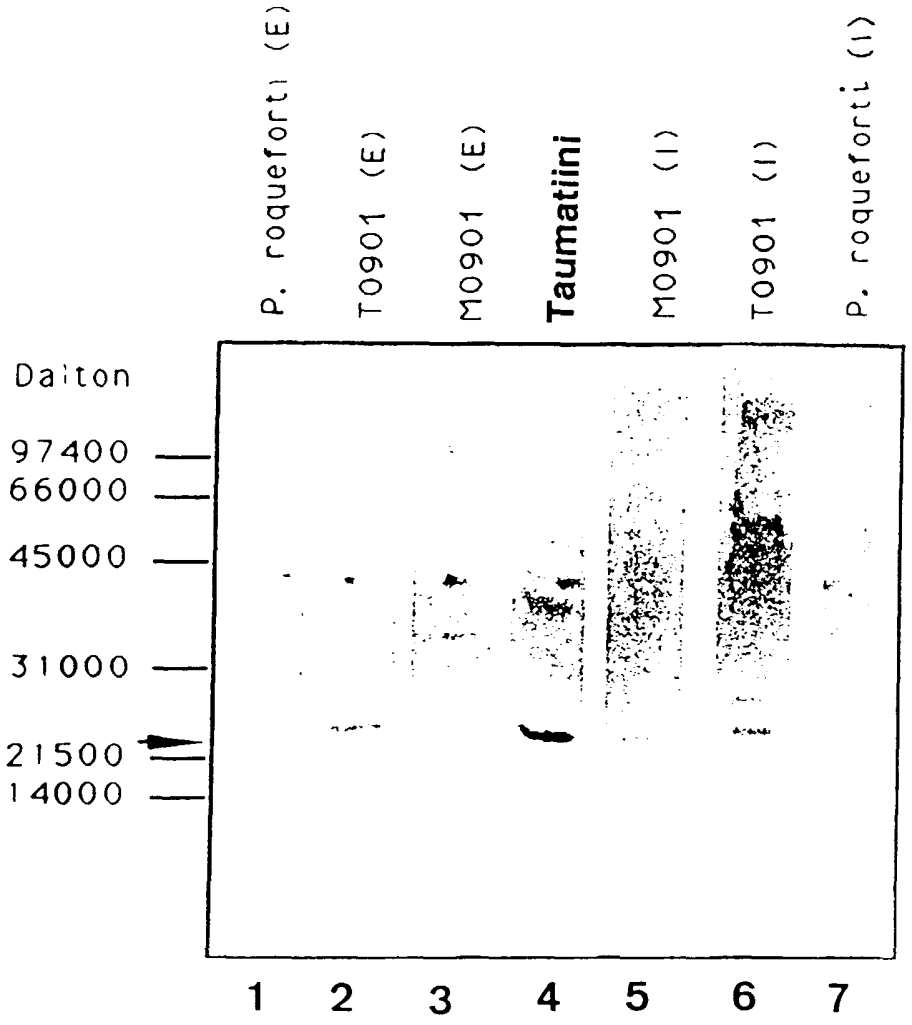

P. roqueforti (E)
T0901 (E)
M0901 (E)
Taumatiini
M0901 (I)
T0901 (I)
P. roqueforti (I)
Dalton
97400
66000
45000
31000
21500
14000
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 8

