(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321650** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C12N 15/85 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19933276	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1992.03.12 PCT/CA92/00109
(22)	Inng.dag	1993.09.14	(85)	Videreføringsdag	1993.09.14
(24)	Løpedag	1992.03.12	(30)	Prioritet	1991.03.15, US, 669765
(41)	Alm.tilgj	1993.11.11			
(45)	Meddelt	2006.06.19			

(73) Innehaver HSC Research and Development Limited Partnership , 88 Elm Street, Toronto, ON M5G 1X8, CA
Seabridght Corp Ltd , c/o Memorial Univ of NF, P.O. Box 4200, St. John's, NF ALC 5S7, CA

(72) Oppfinner Choy L. Hew, Thornhill, ON, CA
Garth L. Fletcher, St. John's, NF, CA

(74) Fullmektig Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO

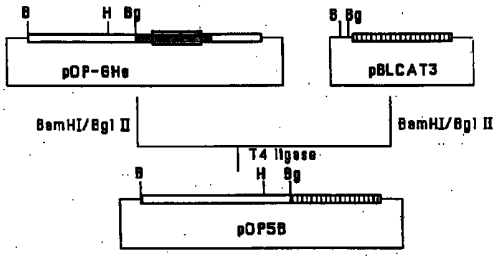
(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for økning av veksthastigheten til salmonid fisk, transgen salmonid fisk, analyse, promotersekvens, chimerisk genkonstruksjon og fiskevert.**

(56) Anførte publikasjoner

J Biol Chem. 1988; 263(24):12049-55 av Hew et al.
Mol Reprod Dev. 1990; 25(1):3-13 av Zhang et al.

(57) Sammendrag

En "generell fiske"-chimer genkonstruksjon som egner seg for genoverføring i kommersielt viktige fiskearter omfatter anti-frysegen(AFP)promotoren koblet til den ønskede gensekvensen som bygges inn i fiskefostre. Den ønskede gensekvensen uttrykkes i den transfekterte fisken og gir en transgen fisk som har egenskapene som svarer til gensekvensen.



OMRÅDE FOR OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen vedrører fremgangsmåte for økning av veksthastigheten til salmonid fisk, transgen salmonid fisk, analyse, promoter sekvens, chimerisk genkonstruksjon og fiskevert.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Det blir henvist til flere artikler i dokumentet for å gi utfyllende informasjon med hensyn til oppfinnelsen. De fullstendige henvisningene for disse referansene er omtalt nedenfor:

Agellon, L. B. og Chen. T. T., (1986) Rainbow trout growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in E. coli. DNA, 5:463-477.

Agellon, L.B., Emery, C.J., Jones, J.M., Davies, S.L., Dingle, A.D. og Chen, T.T. (1988) Promotion of rapid growth of rainbow trout (Salmo gairdneri) by a recombinant fish growth hormone. Can. J. Fish. Auqatic Sci. 45:146-151.

Cantilo, E. og Regalado, T.G. (1942) Investigaciones realizadas con el extracto anterohysofisario en el desarrollo del Salvelinus Fontinalis. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires) 24:323-338.

Chen, T. T., Lin, C. M., Zhu, Z., Gonzalez-Villasenor, L. I., Dunham, R. A. og Powers, D. A. (1990) Gene transfer, expression and inheritance of rainbow trout and human growth hormone genes in carp and loach. s. 127-139 In Transgenic Models in Medicine and Agriculture, Wiley-Liss, Inc., N.Y..

Chen, S. og Evans, G. A. (1990) A simple screening method for transgenic mice using the polymerase chain reaction. Biotechniques, 8:32-33.

Chong, S. S. C., og Vielkind J. R. (1989) Expression and fate of CAT reporter gene microinjected into fertilized medaka (Oryazias latipes) eggs in the form of plasmid DNA, recombinant phage particles and its DNA. Theor. Appl. Genet. 78 : 369-380.

Connelly, S. og Manley, J. L. (1988) A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. Gen. Dev. 2:440-452.
Davies, L. G., Dibuer, M. D. og Battey, J. F. (1986) Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co.

Davies, P. L., Fletchr, G. L. og Hew, C.L. (1989) Fish antifreeze protein genes and their use in transgenic studies. i: Oxford Surveys on Eukaryotic Genes, 6: 85-110. Utgitt av Norman Maclean, publisert av Oxford University Press.

Davies, P. L. og Hew, C. L. (1990) Biochemistry of fish antifreeze proteins. The FASEB Journal, 4:2460-2468.

De Simone, V. og Cortese, R. (1988) The transcriptional regulation of liver-spesific gene expression. s. 51-90. I: Oxford surveys on eukaryotic genes. N. Maclean (Ed.) Oxford University Press, NY.

Du, S. J. og Hew, C. L. (ikke publisert) The isolation and characterization of GH genes from Atlantic salmon and Chinook salmon.

Du, S. J., Gong, Z., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R. and Hew, C. L. (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Bio/Technology, 10:176-181.

Fletcher, G. L., Hew, C. L., Li, X., Haya, K. og Kao, M. H. 1985. Year-round presence of high levels of plasma antifreeze peptides in a temperate fish, ocean pount (Macrozoarces americanus). Can. J. Zool. 63:488-493.

Fletcher, G. L. og Davies, P. L. (1991) Transgenic fish for aquaculture. s. 331-370. I: Genetic Engineering, Principles and methods. J. K. Setlow (Ed.). Plenum Press, NY.

Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Davies, P. L. og Hew, C. L. (1988) Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (Salmo Salar). Can. J. Fisheries and Aquatic Sciences, 45:352-357.

Fletcher, G. L., Idler, D. R., Vaisius, A. og Hew, C. L. (1989) Hormonal regulation of antifreeze protein expression in winter flounder. Fish Physiology and Biochemistry, 7:387-393.

Friedenreich, H. og Schartl, M. (1990) Transient expression directed by homologous and heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells. Nucleic Acids Research, 18:3299-3305.

Gill, J. A., Sumpter, J. P., Donaldson, E. M., Souza, L., Berg, T., Wypych, J. og Langley, K. (1985) Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific salmon, (Oncorhynchus kisutch). Bio/Technology, 3:643-646.

Gong, Z., Fletcher, G. L. og Hew, C. L. (1992) Tissue distribution of antifreeze mRNA. Can. J. Zool. In press.

Gong, Z.Y., Hew, C.L. (ikke publisert) Functional analysis of fish antifreeze gene promoters: presence of silencers.

Gong, Z. Y., Vielkind, J., Hew, C. L., (1991) Functional analysis and temporal expression of fish antifreeze gene promoters in Japanese medaka embryos. Mol. Marine Biol. Biotech. 1:64-72.

Guyomard, R., Chourrout, D., Leroux, C., Houdebine, L. M. og Pourrain, F. (1989) Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilized trout eggs. Biochimies, 71:857-863.

Hammer, R. E., Brinster, R. L. og Palmiter, R. D. (1985) Use of gene transfer to increase animal growth. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:379-388.

Hanley, T. og Merlie, J. P. (1991) Transgene detection in unpurified mouse tail DNA by polymerase chain reaction. BioTechniques. 10:56-56.

Hew, C. L., Slaughter, D., Joshi, S. B. og Fletcher, G. L. (1984) Antifreeze polypeptides from the Newfoundland ocean pout, Macrozoraces americanus: Presence of multiple and compositionally diverse components. J. Comparative Physiology B, 155:81-88.

Hew, C. L., Wang, N. C., Joshi, S., Fletcher, G.L., Scott, G. K., Hayes, P.H., Buettner, B. og Davies, P.L. (1988) Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the Ocean Pout (Macrozoares americanus). J. Biol. Chem., 263:12049-12055

Hew, C. L., Trinh, K. Y., Du, S. J., og Song, S. D. (1989) Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones. Fish Physiology and Biochemistry, 7:375-380.

Hew. C. L. (1989) Transgenic fish: present status and future directions. Fish Physiol. Bioch. 7:409-413.

Hoar, W. S. (1988) The physiology of smolting salmonids in Fish Physiology, vol. 11:275-343 utgitt av Hoar, W. S. og Randall, D. J. Academic Press.

Jankowski, J. M. og Dixon, G. H. (1987) The GC box as a silencer. Bioscience reports 7:955963.

Kawauchi, H. Moriyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K. Shirahata, K. Kubota, J. og Hirano, T. (1986) Isolation and charcterization of Chum salmon growth hormone. Archives of Biochemistry and Biophysics, 244:542-552.

Li, X., Trinh, K., Hew, C. L., Buettner, B., Baenziger, J. og Davies, P. L. (1985) Structure of an antifreeze polypeptide and its precursor from the ocean pout, Macrozoarces americanus. J. Biol. Chem. 260:12904-12909.

Liu, Z., Moav, B., Faraz, A. J., Guise, K. S., Kapuscinski, A. R. og Hackett, P. B. 1990a. Functional analysis of elements affecting expression of the β-actin gene of carp. Mol. Cell. Biol. 10:3432-3440.

Liu, Z., Moav, B., Faras, A. J., Guise, K. S., Kapuscinski, A. R. og Hackett, P. B. (1990b) Development of expression vectors for transgenic fish. Bio/Technology 8:1268-1272.

Luckow, B. og Schutz, G. (1987) CAT construction with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements. Nucleic Acids Res., 15:5490.

McHale, R. H., Stapleton, P. M., og Bergquist, P. L. (1991) Rapid preparation of blood and tissue samples for polymerase chain reaction. BioTechniques. 10:20-22.

Maclean, N., Penman, D. og Zhu, Z. (1987) Introduction of novel genes into fish. Bio/Technology 5:257-261.

Maclean, N. og Penman, D. (1990) The application of gene manipulation to aquaculture. Aquaculture 85:1-20.

Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. og Evans, R. M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 300:611-615.

Proudfoot, N. J. (1989) How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. TIBS. 14:105-1 10.

Rokkones, E., Alestrom, P., Skjervold, H. og Gautvik, K. M. (1989) Microinjection and expression of a mouse metallothionein human growth hormone fusion gene in fertilized salmonid eggs. J. Comp. Physiol. B., 158:751-758.

Schorpp, M., Kugler, W., Wagner, U. og Ryffel, G. U. 1988. Hepatocyte-specific promoter element HPI of the xenopus albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. J. Mol. Biol. 202:307-320.

Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S., og Kawauchi, H. (1985) Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:4306-4310.

Shears, M. A., Fletcher, G. L. Hew, C. L. Gauthier, S. og Davies, P. L. (1991) Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (Salmo salar). MOl. Marine Biol. Biotech. 1:58-63.

Tuckmann, H. (1936) Action de l'hypophyse sur la morphogenese et la differentiation sexuselle de Girardinus Guppii. C. R. Soc. Biol. 122:162-164

Vielkind, J., Haas-Andela, H., Vielkind, U. og Anders, F. (1982) The induction of a spesific pigment cell type by total genomic DNA injected into the neural crest region of fish embryos of genus (Xiphophorus). Mol. Gen. Genet. 185 : 379-389.

Vize, P. D., Michalska, A. E., Ashman, R., LLoyd, B., Stone, B. A., Quinn, P., Wells, J. R. E. og Seamark, R. F. (1988) Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. J. Cell Science, 90 : 295-300.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. og Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the m13mp18 og pUC19 vectors. Gene 33:103-119.

Zafarullah, M., Bonham, K. og Gedamu, L. (1988) Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and charcterization of its metal-responsive region. Mol. Cell Biol., 8:4469-4476.

Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalezvillasenor, L. I., Lin, C. M., Dunham, R. og Chen, T. T. og Powers, D. A. (1990) Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GHcDNA in the common carp, Cyprinus carpio (Linnaeus). Molecular Reproduction and Development, 25:3-13.

Zhous, J. A., McIndoe, A, Davies, H., Sun, X. Y. og Crawford, L. (1991) The induction of cytotoxic T-lymphocyte precursor cells by recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus type 16 L1. Virology 181:203-210.

Zhu, Z., Liu., G., He, L. og Chen, S. (1985) Novel gene transfer into-fertilized eggs of goldfish (Carassius auratus L. 1758). Z. Angew. Ichthyol., 1:31-34.

Zhu, Z., Xu, K., Li, G. Xie, Y. og He, L. (1986) Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach (Misgurnus anguillicaudatus). Kexue Tongbao, 31:988-990.

En rekke forsøk og suksesser er blitt beskrevet for å utvikle transgen fisk og andre dyr. Veksthormon har vært av spesiell interesse i tidligere undersøkelser. Veksthormon er et enkeltkjedet polypeptidhormon som spiller en viktig rolle i reguleringen av somatisk vekst og utvikling i dyr. Mange forsøk er blitt gjort for å øke fiskeveksten ved hjelp av veksthormon. Disse omfatter tilførsel av hypofyseekstrakter (Tuckmann 1936, Cantilo og Regalado 1940), injeksjon eller implantasjon av renset rekombinant-fremstilt veksthormon (Gill et al., 1985, Sekine et al. 1985, Kawauchi et al. 1986, Agellon et al. 1988). Alle disse resultatene viser klart at veksthormon alene er effektivt når det gjelder å stimulere fiskeveksten. Alle studiene har imidlertid begrenset anvendelse i fiskeoppdrett, og en hovedulempe er at ikke fenotypen arves.

Genoverføringsteknikk har blitt en ny og effektiv fremgangsmetode for å manipulere de genetiske og fenotypiske egenskapene til både dyr og planter. Ulike rapporter omtaler fremstillingen av transgen fisk. Det første transgene studium på fisk ble omtalt av Vielkind et al. (1982). Disse forskerne injiserte sverdhale tumorgener i Platy-fisken, og fant at de injiserte sverdhale-Tu-genene kunne starte T-melanoforstimulering i Tu-fri Platy-fisk. I 1985 og 1986, rapporterte Zhu et al. fremstillingen av transgen fisk ved hjelp av veksthormongenoverføring. Ved bruk av en metallotioninpromoter koblet til et humant veksthormonstrukturgen, fremstilte de på en vellykket måte transgen ferskvannsfisk (Cobitis Barbatula), gullfisk og sølvkarpe. I gjennomsnitt var den transgene fisken 1 til 3 ganger større enn kontrollen. Siden den gang er flere rapporter som benytter lignende genkonstruksjoner blitt publisert (Rokkones et al. 1989, Guyomard et al. 1989, Chen et al. 1990). Videre arbeid er også blitt omtalt i Maclean et al 1987; Hew 1989; Maclean og Penman 1990 og Fletcher og Davies 1991. De tidligere veksthormongenoverførings-studiene på fisk ble utført ved bruk av pattedyrs metallotioninpromotere eller viruspromotere og menneske- eller rotteveksthormongener. (Zhu et al. 1986, Rokkones et al. 1989, Guyomard et al. 1989 og Chen et al. 1990). To problemer er forbundet med bruk av disse heterologe genkonstruksjonene. For det første kan kanskje den transgene fisken som fremstilles ved bruk av pattedyrveksthormongener ikke være passende eller aksepterbare for menneskeføde. For det andre er det rapportert av Friedenreich og Schartl (1990) at pattedyrveksthormongenet ikke kunne spleises riktig i fiskecellelinjer in vitro, og de kunne ikke påvise ekspresjon av veksthormongenet i fiskecellene. Dette kan forklare hvorfor Rokkones et al. (1989) og Guyomard et al (1989) ikke kunne observere hurtigere vekst i deres transgene fisk ved bruk av pattedyrmetallotionin-pattedyrveksthormonfusjoner eller virus-promoter-pattedyrveksthormongener. Zhang et al. (1990) og Chen et al. (1990) benyttet regnbueørretveksthormongenet for genoverføring i karpe og Cobitis Barbatula, med bruk av retroviruspromoteren. Imidlertid var den transgene fisken i disse undersøkelsene kun 20% større enn kontrollene, og ørretveksthormongenet som ble benyttet manglet signalsekvensen som var nødvendig for adekvat sekresjon og veksthormonvirkning.

De fleste, hvis ikke alle av disse studiene ble utført ved bruk av enten pattedyrveksthormon eller pattedyrgen og viruspromotere. For å være aksepterbare i

fiskeoppdrett, burde promoter(ene) og gen(ene) som benyttes i transgen fisk stamme fortrinnsvis fra fiske proteingener for å unngå muligheten av potensiell helserisiko. Videre, vil produksjonen av en stamme av hurtigere voksende fisk i en økonomisk viktig art slik som laks med en "generell fiske"-genkonstruksjon være fordelaktig for fiskeoppdrett.

