(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 925359 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 925359

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/56
C12N 15/31
C12N 15/80
C12N 9/24

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.03.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.11.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **25.11.1992**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **20.03.1992 PCT/NL1992/000056**

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

27.03.1991 EP 91200720

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **DSM N.V.,** Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Van Heuvel, Margaretha,** Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)
2 • **Bakhuis, Janna Gardina,** Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)
3 • **Coutel, Yves,** France, RANSKA, (FR)
4 • **Harder, Abraham,** 2651 EP Berkel en Rodenrijs, ALANKOMAAT, (NL)
5 • **De Graaff, Leendert Hendrik,** Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)
6 • **Flipphi, Michel Johannes Anthonie,** Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)
7 • **Van Der Veen, Peter,** Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)
8 • **Visser, Jacob,** CK Wageningen, ALANKOMAAT, (NL)
9 • **Andreoli, Peter Michael,** Belgium, BELGIA, (BE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Sieniperäisiä arabinaania hajottavia entsyymejä koodattavien DNA-molek yylien kloonaus ja ilmentäminen

Kloning och expression av DNA-molekyler, som kodar för arabinandegrade rande enzymer av svampursprung

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

CBS 156.91 CBS CBS 187.92 CBS CBS 188.92 CBS

Sieniperäisiä arabinaania hajottavia entsyymejä koodittavien DNA-molekyylien kloonaus ja ilmentäminen - Kloning och expression av DNA-molekyler, som kodar för arabinandegraderande enzymer av svampursprung

Tämä keksintö koskee molekyylibiologian aluetta. Erityisesti tämä keksintö koskee sieniperäisiä entsyymejä koodittavien geenien kloonausta ja ilmentämistä.

Kasvin soluseinän koostumus on monimutkainen ja vaihteleva. Polysakkarideja tavataan pääasiassa pitkäketjuisessa muodossa käsittäen selluloosan (kasvin soluseinän pääasiallinen rakennekomponentti), hemiselluloosan (joka käsittää erilaisia β-ksylaaniketjuja) ja pektiiniaineet (jotka koostuvat galakturonaaneista ja ramnogalakturonaaneista; arabinaaneista; ja galaktaaneista ja arabinogalaktaaneista). Elintarviketeollisuuden näkökulmasta katsoen pektiiniaineista, erityisesti arabinaaneista, on tullut yksi tärkeimmistä aineosista kasvin soluseinämissä (Whitaker, J.R. (1984) Enzyme Microb. Technol., 6, 341).

Arabinaanit koostuvat pääketjusta, jonka muodostavat α-L-arabinoosialayksiköt kytkettyinä α-(1->5)-sidoksilla toisiinsa. Sivuketjut on kytketty α-(1->3)-sidoksin tai joskus α-(1->2)-sidoksin α-(1->5)-L-arabinaanipäärunkoon. Omenassa esimerkiksi kolmannes kokonaisarabinoosista on läsnä sivuketjuissa. Arabinaanin molekyylipaino on tavallisesti noin 15 kDa.

Arabinaanien hajotukseen kykenevistä entsyymeistä on tulossa yhä tärkeämpiä elintarviketeollisuudelle. Mehutuotannossa esimerkiksi tarve lisätä saantoja tuotantokustannusten vähentämiseksi on tehnyt välttämättömäksi perinteisten prosessien modifioinnin. Se, että hedelmän ydinmassaa esikäsitellään entsymaattisesti ennen puristusta spesifisillä entsyymituotteilla, parantaa tuntuvasti mehusaantoa liuottamalla soluseinän polysakkarideja.

Väkevöityjen mehujen tuotannossa on kuitenkin ongelmien lähteenä ollut alituinen sameus, jota yleisesti nimitetään "arabinaanisameudeksi". Arabinaanisameutta esiintyy useammin väkevöidyssä mehussa kuin väkevöimättömässä mehussa. Tämä saattaa osoittaa sen, että vesiaktiivisuudella on vaikutusta arabinaanin liukoisuuteen. Lisäksi on todettu, että tämä sameus on liukoista 60 ja 80°C:n välillä.

On myös havaittu, että samalla kun haarautunut arabinaani on liukoinen väkevöidyissä jäähdytetyissä omena- ja päärynämehuissa, lineaarinen, suoraketjuiseksi tehty α-(1->5)-L-arabinaani on paljon vähemmän liukoinen. Tätä suoraketjuiseksi tehtyä α-(1->5)-L-arabinaania muodostuu L-arabinaanista arabinaania hajottavan entsyymin vaikutuksesta, jota on läsnä kaupallisissa Aspergillus nigeristä saaduista pektiinientsyymivalmisteissa, joita käytetään yleisesti mehusaannon lisäämiseksi ydinmassan käsittelyn jälkeen mutta ennen puristamista.

Toisaalta, suoraketjuiseksi tehtyjen arabinaanien katsotaan olevan edullisia tiettyihin muihin käyttötarkoituksiin. WO 90/06343:ssa tuodaan esille sokerijuurikkaan arabaanin sivuhaarojen poisto α-L-arabinofuranosidaasin vaikutuksesta, joka ei sisällä endo-arabinanaasiaktiivisuutta, jota eristetään Aspergillus nigerin kasvusuodoksesta tai kaupallisesta pektinaasiseoksesta käyttäen ioninvaihto- ja geelisuodatuskromatografiamenetelmiä. Suoraketjuiseksi tehtyä arabinaania voidaan käyttää rasvan korvikkeena elintarvikkeissa.

Useiden erilaisten kasvien ja mikro-organismien tiedetään tuottavan arabinaania hajottavia entsyymejä, näiden joukossa sienten kuten niiden, jotka kuuluvat sukuihin Aspergillus, Corticium, Rhodotorula (Kaji, A. (1984) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 42, 383), Dichotomitus (Brillouet et al. (1985) Carbohydrate Research, 144, 113),

Ascomycetes ja Basidiomycetes (Sydow, G. (1977) DD-patenttihakemus 124,812).

Erityisesti Aspergillus niger -rihmasienen tiedetään tuottavan kolmea erilaista arabinaania hajottavaa entsyymiä: α-L-arabinanaasia, jonka molekyylipaino on suunnilleen 35 kDa ja kahta α-L-arabinofuranosidaasia, joiden molekyylipainot ovat suunnilleen 118 ja vastaavasti 60 kDa, (Rombouts et al. (1988) Carbohydrate Polymers, 9, 25). [N.B. van der Veen et al. ((1991) Arch. Microbiol., 157, 23) ilmoittaa molekyylipainoiksi 43, 83 ja vastaavasti 67 kDa näille kolmelle samalle entsyymille].

35 kDa arabinanaasilla (tunnetaan myös ABN A:na) on endoaktiivisuutta ja se katkaisee yksinomaan 1->5-sidoksia. Tämän entsyymin aktiivisuus pienenee, kun 1,5-α-L-arabinaanisekvenssit lyhenevät ja arabinoosidimeerien ja -trimeerien pitoisuus lisääntyy (Rombouts et al., edellä). [N.B. van der Veen et al. (1991) ilmoitti molekyylipainoksi 43 kDa.]

118 kDa α-L-arabinofuranosidaasi (tunnetaan myös nimellä arabinofuranosidaasi A, ABF A tai EKSO A) katkaisee yksinomaan 1->5 sidoksia eksotyyppisellä aktiivisuudella mikä näkyy arabinoosimonomeerien kertymisenä. Tämän entsyymin korkein aktiivisuus kohdistuu pienimolekyylipainoisiin substraatteihin (Rombouts et al., edellä). [N.B. van der Veen et al. (1991) ilmoitti molekyylipainoksi 83 kDa.]

60 kDa α-L-arabinofuranosidaasi (tunnetaan myös nimellä arabinofuranosidaasi B, ABF B tai EKSO B), jolla myös on eksotyyppistä aktiivisuutta, katkaisee enimmäkseen 1->3 ja 1->2 α-L-arabinaaneja, kyeten kuitenkin myös katkaisemaan 1->5 α-L-arabinaaneja. Vain arabinoosimonomeerejä havaitaan jälleen α-L-arabinaania sisältävän substraatin pilkkomisen jälkeen (Rombouts et al., edellä).

[N.B. van der Veen et al. (1991) ilmoitti molekyylipainoksi 67 kDa.]

A. nigerin ABF B -entsyymillä on myös osoitettu kyky katkaista 1->6 sidos terminaalisen arabinofuranosyyliyksikön ja monoterpenyyli-α-L-arabinofuranosyyliglukosidien välissä olevan (intermediaarisen) glukoosin välillä (Gunata et al. (1989) EP-patenttihakemus 332.281; Gunata et al. (1990) J. Agric. Chem., 38, 772).

Muilla sienillä kuten Dichotomitus squalensilla (Brillouet et al., edellä), Corticium rolfsiilla ja Rhodotorula flavalla (Kaji, A., edellä) on identifioitu A. nigerin ABF B -entsyymiaktiivisuuden kaltaista aktiivisuutta omaavia entsyymejä.

Mahdollinen ratkaisu sameudenmuodostusongelmaan mehuissa voi olla entsyymivalmisteen käyttäminen, joka sisältää arabinanaasi (ABN A):ta ja ABF A - ja ABF B -entsyymejä paremmassa tasapainossa, tai vaihtoehtoisesti entsyymejä, joilla on samankaltaiset aktiivisuudet, so. yksi tai useampi arabinofuranosidaasi saatuna toisesta mikro-organismista, joka kykenee pilkkomaan 1->3 ja 1->2 α-L-arabinaaneja samoin kuin 1->5 α-L-arabinaaneja. A. nigerin normaalilla fermentoinnilla ei kuitenkaan kyetä tuottamaan riittävästi haluttuja arabinofuranosidaaseja. Olisi sitä paitsi edullista kyetä vähentämään ABF A -, ABF B - ja ABN A -aktiivisuuksia optimitulosten kannalta erityiskäyttösovellutuksissa.

ABF B -entsyymin kykyä katkaista monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidien 1->6 sidos voidaan käyttää edesauttamaan aromikomponenttien vapautumista erilaisista hedelmämehuista ja siten niiden aromien lisääntymistä (Gunata, Z. et al. (1989 ja 1990), edellä). Olisi kuitenkin edullista käyttää puhdistettua ABF B -entsyymiä tai ABF B:n kaltaista entsyymiä tähän tarkoitukseen, koska

muun entsyymiaktiivisuuden läsnäolo voi hajottaa muita tärkeitä mehukomponentteja ja niin ollen sillä voi olla haitallinen vaikutus mehun lopulliseen laatuun.

Mikrobisia arabinaania hajottavia entsyymejä tuotetaan luonnossa aina yhdessä muiden entsyymien kanssa, joilla on polysakkarideja hajottavia aktiivisuuksia, kuten pektinaasien, ksylanaasien, asetyyliksylaaniesteraasien, setyyliesteraasien, galaktanaasien ja sellulaasien kanssa. Kuten edellä on mainittu, joidenkin käyttösovellutusten kohdalla näitä entsyymiaktiivisuuksia ei tarvita tai haluta. Sen lisäksi, johtuen verrattain matalista ilmenemistasoista villityypin kannoissa, arabinaania hajottavat entsyymit ovat osoittautuneet jonkin verran vaikeiksi eristää sekä toisistaan että muista A. nigerin tuottamista entsyymeistä.

Tiedetään, että fermentointiolosuhteita voidaan vaihdella kiinnostuksen kohteena olevien entsyymien tuotannon suosimiseksi. Tiedetään myös, että haluttua entsyymiä koodittavan geenin kloonaus ja sen ilmentäminen luonnollisessa isännässään tai toisessa yhteensopivassa ekspressioisännässä lisää spesifisesti kiinnostuksen kohteena olevan entsyymin tuotantoa. Tämä jälkimmäinen menetelmä on erityisen käyttökelpoinen, jos kiinnostavaa entsyymiä on tarkoitus saada suurina määrinä tai muodossa, joka on vapaa muusta, ei-toivotusta entsyymiaktiivisuudesta.

Olisi selvästikin käyttökelpoista lisätä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta yhdistelmä-DNA -tekniikan avulla. Tähän mennessä ei kuitenkaan ole ollut saatavissa geenejä, jotka koodittavat A. nigerin arabinaania hajottavia entsyymejä. Olisi sen mukaisesti hyvin merkityksellistä saada geenejä, jotka koodittavat sieniperäisiä arabinaania hajottavia entsyymejä, jotka voidaan ilmentää natiivissa isännässä, tai vaihtoehtoisesti muissa mikrobi-isännissä, joissa voidaan saada aikaan yhden tai

useamman arabinaania hajottavan entsyymin korkeita ilmentymistasoja.

Schwarz et al. ((1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 368) on kuvaillut bakteeristen yhdistelmä-α-L-arabinofuranosidaasien ilmentymistä. Bakteerista arabinofuranosidaasia koodittava geeni eristettiin Clostridium stercorariumista ja ilmennettiin E. coli -isännässä.

Arabinosidaasia koodittava geeni kloonattiin anaerobisesta bakteerista Bacteriodes ovatus ja ilmennettiin E. colissa kuten Whitehead & Hespell ovat kuvailleet ((1990) J. Bacteriol., 172, 2408).

E. coli -ilmentämisisäntien katsotaan kuitenkin joissain tapauksissa olevan vaarallisia proteiinien tuottamiseksi yhdistelmä-DNA -menetelmillä johtuen niiden epämiellyttävästä sivutuotteiden kuten toksiinien tuotannosta. Sen lisäksi E. colissa ilmennettäessä suuria määriä heterologista proteiinia pyrkii kasautumaan solujen sisään. Halutun proteiinin myöhempi puhdistaminen E. colin intrasellulaarisesta proteiinimassasta voi joskus olla vaikeaa.

Sen lisäksi, koska bakteerigeenit eivät sisällä introneja, kohdataan hyvin vähän ongelmia sellaisten geenien kloonaamisessa ja ilmentämisessä prokaryoottisissa isännissä. Toisaalta, eukaryoottisten geenien ilmentäminen ei aina ole niin mutkatonta. Tiedetään hyvin, että eukaryoottisista kannoista eristetyt geenit voivat sisältää introneja. Tämä tuo luonnostaan komplikaatioita näiden geenien kloonaukseen ja ilmenemiseen, jos prokaryoottisen isännän tulisi olla edullinen.

Lisäksi on olemassa tiettyjä eroavuuksia sieniperäisten ja bakteeristen arabinaania hajottavien entsyymien fysikaalisten ominaisuuksien välillä. Sienientsyymien pH-optimi on yleensä alueella ≤ 3,0 - 6,0. Muutamat sienila-

jit tuottavat arabinaania hajottavia entsyymejä, joiden pH-optimi on niinkin alhainen kuin pH 2,0. Nämä pH-optimit ovat yleensä merkittävästi alempia verrattuna samanlaisiin entsyymeihin eri bakteerikannoista, joiden pH-optimi on alueella pH 5,0 - 7,0 (Karimi ja Ward (1989) J. Indust. Microbiol., 4, 173; Lee ja Forsberg (1987) Can. J. Microbiol., 33, 1011). On siis selvää, että bakteeriset arabinaania hajottavat entsyymit ovat vähemmän sopivia käyttöön esimerkiksi prosesseissa, joissa tarvitaan alempia pH-olosuhteita.

Tämä keksintö koskee puhdistettuja ja eristettyjä sieniperäisiä DNA-molekyylejä, joista kukin koodittaa entsyymiä, jolla on arabinaania hajottavaa aktiivisuutta.