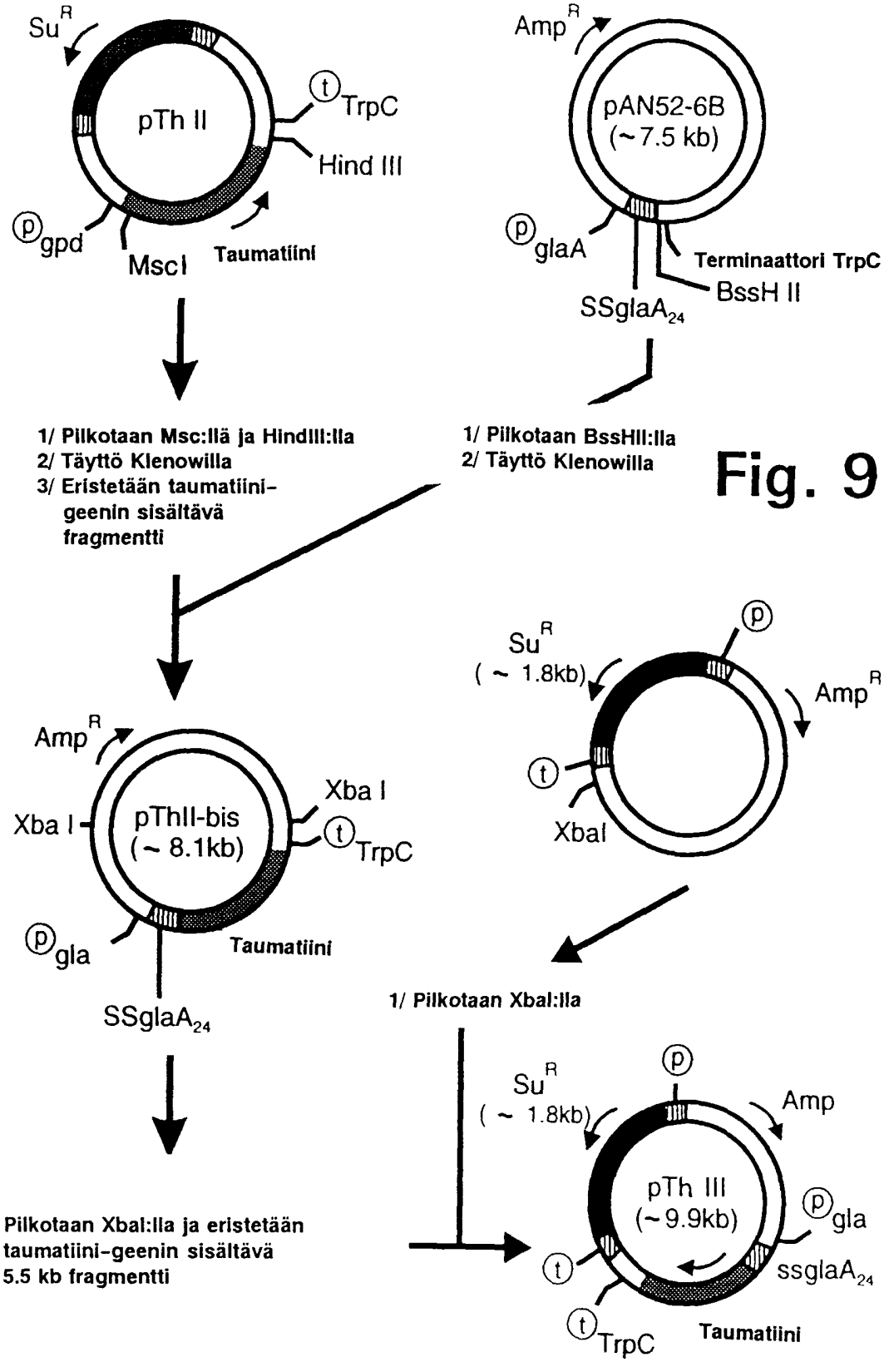

Su R
pTh II
TrpC
Hind III
gpd
MscI
Taumatiini
Amp R
pAN52-6B
(~7.5 kb)
glaA
Terminaattori TrpC
BssH II
SSglaA24
1/ Pilkotaan Msc:llä ja HindIII:lla
2/ Täyttö Klenowilla
3/ Eristetään taumatiini-
geenin sisältävä
fragmentti
1/ Pilkotaan BssHII:lla
2/ Täyttö Klenowilla
Amp R
Xba I
pThII-bis
(~ 8.1kb)
Xba I
TrpC
gla
Taumatiini
SSglaA24
Su R
(~ 1.8kb)
Amp R
XbaI
1/ Pilkotaan XbaI:lla
Su R
(~ 1.8kb)
Amp
pTh III
(~9.9kb)
gla
ssglaA24
TrpC
Taumatiini
Pilkotaan XbaI:lla ja eristetään
taumatiini-geenin sisältävä
5.5 kb fragmentti