Nylig er en "generell fiske"-ekspresjonsvektor som benytter karpe beta-actinpromoteren blitt publisert (Liu et al., 1990b). Ett problem som er av bekymring når det gjelder bruk av denne vektoren er at vektoren benytter polyadenyleringssignalet "chinook"-laksevekstthormon cDNA (Hew et al., 1989) som transkripsjonsterminieringssignalet. Imidlertid krever transkripsjonsterminering både et funksjonelt polyadenyleringssignal og et GT-rikt nedstrømselement (Connelly og Manely, 1988; Proudfoot, 1989). Derfor er polyadenyleringssignalet til veksthormon cDNA sannsynligvis utilstrekkelig for å fungere som et transkripsjonsterminieringssignal. For det andre, blir beta-actinpromoteren uttrykt i flesteparten hvis ikke alle vev, eller mangler vevs-spesifisitet.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for økning av veksthastigheten til salmonid fisk,
kjennetegnet ved

a) innføring i kimlinjen til salmonid fisk av et gen som koder for et salmonid veksthormon operabelt knyttet til en type III AFP-promoter, hvori promoteren erholdes fra en fisk valgt fra gruppen bestående av skjeggtorsk, gråsteinbitt, storulke og vinterflyndre; og

b) oppdrett av fisken under betingelser som tillater en øket veksthastighet av fisken.

Foreliggende oppfinnelse, omfatter videre transgen salmonid fisk, kjennetegnet ved at den har inkorporert i sitt genom en chimerisk genkonstruksjon hvor nevnte chimeriske genkonstruksjon omfatter:

en type III AFP promoter; og

en fisk veksthormon gensekvens.

Fremgangsmåten er videre kjennetegnet ved at promoteren er fra skjeggtorsk, og veksthormonet er det endogene hormon for den salmonide fisk.

Den salmonide fisken velges fra gruppen bestående av: Atlantisk laks og Chinook laks.

Ovennevnte type III AFP promoter er fortrinnsvis oppnådd fra en fisk valgt fra gruppen bestående av skjeggtorsk, gråsteinbitt, storulke og vinterflyndre.

Den transgene fisken er videre kjennetegnet ved at nevnte chimere genkonstruksjon omfatter en kombinert promoter/transkripsjonell terminal sekvens, som inkluderer en 5' utranslatert sekvens mellom nevnte promoter og transkripsjonelle terminale sekvens og hvori nevnte kombinerte sekvens har sekvensen ifølge Tabell V med unike restriksjonseter til Bg1 II ved basepar posisjon 2116 og til HpaI ved basepar posisjon 2188.

Oppfinnelsen omfatter videre analyse for å bestemme en transgen fisk ifølge et hvilket som helst av foregående krav, kjennetegnet ved at den omfatter følgende trinn:

I. amplifisering ved DNA sekvens amplifiseringsteknikker en del av fiske genomet som har en DNA sekvens som er en del av promoter sekvensen ifølge Tabell V; og

II. detektering av tilstedeværelse av den amplifiserte delen for å indikere en transgen fisk.

Ovennevnte analyse ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter videre at nevnte primere er valgt fra gruppen bestående av :

Primer A + 27 5' –GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC-3' + 47 sens tråd;

Primer B + 861 5' –ATCTCAACAGTCTCCACAGGT-3' + 881 antisens tråd;

Primer C + 161 5' –TCTGCTGATGCCAGTCTTACT-3' + 181 sens tråd; og

Primer D + 339 5' –ACAGAAGTCCAGCAGGAATAT-3' + 359 antisens tråd.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre promoter sekvens/transkripsjonell terminal sekvens som inkluderer en 5' utranslatert sekvens mellom nevnte promoter og terminale sekvenser, kjennetegnet ved at nevnte kombinerte sekvenser har sekvensen ifølge Tabell V med unike restriksjonsseter til Bg1 II ved basepar posisjon 2116 og til HpaI ved basepar posisjon 2188.

Det er videre beskrevet chimerisk genkonstruksjon, kjennetegnet ved at den omfatter en promoter som har DNA sekvensen ifølge Tabell V fra 5' ved basepar

posisjon 1 til basepar posisjon 2115.

Oppfinnelsen vedrører også chimerisk genkonstruksjon, kjennetegnet ved at den omfatter en transkripsjonell terminal sekvens hvori nevnte sekvens har DNA sekvensen ifølge Tabell V fra basepar posisjon 2188 til 3' ved basepar posisjon 3350.

Det er videre beskrevet fiskevert av salmonid fisk, kjennetegnet ved at den er transformert med et chimerisk gen ifølge kravene 19 eller 20.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1. (A). Konstruksjon av pOP-CAT for forbigående CAT-analyse i salmonidcellelinjer og japanske medakafostre. Plasmidet er betegnet pOP5B. (B). Konstruksjon av "generelle fiske"-chimere gen (pOP-GHe) for genoverføring;

Figur 2. Strategi med hensyn på PCR-analyse. Tre sett "primere" ble benyttet for å påvise tilstedeværelsen av transgenet. Avstanden mellom primerne er 813 bp for primer A og B, 335 bp for primerne A og D, 119 bp for primerne C og D (sekvenseringsstudier ga mer raffinerte data når det gjelder distansen mellom primerne; dvs., 855 bp for primer A og B; 333 bp for primer A og D; 199 bp for primerne C og D);

Figur 3. Analyse av OP-AFP-promoteraktiviteten i regnbueørret hepatomceller ved hjelp av CAT-analyse. "Ocean pount"-CAT-plasmid er pOP5B;

Figur 4. Tidsanalyse av CAT-utvikling i fostre som er injisert med OP-CAT (pOP%B). En gruppe på 5 fostre ble benyttet for CAT-analyse på 1 dag, 2 dag, 4 dag, 6 dag, 8 dag og 11 dags-fostre. Individuelle larver ble benyttet for CAT-analysen i klekkede medaka (én dag etter klekking). Fostrene som var injisert med pBLCAT3 ble benyttet som negativ kontroll;

Figur 5. Undersøkelse med tanke på transgen laks ved hjelp av PCR med bruk av primerne A/B. (A). Analyse av PCR forøkede produkter ved hjelp av agarosegelelektroforese.
(B). Southern blot analyse av PCR-produktet ved bruk av GH spesifikk probe E;

Figur 6. (A). Bekreftelse av den transgene laksen ved hjelp av PCR ved bruk av primerne C/D. (B). Studie av integriteten til transgenet ved hjelp av PCR ved bruk av primerne A/B;

Figur 7. Størrelsesfordeling av transgen laks og ikke-transgen laks;

Figur 8. Transgen laks versus ikke-transgen laks;

Figur 9. Analyse av opAFP-genpromoteraktiviteten ved hjelp av CAT-analyse i to salmonidcellelinjer, som omfatter regnebueørret heptaomcellelinje RTH-149 og "chinook" lakseembryonisk cellelinje CHSE-214. De acetylerte og ikke-acetylerte kloramfenikoler, som er antydet ved AC og C til høyre, ble adskilt ved hjelp av tynnsjiktskromatografi, etterfulgt av autoradiografi;

Figur 10. CAT-dannelse i forskjellige stadier av fostre som er injisert med opAFT-CAT. Individuelle fostre ble benyttet for hver CAT-analyse. De acetylerte og ikke-acetylerte kloramfenikolene er antydet som AC og C til høyre. Tidspunktene som er analysert var dag 1, dag 2, dag 6, dag 9 og dag 11;

Figur 11 er et diagram av opAFP-V.  "ocean pout" AFP-genpromoter og gen 3'-flankerende sekvenser;  "ocean pout" AFP gen 5'-ikketranslatert sekvens;  "ocean pout" AFP gen 3'-ikketranslatert sekvens; _____, pUC plasmid DNA-sekvens og , Ampicillin resistensgen. TATA-boks, poly(A)signal (AATAAA) og det antatte transkripsjonstermineringssignal (TTTTTCT) er vist. Restriksjonsseter er: A, AatII; Ba, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; H, HindIII; Hp, HpaI; K, KpnI; Sac, SacI; Sal, SalI og Sm, SmaI;

Figur 12. Transgen laks (#34, 33 g) og ikketransgene søsken (gjennomsnittsvekt 5-7 g); og

Figur 13. Størrelse-frekvensfordeling av laks.
(A) fisk (200) ble veid i oktober 1990 og 50 ble merket og blodprøver tatt for DNA-analyse (fylte stolper). Tilstedeværelsen av individuelle transgene fisker er vist ved T. (T) viser en transgen fisk som ble funnet å være mulig ved utelukkende skala DNA-analyse. (B) All fisk (484) i akvariet ble veid i januar 1991 og blodprøver tatt for DNA-analyse. T viser tilstedeværelsen av transgen laks. (T) viser en transgen fisk som ble funnet å være positiv kun ved hjelp av skala DNA-analyse.

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMENE

Den foreliggende oppfinnelse omtaler vellykket fremstilling av transgen fisk med dramatisk ekspresjon av den ønskede genetiske egenskapen. Et chimert gen, pOP-GHe laget ved bruk av antifrysepromoter bundet til "chinook" lakse GH cDNA-

klon. Denne genkonstruksjon pOP-GHe ble mikroinjisert i befruktede, ikke-aktiverte Atlanterhavslakseegg ved hjelp av mikropylene, ifølge teknikken beskrevet i søkernes samtidig innsendte USA patentsøknad S.N. 278.463 datert 1. desember 1988, og De Forente Staters forlengelsessøknad S.N. 805.948 datert 12. desember 1991 og innholdet i disse er herved inntatt som referanse. Transgen Atlanterhavslaks som bærer transgenet ble fremstilt med en innebyggingsfrekvens på minst 2%. Tilstedeværelsen av transgen ble påvist ved hjelp av polymerasekjedereaksjon ved bruk av spesifikk oligonukleotid-"primere". Disse transgene fiskene viste dramatisk økning i sin vekt og veksthastighet. Ved 8 måneders alder var den gjennomsnittlige økningen i den transgene fisken 4 ganger og den største transgene fisken var 8 ganger større enn ikke-transgene kontroller. Disse studiene viste at AFP-promoteren var effektiv når det gjelder å fremstille store transgene laks og burde være anvendbare i mange forskjellige fiskearter. Ved bruk av fiskeveksthormon med promoter fra denne oppfinnelse vil resultatet med hensyn til transgen fisk være opp til 8 ganger større enn kontrollene. Dette er den største økningen som er blitt rapportert til dags dato for transgen fisk. Sammenlignet med 2 gangers økning i transgene mus (Palmiter et al. 1982) og transgen gris (Vize et al. 1988), viste disse studiene at vekst av transgen laks er meget mer uttalt.

Resultatene som presenteres senere i dette dokumentet viser videre til en vellykket produksjon av transgen laks ved å bruke en DNA-konstruksjon som stammer fra fiskegener. I ett område av vår utvikling av oppfinnelsen, ble skjeggtorsk (ocean pout) antifrysegenpromoter og transkripsjonstermineringssignal koblet til Stillehavslaks veksthormongen, begge stammer fra fiskegener, hvilket omgår problemene som er forbundet med anvendelse av pattedyr eller virusgener for genoverføring i kommersielt viktig fisk.

De følgende forkortelsene benyttes:

opAFP"Ocean pout" antifryseproteiner.

opAFP-CATEt chimert plasmid som består av "ocean pout" antifryseproteinpromoteren koblet til bakterielle kloramfenikolacetyltransferasen. (Opprinnelig ble dette produkt referert til som "pOP-CAT". Under den videre utvikling, valgte vi å identifisere det som "opAFP-CAT").

opAFP-GHcEt "generelt fiske"-chimert gen som består av "ocean pount"-antifryseproteinpromoteren og 3' ikke-translaterte sekvenser koblet til fiskeveksthormon-cDNA-genet.
(Opprinnelig ble dette produkt omtalt som "pOP-GHe". Under den videre utvikling, valgte vi å identifisere det som "opAFP-GHc").

opAFP-VEn "generell fiske"-genkassett basert på anvendelsen av "ocean pout"-antifrysepromoterer og 3'-ikke-translaterte sekvenser.

2kb BamHI - BglII-fragmentet til OP-AFP karakteristisk for promoteren ble vist ved hjelp av sekvenseringsstudier å ha en lengde på 2,1 kb. 3'-sekvens HpaI - HindIII-fragmentet ble vist å ha en lengde på 1,1 kb.

"Ocean pout" AFP er et medlem av typen 3 AFP (Davies og Hew 1990). Det har omtrent 150 genkopier (Hew et al. 1988, Davies et al. 1989). Proteinet og genomstrukturen til dette AFP er blitt godt karakterisert av oss (Hew et al. 1984, 1988, Li et al. 1985, 1989). Mer nylig er dets promotersekvenser undersøkt i både salmonidcellelinjene og japansk medakafostre (Gong og Hew ikke publisert, Gong et al. 1991. Se tabell II). "Ocean pout" AFP-genet uttrykkes hovedsakelig i leverceller (Gong et al. 1991), alle disse manuskriptene er inntatt herved som referanse.

Til forskjell fra type 1, alanin-rik AFP fra vinterflyndre som syntetiseres utelukkende om vinteren, er "ocean pout" AFP tilstede hele året, skjønt i høyere konsentrasjon under vintermånedene (Fletcher et al. 1989). De følgende resultatene viser at OP-AFP-promoteren er en meget effektiv promoter for å stimulere CAT og veksthormongen eller andre ønskede sammenlignbare gener i fisk, slik som Atlanterhavslaks. Skjønt der er ikke noe antifryse-(AFP)-gen i salmonider eller medakagenomene, er det sannsynlig i lys av den heldige anvendelsen av oppfinnelsen at transkripsjonsfaktorene som kontrollerer OP-AFP-genekspresjon eksisterer i laks og i alle andre fisker. Dette er overensstemmende med våre tidligere undersøkelse i fremstilling av transgen Atlanterhavslaks ved bruk av type I antifryseproteingen fra vinterflyndre (Fletcher et al. 1988). I den undersøkelsen, ble DNA som koder for den genomiske sekvensen til AFP-genet og dets 5'- og 3'-flankerende sekvenser benyttet. Transgene flyndrer og F1-generasjonene som laget sirkulerende AFP i serum ble påvist (Shears et al. 1991). Våre studier av "ocean pout"-promoter i salmonidcellelinjene, japansk medakafostre og de positive

resultatene fra den transgene Atlanterhavslaksen antyder at promoteren er anvendbar i en rekke fiskearter. Den foreliggende AFP-genkonstruksjonen kan utvikles videre i en genkassett hvor mange andre fiskegener av interesse kan innsettes.

"Ocean pout" AFP-genpromoteren er interessant av flere grunner. For det første, uttrykkes den hovedsakelig i leveren, et vev som har stor syntetisk og sekresjonsevne. Ekspresjonen av et trangen i lever er én av de mest vanlige fremgangsmåter i genoverføringsstudier. For det andre, er AFP-genet tilstede bare i et lite antall i fiskearter. Dens ekspresjon vil ikke affiseres av vertsgenomet, fordi det er ikke noen homologe endogene gener. Videre, fraværet av AFP-genet i de fleste fiskegenomer gjør påvisningen av denne AFP-avledede genkonstruksjonen enkel uten å få bakgrunn fra verts-DNAet. Dette var tydelig vist i våre studier av trangene Atlanterhavslaks (Du et al., 1992). Til slutt er det vist at der er flere positive og negative cis-virkende elementer i oAFP-genpromoteren (Gong et al. 1991). Dette gir en anledning til å modifisere denne vektoren for å imøtekomme de ulike krav med hensyn til transgen ekspresjon.

Vi har også bestemt at adekvat eksprejson av det utvalgte genet kan oppnås ved å plassere den 1,2 kb opAFP-gen 3'-sekvensen i vår vektor opAFP-V. DNA-sekvensanalyse viser at det inneholder et typisk polyadenyleringssignal AATAAA. Videre, ble en 7 bp-sekvens motiv (TTTTTCT) funnet 26 bp nedstrøms for poly(A)signalet. Dette 7 bp-motivet er et passende transkripsjonstermineringssignal (TTTTTNT) som i virus (Zhou et al., 1991). Den 1,2 kb-sekvensen kan derfor fungere som en generell transkripsjonstermineringssignal i genekspresjon.

Utviklingen av opAFP-genkassetten; dvs. opAFP-V, har i sterk grad forenklet innsetningen av andre gener for genoverføring. Transgen laks og andre arter av transgen fisk kan fremstilles med andre hypofysehormoner og mange andre proteiner og polypeptider som benytter denne ekspresjonsvektor.

EKSPERIMENTELLE FREMGANGSMÅTER - FØRSTE SERIE AV UTFØRELSESFORMER AV OPPFINNELSEN

A-1 Atlantisk lakseegginnsamling

Moden Atlanterhavslaks (Salmo salar) ble fanget 2-3 uker før gyting fra felter og Colinet elvesystemene, Newfoundland, og transportert levende til havvitenskapssenteret, Memorial University i Newfoundland. Fisken ble oppbevart i en sesongmessig tilfeldig fotoperiode i 2 x 2 x 0,5 m akvarium forsynt med ferskvann og luft.