Tämän keksinnön kohteena on myös saada aikaan DNA-rakenteita tämän keksinnön mukaisten DNA-molekyylien tehostettua mikrobista ilmentämistä varten. DNA- (tai ekspressio-)rakenteet sisältävät DNA-molekyylin, joka koodittaa haluttua arabinaania hajottavaa entsyymiä, joko natiivien 5' ja 3' säätelyalueiden kanssa tai, vaihtoehtoisessa suoritusmuodossa, hybridi-DNA -rakenteita tuotetaan, joissa DNA-molekyyli on toimivasti kytketty säätelyalueisiin kuten promoottoriin, erityksen ohjaussignaaliin ja terminaattorisignaaliin, jotka voidaan valikoida, jotta saadaan aikaan entsyymin optimaalinen ilmeneminen halutussa ekspressioisännässä ja haluttaessa erittyminen siitä.

Tämän keksinnön kohteena ovat lisäksi mikrobiset ekspressioisännät, jotka on transformoitu yhdellä tai useammalla tämän keksinnön mukaisella DNA-rakenteella, jotka kykenevät tehostettuun ilmentämiseen ja haluttaessa sieniperäisen arabinaania hajottavien entsyymien erittämiseen.

Tämän keksinnön kohteina ovat vielä lisäksi menetelmät kiinnostuksen kohteina olevien arabinaania hajottavien

entsyymien tuottamiseksi suurina määrinä, joita entsyymejä voidaan edullisesti käyttää teollisissa prosesseissa. Tyypillisesti teollisuusprosesseissa, joissa edellytetään arabinaania hajottavien entsyymien aktiivisuutta alemmassa pH:ssa kuin missä samankaltaiset bakteeriperäiset entsyymit toimivat optimaalisesti.

Kuvio 1. Lohkokaavio puhdistusmenettelystä α-L-arabinofuranosidaasi (ABF B) -entsyymin saamiseksi A. nigeristä.

Kuvio 2. A. nigerin ABF B -proteiinin N-pään aminohapposekvenssi (kaava 1) ja oligonukleotidiseoksen AB1719 nukleotidisekvenssi (kaava 1a).

Kuvio 3. A. nigerin ABF B -proteiinin 15 kDa CNBr-fragmentin N-pään aminohapposekvenssi (kaava 3) ja oligonukleotidiseoksen AB2306 nukleotidisekvenssi (kaava 3a).

Kuvio 4. Osittainen restriktioentsyymikartta hybridisoituvasta faagiklooni 7:stä.

Kuvio 5. A. nigerin abfB-geenin nukleotidisekvenssi (kaava 4).

Kuvio 6. A. nigerin ABF B -proteiinin aminohapposekvenssi (kaava 5), johdettuna abfB-geenin sekvenssistä ja varmistettuna abfB cDNA-sekvenssin avulla.

Kuvio 7. pAB 6-1:n fyysinen kartta. 14,5 ke (kiloemästä sisältävä) HindIII DNA-insertti pUC19:ssa sisältää kokonaisen amyloglukosidaasi (AG)-lokuksen A. nigeristä.

Kuvio 8. Kaaviokuva AG/abfB-geenifuusioiden muodostamisesta polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla. Kaikkien käytettyjen oligonukleotidialukkeiden sekvenssit esitetään tekstissä.

Kuvio 9. Kaavioesitys pAGabfB2:n ja pAGabfB3:n konstruoinnista. Selitys käytetyistä symboleista:
 : sekvenssit, jotka koodittavat A. nigerin amyloglukosidaasi (AG)-geenin (glaA) 18 aminohappoista signaalipeptidiä.
 : sekvenssit, jotka koodittavat valmista ABF B -proteiinia
Amp : ampisilliiniresistenssigeeni
ori : E. colin replikaation aloituskohta
AG : A. nigerin amyloglukosidaasi (AG) -promoottori

Kuvio 10. Ekspressiokasetti pAGabfB4:n konstruointi. Selitys käytetyistä symboleista:
pyrA : A. nigerin geeni, joka koodittaa orotidiini-5'-fosfaatti-dekarboksylaasia
Muut symbolit ovat samat kuin kuvion 9 selityksessä esitetyt symbolit.

Kuvio 11. Ekspressiokasetti pAGabfB5:n konstruointi. Selitys käytetyistä symboleista:
amdS : A. nidulansin geeni, joka koodittaa asetamidaasia
Loput symboleista ovat samoja kuin kuvion 9 selityksessä esitetyt symbolit.

Kuvio 12. Restriktiokartta cDNA-klooni pC1X1:stä. Vain KpnI-, PstI- ja XhoI-kohdat on esitetty. Restriktiokohdat pC1X1:n pBluescript SK^{-}vektoriosan monikytkijästä on osoitettu suluissa eikä piirrettynä oikeassa mittakaavassa.

Kuvio 13. pIM900:n restriktiokartta. Viivakuvaaja esittää 8,5 ke XbaI/NseI-fragmenttia kloonattuna vektoriin pGEM-7Zf(+). Vinoviivoitettu laatikko esittää abfA-geenin likimääräistä paikkaa. Ainoastaan KpnI-, PstI- ja XhoI-kohdat esitetään.

Kuvio 14. A. nigerin abfA-geenin nukleotidisekvenssi (kaava 20).

Kuvio 15. A. nigerin ABF A -proteiinin aminohapposekvenssi (kaava 21) saatuna abfA cDNA-sekvenssistä.

Kuvio 16. A: A. nidulansin abfA-transformanttien ja villityyppi WG096:n kasvusuodoksien analyysi, joita oli kasvatettu 24 tuntia sokerijuurikasmassalla, määritettynä SDS-PAGE:n avulla, jota seurasi Coomassie Brilliant Blue R250 -värjäys.
kaista 1: 1 µg puhdistettua α-L-arabinofuranosidaasi A:ta
kaista 2: WG096
kaistat 3-6: sattumanvaraisesti valitut abfA-transformantit
B: A. nigerin abfA-transformanttien ja villityyppi N402:n kasvusuodoksien analyysi, joita oli kasvatettu 24 tuntia sokerijuurikasmassalla, määritettynä Western blot -analyysin avulla.
kaista 1: 1 µg puhdistettua α-L-arabinofuranosidaasi A:ta
kaista 2: N402
kaistat 3-6: sattumanvaraisesti valitut abfA-transformantit

Kuvio 17. ABF B:n ja ABN A:n induktiomallin analyysi A. niger N572:ssa analysoiden kasvusuodokset Western blot -analyysin avulla, käyttäen anti ABF B - ja anti ABN A -vasta-aineita.
kaista 1: 24 tunnin kasvu 1-%:isella D-glukoosilla
kaista 2: 1 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 3: 2 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 4: 3 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 5: 4 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 6: 5 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 7: 6 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 8: 7 tunnin induktio 1-%:isella L-arabitolilla
kaista 9: 1 µg puhdistettua α-L-arabinofuranosidaasi B:tä

Kuvio 18. pIM950:n restriktiokartta. Viivakuvaaja edustaa 3,1 HindIII-fragmenttia kloonattuna vektoriin pEMBL19.

Vinoviivoitettu laatikko esittää abnA-geenin likimääräistä paikkaa.

Kuvio 19. A. nigerin abnA-geenin nukleotidisekvenssi (kaava 22).

Kuvio 20. A. nigerin ABN A -proteiinin aminohapposekvenssi (kaava 23) saatuna abnA cDNA-sekvenssistä.

Kuvio 21. A. nidulansin abnA-transformanttien ja villityyppi WG096:n kasvusuodosten analyysi, kasvatuksen kestettyä 24 tuntia sokerijuurikasmassalla määritettynä Western blot -analyysin avulla.
kaista 1: 1 µg puhdistettua endo 1,5-α-L-arabinanaasia A. nigeristä
kaista 2: 1 µg puhdistettua endo 1,5-α-L-arabinanaasia A. nidulansista
kaistat 3 ja 4: A. nidulansin WG096
kaista 5: Transformantti #20
kaista 6: Transformantti #18
kaista 7: Transformantti #17
kaista 8: Transformantti #16
kaista 9: Transformantti #12
kaista 10: Transformantti #11
kaista 11: Transformantti #7
kaista 12: Transformantti #6
kaista 13: Transformantti #2
kaista 14: Transformantti #1

Kuvio 22. Western blot -analyysi A. nigerin abnA-transformanttien ja villityyppi N402:n kasvusuodoksista kasvatettuina 24 tuntia sokerijuurikasmassalla, määritettynä Western blot -analyysin avulla.
A:
kaista 1: 1 µg puhdistettua endo 1,5-α-L-arabinanaasia A. nigeristä
kaista 2: N402

kaistat 3-9: Transformantit 1-7
B:
kaista 1: 1 µg puhdistettua endo 1,5-α-L-arabinanaasia A. nigeristä
kaista 2: N402
kaistat 3-9: Transformantit 8-14

Tämä keksintö koskee puhdistettuja ja eristettyjä sienistä saatavia DNA-molekyylejä ja niiden geneettisiä muunnelmia, jotka koodittavat entsyymejä, joilla on arabinaania hajottavaa aktiivisuutta. Geneettiset muunnelmat käsittävät DNA-molekyylejä, jotka koodittavat mutantteja arabinaania hajottavia proteiineja ja degeneroituneita DNA-molekyylejä, jolloin niistä ilmennetty haluttu entsyymiaktiivisuus on säilynyt.

Tämä keksintö koskee myös DNA-rakenteita (joita tässä yhteydessä nimitetään myös ekspressiorakenteiksi) yhden tai useamman arabinaania hajottavan entsyymin ilmentämiseksi halutussa ekspressioisännässä. DNA-rakenteet voivat sisältää DNA-molekyylin, joka koodittaa haluttua arabinaania hajottavaa entsyymiä natiivien 5'- ja 3'-säätelyalueiden kanssa. Keksintö koskee vaihtoehtoisesti hybridi-DNA -rakenteita, jotka sisältävät DNA-molekyylin, joka koodittaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, toimivasti kytkettynä säätelyalueisiin kuten promoottoriin, eritys- ja lopetussignaaleihin, jotka ovat peräisin homologisista tai heterologisista organismeista, näiden säätelyalueiden kyetessä ohjaamaan rakennegeenin tehostettua ilmentymistä sopivassa isännässä. Ekspressiorakenne integroidaan edullisesti valitun ekspressioisännän genomiin.

Tämä keksintö koskee lisäksi vektoreita, edullisesti plasmideja, kloonausta varten ja/tai mikrobi-isäntien transformointiin, siirtämällä mikrobi-isäntään DNA-rakenteita halutun arabinaania hajottavan entsyymin ilmentämiseksi.

Tämä keksintö koskee lisäksi mikrobi-isäntiä, jotka on transformoitu yhdellä tai useammalla vektorilla, joista kukin sisältää vähintään yhden edellä kuvaillun DNA-rakenteen. Mikrobiset ekspressioisännät voidaan valita bakteereista, hiivoista tai sienistä.

Tämän keksinnön yhteydessä ilmaisu "tehostunut ilmentyminen" määritellään DNA-rakenteen ilmentymiseksi jolloin kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä tuotetaan korkeammilla tasoilla kuin mitä tavallisesti tavataan homologisessa villityypin organismissa. Samassa yhteydessä tehostunut ilmentyminen tarkoittaa myös ilmentymistä heterologisessa organismissa, joka ei normaalisti tuota sellaista arabinaania hajottavaa entsyymiä, paitsi siirrettäessä kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava DNA-molekyyli, yhdessä sopivien säätelyalueiden kanssa heterologiseen ekspressioisäntään. Näiden ekspressioisäntien jälkipolvien tulee myös tietenkin käsittää kuuluvan tähän keksintöön.

Tämän keksinnön yhteydessä ilmaisun "homologinen" ymmärretään tarkoittavan kaikkea sitä, mikä on natiivia DNA-molekyylille, joka koodittaa kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, mukaan lukien säätelyalueet. Homologinen isäntä määritellään lajiksi, josta sellainen DNA-molekyyli voidaan eristää.

Ilmaisu "heterologinen" määritellään siten kaikeksi siksi, mikä ei ole natiivia DNA-molekyylille, joka koodittaa itse kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, mukaan lukien säätelyalueet. "Heterologinen" isäntä määritellään miksi tahansa muuksi mikrobilajiksi kuin se, josta arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava geeni on eristetty.

Tämän keksinnön puitteissa ilmaisun "kiinnostuksen koh-

teena olevan arabinaania hajottavan entsyymin" ymmärretään sisältävän sieniperäiset arabinaania hajottavat entsyymit.

Arabinaania hajottava aktiivisuus, määriteltynä tämän keksinnön yhteydessä, on entsyymin kyky vapauttaa arabinoositähteitä, joko monomeerejä tai oligomeerejä, arabinaanimolekyylirungosta tai muiden hemiselluloosarunkorakenteiden kuten arabinoksylaanien tai arabinogalaktaanien arabinaania sisältävistä sivuketjuista, tai jopa vapauttaa arabinoosimonomeerejä katkaisemalla 1->6 sidos terminaalisen arabinosyyliyksikön ja monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidien väliglukosyyliyksikön välillä.

Esimerkkejä edullisesta "arabinaania hajottavasta aktiivisuudesta" voidaan valita ryhmästä, jonka jäsenillä on:

a) kyky katkaista (1->2)-α-L-arabinosidisiä sidoksia;

b) kyky katkaista (1->3)-α-L-arabinosidisiä sidoksia;

c) kyky katkaista (1->5)-α-L-arabinosidisiä sidoksia;

d) kyky katkaista 1->6 sidos terminaalisen arabinofuranosyyliyksikön ja monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidien välissä sijaitsevan glukosyyliyksikön välillä.

Edullisimpia arabinaania hajottavia entsyymejä ovat α-L-arabinofuranosidaasit ja α-L-arabinanaasit, joilla on 1) eksotyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->5)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin; tai 2) eksotyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->3)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin ja (1->2)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin; 3) endotyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->5)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin; tai 4) kyky katkaista 1->6 sidos terminaalisen arabinofuranosyy-

liyksikön ja monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidien väliglukosyyliyksikön välillä.

Edullisia DNA-molekyylejä, jotka koodittavat tämän keksinnön mukaista arabinaania hajottavaa entsyymiä, ovat ne, joita saadaan rihmasienisuvuista Aspergillus (erityisesti A. niger, A. niger var. tubigensis (lähemmin myös Kusters-van Someren (1991) Curr. Genet., 19, 21), A. niger var. awamori, A. nidulans (lukuun ottamatta abfA-geeniä) ja A. aculeatis), Dichotomitus (erityisesti D. squalens), Corticium (erityisesti C. rolfsii), Penicillium (erityisesti P. chrysogenum) ja Rhodotorula (erityisesti R. flava). Erityisen edullisia ovat α-L-arabinanaasi (ABN A) ja α-L-arabinofuranosidaasit (ABF A ja ABF B), joita on saatavissa Aspergillus nigeristä, Aspergillus niger var. tubigensiksestä tai Aspergillus niger var. awamorista.

Tämä keksintö pitää sisällään myös DNA-sekvenssejä, jotka hybridisoituvat lievissä olosuhteissa DNA-sekvensseihin, joita on saatavissa edellä kuvailluista sienistä, mutta jotka voivat erota kodonisekvenssin osalta johtuen geneettisen koodin degeneraatiosta tai lajienvälisestä muuntelusta.