Fig. 9

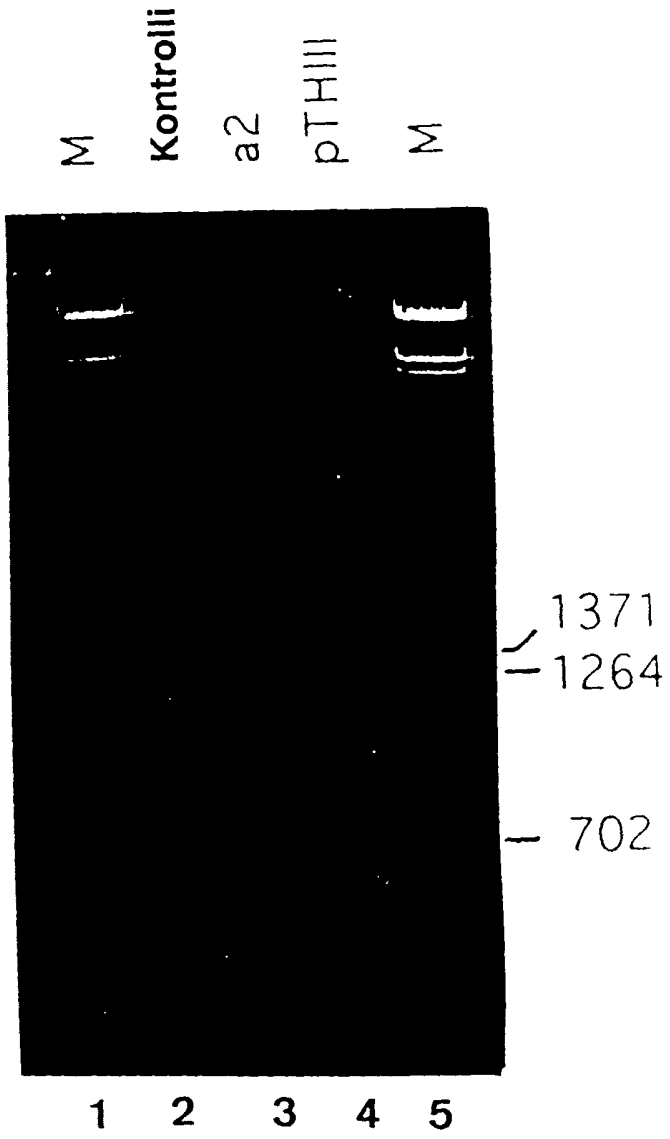


Fig. 10

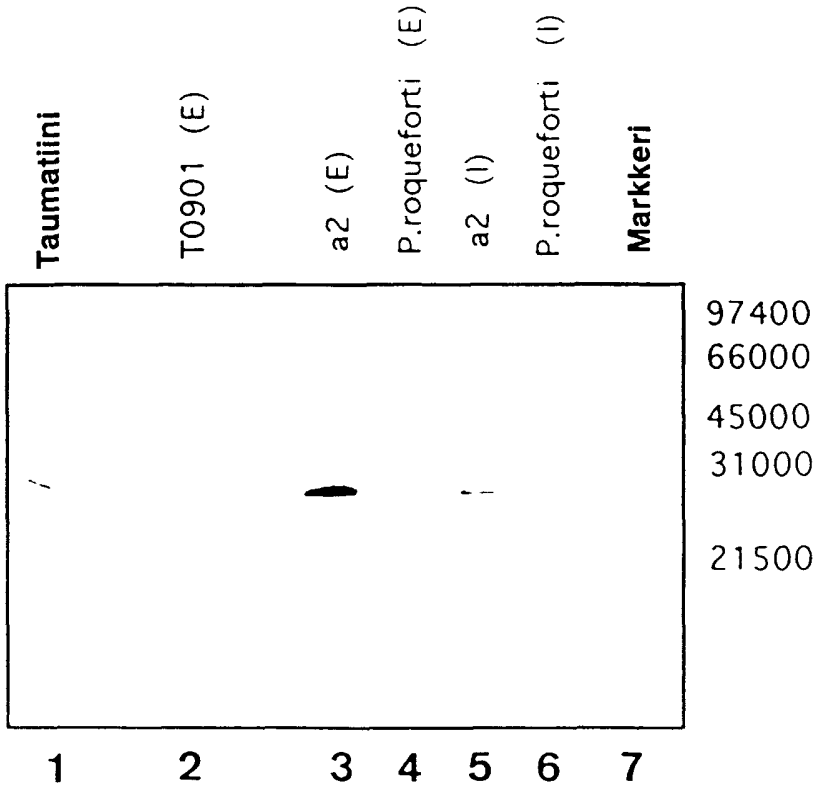

Taumatiini
T0901 (E)
a2 (E)
P.roqueforti (E)
a2 (I)
P.roqueforti (I)
Markkeri
97400
66000
45000
31000
21500
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 11