Egg og melke ble melket fra laksen som var bedøvet med en fortynnet løsning av t-amylalkohol. Eggene ble holdt ved 4°C og ble befruktet opp til 2 timer før mikroninjeksjon og renset med flere bytter iskaldt lakse-Ringer-løsning. Aktiveringen skjedde når eggene ble plassert i ferskvann etter mikroinjeksjon (Fletcher et al. 1988).

A-2 Medakaegginnsamling

Japansk medaka (Oryzias latipes) ble holdt i Dr. J. Vielkind's laboratorium, kreftforskningssenteret, Vancouver. Reproduksjonsaktivitetene til de voksne ble startet ved hjelp av kunstige fotoperioder på 10 timers mørke og 14 timers lys. Befruktede egg bundet til hunnfiskene ble samlet 1-2 timer etter lysstart og oppbevart i Ringer-løsning (0,75% NaCl, 0,02% KCl, 0,02% CaC_2l:, pH 7,3) ved 12°C før injeksjon. Injiserte medakafostre ble oppbevart i medium som inneholdt 0,1% NaCl, 0,003% KCl, 0,004% $CaCl_2$:.$2H_2O$, 0,016% $MgSO_4.7H_2O$, 0,0001% metylenblått og overført til akvariumvann øyeblikkelig etter klekking (Chong og Vielkind 1989).

A-3 Plasmidkonstruksjon

a. "Ocean pout"-antifrysepromoter-CAT-fusjonsgen (pOP-CAT).

Det 2 kb Bam HI-Bgl II-fragmentet som inneholdt OP-AFP-promoteren ble subklonet i plasmid pBLCAT3 (Luckow og Schutz 1987) i Bam HI, Bgl II-setene for å lage OP-CAT-fusjonsgen (fig. 1A). Supertvinnede plasmider for transfeksjon ble laget ved hjelp av etidiumbromid CsCl-gradientsentrifugering. Det 2 kb Bam HI - Bgl II fragmentet isoleres fra gensekvensen til "ocean pout" AFP-genet som beskrevet i Hew et al (1988). Restriksjonskartet i plasmid Op5 er vist i tabel 1. Konstruksjonen

og promoteraktivitetene til andre antifrysepromoterer fra andre fisker er også inkludert i tabell II.

b. "Ocean pout"-antifrysepromoter-laksevekstthormonfusjonsgen (pOP-GHe).

Det 217 bp Hind III-Sau 3A-fragmentet fra plasmid OP5 som inneholdt OP-AFP-promoteren (Hew et al. 1988) i tabell I ble subklonet i plasmid pBLCAT3 i pUC 18 (Luckow og Schutz 1987) i Hind III, Bam HI-setene som illustrert i fig. 1B. Plasmidet ble spaltet med BglII, også ligert med en 73 bp BglII-Pst I syntetisk linker som inneholder den 5'-ikke-translaterte sekvensen til Atlanterhavslaksevekstthormongen (Du og Hew ikke publisert). Vekstthormongenet er blitt karakterisert i Hew et al (1989) og er mer spesifikt beskrevet i laksevekstthormon-sekvensene i tabell III. Det ligerte DNA ble spaltet med Pst I og EcoRI, og det større fragmentet som inneholdt OP-AFP-promoteren, "chinook" lakse-vekstthormon 5'-ikke-translaterte sekvenser og pUC 18 sekvens ble renset ved geleluering. Dette større fragment ble så koblet til en 709 bp Pst I-EcoRI-fragment som inneholdt laksevekstthormonkodende sekvens og del av et 5'- og 3'-ikke-translaterte området (Hew et al. 1989). Det resulterende plasmidet ble spaltet med Hind III og klonet inn i et plasmid som inneholdt 2kb Bam HI-HindIII flankerende sekvens fra "ocean pout"-antifrysegenpromoteren (Hew et al. 1988). Dette plasmidet ble så spaltet med Stu.I og Aat II, og det større fragmentet som inneholdt OP-AFP-promoteren og den vekst-hormonkodende region og del av den vekstthormon 3'-ikke-translaterte sekvens, ble så koblet til et 1 kb Hpa I-Aat II fragment fra OP5 plasmidet som omfattet OP-AFP-genpolyadenylerings- og transkripsjonstermineringssignalene (Hew et al. 1988). Etterfølgende DNA-sekvensbestemmelse viste at 1 kb HpaI-AatII-fragmentet er et 1,6 kb i størrelse. Det inneholder 1,1 kb HpaI-HindIII-fragmentet under OP5-plasmidet og 0,5 kb HindIII-AaI-fragment fra pUC-plasmidet. Den endelige konstruksjonen ble betegnet som pOP-GHe (fig. 1B).

A-4 Forbigående CAT-analyse i laksecellelinjer

RTH-149, en regnbueørret-hepatomcellelinje var en vennlig gave fra Dr. L. Gedamu. Cellene ble holdt ved 18°C i minimum essensiell medium supplert med 25 mM HEPES-buffer (Gibco). Fiskecellene ble transfektert med DNA ved hjelp av kalsiumfosfat ko-presipitering med glyserolsjokk og CAT-analyse utført hovedsakelig ifølge Davies et al. (1986) og modifisert for fiskeceller av Zafarullah et al. (1988).

A-5 Forbigående CAT-analyse i japansk medaka

Det supertvinnede pOP-CAT-plasmid DNA (omtrent 500 pl, 10s kopier) ble mikroinjisert i cytoplasmaet til fertiliserte medakaegg før eller like etter spalting. Fenolrødt ble tilsatt til DNA-et til en endelig konsentrasjon på 0,25% for å hjelpe synliggjøring av injeksjon. CAT-analyser ble utført ifølge Chong og Vielkind (1989). I 5 dagers embryo, ble grupper på 5 embryo benyttet for CAT-analyse. For klekket fisk, ble individer benyttet for CAT-måling.

A-6 Genoverføring i Atlanterhavslaks ved hjelp av mikroinjeksjon.

4 kb-innskuddet i pOP-GHe ble spaltet ut ved hjelp av EcoRI-behandling og løst opp i saltvannsbuffer i en konsentrasjon på 3 µg/ml. Omtrent (2-3 nl, 10^6 kopier) av DNA-innskuddet ble injisert gjennom mikropylen inn i et fertilisert, ikke-aktivert lakseeggcytoplasma (Fletcher et al. 1988) ifølge fremgangsmåten til den forannevnte Forente Staters patentsøknad S.N. 278.463. Omtrent 500 egg ble injisert. Over-levelseshastigheten var 80% sammenlignet med ikke-injiserte kontroller.

A-7 Syntese av oligonukleotidprimerne for PCR

For PCR-analyse, ble fire primere syntetisert i Biotech Service Centre, hospital for syke barn, Toronto, Canada. Som vist i figur 2, er primer A, lokalisert i posisjon +27 til +47 relativt til TATA-boksen, fra "sense"-tråden i OP-AFP-genpromoteren; Primer B, som er lokalisert i posisjon +861 til +881 relativ til TATA-boksen, er fra "antisense"-tråden av OP-AFP-gen 3, flankerende område. Primer C, lokalisert i

posisjon +161 til +181, er fra "sense"-tråden til veksthormonkodende sekvens; mens primer D, som er lokalisert i posisjon +339 til +359, er fra "antisense"-tråden i veksthormongenet.

Primer A + 27 5'-GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC- 3' + 47 senstråd

Primer B + 861 5' -ATCTCAACAGTCTCCACAGGT- 3' + 181 antisenstråd

Primer C + 161 5' -TCTGCTGATGCCAGTCTTACT- 3' + 181 senstråd

Primer D + 339 5' -ACAGAAGTCCAGCAGGAATAT- 3' + 359 antisenstråd

A-8 DNA-isolering fra blodceller for PCR

30 µl blod ble samlet fra ett års gammel fisk. Én µl av blodet ble lysert i 50 µl av 10 mM NaOH, kokt i vannbad i 3 min,., så sentrifugert i 3 min.. 2 µl av supernatanten ble benyttet for PCR direkte.

A-9 PCR-forøkning

PCR ble utført i 70 µl reaksjonsløsning som inneholdt 50 mM KCl, 10 mM Tris, 2,5 mM MgCl:, 1 µM av hver "primer", 4 deoksyribonukleotidtrifosfat i 200 µM hver, og 2,5 enheter Taq DNA-polymerase (Promega), 100 µl mineralolje ble tilsatt for å hindre kondensering. Forøkning ble startet ved denaturering av DNA ved 92°C i 3 min., etterfulgt av 30 PCR-cykler. Hver syklus omfattet 1 min. ved 92°C (denaturering), 1 min. ved 60°C (hybridisering), og 2 min. ved 72°C (forlengelse). Etter en siste syklus, ble reaksjonen holdt i ytterligere 10 min. ved 72°C for å avslutte hele reaksjonen. PCR ble utført ved bruk av PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc. Ocala, FL).

A-10Analyse av PCR-produktet ved hjelp av agarose gelelektroforese og southern blot

20 µl av det forøkte produktet ble undersøkt ved hjelp av elektroforese på en 0,8% agarosegel, og DNA-produktene ble synliggjort ved hjelp av etidiumbromidfarging. DNA-et ble overført til en nylonmembran (Amersham) for Southern-analyse. En 17 bp veksthormonspesifikk oligonukleotidprobe E, 5' -GAAAATGTTCAATGACT- 3' fra sekvensen til Stillehavslaks veksthormon cDNA-"sense"tråd (+277 til +294) (fig. 2) ble endemerket med P^{32} ved hjelp av T4-kinase og benyttet som probe for Southern blot.

EKSPERIMENTELL PROTOKOLL - DEN ANNEN SERIE AV UTFØRELSESFORMER AV OPPFINNELSEN

B-1Alternativ utførelsesform for konstruksjon av "ocean Pout" antifrysepromoter-CAT-fusjonsgen (opAFP-CAT)

Det 2,1 kb BamHI-BglII-fragmentet som inneholdt opAFP-genpromoteren ble spaltet fra plasmidet opAFP-GHc2 (Du et al., ikke publisert), det ble så klonet inn i plasmid pBLCAT3 (Luckow og Schutz, 1987) i Bam HI- og BglII-setene for å lage opAFP-CAT-fusjonsgenet.

B-2Alternativ konstruksjon av en "generell fiske"ekspresjonskassett opAFP-V.

Plasmid opAFP-GHc2, som stammer fra opAFP-GHc ved å erstatte den 73 bp veksthormongen 5'-ikke-translaterte sekvensen med en 72 bp opAFP-gen 5'-ikke translatert sekvens, (Du et al., ikke publisert) var fordøyet med Pst 1, så gjort like-endet med T4 DNA-polymerase og defosforylert med kalvetarmalkalisk fosfatase. Den ble så koblet til en fosforylert 8 bp HpaI-linker (5' CGTTAACG 3'). Det resulterende plasmidet som inneholder 2,1 kb opAFP-genpromoteren, 63 bp opAFP-gen 5'-ikke translaterte sekvens og plasmidet pUC ble spaltet med HpaI og SalI, og så bundet til det 1,2 kb HpaI-SalI-fragment fra OP-5 (Hew et al., 1988) som inneholder opAFP-gen 3'-sekvensen. Den endelige konstruksjon ble betegnet som

vektor opAFP-V. DNA-sekvensen som startet ved Ba og gikk til det andre HindIII-setet H, i fig. 11, inneholder 3350 bp, som vist i tabell V.

B-3Forbigående CAT-analyse i laksecellelinjer

RTH-149, en regnbueørrethepatomcellelinje og CHSE-214, en Stillehavslaksembryonal cellelinje, var vennlig gave fra Dr. L. Gedamu. Universitet av Calgary, Canada. Cellene ble dyrket ved 18°C i minimum essensielt medium supplementert med 25 mM HEPES-buffer (Gibco). Fiskecellene ble transfektert med DNA ved hjelp av kalsiumfosfat ko-presipitering med glycerolsjokk. CAT-analyse ble utført i hovedsak ifølge Davies et al. (1986) som modifisert for fiskeceller av Zafarullah et al. (1988).

B-4 Forbigående CAT-analyser i japansk medaka

Japansk medaka (Oryzias latipes) ble holdt ved Dr. J. Vielkind's laboratorium, Cancer Research Centre, Vancouver. Formeringsaktivitene til de voksne ble staret ved hjelp av kunstig fotoperiode ifølge fremgangsmåten beskrevet av Chong og Vielkind (1989). Befruktede egg bundet til kvinnene ble samlet 1-2 timer etter start av lys og de ble holdt i Ringer-løsning (0,75% NaCl, 0,02% KCl, 0,02% $CaCl_2$, pH 7,3) ved 12°C før injeksjon. Injiserte medakafostre ble holdt i medium som inneholdt 0,1% NaCl, 0,003% KCl, 0,004% $CaCl_2.2H_2O$, 0,016% $MgSO_4.7H_2O$, 0,0001% metylenblå og overført til akvarievann like etter klekking.

Supertvinnet opAFP-CAT plasmid DNA (omtrent 500 pl, 10^6 kopier) ble mikroinjisert inn i cytoplasmaet til befruktede medakaegg på 1- eller 2-celletrinnene. Fenolrøde ble tilsatt til DNA-et til en endelig konsentrasjon på 0,25% for å hjelpe visualisering under injeksjon. CAT-analyse ble utført ifølge Chong og Vielkind (1989). Individuelle fostre ble benyttet for hver CAT-måling.

B-5 DNA-sekvensering

Dideoksykjedeterminator-sekvenseringsanalysen ble benyttet for å sekvensere opAFP-V. En serie av kloner som inneholdt DNA-fragmenter av

forskjellige lengder ble utviklet ved hjelp av EXO-3-nukleasespalting (Promega Erase-a-base-delesjonskit). Dobbelt-trådet DNA renset fra disse klonene ble benyttet som templater for DNA-sekvensering (Phamacia-sekvenseringskit).

TESTRESULTATENE FRA DE OVENFORNEVNTE FREMGANGSMÅTENE - IFØLGE DEN FØRSTE SERIE AV UTFØRELSESFORMER

1. "Ocean pout" AFP-promoter kan fungere i salmonidceller in vitro

For å utprøve effektiviteten til OP-AFP-promoteren ble OP-CAT-konstruksjonen transfektert inn i RTH 149 cellelinjen for CAT-analyse. Som vist i figur 3, var CAT-aktivitet klart påvist. Nivået av CAT-aktivitet som var et resultat av OP-CAT var sammenlignbar med den fra pBLCAT2, som har thymidinkinase-promoteren fra Herpes simplex-virus; imidlertid, når disse cellene som var transfektert med pBLCAT3, en promotermanglende CAT-konstruksjon, ble lite eller ikke noe CAT-aktivitet påvist. Lignende resultater ble oppnådd med "Chinook"-laks-embryonale celler (CHSE-124) og "Chum"-laksehjerteceller (CHH-1). Disse resultatene antyder at OP-AFP-promoteren kan benyttes for å mållokalisere veksthormongenekspresjon i salmonider. Skjønt salmonidene som omfatter regnbueørret mangler AFP-genet, inneholder disse cellene alle transkripsjonsfaktorene som er krevet for å uttrykke AFP-genet.

2. "Ocean pout" AFP-promoter kan fungere i japansk medaka in vivo.

For å undersøke videre hvordan OP-AFP-promoteren fungerer i genoverføring, ble OP-CAT-konstruksjonen mikroinjisert inn i medakaegg. CAT-aktivitet ble bestemt fra fostre på forskjellige tidspunkt under utvikling. Som vist i figur 4, ble CAT-aktiviteten først påvist etter 48 timer etter injeksjonen, aktiviteten nådde et maksimum på 6-7 dager, så begynte CAT-aktiviteten å avta. Imidlertid var CAT-aktiviteten fremdeles påvisbar selv i klekket fisk (11-12 dager). I motsetning, ble CAT-aktiviteten ikke påvist i ikke-injiserte fostre eller fostre injisert med pBLCAT3. Dette resultatet bekrefter at OP-AFP-promoteren er aktiv i en rekke fiskearter.

3. PCR-basert undersøkelsesstrategi

For å undersøke tilstedeværelsen av transgen laks, ble tre forskjellige sett primere benyttet, primerne A/D, primerne C/D og primerne A/B (fig. 2). Grunnen for å benytte primer A/B er at sekvensene på primer A og primer B er spesifikke for OP-AFP-genet, som er fraværende i Atlanterhavslaks, derfor kan ikke DNA fra ikke-transgen laks bli forøket når primerne A/B benyttes i PCR. Kun DNA fra den transgene fisken kan forøkes ved bruke av primer A/B, og vil skape et 855 bp DNA-fragment ved hjelp av PCR.

Basis for å benytte primerne A/D er den samme som for å benytte primer A/B. Skjønt primer D stammer fra "chinook" laksevekstthormon cDNA, og kan hybridisere med det endogene Atlanterhavslaksvekstthormongen, er primer A spesifikk for OP-AFP-genet. Derfor kan DNA fra ikke-transgen fisk ikke forøkes ved bruk av primerne A/D, kun DNA fra transgen fisk kan forøkes og lage et 333 bp DNA-fragment.