Arabinofuranosidaaseja, joilla on haluttu aktiivisuus, voidaan identifioida useilla eri menetelmillä, jotka eivät ole ratkaisevia tämän keksinnön kannalta. Esimerkiksi määritykset koskien paranitrofenolin tai arabinoosimonomeerien läsnäoloa ilmaisevat entsyymin kyvyn katkaista 1->3- tai 1->2-α-L-arabinosidisiä sidoksia käyttäen para-nitrofenyyli-α-L-arabinosidiä tai vastaavasti muita arabinaania sisältäviä substraatteja, käyttäen menetelmiä jollaisia Rombouts et al. ((1988) edellä) tai van der Veen et al. ((1991) edellä) ovat kuvailleet. Entsyymin kyky katkaista 1->5-α-L-arabinosidisiä sidoksia voidaan määrittää käyttämällä omenamehun ultrasuodatusre-

tentaatin (UFR) arabinaanisubstraattia ja määrittämällä pienten arabinosidioligomeerien läsnäolo kuten Rombouts et. al. ovat kuvailleet, edellä. Vaihtoehtoisesti voidaan mitata 1,5-α-L-arabinanaasiaktiivisuus kasvusuodoksesta käyttäen testipakkausta kuten ArabinaZyme™-tabletteja, joita Megazyme Pty. Ltd. valmistaa (North Rocks, New South Wales, Australia).

Kun kiinnostuksen kohteina oleva arabinaania hajottava entsyymi on identifioitu, sellainen arabinaania hajottava entsyymi voidaan saada rihmasienestä, joka luonnostaan tuottaa sitä, viljelemällä sientä sopivassa alustassa, eristämällä haluttu arabinaania hajottava entsyymi käyttäen tunnettuja menetelmiä jollaisia esitetään kuviossa 1 (ABF B -entsyymi) tai sellaisia, joita Rombouts et al. ((1988) edellä) tai van der Veen et al. ((1991) edellä) kuvailevat, ja määrittämällä vähintään osa puhdistetun proteiinin aminohapposekvenssistä.

Sen jälkeen voidaan saada aikaan DNA-koettimia konstruoimalla oligonukleotidejä, jotka pohjautuvat johdettuun osittaiseen aminohapposekvenssiin. Aminohapposekvenssit voidaan määrittää kokonaisen proteiinin N-päästä ja/tai sisäisten peptidifragmenttien N-päistä, jotka on saatu kokonaisen proteiinin proteolyyttisen tai kemiallisen pilkonnan kautta. Kun koetin (koettimet) on saatu, niitä käytetään sitten genomisen kirjaston tai cDNA-kirjaston seulomiseen.

Genominen kirjasto voidaan valmistaa pilkkomalla osittain sienen kromosomaalinen DNA restriktioentsyymillä, joka tunnistaa neljän perättäisen nukleotidin muodostaman DNA-sekvenssin, esim. Sau3A:lla, ja kloonaamalla tuloksena saadut fragmentit sopivaan plasmidiin tai lambda-faagivektoriin, esim. lambda GEM-11 -vektoriin.

cDNA-kirjasto voidaan vaihtoehtoisesti valmistaa kloonaa-

malla cDNA, joka on syntetisoitu mRNA:sta, joka on eristetty sienisoluista, jotka on indusoitu arabinaania hajottavan entsyymin synteesiin, sopivaan faagivektoriin, esim. lambda gt10 -vektoriin, jollaista Harmsen et al. on kuvaillut (1990) Curr. Genet., 18, 161.

Riittävän pesäke- tai plakkimäärän maljaamisen jälkeen genominen kirjasto tai cDNA-kirjasto voidaan myöhemmin seuloa sopivan DNA-koettimen avulla.

Jos tämä menetelmä on tulokseton, genominen kirjasto tai cDNA-kirjasto voidaan seuloa erottavasti cDNA-koettimien avulla, jotka on saatu indusoimattomien ja indusoitujen solujen mRNA:sta. Indusoitua mRNA:ta valmistetaan soluista, jotka on kasvatettu alustoilla, jotka sisältävät arabinaania hiilenlähteenä, kun taas indusoitumaton mRNA on eristettävä soluista, jotka on kasvatettu muulla hiilenlähteellä kuin arabinaanilla, esim. glukoosilla. Niiden kloonien joukosta, jotka hybridisoituvat vain indusoidun cDNA-koettimen kanssa, voidaan ottaa talteen haluttua arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittavan geenin sisältävä klooni. Vaihtoehtoisesti, kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava geeni voidaan identifioida ristihybridisaation avulla läheisen arabinaania hajottavan entsyymin geenin avulla.

ABF B -entsyymin ollessa kysymyksessä, oligonukleotidikoettimia saadaan arabinaania hajottavan entsyymin N-terminaalisesta aminohapposekvenssistä (lähemmin kuvio 2, kaava 1), jonka entsyymin näennäinen molekyylipaino on 60 kDa (glykosyloidussa muodossa), joka on puhdistettu Aspergillus nigerin kasvusuodoksesta, ja/tai sisäisen peptidifragmentin aminohapposekvenssistä (lähemmin kuvio 3, kaava 3), joka fragmentti on saatu pilkkomalla entsyymi CNBr:llä. Oligonukleotidiseokset AB1719 (kuvio 2, kaava 1a) ja AB2306 (kuvio 3, kaava 3a) ovat komplementaarisia

vastaavan johdetun arabinofuranosidaasi mRNA:n suhteen. Neljä positiivista faagikloonia saatiin lambda GEM-11 -kirjaston seulonnasta, valmistettuna osittain Sau3A:lla pilkotusta DNA:sta Aspergillus nigeristä, N-terminaalisen oligoseoksen AB1719 avulla.

Neljästä faagikloonista eristetty DNA hybridisoitui N-terminaalisen oligonukleotidiseos AB1719:n kanssa (lähemmin kuvio 2, kaava 1a). 2,8 ke SacI-fragmentti saatiin (lähemmin kuvio 4) ja se on sekvensoitu. Nukleotidisekvenssi ja kooditettu aminohapposekvenssi esitetään kuvioissa 5 ja 6 (kaavat 4 ja vastaavasti 5). SacI-fragmentti plasmidissa pGBabfB1 talletettiin E. coli -kannassa DH5α the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Barn, Hollanti, 11. maaliskuuta, 1991, talletusnumerolla CBS 156.91).

abfB-geeni koodittaa 499 aminohapon pituista proteiinia, jonka johdettu molekyylipaino on 52523 Da (kuvio 6, kaava 5), saatuna abfB-geenisekvenssistä (kuvio 5) ja varmistettu abfB cDNA:n sekvenssin avulla. N-terminaalista aminohapposekvenssiä, määritettynä esimerkissä 12.2 (kaava 14), edeltää 18 aminohappoa pitkä hydrofobinen sekvenssi. CNBr-peptideistä määritetyt aminohapposekvenssit (kaavat 15, 16 ja 17) tavataan sekvenssissä aminohappopaikasta 203 paikkaan 219, paikasta 267 paikkaan 286 ja vastaavasti paikasta 294 paikkaan 312. Toimintavalmis ABF B -proteiini on 481 aminohappoa pitkä ja glykosyloitumattoman proteiinin johdettu molekyylipaino on 50663 Da ja sen teoreettinen IEP on 3,8.

ABF A -entsyymin ollessa kysymyksessä, cDNA-kirjasto valmistettiin mRNA:n indusoinnin jälkeen Aspergillus niger -kannassa käyttäen L-arabitolia induktorina. Poly A^+ RNA eristettiin ja sitä käytettiin cDNA:n syntetisoimiseksi, joka puolestaan liitettiin bakteriofagi-lambda -vektoriin. cDNA:n ekspressiokirjasto seulottiin ja faagit,

jotka ilmensivät fuusioproteiinia, joka sisälsi osan α-L-arabinofuranosidaasi A (ABF A) -proteiinista, identifioitiin koetinkäsittelemällä suotimia anti α-L-arabinofuranosidaasi A -antiseerumilla ja ilmaisemalla sen jälkeen käyttäen alkalinenfosfataasi-konjugaattia. Suurimman insertin (1,3 ke) sisältävä klooni, tunnuksella pC1X1, analysoitiin rajoitetun restriktioanalyysin avulla (kuvio 12).

Aspergillus niger -genomikirjasto konstruoitiin myös ja seulottiin abfA-geenin suhteen. Plakkihybridisaatio suoritettiin käyttäen nitroselluloosatoistosuotimia, ja 18 hybridisoituvaa plakkia, jotka toistosuotimilla näkyivät kahtena samanlaisena, identifioitiin: lambda$_{abf}$A1 - lambda$_{abf}$A18. DNA, joka eristettiin faageista lambda$_{abf}$A1, lambda$_{abf}$A5, lambda$_{abf}$A6 ja lambda$_{abf}$A12, analysoitiin restriktioanalyysin avulla. abfA-geenin genomisen alueen osittainen restriktiokartta saatiin. 8,5 ke NsiI/XbaI-fragmentti faagista lambda$_{abf}$A5 liitettiin vektoriin pGEM-7Zf(+), josta oli tuloksena plasmidi pIM900. Plasmidi pIM900 analysoitiin edelleen käyttäen restriktioentsyymejä, josta oli tuloksena kuviossa 13 esitettävä restriktiokartta. Plasmidi pIM900, joka sisälsi abfA-geenin, kloonattiin uudelleen E. coliin JM109 ja talletettiin the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Baarn, Hollanti, 17. maaliskuuta, talletusnumerolla CBS 187.92). abfA-geenin sekvenssi annetaan kuviossa 14 (kaava 20).

abfA-geeni koodittaa 628 aminohappoa pitkää proteiinia (kuvio 15, kaava 21), johdettuna abfA cDNA:n sekvenssistä. N-terminaalista aminohapposekvenssiä, määritettynä esimerkissä 12.1 (kaava 12), edeltää 25 aminohappoa pitkä hydrofobinen sekvenssi. CNBr-peptidistä määritetty aminohapposekvenssi (kaava 13) tavataan sekvenssissä paikasta 38 paikkaan 52. Toimintavalmis ABF A -proteiini on 603 aminohappoa pitkä ja glykosyloitumattoman proteiinin johdettu molekyylipaino on 65378 Da ja sen teoreettinen

IEP on 3,7.

ABN A -entsyymin tapauksessa cDNA-kirjasto valmistettiin mRNA:n induktion jälkeen Aspergillus niger -kannassa käyttäen L-arabitolia induktorina. Kantaa viljeltiin ja rihmasto otettiin talteen säännöllisin aikavälein. RNA eristettiin ja käytettiin cDNA:n syntetisointiin ja ekspressiokirjaston konstruointiin. Kirjasto monistettiin ja seulottiin käyttäen ABN A:ta vastaan tehtyjä vasta-aineita. Yksi ainoa positiivinen klooni eristettiin. cDNA-insertin pituus määritettiin pilkkomalla EcoRI/XhoI:llä ja sitä seuraavalla agaroosielektroforeesilla. cDNA-fragmentti oli suunnilleen 700 ep pitkä.

Aspergillus nigerin genominen kirjasto konstruoitiin myös ja seulottiin abnA-geenin osalta. Plakkihybridisaatio suoritettiin kuten ABN A -entsyymillä ja 6 hybridisoituvaa plakkia eristettiin. Kustakin faagista eristettiin DNA:ta ja sitä käytettiin restriktioanalyysiin, josta oli tuloksena osittainen restriktiokartta. Tätä restriktiokarttaa käyttämällä valikoitiin 3,1 ke HindIII-fragmentti abnA-geenin subkloonausta varten vektoriin pEMBL-19, josta oli tuloksena plasmidi pIM950. Tämä plasmidi jatkoanalysoitiin käyttäen restriktioentsyymejä, mikä tuotti kuviossa 18 esitettävän restriktiokartan. abnA-geenin sisältävä plasmidi pIM950 kloonattiin uudelleen E. coli JM109:ään ja talletettiin the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Baarn, Hollanti, 17. maaliskuuta, 1992, talletusnumerolla CBS 188.92). abnA-geenin sekvenssi annetaan kuviossa 19 (kaava 22).

abnA-geeni koodittaa 346 aminohappoa pitkää proteiinia, jonka molekyylipaino on 37184 Da (kuvio 20, kaava 23), johdettuna abnA cDNA:n sekvenssistä. N-terminaalista sekvenssiä, määritettynä esimerkissä 12.3 (kaava 18), edeltää 19 aminohapon pituinen hydrofobinen sekvenssi. Aminohapposekvenssi, määritettynä CNBr-peptidistä (esimerkki

12.3, kaava 19), tavataan paikasta 106 paikkaan 125 aminohapposekvenssissä. Toimintavalmis proteiini on 327 aminohappoa pitkä ja glykosyloitumattoman proteiinin johdettu molekyylipaino on 35204 Da ja teoreettinen IEP on 3,6.

Kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittavan DNA-molekyylin saatavuus mahdollistaa mutanttisten arabinaania hajottavien entsyymien konstruoinnin paikkakohdennetun mutatoinnin avulla. Jos arabinaania hajottavan entsyymin tertiäärirakenne on tunnettu ja sen katalyyttinen ja substraattia sitova domeeni on paikannettu, aminohapot mutatointia varten voidaan valita (esimerkiksi tietokonemallituksen avulla), mikä todennäköisimmin vaikuttaa katalyyttisiin ja/tai substraattia sitoviin toimintoihin. Jos proteiinin tertiäärirakenne ei ole saatavilla, sattumanvaraisia mutantteja voidaan muodostaa koko kooditussekvenssin kanssa tai proteiinin tertiäärirakenne voidaan ennustaa vertailemalla samanlaisiin tunnettuihin arabinaania hajottaviin entsyymeihin, jotka on eristetty toisesta mikro-organismista. DNA-fragmentin, joka sisältää saman DNA-molekyylin, joka koodittaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, liittämisen helpottamiseksi ekspressiorakenteisiin, jotka käsittävät yhden tai useamman heterologisen säätelyalueen, voidaan käyttää polymeraasiketjureaktiota (PCR) (PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, (1989) H.A. Ehrlich, edit., Stockton Press, New York) sopivien restriktioentsyymikohtien liittämiseksi koodaussekvenssin 5'- ja 3'-päihin. Restriktiokohtien valinta riippuu ekspressiovektorin nukleotidisekvenssistä, so. muiden restriktiokohtien läsnäolosta DNA-molekyylissä.

DNA-rakenteen tehostuneen ilmenemisen aikaansaamiseksi kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin tuottamista varten alkuperäisessä (homologisessa) tuotantolajissa, tai vaihtoehtoisesti heterologisessa

sienikannassa, kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava DNA-molekyyli, mukaan lukien sen natiivit säätelyalueet, voidaan siirtää valittuun ekspressioisäntään rakenteen kopioluvun lisäämiseksi ja niin muodoin proteiinin ilmenemisen lisäämiseksi.

Jos heterologinen ekspressioisäntä on edullinen ja hiiva- tai bakteerikanta valitaan, heterologisen ekspressiorakenteen konstruointiin käytetään keskeytymätöntä (intronitonta) DNA-molekyyliä, jotta vältettäisiin mahdollisuus, että genomisessa fragmentissa sijaitsevat silmukkasignaalit eivät tule heterologisen isännän tunnistamiksi. Tämä keskeytymätön DNA-molekyyli voidaan saada cDNA-kirjastosta, joka on konstruoitu soluista eristetystä mRNA:sta, jotka solut on indusoitu arabinaania hajottavien entsyymien synteesiin. Tämä kirjasto voidaan seuloa oligonukleotidi- tai cDNA-koettimen kanssa, jotka on saatu kuten edellä on kuvailtu. Keskeytymätön DNA-molekyyli voidaan vaihtoehtoisesti saada käyttäen polymeraasiketjureaktiota, käyttäen sopivia 5'- ja 3'-oligonukleotidejä ensimmäisen juosteen cDNA:han, joka on syntetisoitu arabinaanilla indusoitujen solujen RNA:sta.

Kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittavan DNA-molekyylin tehostunut ilmentyminen voidaan saada aikaan myös heterologisten säätelyalueiden valinnan avulla, esim. promoottorin, eritystä ohjaavan alueen ja terminaattorialueen, jotka auttavat lisäämään ilmentymistä ja haluttaessa kiinnostavan proteiinin erityksen määriä valitusta ekspressioisännästä ja/tai saavat aikaan kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin ilmentymisen indusoituvan säätelyn.

Paitsi kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittavan geenin natiivia promoottoria, muita promoottoreja voidaan käyttää sen ilmentymisen ohjaamiseen. Promoottori voidaan valita sen tehokkuuden

perusteella ohjata kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin ilmentymistä halutussa ekspressioisännässä.

Toisessa suoritusmuodossa voidaan valita konstitutiivinen promoottori ohjaamaan halutun arabinaania hajottavan entsyymin ilmentymistä. Sellainen ekspressiorakenne voi antaa lisäetuja, koska sen avulla väistetään tarve viljellä ekspressioisäntiä alustalla, joka sisältää arabinaaneja indusoivana substraattina.

Esimerkkejä voimakkaista konstitutiivisista ja/tai indusoituvista promoottoreista, jotka ovat edullisia käytettäväksi sieniekspressioisännissä, ovat ne, joita on saatavissa sienigeeneistä koskien ksylanaasin (xlnA), fytaasin, ATP-syntetaasin, alayksikkö 9:n (oliC), trioosifosfaatti-isomeraasin (tpi), alkoholidehydrogenaasin (adhA), α-amylaasin (amy), amyloglukosidaasin (AG - glaA-geenistä), asetamidaasin (amdS) ja glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (gpd) promoottoreja.

Esimerkkejä voimakkaista hiivapromoottoreista ovat ne, joita on saatavissa geeneistä koskien alkoholidehydrogenaasin, laktaasin, 3-fosfoglyseraattikinaasin ja trioosifosfaatti-isomeraasin promoottoreja.

Esimerkkejä voimakkaista bakteeripromoottoreista ovat α-amylaasi- ja Spo2-promoottorit samoin kuin promoottorit ekstrasellulaarisen proteaasin geeneistä.

Hybridipromoottoreja voidaan myös käyttää edullisesti ekspressiorakenteen indusoituvan säätelyn parantamiseksi.

Usein on edullista, että kiinnostuksen kohteena oleva arabinaania hajottava entsyymi erittyy ekspressioisännästä kasvualustaan, josta arabinaania hajottava entsyymi voidaan helpommin ottaa talteen.

Kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin natiivia eritystä ohjaavaa sekvenssiä voidaan tämän keksinnön mukaisesti käyttää ilmennetyn arabinaania hajottavan entsyymin erityksen aikaansaamiseksi.

Arabinaania hajottavan entsyymin ilmentymisen lisääntyminen johtaa kuitenkin joskus proteiinintuottotasoihin, jotka ovat enemmän kuin mitä ekspressioisäntä kykenee prosessoimaan ja erittämään, mikä saa aikaan pullonkaulan siten, että proteiinituotetta kertyy solun sisään. Keksintö koskee myös siten heterologisia ohjaussekvenssejä, jotka saavat aikaan arabinaania hajottavan entsyymin tehokkaimman erittymisen valitusta ekspressioisännästä.

Erityksen ohjaussekvenssi voidaan tämän keksinnön mukaisesti valita halutun ekspressioisännän pohjalta. Voidaan valita heterologinen erityksen ohjaussekvenssi, joka on homologinen ekspressiorakenteen muiden säätelyalueiden suhteen. Esimerkiksi runsaasti erittyvän amyloglukosidaasi (AG) - proteiinin ohjaussekvenssiä voidaan käyttää yhdessä itse amyloglukosidaasi (AG) -promoottorin kanssa samoin kuin yhdessä muiden promoottoreiden kanssa. Hybridisignaalisekvenssejä voidaan myös edullisesti käyttää tämän keksinnön yhteydessä.

Esimerkkejä edullisista heterologisista erityksen ohjaussekvensseistä ovat ne, jotka ovat peräisin sienen amyloglukosidaasi (AG) -geenistä (glaA - sekä 18- että 24-aminohappoiset versiot esim. Aspergilluksesta), α-tekijägeenistä (hiivat esim. Saccharomyces ja Kluyveromyces) tai α-amylaasigeenistä (Bacillus).

Terminaattoreiden ei yleisesti ottaen katsota olevan ratkaisevia elementtejä geenien tehostuneen ilmentymisen kannalta. Terminaattori voidaan haluttaessa valita samoista geeneistä kuin promoottorit, tai vaihtoehtoisesti voidaan käyttää homologista terminaattoria.

Edellä mainitun genomifragmentin lisäksi transformoiva DNA voi sisältää valintamarkkerin solujen erottamiseksi, jotka ovat liittäneet itseensä halutun geenin, transformoimattomasta solumassasta. Tämä valintamarkkeri, joka on varustettu sopivilla 5'- ja 3'-säätelyalueilla, voi sijaita samassa DNA-molekyylissä, joka sisältää halutun geenin, tai se voi olla läsnä eri molekyylissä. Jälkimmäisessä tapauksessa on suoritettava kotransformaatio. Ekspressiovektorin/valintavektorin suhde on säädettävä sillä tavalla, että suuri osa valituista transformanteista on myös ottanut sisäänsä vektorin, joka sisältää kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin ekspressiorakenteen.

Teollisuusmikro-organismeille sopivimmat valintasysteemit ovat ne, jotka muodostuvat valintamarkkeriryhmästä, jotka eivät edellytä mutaatiota isäntäorganismissa. Esimerkkejä sienten valintamarkkereista ovat geenit asetamidaasille (amdS), ATP-syntetaasille, alayksikkö 9:lle (oliC), orotidiini-5'-fosfaattidekarboksylaasille (pyrA), fleomysiiniresistenssille (Durand et al. (1991) Curr. Genet., 19, 149) ja benomyyliresistenssille (benA). Esimerkkejä ei-sieniperäisistä valintamarkkereista ovat bakteerinen G418-resistenssigeeni (tätä voidaan käyttää myös hiivassa mutta ei sienissä), ampisilliiniresistenssigeeni (E. coli), neomysiiniresistenssigeeni (Bacillus) ja E. colin uidA-geeni, joka koodittaa β-glukuronidaasia (GUS).

Kun haluttu ekspressiorakenne on koottu, se transformoidaan sopivaan kloonausisäntään kuten E. coliin rakenteen lisäämiseksi (monistamiseksi). Ekspressiorakenne siirretään jälkikäteen sopivaan ekspressioisäntään, jossa ekspressiorakenne integroidaan edullisesti genomiin. Tiettyjä isäntiä kuten Bacillusta voidaan käyttää sekä kloonaus- että ekspressioisäntinä välttäen siten ylimääräinen transformaatiovaihe.

Tämän keksinnön mukaisesti voidaan käyttää useita erilaisia organismeja isäntinä kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin tuottamiseksi. Jos on tarkoitus tuottaa useampia kuin yhtä kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, samaan ekspressioisäntään voidaan siirtää monia vektoreita, joista kukin sisältää ekspressiorakenteen kiinnostuksen kohteena olevalle arabinaania hajottavalle entsyymille (esim. ABF A, ABF B ja/tai ABN A). Kutakin haluttua arabinaania hajottavaa entsyymiä voidaan vaihtoehtoisesti tuottaa itsenäisesti eri ekspressioisännissä.

Tämän keksinnön yhden suoritusmuodon mukaan voidaan käyttää homologista ekspressioisäntää. Tämä käsittää ekspressiorakenteen siirtämisen takaisin kantaan, josta arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava DNA-molekyyli eristettiin, joko lisääntyneinä geenikopiomäärinä tai heterologisten säätelyalueiden ohjauksessa, joita edellä on kuvailtu, tai molemmilla tavoilla.

Toisessa suoritusmuodossa yhtä tai useampaa kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä voidaan tuottaa siirtämällä ja ilmentämällä yksi tai useampi DNA-molekyyli, joka koodittaa kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä, joista jokainen on sopivien säätelyalueiden ohjauksessa, heterologisiin isäntiin kuten bakteereihin, hiivoihin tai sieniin. Sitä tarkoitusta varten kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittava DNA-molekyyli ilmennetään edullisesti promoottori- ja terminaattorisekvenssien ohjauksessa, jotka ovat peräisin heterologisesta isännästä. Lisäksi voi olla tarpeen korvata kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin geenin natiivi eritystä ohjaava sekvenssi ohjaussekvenssillä, joka on homologinen ekspressioisännän suhteen, jotta saataisiin aikaan tuotteen tehokkain ilmentyminen ja erittyminen.

Sellaisilla tekijöillä kuin kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin koko (molekyylipaino), tarve oikeaan glykosylaatioon tai ekstrasellulaarisen erittymisen edullisuus on tärkeä merkitys ekspressioisännän valinnan kannalta.

Gram-negatiivinen bakteeri E. coli on laajasti käytetty isäntä heterologisessa geenin ilmentämisessä. Suuria määriä heterologista proteiinia pyrkii kuitenkin kertymään solun sisään. Halutun proteiinin myöhempi puhdistaminen E. colin solunsisäisestä proteiinimassasta voi joskus olla vaikeaa.

Päinvastoin kuin E. colin tapauksessa, Bacillus-suvun bakteerit ovat hyvin sopivia heterologisina isäntinä johtuen niiden kyvystä erittää proteiineja kasvualustaan. Muita isänniksi sopivia bakteereja ovat bakteerit suvuista Streptomyces ja Pseudomonas.

Riippuen kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä koodittavan DNA-molekyylin laadusta ja/tai ilmennetyn proteiinin jatkoprosessoinnin toivottavuudesta, eukaryoottiset isännät kuten hiivat tai sienet voivat olla edullisia. Hiivasolut ovat yleensä edullisempia kuin sienisolut, koska niitä on helpompi käsitellä. Jotkut proteiinit kuitenkin joko erittyvät heikosti tai joissain tapuksissa eivät prosessoidu oikein (esim. liikaglykosylaatio hiivalla). Näissä tapauksissa tulisi valita sieni isäntäorganismiksi.

Voidaan myös valita heterologinen isäntä, jolloin kiinnostuksen kohteena olevaa arabinaania hajottavaa entsyymiä muodostuu muodossa, joka on pääasiallisesti vapaa muista polysakkarideja hajottavista entsyymeistä. Tämä voidaan saada aikaan valitsemalla isäntä, joka ei normaalisti tuota sellaisia entsyymejä, kuten Kluyveromyces lactis.

Esimerkkejä edullisista ekspressioisännistä tämän keksinnön puitteissa ovat sienet kuten Aspergillus-lajit (kuvailtu EP-patenttihakemuksissa 184.438 ja 284.603) ja Trichoderma-lajit; bakteerit kuten Bacillus-lajit (kuvailtu EP-patenttihakemuksissa 134.048 ja 253.455), Streptomyces-lajit ja Pseudomonas-lajit; ja hiivat kuten Kluyveromyces-lajit (kuvailtu EP-patenttihakemuksissa 96.430 ja 301.670) ja Saccharomyces-lajit.

Erityisen edulliset ekspressioisännät voidaan valita joukosta Aspergillus niger, Aspergillus niger var. tubigensis, Aspergillus niger var. awamori, Aspergillus aculeatis, Aspergillus nidulans, Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Kluyveromyces lactis ja Saccharomyces cerevisiae.

Kiinnostuksen kohteena olevan arabinaania hajottavan entsyymin (entsyymien) tuotanto saadaan tämän keksinnön mukaisesti aikaan viljelemällä mikrobisia ekspressioisäntiä, jotka on transformoitu yhdellä tai useammalla tämän keksinnön mukaisella DNA-rakenteella, tavanomaisessa fermentaatioravintoalustassa.

Fermentaatioalusta käsittää tavanomaisen kasvatusalustan, joka sisältää hiilenlähteen (esim. glukoosi, maltoosi, melassi, jne.), typenlähteen (esim. ammoniumsulfaatti, ammoniumnitraatti, ammoniumkloridi, jne.), orgaanisen typenlähteen (esim. hiivauute, mallasuute, peptoni, jne.) ja epäorgaanisia ravinnelähteitä (esim. fosfaatti, magnesium, kalium, sinkki, rauta, jne.). Induktori (esim. sokerijuurikkaan arabinaani) voidaan sisällyttää valinnaisesti.

Sopivan alustan valinta voi pohjautua ekspressioisäntien valintaan ja/tai se voi perustua ekspressiorakenteen säätelyvaatimuksiin. Sellaiset alustat ovat hyvin alaa

tuntevien henkilöiden tiedossa. Alusta voi haluttaessa sisältää lisäkomponentteja, jotka suosivat transformoituja ekspressioisäntiä muihin mahdollisesti kontaminoiviin mikro-organismeihin nähden.

Fermentointi suoritetaan 0,5-20 päivän kuluessa panosprosessissa tai syötetyssä panosprosessissa lämpötila-alueen ollessa välillä 0-45°C ja pH:n ollessa välillä 2-10. Edulliset fermentointiolosuhteet käsittävät lämpötila-alueen välillä 20-37°C ja pH:n välillä 3-9. Sopivat olosuhteet valitaan perustuen ekspressioisäntävalintaan.

Fermentoinnin jälkeen solut poistetaan fermentaatioliemestä sentrifugoinnin tai suodatuksen avulla. Solujen poistamisen jälkeen kiinnostuksen kohteena oleva arabinaania hajottava entsyymi voidaan sitten ottaa talteen ja haluttaessa puhdistaa ja eristää tavanomaisin keinoin.

Tuote formuloidaan pysyvästi joko nestemäiseen tai kuivaan muotoon. Entsyymin immobillisointi kiinteään kantajaan voi tietyissä käyttösovellutuksissa olla edullista.

Kiinnostuksen kohteena olevia arabinaania hajottavia entsyymejä voidaan tämän keksinnön mukaisesti tuotettuna käyttää joko yksittäisesti tai seoksena, joka sisältää arabinaania hajottavia entsyymiaktiivisuuksia (so. ABF A- ja/tai ABF B- ja/tai ABN A -aktiivisuuksien yhdistelmiä), ja valinnaisesti yhdessä muiden valikoitujen entsyymien kanssa monessa eri prosessissa, joissa edellytetään arabinaania hajottavien entsyymien toimintaa. Sen lisäksi, tämän keksinnön mukaiset sieniperäiset arabinaania hajottavat entsyymit, joilla yleensä on matalammat pH-optimit kuin bakteeriperäisillä arabinaania hajottavilla entsyymeillä, sopivat erityisen hyvin teollisiin prosesseihin, jotka suoritetaan alhaisessa pH:ssa.