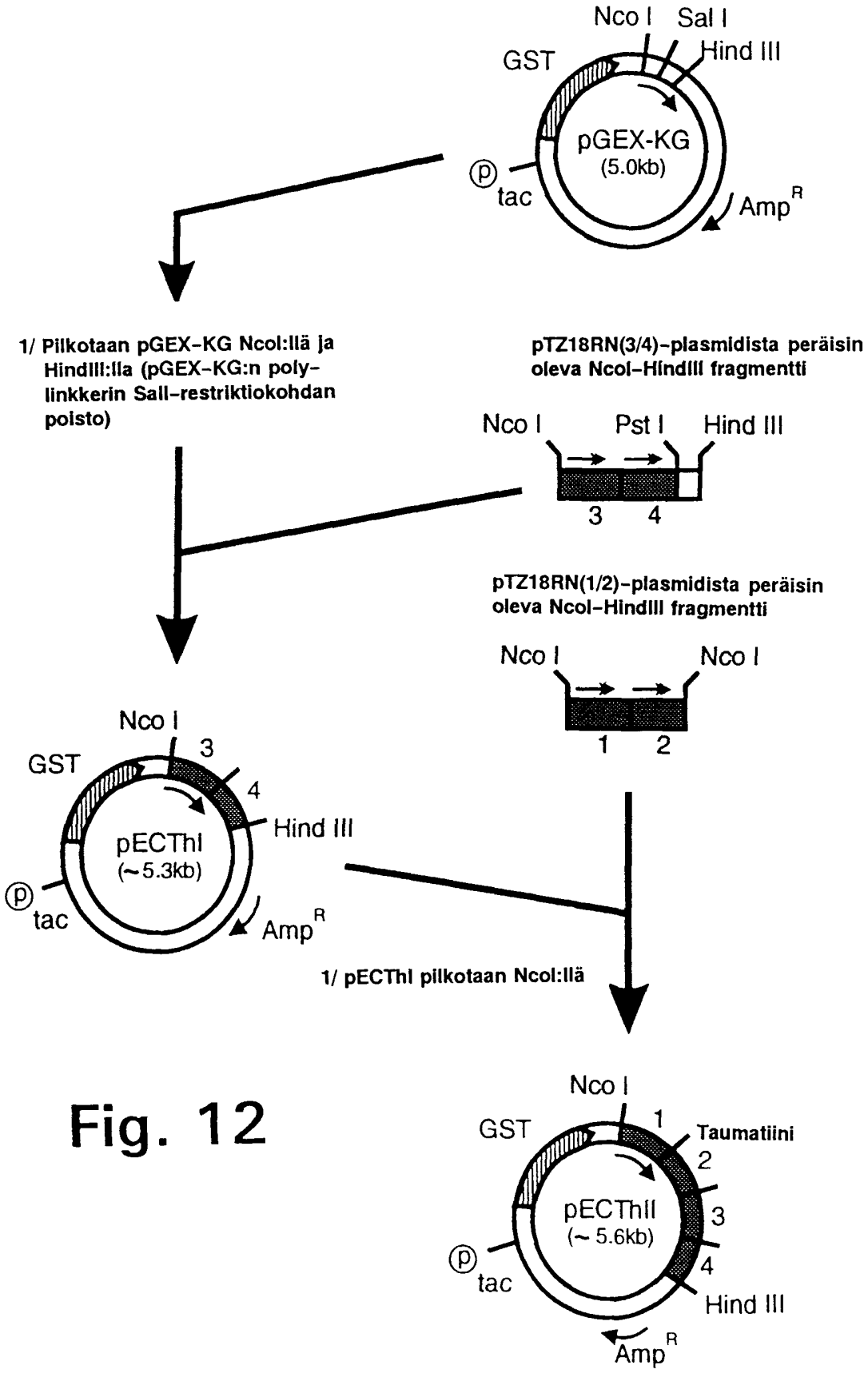

Nco I
Sal I
Hind III
GST
pGEX-KG
(5.0kb)
tac
Amp R
1/ Pilkotaan pGEX-KG NcoI:llä ja HindIII:lla (pGEX-KG:n poly-linkkerin SalI-restriktiokohdan poisto)
pTZ18RN(3/4)-plasmidista peräisin oleva NcoI-HindIII fragmentti
Nco I
Pst I
Hind III
3
4
pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin oleva NcoI-HindIII fragmentti
Nco I
Nco I
1
2
Nco I
3
GST
4
Hind III
pECThI
(~5.3kb)
tac
Amp R
1/ pECThI pilkotaan NcoI:llä
Nco I
1
GST
Taumatiini
2
pECThII
(~ 5.6kb)
3
tac
4
Hind III
Amp R