Grunnen for å benytte primerne C/D er forskjellig fra den til de andre to settene. Sekvensene for både primer C og D er fra "chinook"-laksevekstthormon cDNA, som kunne hybridisere med Atlanterhavslakseveksthormongenet, og derfor kan DNA fra Atlanterhavslaks bli forøket ved bruk av primer C/D. Imidlertid er det et intron (intron 2) mellom primer C og primer D, avstanden mellom primer C og primer D er 344 bp (Du og Hew ikke publisert). Primerne C/D vil lage et 344 bp-fragment i alle DNA-prøvene. Det transgene pOP-GHe ble konstruert ved bruk av "chinook"-laksevekstthormon cDNA som mangler intronet og distansen mellom primer C og primer D er 199 bp. Primerne C/D vil lage to fragmenter i transgen laks, en 344 bp fra endogent veksthormongen og en 199 bp fra veksthormon cDNA-innskuddet.

4. Identifisering av transgen laks ved hjelp av PCR.

Preliminær analyse av DNA ekstrahert fra 100 1 måneders gamle laksefostre viste at to av dem (2%) inneholdt den injiserte sekvensen (pOP-GHe).

8 måneder etter klekking, var laksene store nok for å merkes for identifisering. På det tidspunkt, ble 50 av de omtrent 500 laksene i ett akvarium veid og blodprøveanalysert ved hjelp av PCR. Disse 50 omfattet de 14 største laksene i

akvariet (>8 g kroppsvekt) og 36 ytterligere fisk med kroppsvekter som varierte fra 5 til 14 g.

PCR-analysen ble utført uten at den som analyserte visste størrelsen på noen av fiskene. Med andre ord, ble analysene utført "blindt" for å være sikker på å fjerne enhver inhabilitet (bias) til undersøkeren.

8 måneders gamle Atlanterhavslaks utviklet fra eggene injisert i November 1989 med pOP-GHe ble blodtappet i oktober 1990. DNA fra de kjerneholdige blodcellene ble benyttet direkte for PCR-analyse ved bruk av primer A/D for å bestemme tilstedeværelsen av pOP-GHe-transgenet. Av de 50 fiskene som ble analysert, ble 8 vist å være positive. Som vist i fig. 5A, ble et 333 bp-fragment laget fra laksene #14, #20, #28, #31, #34, #42, #11, #25 og den positive kontrollen (pOP-GHe), i kontrast var dette 333 bp-fragmentet fraværende i den ikke-injiserte laksen. Størrelsen på det forøkte fragmentet (333 bp) svarte til størrelsen som var antatt fra den transgene sekvensen.

For å bekrefte at det forøket 333 bp DNA-fragmentet stammet fra det transgene pOP-GHe, ble DNA overført til en nylonmembran for Southern blot hybridisering med en veksthormon-spesifikk probe E (fig. 2) som var fra sekvensen mellom primeren A og primeren D, og resultatet viste at alle 333 bp hybridiserte med proben E (fig. 5B). Dette bekreftet at 333 bp DNA-fragmentet var faktisk avledet fra det transgene pOP-GHe.

For å bekrefte videre at nærværet av transgen pOP-GHe i de positive, ble DNA forøket ved bruk av primerne C/D. Som diskutert i undersøkelsesstrategien, ble det forventede 344 bp DNA-fragmentet som stammet fra det endogene Atlanterhavslakseveksthormongenet funnet i alle laksene som ble analysert. Et ytterligere lite DNA-fragment (199 bp) ble funnet fra fisk #14, #20, #28, #31, #34 og #42, #11 og #25 (fig. 6A). Dette 119 bp-fragment stammet fra "chinook"-lakseveksthormtransgenet. Disse positive var de samme som ble oppnådd ved bruk av primerne A/D, hvilket bekreftet at fisk #14, #20, #28, #31, #34, #42, #11 og #25 var transgene lakser.

5.De veksthormonkodende områdene til transgenene er intakte i den transgene laksen.

For å bestemme integriteten til den veksthormonkodende sekvensen i de transgene, ble primerne A/B benyttet for PCR-analyse. Primer A og primer B stammet fra sekvensene til OP-AFP-genet 5' og 3', som var lokalisert på utsiden av det 5' og 3' til den veksthormonkodende sekvensen i transgenet (fig. 2), derfor, hvis veksthormonkoden i transgenet var intakt i den transgene fisken, skulle et 855 bp DNA-fragment dannes når primerne A/B ble benyttet for å forøke DNA fra den transgene fisken. Som vist i figur 6B, ble et 855 bp-fragment funnet i alle de 8 positive, hvilket indikerte at veksthormontransgenet var intakt i den transgene laksen.

6. Vekstevnen til den transgene fisken.

a. Vekt av den transgene fisken

PCR-analyse viste at 8 fisker var transgene. To fisker (#11, #25) døde i juli 1990. Derfor ble bare de 6 gjenværende transgene fiskene analysert.

Av de 6 laksene som ble funnet å være transgene med tanke på veksthormongenkonstruksjonen, var 5 av dem blant de 6 største fiskene i akvariet. Mulighetene for at observasjonen opptrådte tilfeldig er ytterst liten. Den gjennomsnittlige vekten til de 6 transgene fiskene var 29,2 ± 0,3 g. Den gjennomsnittlige vekten til alle de 459 fiskene i akvariet var 5,06 ± 1,0 g. Således var gjennomsnittlig den transgene fisken fire ganger større enn de ikke-transgene kontrollene og omtrent 6 ganger den gjennomsnittlige størrelsen til laksen i akvariet. Den største transgene fisken i akvariet var 8 ganger større enn de ikke-transgene kontrollene.

b. Veksthastigheten til den transgene fisken.

For å vurdere veksthastighetene, ble de 50 fiskene det var tatt blodprøve av merket og veid om igjen 100 dager senere. De gjennomsnittlige veksthastighetene til de 6 transgene laksene under denne perioden var 0,766 ± 0,18% pr. dag, mens de

24 ikke-transgene fiskene vokste 0,224 ± 0,03% pr. dag. Denne forskjellen er statistisk signifikant.

c. Vekt av den transgene fisken

Kroppsvektene til de to transgene laksene som hadde dødd juli 1990, nummer 11 og 25, var hhv. 8,07 g og 12,1 g. Disse laksene var betraktelig større enn alle andre laksene i akvariet på det tidspunkt. Den gjennomsnittlige kroppsvekten til de 10 fiskene som ble valgt tilfeldig fra omtrent 500 fisk i akvariet var 1,4 ± 0,17 g.

Størrelsesfrekvensfordelingen av alle de 200 laksene som ble veiet i oktober 1990, inklusive de 50 som ble tatt blodprøve av og merket er presentert i figur 13A. Av de 7 transgene laksene funnet blant de 50 fiskene som ble undersøkt, var 6 de største fiskene i akvariet (figur 1#A). Den gjennomsnittlige kroppsvekten til de 200 fiskene var 5,91 ± 0,43 g. Kroppsvektene til de 3 største transgene laksene var større enn to standarddeviasjoner over dette gjennomsnittet. Den gjennomsnittlige kroppsvekten til de 7 transgene var 27,3 ± 7,8 g, mens 43 ikke-transgene søsken veide 7,4 ± 0,26 g. Således var gjennomsnittlig de transgene 3,7 ganger større enn deres ikke-transgene søsken. Den største transgene laksen (#28, 65,8 g) var 8,9 ganger den gjennomsnittlige vekten til kontrollene. De tre største transgene laksene hadde tapt alle holdepunkter for parr-markeringer og hadde tatt det sølvaktige utseende til smolt (figur 12). Veksthormon er antatt å være innblandet i denne prosess.

Størrelsesfordelingsdistribusjonen på i alt 494 fisker tilstede i januar 1991 og vektene til de individuelle transgene er presentert i figur 12B. Den største transgene laksen som ble undersøkt i oktober 1990 (#28) døde etter blodprøvetaking, og var ikke tilstede i figuren.

Den gjennomsnittlige kroppsvekten til alle (484) laks i akvarie var 6,36 ± 0,26 g. Den gjennomsnittlige kroppsvekten til de ikke-transgene laksene (476 fisk) var 5,94 ± 0,14 g, mens den gjennomsnittlige vekten til de transgene var 37,0 ± 10,2 g; omtrent 6 ganger større enn de ikke-transgene. 5 av de 8 transgene i denne gruppen hadde kroppsvekter som overskred to standarddeviasjoner i gjennomsnittsverdi for akvariet. Kroppsvektene til to av de 476 ikke-transgene

laksene overskred også to standarddeviasjoner av akvariegjennomsnittet. Den største transgene laksen i januar 1991 (#31, 76,7 g) var omtrent 13 ganger gjennomsnittsvekten til kontrollene.

Veksthastighetene til den transgene laksen (6) og deres ikke-transgene søsken (43) fra oktober 1990 til januar 1991 er presentert i tabell VI. Det er klart at gjennomsnittlig var den transgene laksen betydelig større og vokste betydelig hurtigere i vekt og lengde, enn ikke-transgen fisk som ble holdt i det samme akvarium. I tillegg, var kondisjonsfaktorene til de transgene litt, men signifikant lavere enn de til kontrollene. Økningene i vekt til den transgene fisken varierte fra 0,48 til 1,6% pr. dag. Bare to av de 43 ikke-transgene kontrollene hadde veksthastigheter som gikk ut over de av den langsomst voksende transgene.

Smolting er en meget komplisert overføringsprosess som omfatter mange morfologiske og fysiologiske forandringer (se oversikt av Hoar 1988). Én av de morfologiske forandringene er det sølvhvite utseende til smolt. I våre studier, oppnådde den transgene laksen dette tidligere enn kontrollen, hvilket antydet at den transgene laksen ble utviklet til smolt tidligere (fig. 8). Det er blitt rapportert at fiskestørrelsen og veksthastigheten synes å være betydelige faktorer for å kontrollere laksesmoltutvikling (se oversikt av Hoar 1988), dette blir støttet av vår observasjon at den transgene laksen utvikler seg til smolt tidligere enn deres kontroll. Derfor, synes den transgene laksen å være en god modell for å studere laksesmoltutvikling.

TESTRESULTATER FRA DE OVENFOR BESKREVNE FREMGANGSMÅTENE IFØLGE DEN ANDRE SERIEN AV UTFØRELSESFORMER

1. "Ocean pout"-AFP-promoteren kan fungere i salmonidceller in vitro.

CAT-analyser ble benyttet for å undersøke effektiviteten til opAFP-promoteren. opAFP-CAT-konstruksjonen ble transfektert inn i to salmonidcellelinjer, RTH 149, en regnbueørrethepatomcellelinje og CHSE-214, en "chinook"-lakseembryonal cellelinje. Som vist i figur 9, var CAT-aktivitet klart påvist i begge. Nivået av CAT-aktivitet som resulterte fra opAFP-CAT kunne sammenlignes med den fra pBLCAT2, som har thymidinkinasepromoter fra Herpes simplex virus. Når disse cellene ble transfektert med pBLCAT3, en CAT-konstruksjon uten promoter, ble lite eller ikke noe CAT-aktivitet påvist. Disse resultatene antydet at skjønt salmonidcellene mangler AFP-genet, inneholder disse cellene transkripsjonsfaktorer som var nødvendig for basalekspresjon av AFP-genet, hvilket tydet på at de var nyttige for transgene studier.

2. "Ocean pout"-AFP-genpromoteren kan fungere i japanske medakafostre in vivo.

For å undersøke videre anvendeligheten av å benytte opAFP-genpromoteren i genoverføring, ble opAFP-CAT-konstruksjonen mikroinjisert inn i medakafostre på 1 eller 2 cellestadier. CAT-aktiviteten ble bestemt fra individuelle fostre på forskjellig tid under den embryonale utvikling. Som vist i figur 10, ble CAT-aktivitet først påvist 2 dager etter injeksjon, aktiviteten nådde et maksimum etter 6-8 dager, så begynte CAT-aktiviteten å avta. Imidlertid var CAT-aktiviteten fremdeles påvisbar endog i klekket fisk (11 dager). I motsetning, ble lite eller ikke noe CAT-aktivitet påvist i ikke-injiserte embryoer eller embryoer injisert med pBLCAT3 (data ikke vist). Disse resultatene viser videre at opAFP-genpromoteren var aktiv in vivo i en annen fiskeart som manglet AFP-genene.

3. Design og konstruksjon av en generell genoverføringskassett, opAFP-V.

Resultatene ovenfor fra CAT-analysen i salmonidcellelinjer og medakafostre tyder på at opAFP-promoteren er aktiv i fisk som ikke normalt uttrykker AFP. Dette blir videre støttet opp av vår nye veksthormon-genoverføringsstudier i Atlanterhavslaks. Når opAFP-genpromoteren ble koblet med laksevekstormon cDNA og fusjonsgenet mikroinjisert inn i Atlanterhavslaks, viste den transgene laksen en dramatisk økning i veksthastigehtene (Du et al. 1992). Totalt sett, viste disse eksperimentene at opAFP-promoteren er aktiv i en rekke fiskearter.

For å forenkle anvendelsen av opAFP-genpromoteren som en nyttig bærer for genoverføringsstudier, og for å forenkle konstruksjonen av andre fusjonsgener ved bruk av denne promoteren, ble en ekspresjonsvektor, opAFP-V, klonet i pUC ved bruk av opAFP-genpromoteren, den 5'-ikke-translaterte sekvensen og opAFP-gen-3'-sekvensen. Den 2,1 kb promoteren kreves for aktiv transkripsjon den 1,2 kb 3'-sekvensen foretrekkes for polyadenylering og transkripsjonsterminering. Som vist i figur 11, ble 2,1 kb opAFP genpromtoren koblet til den 63 bp opAFP gen 5'-ikke-translaterte sekvensen ved hjelp av et enkeltstående BglII-sete, og den 5'-ikke-translaterte sekvensen ble bundet ved hjelp av dets 3'-sekvens til et enkeltstående HpaI-sete. Hvor og hvordan et gen skal innsettes i denne vektoren avhenger av typen av genet som skal benyttes, dvs., et cDNA eller genomisk DNA, med eller uten dets egne 5'-ikke-translaterte sekvens.

For å innsette en cDNA-sekvens som inneholder en kort eller ingen 5'-ikke-translatert region i opAFP-V, burde innsettingen være ved HpaI-setet, som er rett etter den opAFP-gen 5'ikke-translaterte sekvens. HpaI-setet er det eneste HpaI-sete i denne vektoren, siden den kan spaltes ved hjelp av enkel HpaI-behandling og cDNA-klonene som er av interesse uten den 5'-ikke-traslaterte sekvensen, kan klones direkte inn i dette enkeltstående HpaI-setet. Det 5'-ikke-translaterte området fra opAFP-genet kan tjene som en ledersekvens for ribosomal behandling for translasjonsstart.

For å innsette en cDNA-sekvens med et relativt langt 5'-ikketranslatert område, skulle innsettingen skje i det enkeltstående BglII-setet som er før den opAFP-gen 5'-ikke-translaterte sekvensen. For å unngå å ha den ekstra opAFP gen 5'-ikke-translaterte sekvensen, kan den opAFP-gen 5'-ikke-translaterte sekvensen

fjernes ved hjelp av BglII/HpaI-behandling. Innsettingen skulle også være ved HpaI-setet og lage et mRNA med en lang fusjon 5'-ikke-translatert sekvens.

Siden de genomiske genene inneholder deres egne 3'-sekvenser som fungerer som en transkripsjonsterminator, er 3'-opAFP-gensekvensen ikke krevet for kloning av genomiske gener. opAFP-gen 3'-sekvensen kan fjernes fra vektoren ved hjelp av BglII/SalI eller HpaI/SalI-spalting avhengig av lengden av den 5'-ikke-translaterte sekvensen i det innsatte genomiske genet.

Som vist i figur 11, er flere ytterligere enkeltstående restriksjonsseter tilstede ved 5'- og 3'-endene i vektoren, slik som EcoRI, PpnI, SmaI og BamHI-setene i 5'-enden og PstI, SalI, BamHI, SmaI og EcoRI i 3'-enden. Disse muliggjør spaltingen av det intakte fusjonsgenet fra vektoren.