On todettu, että johtuen siitä seikasta, että ABF A -entsyymi vaikuttaa vain alempioligomeerisiin arabinosideihin, ABF B -entsyymi hydrolysoi edullisesti sivuketjun L-arabinoositähteiden (sisältäen jonkin verran endo-aktiivisuutta) ja ABN A vaikuttaa optimaalisesti lineaariseen arabinaaniin, ABF A- ja/tai ABF B -entsyymien seokset vaikuttavat synergistisesti ollessaan yhdistettynä endo-arabinanaasi (ABN A) -aktiivisuuden kanssa. Tämä keksintö antaa alan tutkijalle mahdollisuuden tuottaa seoksia halutuista arabinaania hajottavista entsyymiaktiivisuuksista, jotka sisältävät optimisuhteissa haluttuja aktiivisuuksia erityisiin teollisiin käyttösovelluksiin.

Tämän keksinnön mukaisesti on todettu, että tämän keksinnön mukaisella tavalla tuotettuja arabinaania hajottavia entsyymejä voidaan käyttää väkevöityjen mehujen tuotantoon, erityisesti hedelmä (esim. omena, päärynä ja vastaavat) - tai vihannesmehujen tuotantoon "arabinaanisameuden" eliminoimiseksi.

Esimerkiksi jonkin ABF B -määrän lisääminen entsyymivalmisteeseen (kuten sellaiseen, joka saadaan Aspergillus-lajista), joka vuorostaan lisätään massaan ennen puristamista, lisää tuloksena olevan mehun saantoa ilman epämiellyttävän arabinaanisameuden läsnäoloa joko väkevöidyssä tai väkevöimättönässä mehumuodossa. Kaikkia kolmea tämän keksinnön mukaisesti valmistettua arabinaania hajottavaa entsyymiä sisältävä seos voidaan lisätä väkevöityjen mehujen prosessointiin hedelmistä, jotka sisältävät suurempia arabinaanimääriä (esim. päärynämehu). Lisäentsyymiaktiivisuutta kuten pektinaasiaktiivisuutta voidaan myös lisätä optimitulosten saamiseksi, jonka alaa tunteva henkilö voi määrittää.

Sen lisäksi tämän keksinnön mukaisesti tuotettujen arabinaania hajottavien entsyymien sisällyttäminen hedelmä- ja vihannesmehuihin parantaa mehujen kuten grapehedelmämehun

suodatettavuutta. Arabinogalaktaanien hajottamiseksi, joiden tiedetään aiheuttavan viskositeettia, mehua käsitellään ensin entsyymiseoksella, joka sisältää suuria määriä arabinanaaseja ja arabinofuranosidaaseja, jotka on valmistettu tämän keksinnön mukaisesti, jota seuraa käsittely β-1-3- ja β-1-6-galaktanaaseilla.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää α-L-arabinofuranosidaaseja, erityisesti ABF B -entsyymiä aromiyhdisteiden vapautumisen edesauttamiseksi substraateista kuten mehuista tai viineistä kuten Gunata et al. on kuvaillut ((1989 ja (1990), edellä). Tämä saadaan aikaan kaksivaiheprosessissa, jossa ensimmäinen vaihe käsittää α-L-arabinofuranosidaasin käyttämisen, joka sisältää edullisesti ABF B:n kaltaista aktiivisuutta, arabinoositähteiden vapautumisen katalysoimiseksi monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosideista, jotka sisältyivät mehu- tai vihannesmehuun, katkaisemalla (1->6)-sidos terminaalisen arabinofuranosyyliyksikön ja monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidin väliglukoosin välillä. α-L-arabinofuranosidaasi on edullisesti puhdistetussa muodossa, jotta vältetään muiden mehukomponenttien ei-toivottu hajoaminen, joka voi olla haitallista mehun lopullisen laadun kannalta. Tuloksena olevaa desarabinosyloitua monoterpenyyliglukosidia käsitellään sen jälkeen β-glukosidaasilla, jolloin saadaan vapaata terpenolia. Haluttaessa molemmat reaktiovaiheet voidaan suorittaa samassa reaktioastiassa tarvitsematta eristää välituotetta (Gunata et al. (1989), edellä).

Näiden aromiyhdisteiden vapautuminen parantaa mehun tai viinin aromia. Sen lisäksi, viinin ollessa kysymyksessä, aromiyhdisteiden vapautumisen kontrollointi antaa viineille tasaisemman aromin, mikä siten vähentää tai eliminoi epämiellyttävää "heikkojen viinisatovuosien" vaikutusta.

Arabinaania hajottavia entsyymejä voidaan lisätä myös eläinten rehuihin, jotka sisältävät runsaasti arabinaaneja. Lisättäessä yksimahaisten eläinten (esim. siipikarja tai sika) rehuihin (mukaan lukien säilörehu), jotka sisältävät viljakasveja kuten ohraa, vehnää, maissia, ruista tai kauraa tai viljan sivutuotteita kuten vehnän leseitä tai maissin leseitä, entsyymi parantaa merkittävästi kasvisoluseinien hajoamista, mikä johtaa kasviravinteiden parempaan hyväksikäyttöön eläimissä. Sen seurauksena kasvunopeus ja/tai rehun konversio paranevat. Arabinaania hajottavia entsyymejä voidaan sen lisäksi käyttää arabinaaneja sisältävien rehujen viskositeetin alentamiseen.

Arabinaania hajottava entsyymi voidaan lisätä etukäteen rehuun tai säilörehuun, jos esiliottaminen tai märkädieetit ovat edullisia. Vielä edullisemmin, tämän keksinnön mukaisesti tuotetut arabinaania hajottavat entsyymit jatkavat arabinaanien hydrolysoimista rehussa <u>in vivo</u>. Sienten arabinaania hajottavat entsyymit, joilla yleensä on alemmat pH-optimit, kykenevät vapauttamaan tärkeitä ravinteita sellaisissa happamissa ympäristöissä kuin eläimen maha, joka nauttii sellaista arabinaania hajottavalla entsyymillä täydennettyä rehua.

Toinen käyttösovellutus tämän keksinnön mukaisesti tuotetuille arabinaania hajottaville entsyymeille on sellumassa- ja paperiteollisuudessa. Ksylanaasien käyttö ilmoitetaan usein hyödylliseksi poistettaessa ligniinejä ja terpenoideja selluloosasta ja hemiselluloosarungon hemiselluloosatähteistä, mikä on olennainen vaihe puun, puumassan tai puun johdannaistuotteen prosessoinnissa paperin tuottamista varten. Tämän keksinnön mukaisesti tuotettujen arabinaania hajottavien entsyymien lisääminen ksylanaasikäsittelyvaiheeseen edesauttaa arabinaania sisältävän hemiselluloosarungon hajoamista ja helpottaa siten ligniinien ja terpenoidien parannettua tehokkaampaa pois-

tamista. Arabinaania hajottavien entsyymien käyttö on erityisen edullista prosessoitaessa havupuita, joissa hemiselluloosarunko sisältää arabinoglukuroniksylaaneja.

Tämän keksinnön mukaisesti tuotettuja arabinaania hajottavia entsyymejä voidaan lisäksi käyttää muissa prosesseissa kuten esimerkiksi lisättäessä saantoa sokerijuurikasmassan entsymaattisessa hydrolyysissä, tuloksena olevan hydrolysoidun fraktion ollessa käyttökelpoinen mikroorganismien kasvualustassa; ja sykomorin tai arabikumin tai maatalousjätteiden kuten vehnäoljen hydrolyysissä.

Seuraavat esimerkit annetaan tarkoituksella esittää alaa tunteville henkilöille täydellinen esitys ja kuvaus siitä kuinka keksintöä toteutetaan ja käytetään, eikä niitä ole tarkoitettu rajoittamaan keksinnön piiriä. Tarkkuuden varmistamiseksi on nähty vaivaa mitä tulee käytettyihin lukuarvoihin (esim. määrät, lämpötila, pH jne.) mutta joitakin koevirheitä ja poikkeamia tulisi ottaa huomioon. Ellei toisin ole osoitettu, lämpötila esitetään asteina celsiusta ja paine on ilmakehän paine tai lähellä sitä.

Esimerkki 1

Entsyymimääritykset

Proteiinipitoisuus, jota käytettiin spesifisen entsyymiaktiivisuuden määrittämiseen, määritettiin Lowryn et al. menetelmällä ((1951) J. Biol. Chem. 193, 265), paitsi milloin toisin on osoitettu.

Arabinofuranosidaasiaktiivisuus voidaan määrittää lisäämällä 0,250 ml entsyymiliuosta 8 mM p-nitrofenyyli α-L-arabinofuranosidiin (PNA - 0,1 M natriumasetaattipuskurissa; pH 4,4). Reaktio pysäytettiin 10 min. inkuboinnin jälkeen 40°C:ssa lisäämällä 2 ml 0,5 M glysiini-natriumpuskuria, pH 9,0. p-nitrofenolin (pNP) pitoisuus määritettiin lukemalla absorbanssi 400 nm:ssä. 1 nkat aktiivi-

suutta vastaa yhden pNP-nmoolin vapautumista sekunnissa koeolosuhteissa. Arabinofuranosidaasiaktiivisuus voidaan vaihtoehtoisesti ilmaista yksikkönä/millilitra (U/ml) jolloin arabinofuranosidaasiaktiivisuusyksikkö määritellään entsyymimääräksi, joka vapauttaa 1 µmoolin pNP:tä minuutissa PNA:sta (lähemmin van der Veen et al. (1991), edellä).

β-D-glukopyranosidaasin ja α-L-ramnopyranosidaasin aktiivisuudet määritettiin samoissa olosuhteissa, sen mukaan mikä oli niiden vaikutus p-nitrofenyyli β-D-glukopyranosidisubstraattiin ja vastaavasti p-nitrofenyyli α-L-ramnopyranosidisubstraattiin.

Viljelmäsuodoksen endo 1,5-α-L-arabinanaasiaktiivisuus määritettiin ja laskettiin käyttäen Megazyme Pty. Ltd:'n (North Rocks, New South Wales, Australia) tuottamaa AbinaZyme™-testipakkausta valmistajan ohjeiden mukaisesti. Yhdeksi aktiivisuusyksiköksi määritellään entsyymimäärä, joka tarvitaan vapauttamaan 1 µmooli arabinoosin pelkistävää sokeriekvivalenttia lineaarisesta karboksimetyyli (1->5)-α-L-arabinaanista minuutissa määritysolosuhteissa.

Esimerkki 2

Aspergillus nigerin α-L-arabinofuranosidaasi B:n (ABF B) puhdistaminen

Kaaviokuva toimenpiteistä, joita sovellettiin α-L-arabinofuranosidaasi (ABF B) -entsyymin puhdistukseen A. nigerin HEM-kannan kasvusuodoksesta, esitetään kuviossa 1. Puhdistamiseen käytettiin viittä vaihetta: 1) fraktioitu saostaminen ammoniumsulfaatilla; 2) kokoekskluusiokromatografia; 3) ioninvaihtokromatografia; 4) geelipermeaatio; ja 5) adsorptiokromatografia.

Eluoiduista fraktioista analysoitiin arabinaania hajottavat ramnosidaasin, glukopyranosidaasin aktiivisuudet

esimerkissä 1 kuvaillun kolorimetrisen menetelmän avulla. Proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin mikrotestin avulla titrausmikrolevyllä (Margaret et al. 81985) Anal. Biochem. 147, 144). Kromatografiakokeet suoritettiin 5°C:ssa.

Esimerkki 2.1 Fraktioitu saostus $(NH_4)_2SO_4$:llä

A. niger HEM-kannasta saadun kasvusuodosnäytteen, joka sisälsi muun muassa ABF B -entsyymin, pH säädettiin 5,5-:een (α-L-arabinofuranosidaasin isoelektrinen piste) laimealla etikkahapolla ja se fraktiosaostettiin $(NH_4)_2SO_4$:llä pitoisuuksien ollessa 50, 60, 70, 80 ja 90 % kyllästyksestä lämpötilassa 5°C. Saostuma liuotettiin natriumasetaattipuskuriin (pH 4,5; 0,05 M) ja diasuodatettiin samassa puskurissa suolojen poistamiseksi. Eri fraktioiden ominaisuudet esitetään yhteenvetona taulukossa 1.

Taulukko 1
Saostumien entsyymiaktiivisuudet

Entsyymiaktiivisuus (nkat/ml)	% $(NH_4)_2SO_4$ 50	60	70	80	90
α-L-arabinofuranosidaasi	1160	1100	260	43	12
β-D-glukopyranosidaasi	1300	1700	230	37	12
α-L-ramnopyranosidaasi	131	140	63	62	2,7

Esimerkki 2.2 Kokoekskluusio Bio-Gel P-10:llä

Bio-Gel P-10 -kolonni (Bio-Rad; Richmond, Va., USA) esitasapainotettiin natriumasetaattipuskurilla (pH 4,5; 0,05 M) virtausnopeudella 60 ml/tunti. 100 ml:n näyte 50 %:ista $(NH_4)_2SO_4$-saostumaa pantiin kolonniin. Proteiinit eluoitiin samoissa olosuhteissa. 20 ml:n fraktioita kerättiin ja niistä määritettiin α-L-arabinofu-

ranosidaasiaktiivisuus. Fraktiot 14-22 koottiin yhteen ja väkevöitiin ultrasuodattamalla (raja-arvo = 10 000 x D) lähtötilavuudessa.

Esimerkki 2.3 Anioninvaihtokromatografia DEAE ART LS:llä

DEAE ART LS -kolonni (5,2 x 36 cm; IBF Biotechnics, Ranska) esitasapainotettiin 0,05 M natriumasetaattipuskurissa pH 4,5 virtausnopeudella 100 ml/tunti. Kolonniin sijoitettiin 100 ml:n tilavuus koostetta esimerkissä 2.2 (edellä) saatua α-L-arabinofuranosidaasia. Proteiini eluoitiin käyttäen natriumkloridigradienttia 0-0,5 M lähtöpuskurissa. 15 ml fraktioita kerättiin talteen ja niistä määritettiin entsyymiaktiivisuudet.

α-L-ramnosidaasihuippu ilmeni lähellä kolonnin välisijatilavuutta, mikä osoitti sen, että entsyymi oli neutraalissa tai kationisessa muodossa tässä pH:ssa (kooste CY183 III-1). β-D-glukopyranosidaasi ja α-L-arabinofuranosidaasi eluoituivat kumpikin erikseen hyvällä erotusterävyydellä käytettäessä natriumkloridigradienttia.

Fraktiot 164-166 koottiin yhteen (kooste CY183 III-3); ultrasuodatettiin ja vakioitiin glyseroliin 50/50 paino/-paino. Eri koosteiden ominaisuudet esitetään tiivistettynä taulukossa 2.

Taulukko 2.
DEAE TRISACRYL ART LS:llä puhdistettujen glykosidaasien ominaisuuksia

Tuote	Entsymaatinen aktiivisuus (nkat/ml) α-L-A*	α-L-R**	β-D-G***
Ramnopyranosidaasi (A. niger)	34,5	231	15,0
Glukopyranosidaasi (A. niger)	0	0	243
Arabinofuranosidaasi (A. niger)	4240	0	14,8

* α-L-arabinofuranosidaasi
** α-L-ramnopyranosidaasi
*** β-D-glukopyranosidaasi

Esimerkki 2.4: Geelipermeaatio

Bio-Gel P-60 -kolonni (2,8 x 30 cm; Bio-Rad; Richmond, Va., USA) esitasapainotettiin 0,01 M natriumfosfaattipuskurilla (pH 8,8) virtausnopeudella 30 ml/tunti. Kolonniin sijoitettiin 5 ml:n näyte α-L-arabinofuranosidaasia vakioituna glyseroliin 1/1 paino/paino, saatuna DEAE ART LS -kromatografoinnista (esimerkki 2.3, edellä). Eluoitu proteiini ilmaistiin UV-detektorilla absorbanssikohdassa 280 nm.