Fig. 12

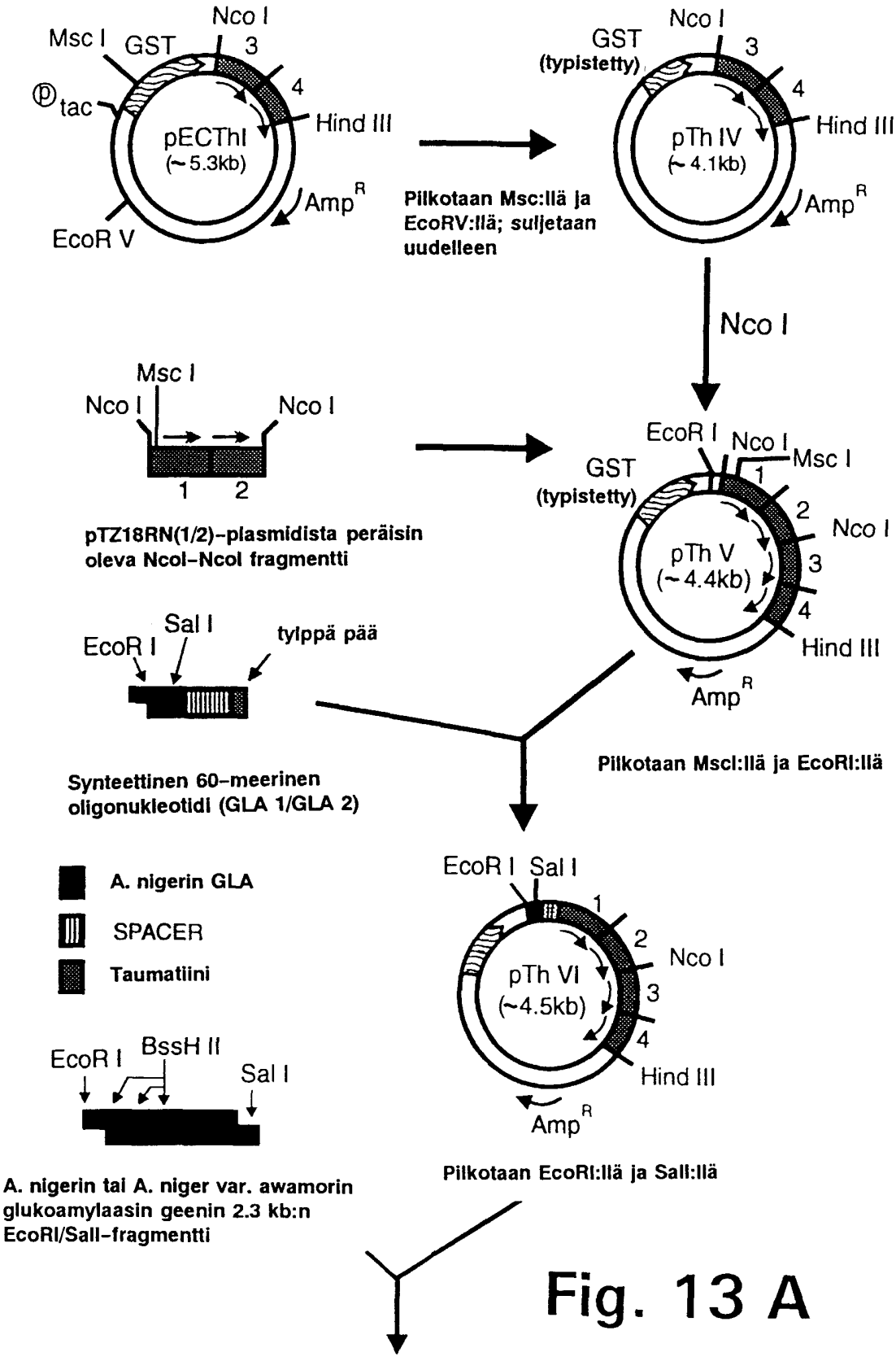