4. Den fullstendige DNA-sekvensen til OpAFP-V.

For å underlette integreringsanalysen og ekspresjon av transgenet med denne vektoren, ble den fullstendige DNA-sekvensen til opAFP-V bestemt. Full-lengden til opAFP-V er 6027 bp, med 2677 bp som stammer fra pUC-sekvens (Yanisch-Perron et al., 1985) og 3350 bp som stammer fra opAFP DNA-sekvensen. Den fullstendige opAFP DNA-sekvensen er vist i tabell V. opAFP-genpromoteren omfatter 2,1 kb, den har en "CAAT"-boks og en "TATA"-boks lokalisert hhv. i posisjon 2006 og 2049. Etter promotersekvensen finnes den opAFP-gen 5'-ikke-translaterte sekvensen, som er koblet til promoteren ved hjelp av en syntetisk BglII-linker (i posisjon 2116). Den eksakte størrelsen til 5'-ikke-translaterte sekvensen er ikke kjent fordi "ocean pout" har 150 kopier av AFP-genet (Hew et al., 1988) som har svært like, men ikke identiske genstrukturer, derfor er det vanskelig å bestemme CAP-setet for dette spesielle AFP-genet. I eukaryote gener er CAP-setet vanligvis lokalisert 25-30 bp nedstrøms fra "TATA"-boksen. Derfor er den 5'-ikke-translaterte sekvensen til opAFP-genet omtrent 90 bp. Den 5'-ikke-translaterte sekvensen tilstede i opAFP-V er 63 bp lang, og er lokalisert mellom BglII og HpaI-setene. opAFP-gen 3'-sekvensen er koblet til promoteren og den 5'-ikke-translaterte sekvensen ved hjelp av et enkeltstående HpaI-sete (i posisjon 2188). Den 3'-sekvensen omfatter 1,2 kb, som inneholder en 80-90 bp 3'-ikke-translatert sekvens, og en 1,1 kb 3'flankerende se-

kvens. Et poly(A)signal "AATAAA" og et potensielt transkripsjonstermineringssignal CT" er lokalisert hhv. i posisjon 2253 og 2285.

DNA-sekvensen til opAFP-genet ble analysert med tanke på nærvær av lever-spesifikke sekvenser. To 17 bp fragmenter med 70% identitet til lever-spesifikt promoterelement HP1 i Xenopus albumingenet (Schorpp et al., 1988), ble påvist i posisjon 1004 til 1020 og 1944 til 1960 (tabell V). Disse to fragmentene ble lokalisert hhv. omtrent -1 kb og -100 bp oppstrøms for CAP-setet. Xenopus albumin HP1-sekvensen er foreslått som bindingsete for en lever-spesifikk transkripsjnsfaktor LF-B1 (De Simone og Cortese, 1988). Imidlertid, gjenstår undersøkelser av funksjonen til disse to antatte lever-spesifikke sekvensene.

Nylig, har PCR blitt et nyttig verktøy for å analysere DNA, hvor kilden til DNA er begrenset. PCR er blitt benyttet i undersøklse av transgen mus (Chen og Evans 1990), blodcellene ble lysert ved hjelp av SDS og DNA ble benyttet direkte for PCR. Nylig har Hanley og Merile (1991) rapportert transgen påvisning i mus ved hjelp av PCR ved bruk av ikke-renset hale DNA. Våre resultater viste at 1 µl blod er tilstrekkelig for å undersøke transgen fisk direkte ved hjelp av PCR. Denne protokollen er blitt benyttet for rutineanalyse i laboratoriet for påvisning av flere tusen prøver.

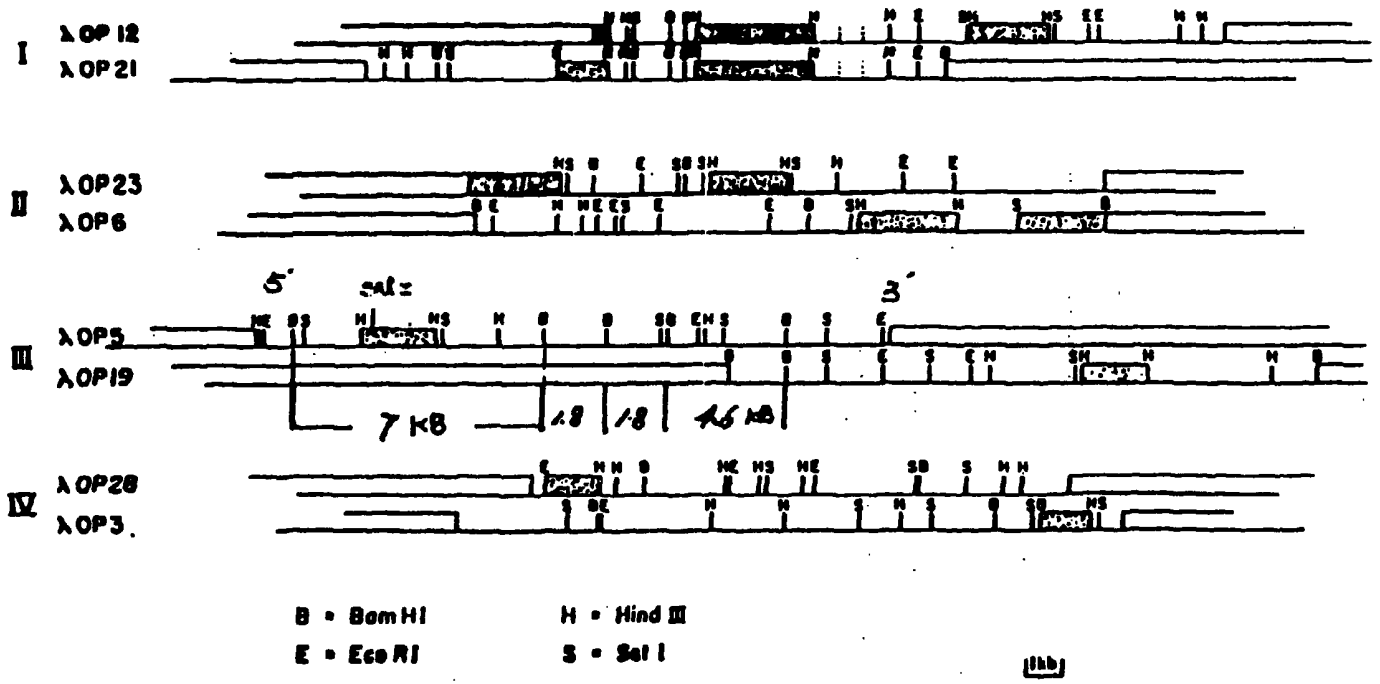
Det kan forstås at det er andre promotersystemer som, ifølge denne oppfinnelsen, virker like godt i en transgen genkonstruksjon. Disse omfatter promotersekvenser som er isolert fra ulvefisk, vinterflyndre, sjøravn og andre AFP- eller AFGP-inneholdende fisker.

Det forstås fra den ovenfornevnte diskusjon av forskjellige utførelsesformer av oppfinnelsen at de berører promoteren, valgfri 5'-ikketranslatert sekvens som et genforstadium og 3'terminalsekvensen som der er, selvfølgelig, mange funksjonelle sammenlignbare alternativer, ikke bare med hensyn til den spesielle sekvensen i tabell V, men også som vist av promotersekvensene slik de er isolert fra andre arter enn "ocean pout", nemlig ulvefisk som beskrevet med hensyn til tabell IV. Promotersekvensen, ifølge denne oppfinnelsen, kan benyttes i en rekke genprodukter siden de stammer fra fiskegener og er derfor forlikelige med en rekke fisketyper. Derfor er promotersekvensen referert til som en "generell fiske"-genkonstruksjon. I lys av fordelen med promotersekvensen som leverspesifikk eller lever-dominerende med tanke på ekspresjon, hvilket er et vev som passer godt for

syntese og sekresjon av transgene produkter, er en rekke AFP/AFGP-promoterer nyttige for å lage den "generelle fiske"-genkonstruksjonen (Gong et al, 1992).

I lys av at AFP-promotersekvensen ikke er tilstede i de fleste artene, er påvisning av transgene arter greit utført ved hjelp av PCR eller andre former for gensekvensforøkningsteknikker, slik som ligasekjedereaksjon. Videre, siden de fleste fiskene ikke inneholder disse AFP-genene, er det lettere å modifisere transgenet ved bruk av AFP-promoteren uten å påvirke funksjonen til de endogene genene. Også AFP-gensekvensen som omfatter både 5'- og 3'-ender inneholder funksjonelle DNA-sekvenser som er viktige for normal DNA-transkripsjon og terminering og vevsspesifikk ekspresjon. Disse DNA-sekvensene kan videre modifiseres for å forbedre dets funksjonsnivå etter ønske og være påvirkelige overfor mange ytre signaler slik som hormoner, vekstfaktorer osv..

TABELL I

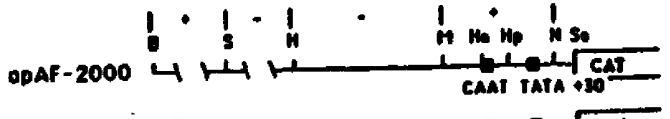

I
λOP 12
λOP 21
II
λOP23
λOP6
5'
Sal I
3'
III
λOP5
λOP19
7 KB
1.8
1.8
4.6 KB
IV
λOP28
λOP3
B = Bam HI
H = Hind III
E = Eco RI
S = Sal I
1kb

TABELL II

PROMOTER ANALYSE AV ANTIFRYSE I RTH-CELLELINJE OG JAPANSKE MEDAKA FOSTRE

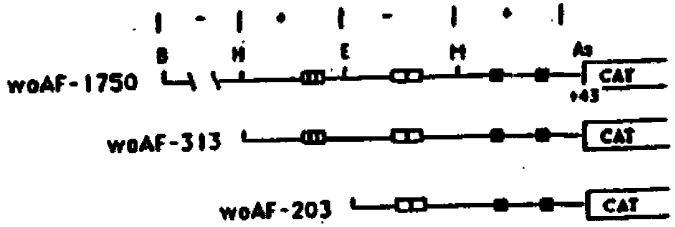
CAT-AKTIVITET

A.



	MADAKA	RTH
opAF-2000	155.8	39
opAF-500	1.0	15
opAF-185	27.8	70
opAF-93	132.8	100
opAF-77	30.0	25
opAF-51	24.0	30
opAF-16	0.5	3

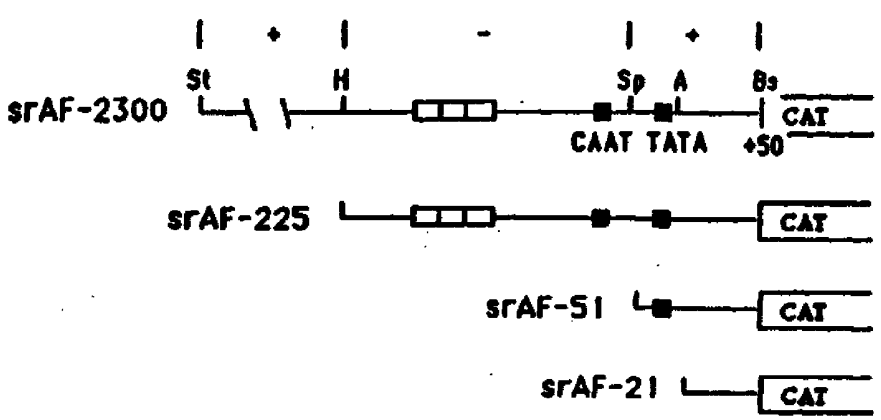
B.



woAF-1750	24.7	16
woAF-313	122.8	91
woAF-203	1.0	22

TABELL II (FORTS.)

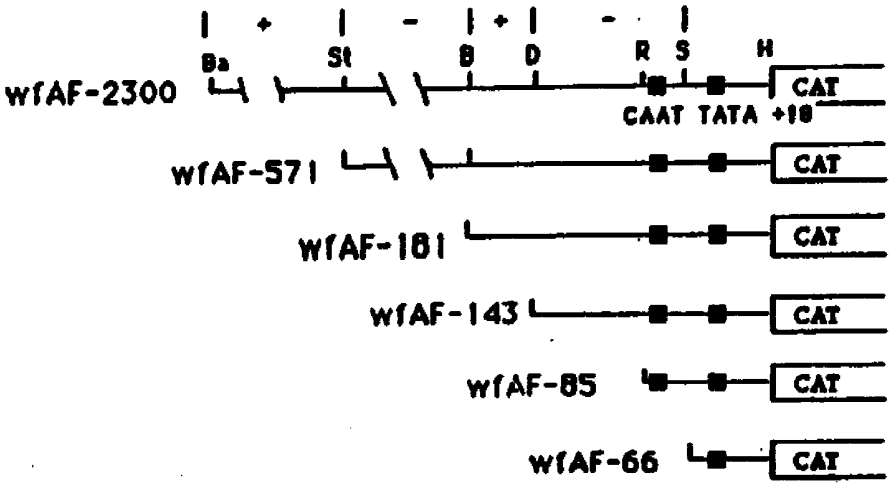
C.



	CAT-AKTIVITET	
	MADAKA	RTH
srAF-2300	123.5	9
srAF-225	33.5	9
srAF-51	118.5	100
srAF-21	104.3	40

TABELL II (FORTS.)

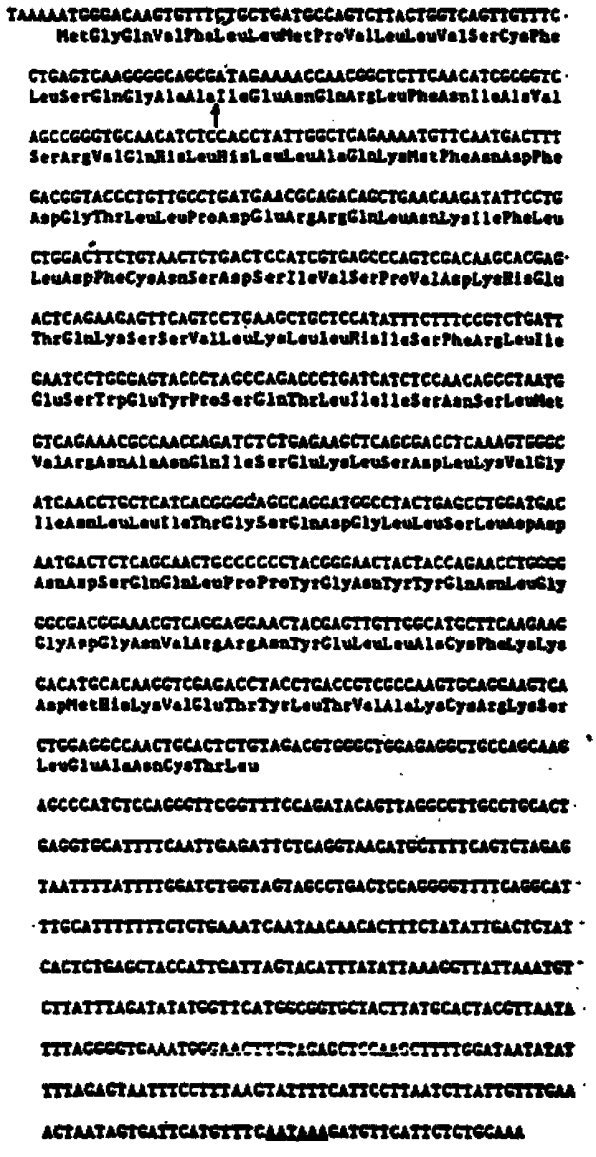
D.