Viiden ml:n fraktioita kerättiin talteen ja niistä analysoitiin aktiivisuus p-nitrofenyyli α-L-arabinofuranosidaasiin. Proteiinit eluoitiin yhtenä terävänä huippuna, joka sisälsi α-L-arabinofuranosidaasiaktiivisuuden.

Esimerkki 2.5: Adsorptiokromatografointi Bio-Gel HTP:llä

Bio-Gel HTP -kolonni (2,8 x 20 cm; Bio-Rad; Richmond, Va., USA) esitasapainotettiin 0,01 M natriumfosfaattipuskurilla (pH 8,8) virtausnopeudella 30 ml/tunti. α-L-arabinofuranosidaasikooste Bio-Gel P-60:stä (35 ml) (saatuna esimerkistä 2.4, edellä) sijoitettiin esitasapainotettuun Bio-Gel HTP -kolonniin ja kromatografoitiin virtausnopeudella 30 ml/tunti. Proteiinit eluoitiin sopivalla 0,01-0,2 M natriumfosfaattipuskurigradientilla (pH 8,8).

Viiden ml:n fraktioita otettiin talteen ja niiden α-L-arabinofuranosidaasi-, β-D-glukopyranosidaasi- ja α-L-ramnopyranosidaasiaktiivisuudet analysoitiin. Kahta jälkimmäistä entsyymiä ei havaittu vakio-olosuhteissa. ABF B -entsyymi eluoitui ensimmäisen suurehkon huipun mukana.

Esimerkki 3
Aspergillus nigerin puhdistetun α-L-arabinofuranosidaasi B (ABF B) -entsyymin karakterisointi

Esimerkki 3.1: Suuren erotuskyvyn kokoekskluusiokromatografointi (HPSEC) TSK G3000 SW -kolonnilla

Entsyymin homogeenisuuden määrittämiseksi ja molekyylipainon arvioimiseksi fraktiot 63, 64, 65, 66, 67 (saatuina esimerkistä 2, edellä) kromatografoitiin TSK G3000 SW -kolonnilla (LKB, Produkter AB; Bromma, Ruotsi) seuraavissa olosuhteissa. 100 µl:n näyte-erät kustakin fraktiosta injisoitiin TSK G3000 SW -kolonniin, joka oli esitasapainotettu natriumkaliumfosfaattipuskurilla (pH 7,00; 0,1 M) virtausnopeudella 0,5 ml/min. Eluoidut proteiinit ilmaistiin spektrofotometrisesti absorbanssikohdassa 280 nm. 0,5 ml:n fraktiot kerättiin talteen ja α-L-arabinofuranosidaasiaktiivisuus testattiin kvalitatiivisesti kolorimetrisellä testillä mikrotitrauslevyllä.

Kolonni kalibroitiin molekyylipainostandardiproteiineilla (Pharmacia Gel filtration calibration kit; Pharmacia AB,

Uppsala, Ruotsi). Kromatografiakuvio ilmaisee fraktioissa 63-66 eluoituneen proteiinin suuren homogeenisuuden. α-L-arabinofuranosidaasi B -entsyymin molekyylipainoksi määritettiin suunnilleen 70 kDa, joka on lähestulkoon yhteneväinen saman entsyymin molekyylipainon kanssa, jonka van der Veen et al. (1991) edellä on ilmoittanut.

Esimerkki 3.2: SDS-PAGE-elektroforeesi

Fraktiot 62-66 (saatuina esimerkistä 2, edellä) koottiin yhteen ja väkevöitiin ultrasuodatuksen avulla (raja-arvo = 10 000 x D). Tämän näytteen ominaisuudet määritettiin ja esitetään tiivistettynä jäljempänä:

- proteiinipitoisuus	: 0,25 mg/ml
- aktiivisuus pNP-arabinofuranosidiin	: 38 nkat/ml
- spesifinen aktiivisuus	: 153 nkat/ml

SDS-PAGE-elektroforeesi vahvistaa entsyymin korkean puhtauden ja molekyylipainon määritettynä HPSEC:n avulla.

Esimerkki 4
Toimintavalmiin ABF B -proteiinin ja kahden CNBr:llä muodostetun peptidifragmentin N-päiden aminohapposekvenssimääritys

Suunnilleen 10 µg puhdistettua ABF B:tä elektroforesoitiin 7,5 %:isella SDS-polyakryyliamidigeelillä ja elektroblotattiin Immobilon-membraanille (Millipore), Matsudairan ((1987) J. Biol. Chem., 262, 10035) kuvaileman menetelmän mukaisesti. Sopiva vyöhyke leikattiin irti ja lähetettiin sekvenssimääritykseen (Eurosequence, Groningen). Seuraava N-terminaalinen sekvenssi saatiin:

Gly-Pro-Xaa-Asp-Ile-Tyr-Glu-Ala-Gly-Asp-Thr-Pro-Xaa-Val-Ala-Ala (kaava 1)

Suunnilleen 100 µg puhdasta ABF B:tä pilkottiin yli yön huoneen lämpötilassa 150 µl:n tilavuudessa 0,15 M CNBr:ää 70 %:isessa muurahaishapossa. Hydrolyysituotteet erotettiin 15 %:isella SDS-polyakryyliamidigeelillä ja elektroblotattiin Immobilonille (Millipore; Matsudaira, edellä). Kaksi vyöhykettä, 29 ja 15 kDa, leikattiin irti ja sekvensoitiin (Eurosequence, Groningen, Hollanti). Seuraavat sekvenssit saatiin 29 kDa (kaava 2) ja vastaavasti 15 kDa (kaava 3) fragmentille:

Gly-Pro-Xaa-Asp-Ile-Tyr-Glu-Ala-Gly-Asp-Thr-Pro-Xaa-Val-Ala-Ala (kaava 2)

Xaa-Lys-Glu-Xaa-Ala-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Gly-Gly-Asp-Xaa-Xaa-Asn-Gly-Ala (kaava 3)

Kaavalla 2 kuvattu aminohapposekvenssi on identtinen ABF B -proteiinin N-terminaalisen sekvenssin kanssa (kaava 1), 29 kDa vyöhyke edustaa proteiinin N-terminaalista fragmenttia, kun taas 15 kDa fragmentti edustaa sisäistä fragmenttia.

Esimerkki 5

Aspergillus nigerin genomikirjaston konstruointi

Viisi grammaa A. niger HEM-rihmastoa jauhettiin huhmaressa nestetypessä kunnes saatiin hienojakoinen valkoinen jauhe. Jauhe hajotettiin 35 ml:ssa TES:iä (10 mM Tris.-HCl, pH 7,5; 50 mm EDTA; 150 mM NaCl) + SDS:ää 55°C:ssa 2-4 tunnin aikana. Lysaatti uutettiin kerran yhdellä tilavuudella fenolia ja useita kertoja yhdellä tilavuudella fenoli-kloroformia kunnes rajapinta ei enää ollut näkyvä. Viimeisen uuton jälkeen yhdellä tilavuudella kloroformia, DNA saostettiin etanolilla. Pelletti liuotettiin TE-puskuriin (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0) ja RNaasi:a lisättiin pitoisuudeksi 1 µg/ml.

Kymmenen mikrogrammaa tätä DNA:ta pilkottiin osittain Sau3AI:llä sillä tavalla, että saatiin keskimäärin 10-20 ke pitkiä fragmentteja. Tuloksena saadut Sau3AI-päät täytettiin osittain Klenow-polymeraasin avulla käyttäen nukleotidejä dGTP ja dATP, ja liitettiin LambdaGEM™-11 XhoI puolivälikäsivarsiin (Promega). Nämä käsivarret sisältävät osittain täytetyt XhoI-kohdat (dTTP:llä ja dCTP:llä) ja ne ostetaan käyttövalmiina valmistajalta. Ligoitu DNA pakattiin käyttäen Packagene in vitro pakkaussysteemiä (Promega). Tämän primaarigenomikirjaston titraaminen E. coli MB406 -massalla tuotti 8000 plakin muodostavaa yksikköä (pfu).

Esimerkki 6

A. nigerin genomikirjaston seulonta α-L-arabinofuranosidaasi B (abfB) -geenin suhteen ja hybridisoituvien faagikloonien osittainen karakterisointi

Sambrook et al. kuvailee yksityiskohtia molekulaarisesta kloonaustekniikasta julkaisussa Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos (1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press). Entsyymi-inkuboinnit suoritetaan noudattamalla valmistajan antamia ohjeita.

Kaavoilla 1 ja 3 kuvattuja aminohapposekvenssejä käytettiin oligonukleotidiseosten AB1719 ja AB2306 konstruointiin (lähemmin kuviot 2 ja 3). Inosiininukleotidejä käytettiin geneettisen koodin degeneraation käsittäessä 4 tai useampia nukleotidejä.

Southern-blotteja, jotka käsittivät 10 µg kromosomaalista A. niger HEM -kannan DNA:ta, pilkottuna joko BamHI:llä, BglII:lla, EcoRI:llä tai HindIII:lla, hybridisoitiin yli yön 35°C:ssa liuoksessa: 6 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 0,5 %:inen SDS ja 100 µg/ml denaturoitua vasikan tyymuksen DNA:ta, 15 pmoolin kanssa mainittuja oligoseoksia, minkä jälkeen blotit pestiin kahteen kertaan 10 min.

roosi agarin sijasta pohjalla ja pinnalla. Yön yli tapahtuneen inkuboinnin jälkeen faagit eluoitiin pinta-agarista ravistelemalla maljaa jatkuvasti heilutusalustalla 90 minuutin aikana 15 ml:n kanssa Phage Buffer -liuosta. Puolivälissä maljoja käännettiin neljänneksellä. Faagisuspensio kerättiin talteen maljoilta ja sentrifugoitiin solujäännöksen poistamiseksi. DNaasi ja RNaasi lisättiin loppupitoisuudeksi 1 µg/ml ja faagisuspensiota inkuboitiin 45 min. 37°C:ssa. Faagit PEG-saostettiin yhden tunnin kuluessa jäiden päällä liuoksessa, joka sisälsi 1 M NaCl-:ia ja 10 % PEG 6000:ta. Sentrifugoinnin jälkeen faagipelletti suspendoitiin uudelleen 1 ml:aan Phage Buffer -liuosta maljaa kohti ja liukenematon jäännös poistettiin sentrifugoimalla. SDS ja EDTA lisättiin loppupitoisuuksiin 0,2 % ja 15 mM, minkä jälkeen lisättiin proteinaasi K:ta pitoisuudeksi 50 µg/ml ja seosta inkuboitiin 30 min. ajan 65°C:ssa. Perättäisten uuttojen jälkeen yhtä suurilla tilavuuksilla fenolia, fenoli/kloroformia ja kloroformia, DNA saostettiin vesifaasista isopropanolilla. DNA liuotettiin TE-puskuriin, joka sisälsi 0,1 µg/ml RNaasia.

Kustakin faagi-DNA:sta konstruoitiin osittainen restriktiokartta (lähemmin kuvio 4 - faagiklooni 7). Kaksi faagiklooneista (8 ja 53) sisälsi fragmentin A. nigerin samasta genomialueesta, kun taas muut kloonit (7 ja 45) sisälsivät erilaiset genomifragmentit.

Esimerkki 7

abfB-geenin eristäminen ja karakterisointi

Faagi-DNA pilkottiin loppuun entsyymeillä, jotka tunnistavat neljän perättäisen nukleotidin sekvenssin, ja tuloksena olevat fragmentit liitettiin plasmideihin pTZ18R ja pUC18. Tuloksena olevat pesäkkeet siirrettiin nitroselluloosakalvoille ja seulottiin oligon AB1719 kanssa hybridisoituvan insertin sisältämien plasmidien valikoimiseksi. Riittävän pienet insertit sekvensoitiin insertin

identifioimiseksi. Sekvenssianalyysi faagiklooni 7:n 2,8 ke SacI-fragmentista suoritettiin käyttäen Sequenase^{R}:n versio 2 -reagenssipakkausta (United States Biochemical) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Sekvenssianalyysin tulokset (kuvio 5, kaava 4) osoittavat sekvenssin, jossa sekä oligon AB1719 nukleotidisekvenssi että ABF B -proteiinin N-pään aminohapposekvenssi voitiin havaita (vertaa kaava 1 ja kuvio 6, kaava 5).

2,8 ke SacI-fragmentti kloonattiin E. colin plasmidiin pUC18. Tuloksena saadulle plasmidille annettiin tunnus pGBabfB ja se talletettiin E. colin kannassa DH5α the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Baarn, Hollanti, 11. maaliskuuta, 1991, talletusnumerolla CBS 156.91).

Esimerkki 8
abfB-geenin siirtäminen Aspergillus niger N 593:een kotransformaation avulla

Faagiklooni 7:n DNA, saatuna esimerkissä 6, viedään Aspergillus nigeriin kotransformoimalla Aspergillus nigerin N593-kanta käyttäen Aspergillus nigerin pyrA-geeniä valintamarkkerina plasmidissa pGW635 (Goosen et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 219, 282) ja faagiklooni 7:n DNA:ta kotransformoivana DNA:na. Kotransformaatiota varten transformoivia DNA-molekyylejä lisättiin 1:20 moolisuhteissa kotransformaatiofrekvenssin suosimiseksi.

Kotransformaatiofrekvenssien määrittämiseksi plasmidia pNOM102 (Roberts et al. (1989) Curr. Genet., 15, 177), joka sisältää E. colin uidA-geenin, joka koodittaa β-glukuronidaasia (GUS), käytettiin kotransformoivana DNA:-na.

PYRA^{+}-transformantteja siirrettiin myöhemmin X-glukuronidialustaan (Clontech, Palo Alto, CA, USA; Roberts et al. (1989) edellä) ja arvosteltiin GUS-aktiivisuuden suhteen.

Siniset pesäkkeet arvosteltiin GUS+ -fenotyypiksi, värittömät GUS- -fenotyypiksi. A. niger, kotransformoituna pNOM102- ja pGW635-plasmideilla transformaatiota varten ja vastaavasti valikointia varten, antoi kotransformaatiofrekvensseiksi jopa 85 %.

Protoplasteja valmistettiin rihmastosta kasvattamalla Aspergillus niger N593:a minimaalialustalla, joka sisälsi lisäksi 50 mM glukoosia, 0,5 % hiivauutetta, 0,2 % kasaminohappoja ja 10 mM uridiinia, 20 tunnin ajan 30°C:ssa. Minimaalialustalla oli seuraava koostumus (1000 ml:aa kohti): 6,0 g $NaNO_3$, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 g KCl, 1 ml Visniac-liuosta (Visniac, W. & Santer, M. (1957) Bact. Rev., 21, 195), esitetty hiilenlähde, pH 6,0. Protoplastien valmistaminen A. niger N593:sta ja transformaatiomenettely suoritettiin kuten Goosen et al. (1987) on kuvaillut, Current Genet., 11, 499.