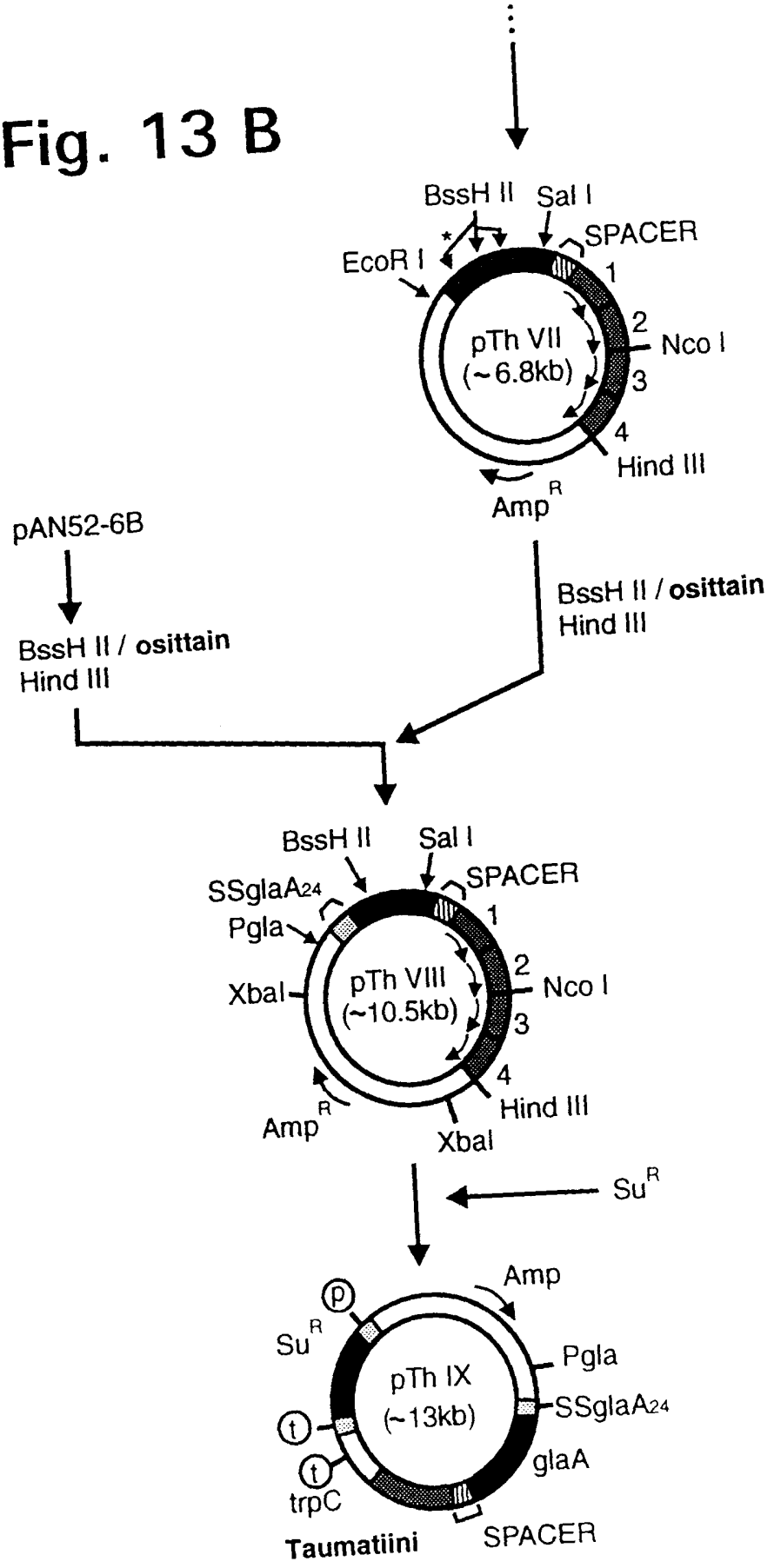