	CAT-AKTIVITET	
	MADAKA	RTH
wtAF-2300	60.0	7
wtAF-571	7.1	10
wtAF-181	64.8	10
wtAF-143	5.8	10
wtAF-85	0.9	9
wtAF-66	1.4	10

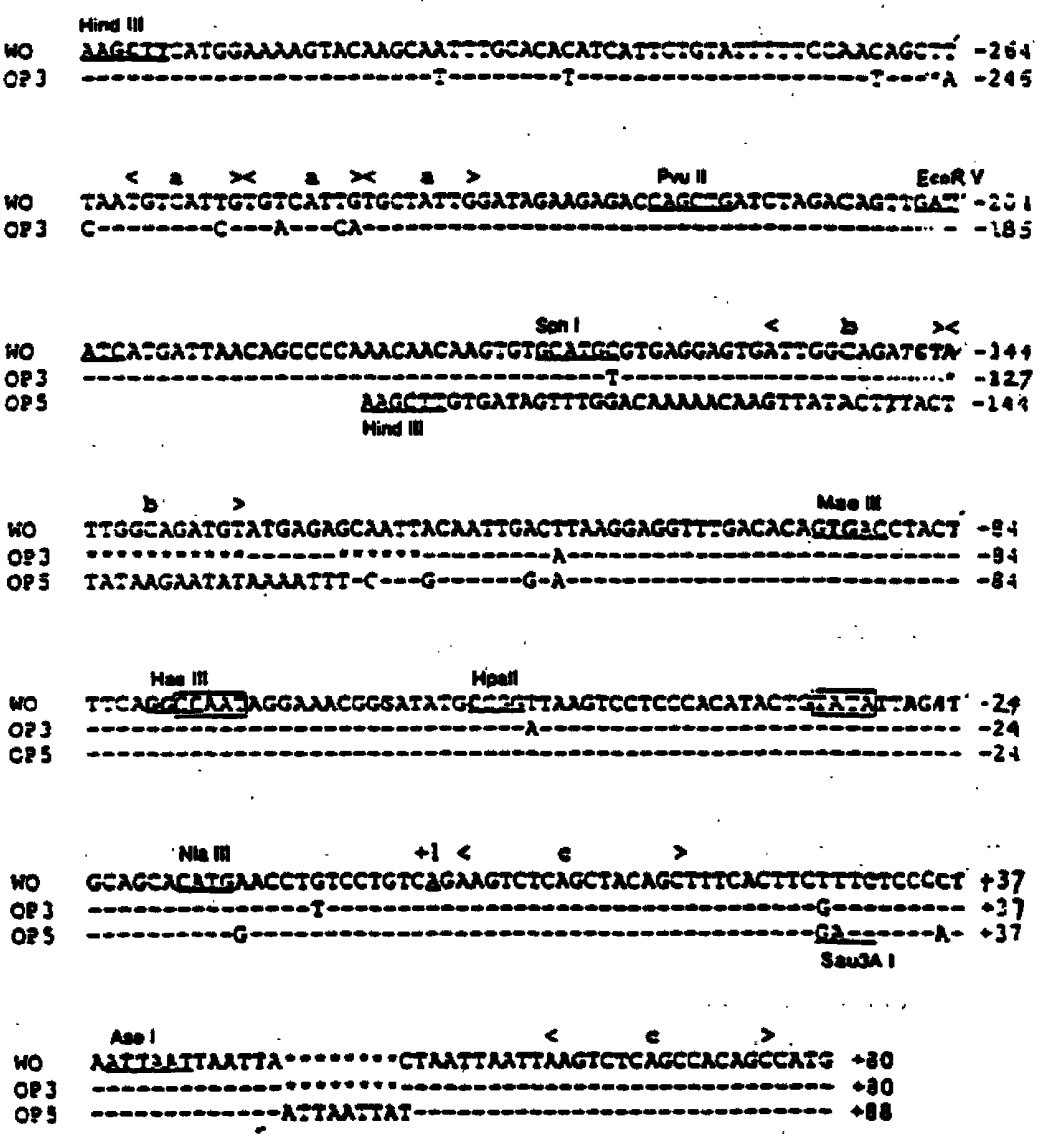
TABELL III

LAKSE GH



Den komplette nukleotid-sekvensen og avledede aminosyresekvens fra Stillehavslaks-veksthormon (GH) antyder spaltningsstedet mellom signalsekvensen og ferdig protein. Polyadenyleringssignalet AATAAA er understreket.

TABELL IV


Hind III
WO
OP3
OP5
Pvu II
EcoR V
Sph I
Hind III
Mae III
Hae III
HpaII
Nla III
Sau3A I
Ase I

TABELL V

Den fullstendige "ocean pout" DNA-nukleotidsekvensen i opAFP-V. "CAAT"- og "TATA"-sekvensene er rammet inn; poly(A)-signalet (AATAAA) og det avledede transkripsjons-termineringssignal (TTTTTCT) er understreket ved hjelp av doble linjer; de to antatte lever-spesifikke sekvensene er understreket med enkel linje; og de enkeltstående BglII og HpaI-setene for geninnsetting er anvist.

```
          10         20         30         40         50         60
5' GGATCCCCCAGAATGAGCTGGAACATGTTGCGGGGAGAGGGAAGTCTGGGTCAGCCTGCT

          70         80         90        100        110        120
TGGCCTGCTGCCACCGTGACCCGACCTCAGATAAGCGGAGGAAAATGGATGGATGGATTG

         130        140        150        160        170        180
AATCACAGAATGTTTCTGAAGACAGATATCACCTTCGCTTCAAAGAGGTGCGCACCTGGG

         190        200        210        220        230        240
CAGGCACCCACACAGCCACACAAATGGCATATGAATCAACCAAGAAGACGGTTGGAACTG

         250        260        270        280        290        300
GTCAAAACCTTCACTATACCATGTGTGACAGTTGTTTGTCACAGTGTATAAAAGACAGGG

         310        320        330        340        350        360
ACTTAGAGACAGAGCTCTGAGCAGCTATGAGATTGTAGTTTGGCCAGGATGCGCTTAAGA

         370        380        390        400        410        420
CCTTTGTGATGAAAAGTTATCAAATTCGTGAGTTTTCATGGAAGAACCTTGACGTGGCGT
```

TABELL V (FORTS.)

```
      430       440       450       460       470       480
GGTGGCCATTTTGCGTCATTCGGCATGGAAAAGGAAGTCGTTATAACTCCCAGGTACATT

      490       500       510       520       530       540
ATCTTATCTACACAAAATGTCTAATGCATGATACTACTTAAAGCCTGAGCATATTTCAAG

      550       560       570       580       590       600
GCCAGCACTTTTCAATAACTCATAGGCCACCTGCTGGCAAAAGGAAATGCCACATTTTAT

      610       620       630       640       650       660
ACTTTTATTTACTCCTAGACAGTTGACCTGATCAGTCTCAAATTTGGTAAGGATAGCCTT

      670       680       690       700       710       720
AAGACAATGAAGATGCTTCATCAGGAATATTGTGAGTTGTCGTTGAACGTTGTTGCCGTG

      730       740       750       760       770       780
GCAACGCATCATTCGCCATGAAAAAGAAGCTGATGGTTCAGTGGCTTGGGATGCTCAAAA

      790       800       810       820       830       840
AGTCATGGAACTTTGTACATGTGTCATAATTGATGGGAAGTTGTATGGGTTTTTGGCTTG

      850       860       870       880       890       900
CTTGTTATAAATTGTCTCCATAGCGCCCCCTACAATATTTCAAAAGAGCAGCCCCAGTGC

      910       920       930       940       950       960
TACGTACATGTATGAAACTTAGTAGCCAGATGTACCATATAGAGACTTACAAAAAGGTAT

      970       980       990      1000      1010      1020
CTTGGCCATGCTCTCAACCGTACTGGAAGTCGGCCATTTTGATTTTTTGCATAATTTTTCA

     1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATAGATTTTTTGCACATTTGTAATCGCTATACTTTAACGAACTCCTCCAAGGAACTTTGTC
```

5

TABELL V (FORTS)

1090 1100 1110 1120 1130 1140

TAATCAATTTCAAATTTTGTCAGTACAATCTCAGTACTACAGTACCAAATCTACAGTTCT

1150 1160 1170 1180 1190 1200

GCATCTCGTAGCTGCTCAGAGGTCTGTCTCTAAGTCCCTGTCTTTTATACACTGTGACAA

1210 1220 1230 1240 1250 1260

ACAACTGTCACACATGGTATAGTGAAGGTTTTGACCAGTTCCAACCGTCTTGTTGGTTGA

1270 1280 1290 1300 1310 1320

TTCATATGCCATTCGTGTGGCTGTGTGGGTGCCTACCCAGATGCGCACCTCTTTGAAGCG

1330 1340 1350 1360 1370 1380

AATGTGATATCTGTCTTCATAAACATTCTGTTATTAGCAAGTTCATATGAGAATGAAGGC

1390 1400 1410 1420 1430 1440

TGTATGCAAACAGGTGCACAGTCTGTTTCTAAGCATCATGGAAAAGTACAAGCAATTTGC

1450 1460 1470 1480 1490 1500

ACAAATCATTCTGTATTTTTCCAATAGCTAACAATGTCACCGGGACATTGTGCTATTGGA

1510 1520 1530 1540 1550 1560

TAGAAGAGACCAGCTGATCTAGACAGTTGATATCATGATCAACAGCCCCAAACAACAAGT

1570 1580 1590 1600 1610 1620

GTGCATGCGCGAGGAGTGATTGGCAGATGTATGAGAACTAAACCACTGACTGAACTTGCA

1630 1640 1650 1660 1670 1680

CTAGAGGCATCTATTTTGTCTTTTCTCATATGATGTTGGGATGGCACATGGGAGTTTTTC

1690 1700 1710 1720 1730 1740

CCCTGTCTCAGCTTGCTTTTTACCCCAAATATTGTATATCTATTAGAACCGTTGTCACAG

TABELL V (FORTS.)

1750 1760 1770 1780 1790 1800

GGTTCAAATTAACGTTTTAGTTTAGTTTTGATCATGATATACACATTTTATCCGTAAAGC

1810 1820 1830 1840 1850 1860

ATGTGCATATACAGTAAGGGCTTGTTATTCGACAGCAAGAAGAAGAGGATATGTGTGCAG

1870 1880 1890 1900 1910 1920

GCAGTCAGCTAATGCATGGATCACAAGTTATAGAATGCAAGCTTGTGATAGTTTGGACAA

1930 1940 1950 1960 1970 1980

AAACAAGTTATACTTTACTTATAAGAATATAAAATTTCCATTGCAATTGGCATAAGGAGG

1990 2000 2010 2020 2030 2040

TGTGACACAGTGACCTACTTTCAGGCCAATAGGAAACGGGATATGCCGGTTAAGTCCTCC

2050 2060 2070 2080 2090 2100

CACATACTGTATATTAGATGCAGCACATGGACCTGTCCTGTCAGAAGTCTCAGCTACAGC

2110 2120 2130 2140 2150 2160

TTTCACTTCGATCCAGATCTTTTCACTTCGATCTCCGATAATTAATTAATTAATTAATTA

BglII

2170 2180 2190 2200 2210 2220

TTAATTAATTAAGTCTCAGCCACCGTTAACTGAACATGTCAAAACCTGTGGAGACTGTTG

HpaI

2230 2240 2250 2260 2270 2280

AGATTTGATGTTCTGAAAAGATAAAGCCTATAAATAAAATGTTGCCCAAATTTCCTGCCT

2290 2300 2310 2320 2330 2340

GATGTTTTTTCTTTGTCTTTGCTACATGGCTTTGCTGCTCGGATCGGCTCACTCTGTGTAT

2350 2360 2370 2380 2390 2400

GCCACGTTCACTTTGTACTCTCCTTCTCACGGTAGGTTTATTATTTTTAGATGTGCAGTT

TABELL V (FORTS.)

2410 2420 2430 2440 2450 2460

AGTTTCTGTGAAATAACACACCACACACTGATATTGTCTGTGCATTGACTTGGTGAGTGC

2470 2480 2490 2500 2510 2520

ACATTGTTTTTGATCTTGACATATTTATATTTGATTGATCAGGTGAACTGTGTGAATCTA

2530 2540 2550 2560 2570 2580

AAGTGCTCCATACAGATGTTCTGCATTGAAAATATTCTCATTTTATTAGTGGAAGTGAGT

2590 2600 2610 2620 2630 2640

GTATGCCACATCCAATCAATTTCAGCAAACACCCCAGTATGATTTAATGCAAAAAAATGA

2650 2660 2670 2680 2690 2700

AGGTATCAAACACGCATTACTACTTTGCAGTTAAATATTTAACATTTATTCCAACACGAA

2710 2720 2730 2740 2750 2760

AAAAAGCAGTAAATAACACTTTGACAAACACGTCAGGACATCTTATTTTTGTCACCCTCA

2770 2780 2790 2800 2810 2820

CAGGCAATTTAGTATAATATATTATATATATATATATATCATATAATAATATTCAGTATA

2830 2840 2850 2860 2870 2880

ATATATATATATATATCATATTATAATATTCAGTATAATATAAAACACAAACACATATAT

2890 2900 2910 2920 2930 2940

GTATAATATAATATAACATTTTTATTTATTGAGATGCCTCTATGGACCGTGTTATAAGAA

2950 2960 2970 2980 2990 3000

GTAAAGATCAGGAGAAGTAAACATGAAGTGTAATTATGAATACTGATGTTAAATTAAGCT

3010 3020 3030 3040 3050 3060

ATGATGAGTTTTCACTGTTAATTTACCATCTCAATTAAATGTTGATGCCTCCATGACCAA

TABELL V (FORTS.)

```
3070       3080       3090       3100       3110       3120
GTTAAGCAGATGAGACTGAGACAACTGTAGAAGACAAGATGTTCACTTTGCTGAATATAG

3130       3140       3150       3160       3170       3180
CTGGCTTGACAGTTATCTATGACTCTATAAATATATATATATTTTTTTTTTTATAAAATG

3190       3200       3210       3220       3230       3240
ATTTATTTATAACTATATATCCATTTCTCAGACAGGTGCTTCATATCCCTCACTCCCGTA

3250       3260       3270       3280       3290       3300
GCTGTCCATGCTGGATCTGTCCCCGTTGTTTTTAAAAAGCTAAATAAGTTATTAACATGA

3310       3320       3330       3340       3350
CTGCATCCAGCGAGCCAAACCTGTCTGGTGTACAGCTACCAGAGAAGCTT 3'
```

TABELL VI

VEKSTHASTIGHET I TRANSGEN OG IKKE-TRANSGEN ATLANTERHAVSLAKS

	Vekt (g)		Vekst-hastighet	Lengde (cm)		Vekst-hastighet	Kondisjonerings-faktor	
	Okt 4/90	Jan 12/91	(%/dag)	Okt 4/90	Jan 21/91	(%/dag)	Okt 4/90	Jan 12/91
Transgen	20,9± 5,13(6)	47,3± 9,5(6)	0,836% 0,186(6)	12,8± 1,11(6)	16,9± 0,45(6)	0,278± 0,054(6)	8,99± 0,27(6)	9,0± 0,48(6)
Søsken	7,4± 0,26(43)	9,48± 0,6(43)	0,213± 0,023(43)	9,0± 0,086(43)	9,55± 0,16(43)	0,057± 0,007(43)	10,0± 0,01(43)	10,5± 0,1(43)
P	< 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,05	< 0,001	<0,001	< 0,01	< 0,01
Kontroll		10,4± 0,6(10)						
P		< 0,01						

Transgen laks og deres søsken ble utviklet fra egg injisert med veksthormongenkonstruksjonen og dyrket i samme akvarium. Kontroll-laks ble utviklet fra ikke-injiserte egg. Kondisjonsfaktor er et mål for vekt pr. enhet lengde; beregnet som vekt/lengde x 1000. Alle verdiene representerer gjennomsnitt ± én standardfeil. Tallene i parentes viser antall fisk, eller prøver som er analysert. Statistiske sammenligninger ble utført mellom transgen laks og søsken eller kontroller.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for økning av veksthastigheten til salmonid fisk, karakterisert ved

a) innføring i kimlinjen til salmonid fisk av et gen som koder for et salmonid veksthormon operabelt knyttet til en type III AFP-promoter, hvori promoteren erholdes fra en fisk valgt fra gruppen bestående av skjeggtorsk, gråsteinbitt, storulke og vinterflyndre; og

b) oppdrett av fisken under betingelser som tillater en øket veksthastighet av fisken.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved promoteren er fra skjeggtorsk, og veksthormonet er det endogene hormon for den salmonide fisk.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den salmonide fisk velges fra gruppen bestående av: Atlantisk laks og Chinook laks.

4. Transgen salmonid fisk, karakterisert ved at den har inkorporert i sitt genom en chimerisk genkonstruksjon hvor nevnte chimeriske genkonstruksjon omfatter:

en type III AFP promoter; og

en fisk veksthormon gensekvens.

5. Transgen fisk ifølge krav 4, karakterisert ved at nevnte type III AFP promoter er oppnådd fra en fisk valgt fra gruppen bestående av skjeggtorsk, gråsteinbitt, storulke og vinterflyndre.

6. Transgen fisk ifølge krav 4 eller 5, karakterisert ved nevnte type III AFP promoter omfatter sekvensen i Tabell V fra 5' enden ved baseposisjon 1 til baseposisjon 2115.

7. Transgen fisk ifølge et hvilket som helst foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte genkonstruksjon omfatter transkripsjonell terminal sekvens i Tabell V fra basepar posisjon 2188 til 3' enden av basepar posisjon 3350.

8. Transgen fisk ifølge et hvilket som helst foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte chimere genkonstruksjon omfatter en kombinert promoter/transkripsjonell terminal sekvens, som inkluderer en 5' utranslatert sekvens mellom nevnte promoter og transkripsjonelle terminale sekvens og hvori nevnte kombinerte sekvens har sekvensen ifølge Tabell V med unike restriksjonseter til Bg1 II ved basepar posisjon 2116 og til Hpal ved basepar posisjon 2188.

9. Transgen fisk ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte 5' utranslaterte sekvens mellom setene Bg1 II og Hpal er fjernet.

10. Transgen fisk ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t en chimerisk gensekvens som skal bli uttrykt blir innsatt i nevnte Bg1 II sete eller Hpal sete.

11. Transgen fisk ifølge et hvilket som helst foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte genkonstruksjon blir uttrykt hovedsaklig i fiskelever.

12. Transgen fisk ifølge er hvilket som helst foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte fisk er laks, skjeggtorsk, storulke eller gråsteinbitt.