Tuloksena saadut PYR+ -transformantit eristettiin, puhdistettiin ja testattiin arabinofuranosidaasituotannon suhteen ravistelupulloissa (esimerkki 9). Koska kotransformoidulle geenille ei ollut saatavilla maljamääritystä, käytettiin polymeraasiketjureaktio (PCR) -monistustestiä, jonka D. Seth (Biotech International Ltd., Australia) on kehittänyt nopeaksi seulaksi niiden transformanttien identifioimiseksi, jotka sisältävät ei-valikoidun geenin. Tämä PCR-monistustesti suoritettiin seuraavasti:

- muutama nuori myseelirihma PYR+ -transformanteista laitettiin 1,5 ml:n putkeen;
- 50 µl 2 %:ista SDS-liuosta lisättiin tähän putkeen ja kuumennettiin 95°C:ssa 10 minuutin ajan;
- kuumennettu näyte laimennettiin 100-kertaisesti steriilillä ultrapuhtaalla vedellä;
- 5 µl laimennettua näytettä käytettiin PCR-monistukseen;
- polymeraasiketjureaktioita suoritettiin AmpliTaq™-polymeraasin (Perkin Elmer Cetus) toimittajan mukaisesti.

Denaturoinnin (8 minuuttia 100°C:ssa) ja 1 µl:n Ampli-Taq™-polymeraasilisäyksen jälkeen reaktioseokset monistettiin 25 jaksossa (kukin: 2' 94°C:ssa, 2' 55°C:ssa, 3' 72°C:ssa) PHC-2 DNA-monistuslaitteessa (Techne). Viimeisen jakson jälkeen polymerisaatiovaihetta 72°C:ssa jatkettiin 7 minuuttiin kaikkien juosteiden saattamiseksi valmiiksi;

- PCR-tuotteet analysoitiin agaroosigeelielektroforeesilla. Kotransformaatiofrekvenssit vaihtelivat välillä 5-45 % tässä pyrA/PCR-seulonnassa.

Esimerkki 9
Kotransformanttien seulonta abfB-geenin ilmentämistä varten

Esimerkissä 8 saadut PYR⁺-transformantit analysoitiin abfB-geenin ilmenemisen suhteen. PYR⁺-transformantit, jotka pitävät sisällään bakteriofagi lambda 7:n DNA:n, valikoidaan PCR-monistustestin avulla.

Näiden transformanttien itiöitä kerättiin talteen soluista, joita oli kasvatettu 5 päivän ajan 34°C:ssa peruna-dekstroosiagar (Difco) -maljoilla.

Arabinofuranosidaasituotanto testattiin ravistelupulloissa seuraavissa olosuhteissa:

Suunnilleen 1 x 10^6 itiötä siirrostettiin 100 ml:aan esiviljelyalustaa, joka sisälsi (litraa kohti): 30 g sakkaroosia, 2 g $NaNO_3$:a, 1 g K_2HPO_4:ää, 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$:ta, 0,5 g KCl:ää, 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$:ta, 5 g hiivauutetta, 10 g mallasuutetta ja 3 g karboksipolymetyleeniä (B.F. Goodrich Company). pH säädettiin 6,1:ksi NaOH:n avulla.

48 tunnin kasvatuksen jälkeen 34°C:ssa pyöriväliikkeisessä ravistelulaitteessa (250 rpm), 5 ml kasvanutta viljelmää siirrostettiin 100 ml:aan P-pääviljelyalustaa, joka si-

sälsi (litraa kohti): 5 g soijajauhoa, 4,4 g juurikasmassaa, 3 g $(NH_4)_2SO_4$:a, 3 g glysiiniä, 12 g $(NH_4)_2HPO_4$:ää ja 0,24 g $MnSO_4.H_2O$:ta. pH säädettiin 6,2:ksi H_3PO_4:llä.

Rihmastoa kasvatettiin vähintään vielä 100 tuntia 34°C:ssa ja 250 rpm. Näytteitä otettiin valituin aikavälein. Rihmasto poistettiin suodattamalla ja kasvusuodos analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla ja arabinofuranosidaasimäärityksen avulla kuten esimerkissä 1 on kuvailtu.

Arabinofuranosidaasimääritysten tulokset esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Arabinofuranosidaasituotanto kotransformoitaessa A. niger N593 lambda-klooni 7:llä

PYR⁺-transformantti* kannasta N593	PCR-määritys[a]	α-L-arabinofuranosidaasiaktiivisuus (nkat/ml) tuntia siirrostuksen jälkeen			
		24	48	72	96
* 2	-	8	13	22	6
* 6	-	12	30	34	22
* 7	-	13	31	36	25
* 9	-	17	33	30	19
* 1	+	37	50	43	35
* 8	+	33	52	49	37
* 21	+	44	57	62	48
* 34	+	46	53	59	41

[a] - osoittaa PCR DNA-fragmentin puuttumisen
+ osoittaa PCR DNA-fragmentin läsnäolon agaroosigeeli elektroforeesin jälkeen.

Taulukossa 3 esitetyistä tuloksista voidaan päätellä, että PCR-positiiviset transformantit tuottavat vain 1,5-2 kertaa enemmän arabinofuranosidaasia kuin PCR-negatiiviset transformantit, so. ne, jotka saivat vain pyrA-valintamarkkerin plasmidista pGW635.

Esimerkki 10

Arabinofuranosidaasin ilmeneminen Aspergilluksessa, joka on transformoitu ekspressiovektoreilla, jotka sisältävät abfB-geenin yhdistyneenä A. nigerin amyloglukosidaasi (glaA) -geenin promoottoriin ja signaalisekvensseihin

Esimerkki 10.1: Ekspressiovektorin konstruointi

Kaikki rakenteet valmistettiin käyttäen molekyylibiologian standardimenetelmiä kuten esimerkiksi Sambrook et al. on kuvaillut: (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Arabinofuranosidaasin liikailmentymisen aikaansaamiseksi Aspergillus nigerissä lisäekspressiokasetti on valmistettu, jossa abfB-geeni on A. nigerin amyloglukosidaasi (AG) -promoottorin ohjauksessa yhdessä glaA-geenin 18 aminohappoa sisältävän signaalisekvenssin kanssa.

Esimerkki 10.2: pAB6-1:n, pAB6-3:n, pAB6-4:n, pAB6-31:n ja pAGEK1:n konstruointi

A. nigerin amyloglukosidaasi (AG) -geeni (glaA) eristettiin plasmidikirjastoista, jotka sisälsivät 3-4 ke EcoRI-fragmentteja tai 13-15 ke HindIII-fragmentteja E. colin vektorissa pUC19 (Yanisch-Perron et al. 81985) Gene, 33, 103; saatavissa esim. Pharmacia LKB Biotechnology'ltä, Ruotsi) käyttäen seuraavia AG-spesifisiä oligoja:

AG-1: 5'-GACAATGGCTACACCAGCACCGCAACGGACATTGTTTGGCCC-3'
(kaava 6)

AG-2: 5'-AAGCAGCCATTGCCCGAAGCCGAT-3'
(kaava 7)

joista kumpikin perustuu A. nigerille julkaistuun nuk-

leotidisekvenssiin (Boel et al. (1984) EMBO J., 3, 1097-1102; Boel et al. (1984) Mol. Cell. Biol., 4, 2306). Oligonukleotidikoettimet saatiin introni 2:n ympärillä olevasta sekvenssistä: oligo AG-1 sijaitsee intronin 3'-puolella ja sen polaarisuus on identtinen AG mRNA:n suhteen, ja oligo AG-2 tavataan introni 2:n yläpuolella ja valitaan erisuuntaisena AG mRNA:n suhteen.

Tästä seulonnasta saatiin plasmidi pAB-6-1, joka sisältää glaA-geenin 14,5 ke HindIII-fragmentissa (lähemmin kuvio 7).

Plasmidista pAB6-1 valmistettiin useita subklooneja plasmidiin pUC19: pAB6-3, joka sisältää 1,8 ke EcoRI-fragmentin juuri glaA-geenin yläpuolella ja pitää luultavasti sisällään säätelysekvenssejä; pAB6-4, joka sisältää 4,6 ke HindIII - BglII -fragmentin, joka sisältää glaA-geenin promoottorin ja osan tämän geenin 5'-päästä.

Plasmidi pAB6-3 pilkottiin sen jälkeen osittain EcoRI:llä ja käsiteltiin T4-polymeraasilla. Tähän plasmidiin ligoitiin HindIII- plus EcoRI-fragmentti plasmidista pAB6-4, jälleen T4-polymeraasikäsittelyn jälkeen. Tuloksena saatu rakenne merkittiin tunnuksella pAB6-31; tämä rakenne sisältää glaA-geenin yläpuolisen 3,6 ke fragmentin, jonka keskellä on tuhoutunut EcoRI-kohta, ja jonka lähellä on tunnusomainen EcoRI-kohta.

Plasmidista pAB6-31 subkloonattiin 3,4 ke KpnI/EcoRI-fragmentti, joka piti sisällään glaA-geenin samat yläpuoliset sekvenssit, vektoriin pTZ18R (Pharmacia, Ruotsi). Tuloksena saatua fragmenttia merkittiin tunnuksella pAGEK1.

Esimerkki 10.3: pAGabfB1:n konstruointi

glaA-geenin AG-promoottorin ja 18 aminohappoisen ohjaus-

sekvenssin yhdistäminen abfB-rakennegeeniin, joka koodittaa valmista proteiinia, suoritettiin polymeraasiketjureaktio (PCR) -menetelmän avulla, joka on esitetty kaavamaisesti kuviossa 8.

Alukkeiksi PCR-monistuksiin konstruoitiin neljä synteettistä oligonukleotidiä, joilla oli seuraavat sekvenssit:

aluke 2796: 5'-CTCTGCAGGAATTCAAGCTAG-3'
AG-spesifinen sekvenssi EcoRI-kohdan ympärillä suunnilleen 250 emäsparia (ep) ATG-aloituskodonin yläpuolella. (kaava 8)

aluke 2628: 5'-GTAGATGTCACAGGGGCCTGCCAACCCTGTGCAGAC-3'
käänteinen valmis abfB <---┘---> käänteinen 18 aminohappoinen ohjaussekvenssi
(kaava 9)

aluke 2629: 5'-GTCTGCACAGGGTTGGCAGGCCCCTGTGACATCTAC-3'
18 aminohappoinen AG-ohjaus- <---┘---> valmis abfB sekvenssi
(kaava 10)

aluke 2630: 5'-GCTTAGCCCGGGGGTGCTTGGGTCAGG-3'
abfB-spesifinen sekvenssi, joka sijaitsee SmaI-kohdassa paikassa 483. (kaava 11)

PCR suoritettiin kuten Pomp & Medrano ovat kuvailleet (1991) Biotechniques, 10, 58, vähäisin muunnelmin (lähemmin esimerkki 8).

AG-sekvenssien liittämiseksi abfB-kooditussekvensseihin suoritettiin kaksi erillistä PCR:ää:

- ensimmäinen reaktio (PCR(1) kuviossa 8) käyttäen pAB6-1:tä templaattina ja oligoja 2796 ja 2628 alukkeina 230 ep DNA-fragmentin monistamiseksi, joka sisälsi AG-pro-

moottorin 3'-fragmentin ja 18 aminohappoisen AG-ohjaussekvenssin, jota 3'-reunalla reunustivat abfB-geenin nukleotidit;

- toinen reaktio (PCR(2) kuviossa 8) käyttäen pGBabfB1:tä templaattina ja oligoja 2629 ja 2630 alukkeina 300 ep DNA-fragmentin monistamiseksi, joka sisälsi valmiin arabinofuranosidaasi B (abfB) -geenin 5'-osan, jota reunusti 5'-reunassa 18 nukleotidiä sisältävä amyloglukosidaasi (AG) -signaalipeptidi.

PCR:n avulla aikaansaadut kaksi DNA-fragmenttia puhdistettiin geelielektroforeesin ja Sephaglas™ Band prep-pakkauksen (Pharmacia, Ruotsi) avulla.

Näitä kahta puhdistettua DNA-fragmenttia käytettiin templaatteina kolmannessa reaktiossa (PCR(3) kuviossa 8) käyttäen oligoja 2796 ja 2630 alukkeina AG-arabinofuranosidaasi B -fuusion aikaansaamiseksi. 530 ep DNA-fragmentti pilkottiin SmaI:llä, puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesin ja Sephaglas™ Band prep-pakkauksen avulla ja liitettiin SmaI-katkaistuun pTZ18R-vektoriin.

Ligoitu DNA transformoitiin E. colin elektrokompetentteihin Top10-soluihin kuten toimittaja on kuvaillut (Invitrogen corporation; San Diego, CA, USA). Valikointi suoritettiin Luria Broth (LB) -maljoilla, jotka sisälsivät Xgal:ia (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi), IPTG:tä (isopropyylitiogalaktosidi) ja ampisilliiniä. Plasmidi-DNA:ta preparoitiin valkoisista transformanteista kuten Andreoli, P. on kuvaillut (1985) Mol. Gen. Genet., 199, 372 ja analysoitiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja SmaI. Ne transformantit, jotka sisälsivät 530 ep fuusio-DNA -fragmentin, sekvensoitiin ja merkittiin tunnuksella pAGabfB1.

Kaaviokuva plasmidi pAGabfB1:n konstruoinnista esitetään kuviossa 8.

Esimerkki 10.4: pAGabfB2:n ja pAGabfB3:n konstruointi

Kaaviokuva näiden kahden plasmidin konstruoinneista esitetään kuviossa 9.

E. colin vektori pBluescript II SK(+), saatavissa Stratagene cloning systems'ltä (La Jolla, CA, USA), pilkottiin EcoRI:llä ja XhoI:llä ja puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesilla.

530 ep EcoRI-SmaI-fragmentti plasmidista pAGabfB1 eristettiin ja 1,8 ke SmaI-XhoI-fragmentti pGBabfB1:stä (joka sisältää valmiin abfB-geenin) eristettiin (lähemmin esimerkki 7). Nämä kaksi fragmenttia liitettiin EcoRI-XhoI-katkaistuun pBluescript II SK(+) -vektoriin ja transformoitiin E. colin kompetentteihin DH5α-soluihin, jotka oli valmistettu muunnellun Hanahanin menetelmän mukaisesti ((1983) J. Mol. Biol., 166, 557). Valikointi suoritettiin LB-maljoilla, jotka sisälsivät Xgal:ia, IPTG:tä ja ampisilliiniä. Plasmidi-DNA:ta preparoitiin valkoisista transformanteista ja analysoitiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja XhoI. Plasmidia, joka piti sisällään halutun 2,3 ke EcoRI-XhoI-fragmentin, merkittiin tunnuksella pAGabfB2.

pAGabfN3:n konstruointia varten jäljellä oleva 3,4 ke yläpuolinen alue AG-promoottorista saatiin pilkkomalla plasmidi pAGEK1 KpnI:llä ja EcoRI:llä ja puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesin avulla.

2,3 ke EcoRI-XhoI-fragmentti, joka sisälsi AG-arabanaasigeenifuusion, puhdistettiin plasmidista pAGabfB2.

Nämä kaksi fragmenttia liitettiin pBluescript II SK(+) -

vektoriin (joka oli katkaistu KpnI-XhoI:llä) ja käytettiin transformoitaessa E. colin kompetentteja DH5α-soluja kuten edellä on kuvailtu.

Plasmidi-DNA -eristysten ja restriktioentsyymianalyysien jälkeen saatiin toivottu ekspressiokasetti pAGabfB3 (lähemmin kuvio 9).