Msc I
GST
Nco I
3
4
tac
Hind III
pECThI
(~5.3kb)
Amp R
EcoR V
Pilkotaan Msc:llä ja EcoRV:llä; suljetaan uudelleen
GST
(typistetty)
Nco I
3
4
Hind III
pTh IV
(~4.1kb)
Amp R
Nco I
Msc I
Nco I
Nco I
1
2
pTZ18RN(1/2)-plasmidista peräisin oleva NcoI-NcoI fragmentti
EcoR I
Nco I
Msc I
GST
(typistetty)
1
2
Nco I
3
4
Hind III
pTh V
(~4.4kb)
Amp R
Sal I
EcoR I
tylppä pää
Synteettinen 60-meerinen oligonukleotidi (GLA 1/GLA 2)
Pilkotaan MscI:llä ja EcoRI:llä
A. nigerin GLA
SPACER
Taumatiini
EcoR I
Sal I
1
2
Nco I
3
4
Hind III
pTh VI
(~4.5kb)
Amp R
Pilkotaan EcoRI:llä ja SalI:llä
EcoR I
BssH II
Sal I
A. nigerin tai A. niger var. awamorin glukoamylaasin geenin 2.3 kb:n EcoRI/SalI-fragmentti

Fig. 13 A

Fig. 13 B


BssH II
Sal I
SPACER
EcoR I
pTh VII
(~6.8kb)
Nco I
Hind III
Amp R
pAN52-6B
BssH II / osittain
Hind III
BssH II / osittain
Hind III
BssH II
Sal I
SPACER
SSglaA24
Pgla
XbaI
pTh VIII
(~10.5kb)
Nco I
Hind III
Amp R
XbaI
Su R
Amp
Su R
Pgla
SSglaA24
pTh IX
(~13kb)
glaA
trpC
SPACER
Taumatiini