13. Analyse for å bestemme en transgen fisk ifølge et hvilket som helst av foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter følgende trinn:

I. amplifisering ved DNA sekvens amplifiseringsteknikker en del av fiske

genomet som har en DNA sekvens som er en del av promoter sekvensen ifølge Tabell V; og

II. detektering av tilstedeværelse av den amplifiserte delen for å indikere en transgen fisk.

14. Analyse ifølge krav 13,
karakterisert ved at primerne anvendt i PCR amplifikasjonsteknikken er valgt fra sekvensfragmenter i Tabell V, fra 5' enden til BglII setet.

15. Analyse ifølge krav 14,
karakterisert ved at nevnte primere er valgt fra gruppen bestående av :
Primer A + 27 5' –GTCAGAAGTCTCAGCTACAGC-3' + 47 sens tråd;
Primer B + 861 5' –ATCTCAACAGTCTCCACAGGT-3' + 881 antisens tråd;
Primer C + 161 5' –TCTGCTGATGCCAGTCTTACT-3' + 181 sens tråd; og
Primer D + 339 5' –ACAGAAGTCCAGCAGGAATAT-3' + 359 antisens tråd.

16. Promoter sekvens/transkripsjonell terminal sekvens som inkluderer en 5' utranslatert sekvens mellom nevnte promoter og terminale sekvenser,
karakterisert ved at nevnte kombinerte sekvenser har sekvensen ifølge Tabell V med unike restriksjonsseter til Bg1 II ved basepar posisjon 2116 og til HpaI ved basepar posisjon 2188.

17. Promoter/terminal sekvens ifølge krav 16,
karakterisert ved at nevnte 5' utranslaterte sekvens mellom setene Bg1 II og HpaI er fjernet.

18. Promoter/terminal sekvens ifølge krav 16 eller 17,
karakterisert ved at en chimerisk gensekvens som skal bli uttrykt skal bli satt inn i nevnte Bg1 II sete eller nevnte HpaI sete.

19. Chimerisk genkonstruksjon,
karakterisert ved at den omfatter en promoter som har DNA sekvensen ifølge Tabell V fra 5' ved basepar posisjon 1 til basepar posisjon 2115.

20. Chimerisk genkonstruksjon,
karakterisert ved at den omfatter en transkripsjonell terminal sekvens hvori nevnte sekvens har DNA sekvensen ifølge Tabell V fra basepar posisjon 2188 til 3' ved basepar posisjon 3350.

21. Fiskevert av salmonid fisk,
karakterisert ved at den er transformert med et chimerisk gen ifølge kravene 19 eller 20.

22. Vert ifølge krav 21,
karakterisert ved at nevnte transformerte vert er en fiske embryocelle.

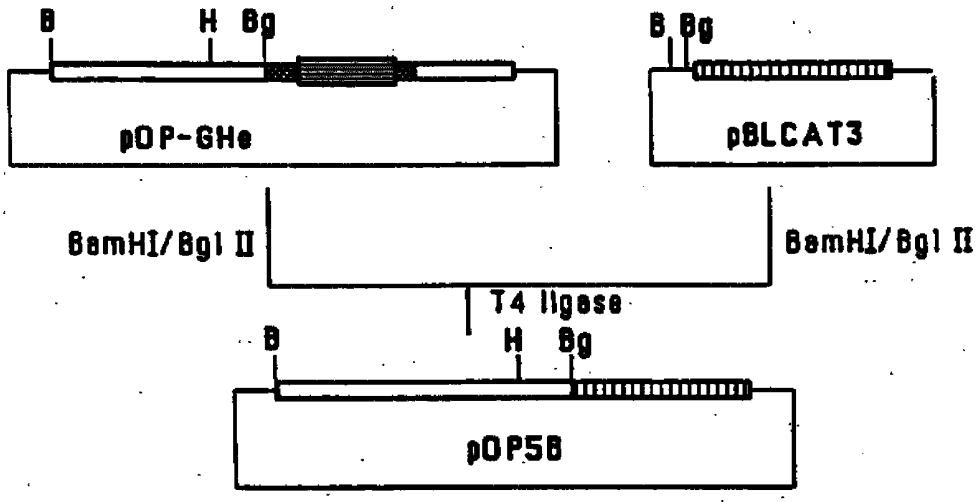

B
H
Bg
pOP-GHe
B
Bg
pBLCAT3
BamHI/Bgl II
BamHI/Bgl II
T4 ligase
B
H
Bg
pOP5B

FIG.1.A.

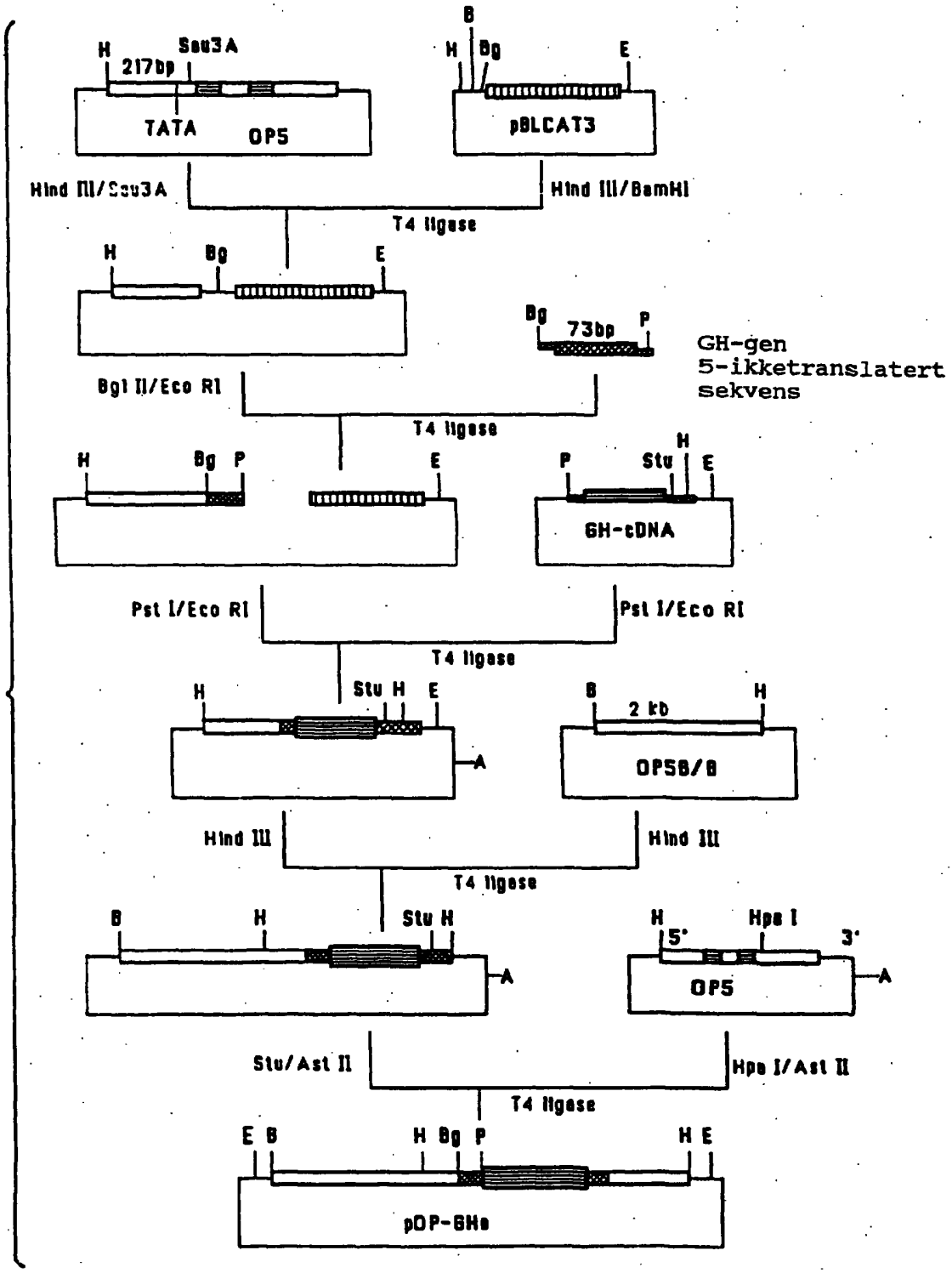

H
Sau3A
217bp
TATA
OP5
B
H
Bg
E
pBLCAT3
Hind III/Sau3A
Hind III/BamHI
T4 ligase
H
Bg
E
Bg
73bp
P
GH-gen
5-ikketranslatert
sekvens
Bgl II/Eco RI
T4 ligase
H
Bg
P
E
P
Stu
H
E
GH-cDNA
Pst I/Eco RI
Pst I/Eco RI
T4 ligase
H
Stu
H
E
A
B
2 kb
H
OP5B/B
Hind III
Hind III
T4 ligase
B
H
Stu
H
A
H
5'
Hpa I
3'
OP5
A
Stu/Ast II
Hpa I/Ast II
T4 ligase
E
B
H
Bg
P
H
E
pOP-GHa

FIG.1.B.

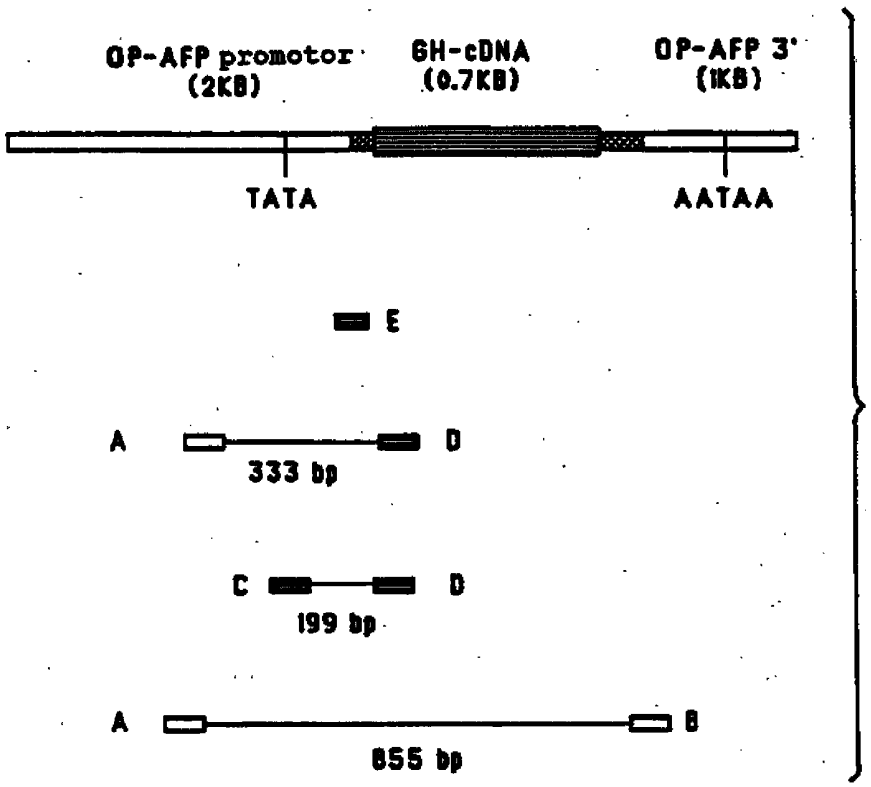

OP-AFP promotor
(2KB)
GH-cDNA
(0.7KB)
OP-AFP 3'
(1KB)
TATA
AATAA
E
A
D
333 bp
C
D
199 bp
A
B
855 bp

FIG.2.

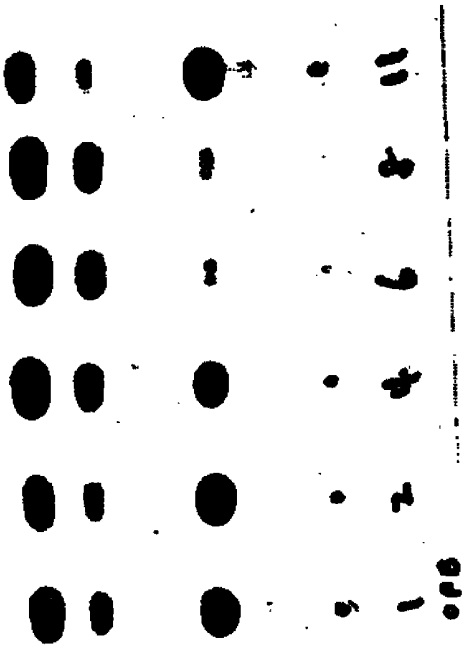
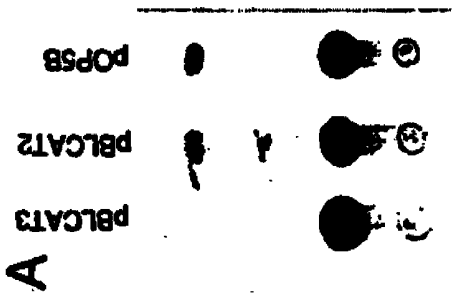


FIG.4.



RTH-149

FIG.3.

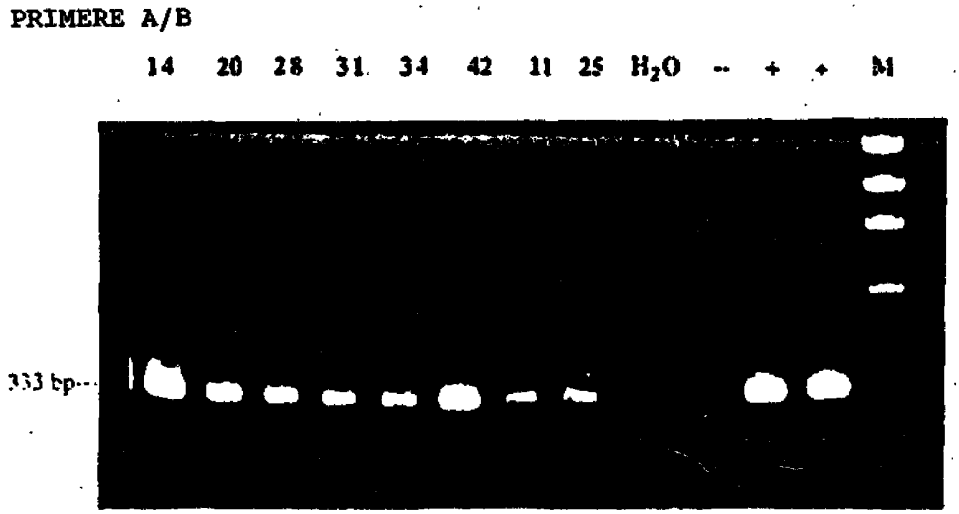

PRIMERE A/B
14 20 28 31 34 42 11 25 H_2O -- + + M
333 bp

FIG.5A.

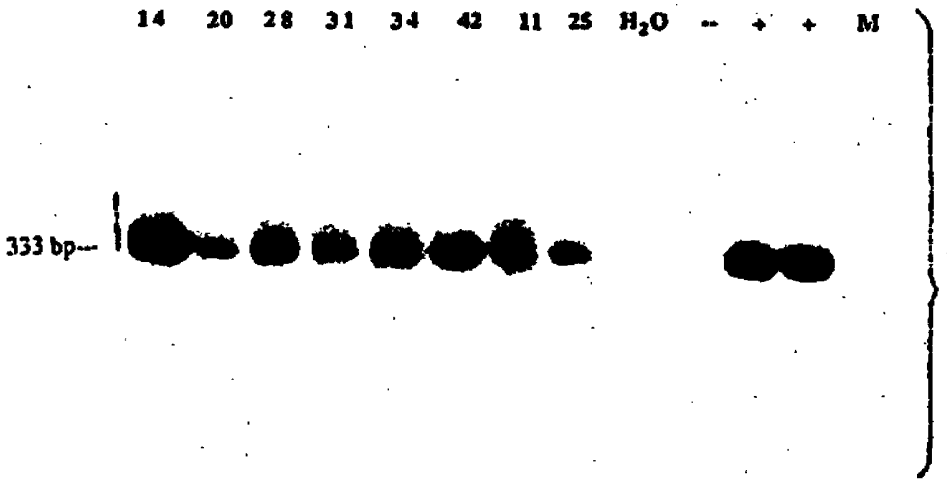

14 20 28 31 34 42 11 25 H_2O -- + + M
333 bp

FIG.5B.

Primere C/D

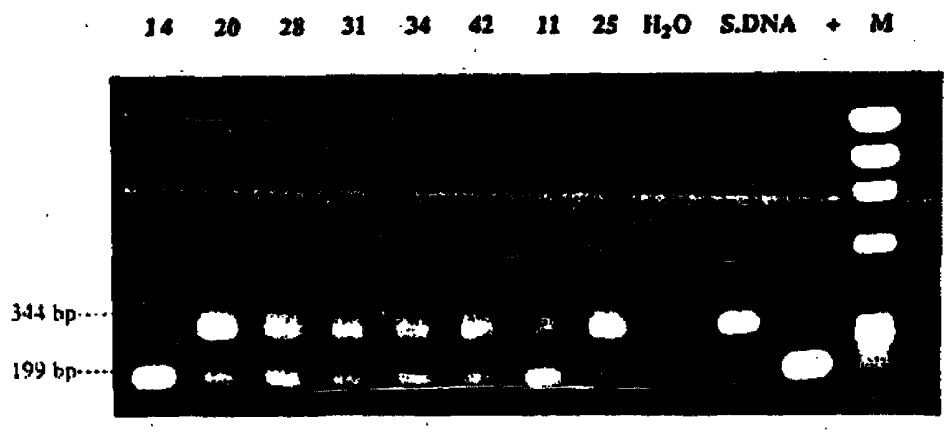


FIG.6A.