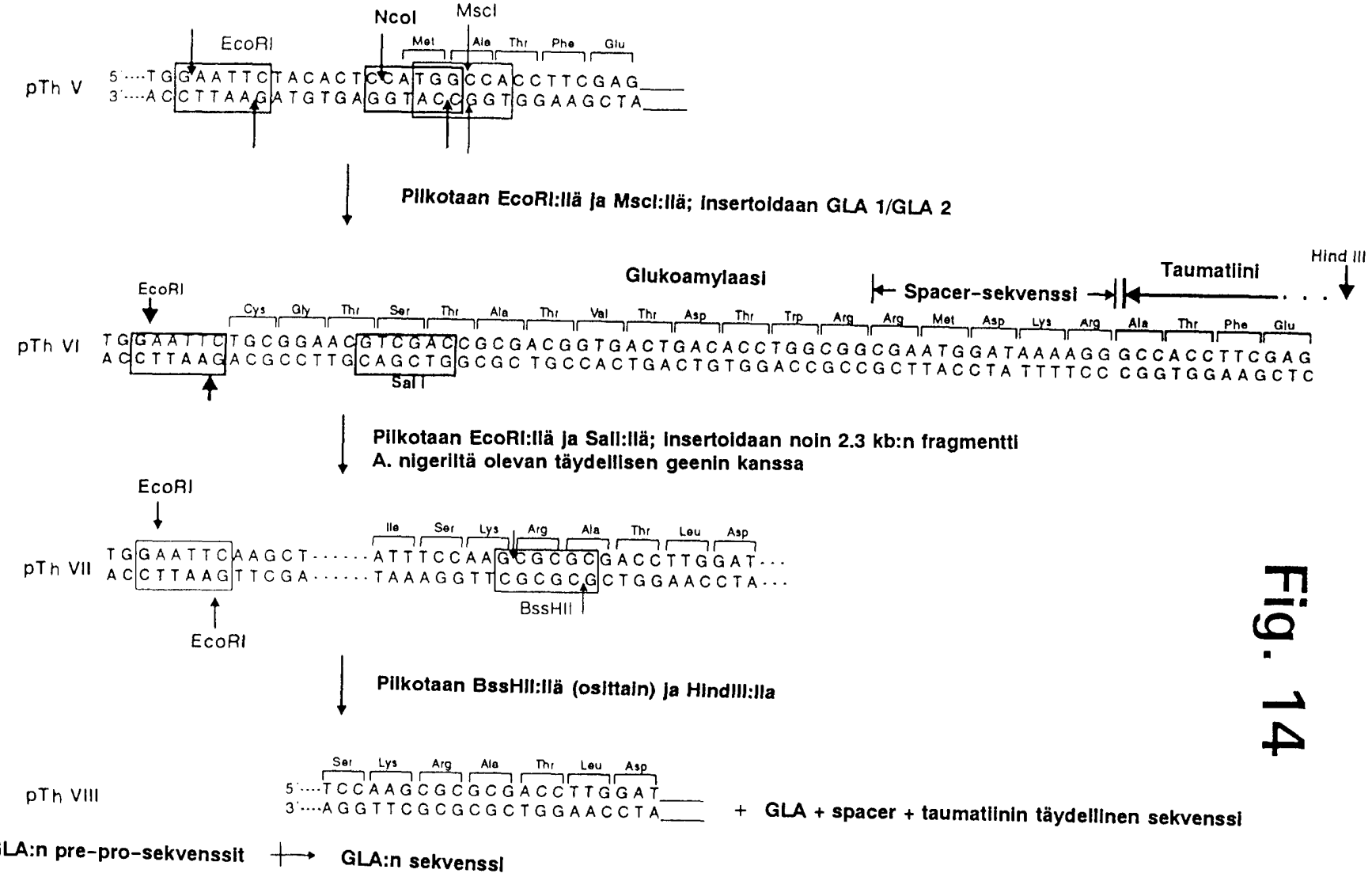

NcoI
MscI
EcoRI
Met
Ala
Thr
Phe
Glu
pTh V
5'....TGGAATTCTACACTCCATGGCCACCTTCGAG____
3'....ACCTTAAGATGTGAGGTACCGGTGGAAGCTA____
Pilkotaan EcoRI:llä ja MscI:llä; insertoidaan GLA 1/GLA 2
Glukoamylaasi
Spacer-sekvenssi
Taumatiini
Hind III
EcoRI
Cys
Gly
Thr
Ser
Thr
Ala
Thr
Val
Thr
Asp
Thr
Trp
Arg
Arg
Met
Asp
Lys
Arg
Ala
Thr
Phe
Glu
pTh VI
TGGAATTCTGCGGAACGTCGACCGCGACGGTGACTGACACCTGGCGGCGAATGGATAAAAGGGCCACCTTCGAG
ACCTTAAGACGCCTTGCAGCTGGCGCTGCCACTGACTGTGGACCGCCGCTTACCTATTTTCCCGGTGGAAGCTC
SalI
Pilkotaan EcoRI:llä ja SalI:llä; insertoidaan noin 2.3 kb:n fragmentti
A. nigeriltä olevan täydellisen geenin kanssa
EcoRI
Ile
Ser
Lys
Arg
Ala
Thr
Leu
Asp
pTh VII
TGGAATTCAAGCT------ATTTCCAAGCGCGCGACCTTGGAT...
ACCTTAAGTTCGA------TAAAGGTTCGCGCGCTGGAACCTA...
BssHII
EcoRI
Pilkotaan BssHII:llä (osittain) ja HindIII:lla
Ser
Lys
Arg
Ala
Thr
Leu
Asp
pTh VIII
5'....TCCAAGCGCGCGACCTTGGAT____
3'....AGGTTCGCGCGCTGGAACCTA____
+ GLA + spacer + taumatiinin täydellinen sekvenssi
GLA:n pre-pro-sekvenssit
GLA:n sekvenssi

Fig. 14