Primere A/B

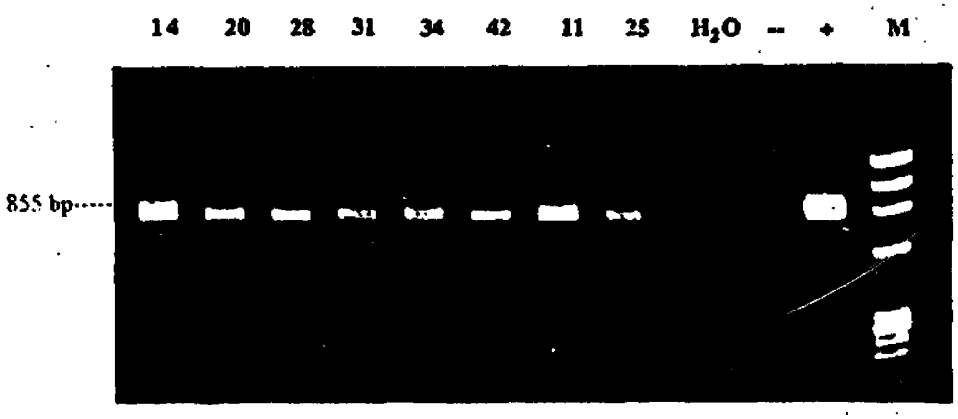


FIG.6B.

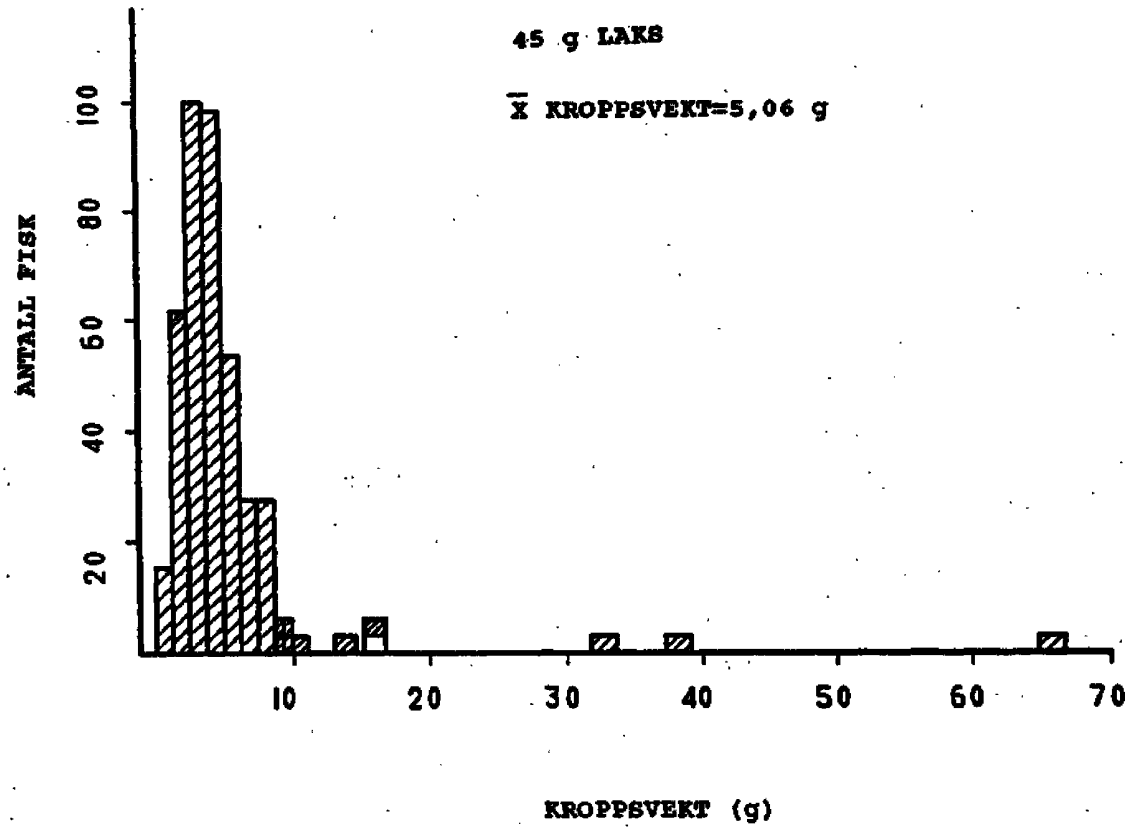

45 g LAKS
$\bar{x}$ KROPPSVEKT=5,06 g
ANTALL FISK
20
40
60
80
100
10
20
30
40
50
60
70
KROPPSVEKT (g)

FIG.7.

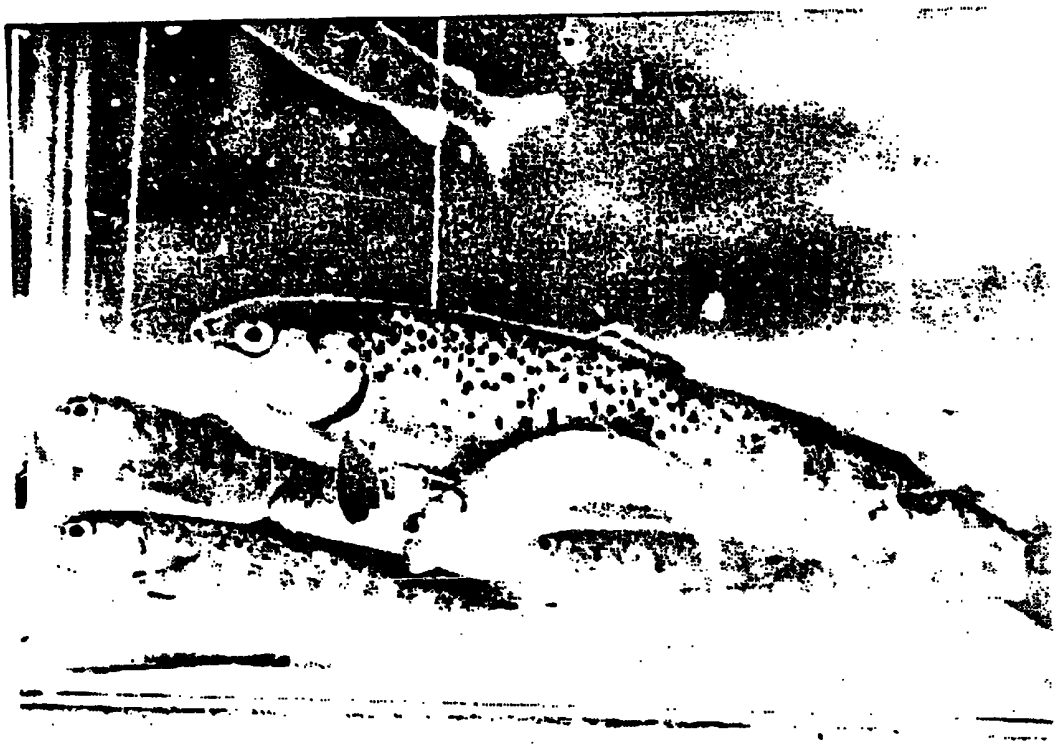


FIG.12.



FIG.8.

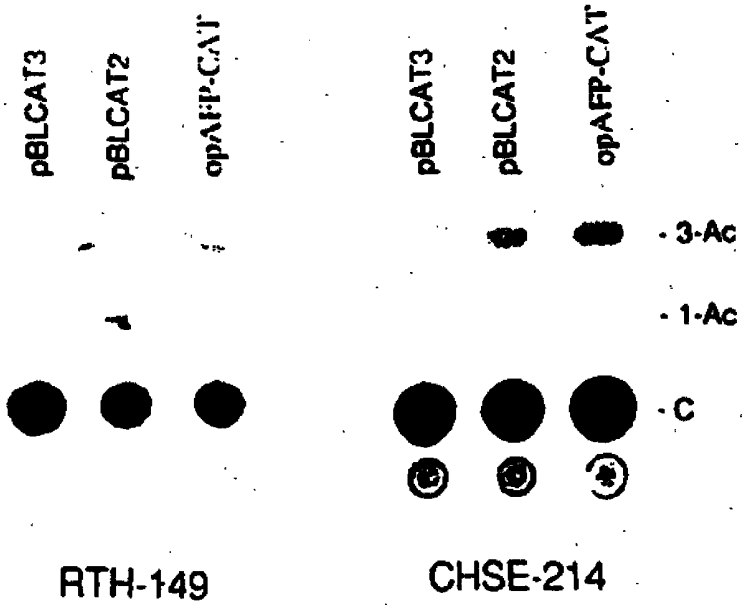

pBLCAT3
pBLCAT2
opAFP-CAT
pBLCAT3
pBLCAT2
opAFP-CAT
- 3-Ac
- 1-Ac
- C
RTH-149
CHSE-214

FIG.9.

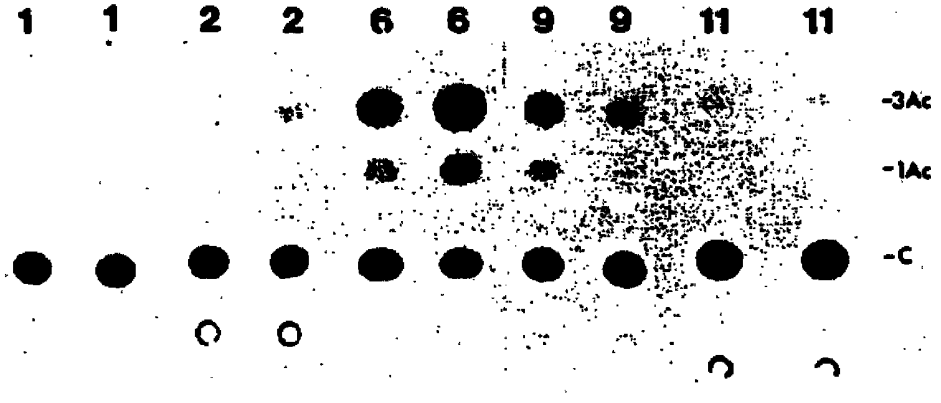

1 1 2 2 6 6 9 9 11 11
-3Ac
-1Ac
-C

FIG.10.

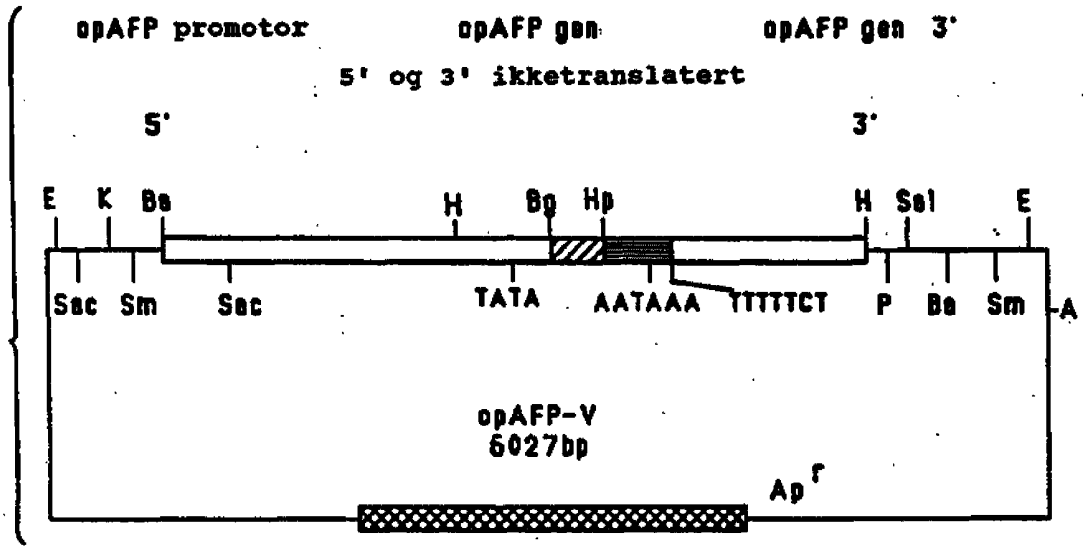

opAFP promotor
opAFP gen
opAFP gen 3'
5' og 3' ikketranslatert
5'
3'
E
K
Ba
H
Bg
Hp
H
Sal
E
Sac
Sm
Sac
TATA
AATAAA
TTTTTCT
P
Ba
Sm
A
opAFP-V
6027bp
Ap r

FIG.11.

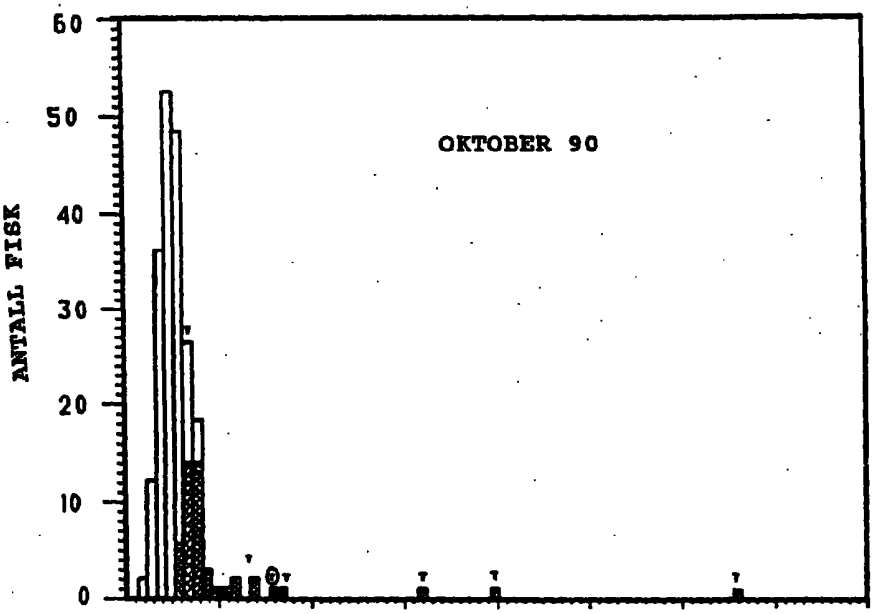


FIG.13.A.

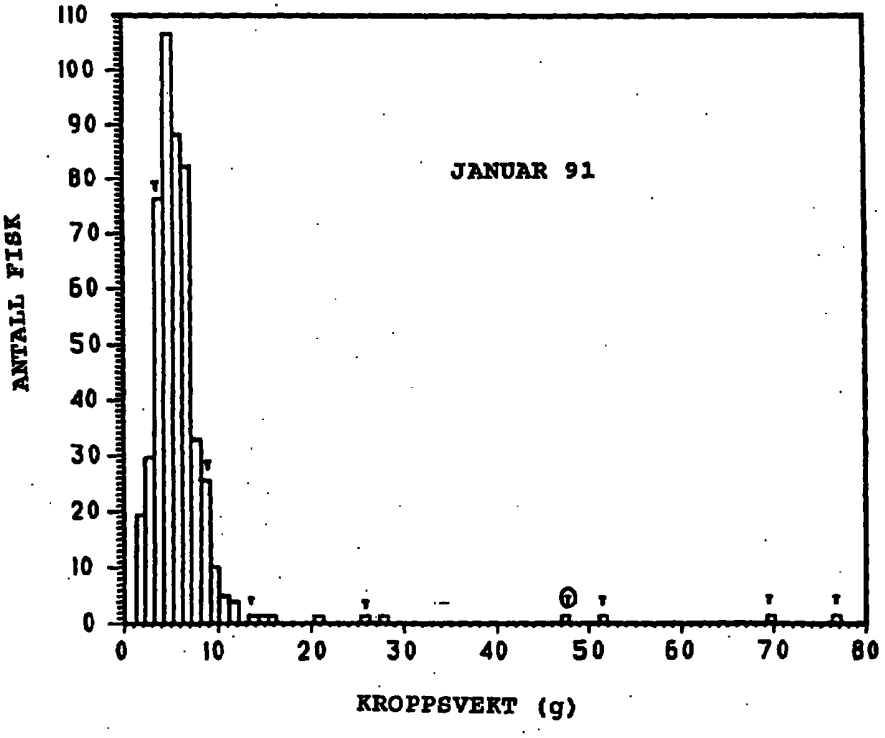


FIG.13.B.