Esimerkki 10.5: pAGabfB4:n konstruointi

Homologisen valintamarkkerin liittämiseksi Aspergillus nigerin kanta N593:n transformaatiota varten (Goosen et al. 1987) edellä), 3,8 ke plasmidin pGW635 XbaI-fragmentti, joka sisälsi pyrA-geenin (Goosen et al. (1989) edellä), liitettiin pAGabfB3-ekspressiokasetin tunnusomaiseen XbaI-kohtaan. Tuloksena saatua ekspressio/valintaplasmidia merkittiin tunnuksella pAGabfB4 ja se esitetään kuviossa 10.

Esimerkki 10.6: pAGabfB5:n konstruointi

3,8 ke HindIII-XbaI-fragmentti plasmidista pFYT3 (van Gorcom, R.F. et al. (1991) EP-patenttihakemus 0 420 358 A1), joka sisältää amdS-valintageenin Aspergillus nidulansista (Corrick et al. (1987) Gene, 53, 63), eristettiin ja liitettiin HindIII-XbaI-katkaistuun pAGabfB3-plasmidiin. Tuloksena olevaa ekspressio/valintaplasmidia merkittiin tunnuksella pAGabfB5 ja sitä kuvataan kuviossa 11.

Esimerkki 10.7: pAGabfB3- ja pAGabfB4-ekspressiokasettien siirtäminen Aspergillus niger N593:een

Plasmidi pAGabfB3 siirrettiin A. nigeriin kotransformoimalla kanta N593 käyttäen pyrA-geeniä valintamarkkerina plasmidissa pGW635 (Goosen et al. (1989) edellä) ja ekspressiokasettia pAGabfB3 kotransformoivana DNA:na.

Kannan N593 transformointi ekspressiokasetilla pAGabfB4 suoritettiin kuten Kusters-van Someren et al. on kuvailut (1991) Curr. Genet., 20, 293.

Tuloksena saadut PYR$^+$-transformantit eristettiin, puhdistettiin ja testattiin arabinofuranosidaasituotannon suhteen ravistelupulloissa käyttäen esimerkissä 11 kuvailtua menetelmää.

Kontrollina testattiin transformantit, jotka pitivät sisällään vain vektori pGW635:n.

Esimerkki 10.8: pAGabfB5-ekspressiokasetin liittäminen Aspergillus niger -kantaan CBS 513.88

Plasmidi pAGabfB5 liitettiin Aspergillus niger -kantaan CBS 513.88 (talletettu 10. lokakuuta, 1988) käyttäen Tilburnin et al. (1983) Gene, 26, 205 ja Kellyn & Hynesin (1985) EMBO J., 4, 475 kuvailemia transformaatiomenettelyjä seuraavin muunnelmin:

- rihmastoa kasvatettiin Aspergillus-minimaalialustalla (Cove (1966) Biochem. Biophys. Acta, 113, 51), joka sisälsi lisäksi 10 mM argiiniinia ja 10 mM proliinia, 16 tunnin ajan 30°C:ssa pyöriväliikkeisessä ravistelijassa 300 rpm;

- vain Novozym 234:ää (NOVO Industri) eikä lainkaan helikaasia käytettiin protoplastien muodostamisessa;

- protoplastien muodostuksen kestettyä 90 minuuttia, 1 tilavuus STC-puskuria (1,2 M sorbitoli, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM $CaCl_2$) lisättiin protoplastisuspensioon ja sentrifugoitiin 2500 x g 4°C:ssa 10 minuutin ajan kääntöastiaroottorissa. Protoplastit pestiin kahdesti ja suspendoitiin uudelleen STC-puskuriin pitoisuudessa 10^8 solua/ml;

- plasmidi-DNA:ta lisättiin 10 µl:n tilavuudessa TE-puskurissa (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) 100 µl:aan protoplastisuspensiota;

- DNA-protoplastisuspension 15 minuutin inkuboinnin jälkeen 0°C:ssa 200 µl PEG-liuosta lisättiin pisaroittain (25 % PEG 4000 (Merck), 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM $CaCl_2$) ja inkubointia jatkettiin huoneen lämpötilassa 10 minuutin ajan. Seuraavaksi lisättiin hitaasti 1 ml PEG-liuosta (60 % PEG 4000 10 mM Tris-HCl:ssa pH 7,5, 50 mM $CaCl_2$) sekoittaen putkia toistuvasti. 20 minuutin inkuboinnin jälkeen huoneen lämpötilassa suspensiot laimennettiin STC-puskurilla, sekoitettiin kääntämällä ja sentrifugoitiin nopeudella 2000 x g 4°C:ssa 10 minuutin ajan. Protoplastit suspendoitiin uudelleen varovaisesti 200 µl:aan STC-puskuria ja maljattiin valikoivalle Aspergillus-minimaalialustalle 10 mM asetamidi ainoana typenlähteenä, mukana 1 M sakkaroosia, jähmetettiin käyttäen 0,75 % bakteriologista agaria n:o 1 (Oxoid). Kasvatus suoritettiin 30°C:ssa 6-10 päivän aikana.

Tuloksena saadut transformantit toistomaljattiin valikoiville asetamidiminimaalialustamaljoille, agaroosia 1,2 %, ja inkuboitiin 30°C:ssa 4-7 päivää.

4-7 päivän kuluttua nopeasti kasvavat ja hyvin sporuloivat transformantit tulevat näkyviin hyvin heikkoa taustaa vasten.

AMDS$^+$-transformantit puhdistettiin sivelemällä erillisten pesäkkeiden saamiseksi valikoiville asetamidiminimaalialustamaljoille, sisältäen 1,2 % agaroosia, ja niistä testattiin arabinofuranosidaasituotanto ravistelupulloissa käyttäen esimerkissä 11 kuvailtua menetelmää.

Esimerkki 11

Arabinofuranosidaasi B:n ilmentäminen AG-promoottorin ja

18 aminohappoisen AG-ohjaussekvenssin ohjauksessa Aspergillus nigerissä

Puhdistettujen transformanttien itiöitä kerättiin talteen soluista, jotka olivat kasvaneet 3-5 päivän ajan 34°C:ssa perunadekstroosiagarmaljoilla (Difco).

Suunnilleen 1 x 10^8 itiötä siirrostettiin 100 ml:aan esiviljelyalustaa, joka sisälsi (litraa kohti): 1 g KH_2PO_3:a; 30 g sakkaroosia (maltoosia); 5 g hiivauutetta; 10 g kaseiinihydrolysaattia; 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$:ta ja 3 g Tween 80:tä. pH säädettiin 5,5:ksi.

Yli yän tapahtuneen kasvatuksen jälkeen 34°C:ssa pyörivä-liikkeisessä ravistelijassa (250 rpm) 1 ml kasvavaa viljelmää siirrostettiin 100 ml:aan pääviljelyalustaa, joka sisälsi (litraa kohti): 1 g KH_2PO_3:a; 70 g maltodekstriiniä (Maldex MD03, Amylum); 12,5 g hiivauutetta; 25 g kaseiinihydrolysaattia; 2 g K_2SO_4:ää; 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$:ta; 0,03 g $ZnCl_2$:ta; 0,02 g $CaCl_2$:ta; 0,05 g $MnSO_4.H_2O$:ta ja 0,3 g $FeSO_4$:ää. pH säädettiin 5,6:ksi.

Rihmastoa kasvatettiin vielä vähintään 140 tunnin ajan 34°C:ssa ja 250 rpm ravistuksessa. Näytteitä otettiin valituin aikavälein. Rihmasto poistettiin suodattamalla ja kasvusuodos analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeeli-elektroforeesin avulla ja arabinofuranosidaasimäärityksen avulla kuten esimerkissä 1 on kuvailtu.

N593-transformantit, jotka pitävät sisällään pAGabfB3- tai pAGabfB4-ekspressiokasetin, tuottavat tehokkaasti ABF B -entsyymiä verrattuna N593-transformantteihin, jotka sisältävät ainoastaan pyrA-valintamarkkerin.

CBS 513.88 -transformantit, jotka sisältävät pAGabfB5-ekspressiokasetin, tuottavat tehostetusti ABF B -entsyymiä verrattuna CBS 513.88 -transformantteihin, jotka

sisältävät p18FYT3-ekspressiokasetin.

Esimerkki 12

Aminohapposekvenssien määrittäminen

Esimerkki 12.1: α-L-arabinofuranosidaasi A:n (ABF A) aminohapposekvenssin määrittäminen

Suunnilleen 1-2 nmoolia α-L-arabinofuranosidaasi A:ta (ABF A), saatuna A. niger N400:n kasvusuodoksesta, puhdistettuna kuten van der Veen et al. on kuvaillut ((1991) edellä), käytettiin kaasufaasisessa sekvensoinnissa (SON facility, Leiden, Hollanti). Seuraava sekvenssi määritettiin:

Xaa-Xaa-(Leu)-Lys-Val-Xaa-Thr-Gln-(Gly)-(Gly)
(kaava 12)

Lisäksi 2-4 nmoolia proteiinia katkaistiin CNBr:llä käyttäen seuraavia menetelmiä: proteiini dialysoitiin kahteen kertaan tislattua vettä vastaan 18 tunnin ajan, minkä jälkeen proteiini pakastekuivattiin. Jauhe suspendoitiin uudelleen 70 %:iseen muurahaishappoon pitoisuudessa 1 mg/ml. Tähän liuokseen lisättiin 200-kertainen ylimäärä CNBr:ää, oletettujen metioniinitähteiden lukumäärän suhteen, ja proteiiniliuosta inkuboitiin pimeässä huoneen lämpötilassa 24 tunnin ajan. Reaktioseos pakastekuivattiin ja pestiin kahdesti kahteen kertaan tislatulla vedellä ja suspendoitiin uudelleen näytepuskuriin (50 mM Tris pH 6,8; 100 mM ditiotreitoli; 2 % SDS 0,1 % bromifenolisininen ja 10 % glyseroli). Tätä liuosta kuumennettiin 3 minuuttia 100°C:ssa, minkä jälkeen peptidit erotettiin 15 %:isella SDS-polyakryyliamidigeelillä, jota seurasi blottaus Immobilon-P -membraanille (Millipore) menetelmän mukaisesti, jota on kuvaillut Matsudaira, P. ((1987) J. Biol. Chem., 262, 10035). Membraanifragmentit, jotka sisälsivät 2-3 nmoolia tiettyä peptidiä, pestiin kahdesti tislatulla vedellä ja niiden sekvenssi analysoi-

tiin menetelmän mukaisesti, jota on kuvaillut Amons, R. ((1987) FEBS Lett., 212, 68). Seuraava aminohapposekvenssi määritettiin:

Leu-Gln-Asn-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Thr-Ala-Pro-Xaa-Leu-Thr-Ala-(Gly) (kaava 13)

Esimerkki 12.2: α-L-arabinofuranosidaasi B:n (ABF B) aminohapposekvenssin määrittäminen

α-L-arabinofuranosidaasi B (ABF B) -proteiininäyte saatiin A. niger N400:n kasvusuodoksesta ja puhdistettiin kuten van der Veen et al. on kuvaillut ((1991 edellä). Seuraava N-terminaalinen aminohapposekvensi määritettiin kuten esimerkissä 12.1 on kuvailtu:

Xaa-Pro-Xaa-Asp-Ile-Tyr-Glu-Ala-Gly-Asp-Thr-Pro
(kaava 14)

Tämän N-terminaalisen sekvenssin lisäksi saatiin lisäsekvenssejä sekvensoimalla CNBr-peptidejä kuten esimerkissä 12.1 on kuvailtu:

Glu-Asn-Asn-Leu-Phe-Ser-(Gly)-Ala-Asp-Glu-(Gly)-Tyr-Asn-Ser-(Thr)-Asp-Pro-Thr
(kaava 15)

Ser-Lys-Glu-Gly-Ala-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Gly-Gly-Asp-Asn-Ser-Asn-Gly-Ala-Gln-Gly
(kaava 16)

Thr-Ser-Gly-Tyr-Pro-Ser-Asp-Asp-Val-Glu-Asn-(Ser)-Val-Xaa-Gln-Ile-Val-Ala
(kaava 17)

Kaavojen 14-17 mukaiset aminohapposekvenssit havaitaan myös johdetussa aminohapposekvenssissä, joka annetaan

kuviossa 6. Tämä varmistaa sen, että ABF B -entsyymi on säilynyt vaihtelevissa Aspergillus niger -kannoissa.

Esimerkki 12.3: Endo 1,5-α-L-arabinanaasi (ABN A):n aminohapposekvenssin määrittäminen

Endo 1,5-α-L-arabinanaasi (ABN A) -proteiininäyte saatiin A. niger N400:n kasvusuodoksesta ja puhdistettiin kuten van der Veen et al. ((1991 edellä) on kuvaillut. Seuraava N-terminaalinen aminohapposekvenssi määritettiin kuten esimerkissä 12.1 on kuvailtu:

Tyr-Ala-Asp-Pro-Gly-Ala-Xaa-Ser-Gly-Val-Xaa-Thr-Thr
(kaava 18)

Tämän N-terminaalisen sekvenssin lisäksi saatiin lisäsekvenssejä sekvensoimalla CNBr-peptidejä kuten esimerkissä 12.1 on kuvailtu:

Glu-Tyr-Gly-Ser-Trp-Thr-Asp-His-Gly-Ser-Thr-Gly-Ile-Ala-Ser-(Arg)-Xaa-Ala-Lys-Ile
(kaava 19)

Esimerkki 13

Aspergillus nigerin α-L-arabinofuranosidaasi A -geenin (abfA) molekulaarikloonaus ja analyysi

Esimerkki 13.1: cDNA-ekspressiokirjaston konstruointi

Esimerkki 13.1.1: mRNA:n indusointi ja eristäminen

A. niger N572:ta (Witteveen et al. (1989) J. Gen. Microbiol., 135, 2163) esiviljeltiin 24 tunnin ajan minimaalialustalla, joka sisälsi 1 % glukoosia hiilenlähteenä, minkä jälkeen rihmasto otettiin talteen suodattamalla ja pestiin steriilillä saliinilla. Rihmasto siirrettiin sen jälkeen tuoreeseen alustaan, joka sisälsi 1 % (paino/tilavuus) L-arabitolia. Induktion kestettyä 16 tuntia rih-

masto otettiin jälleen talteen suodattamalla ja pestiin kauttaaltaan steriilillä saliinilla. Rihmasto jäädytettiin sen jälkeen nestetypessä, minkä jälkeen se jauhettiin hienoksi käyttäen Microdismembrator-laitetta (-Braun). Kokonais-RNA eristettiin rihmastojauheesta Cathalan et al. ((1983) DNA, 2, 329) guanidiinimonotiosyanaatti/LiCl-toimintaohjeen mukaisesti, paitsi että SDS jätettiin pois liuotuspuskurista. Poly A$^+$ RNA eristettiin 1 mg:sta kokonais-RNA:ta oligo(dT)-selluloosakromatografian avulla (Aviv & Leder (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.) seuraavilla muunnoksilla: 10 mM HEPES:-tä pH 7,6 käytettiin puskurina ja SDS jätettiin pois kaikista liuoksista, latauspuskuria täydennettiin 9 %:illa (tilavuus/tilavuus) dimetyylisulfoksidia.

Esimerkki 13.1.2: cDNA-ekspressiokirjaston konstruointi ja immunokemiallinen seulonta

cDNA syntetisoitiin 5 µg:sta poly A$^+$ RNA:ta ja ligoitiin bakteriofagi-lambda Uni-ZAP XR:ään käyttäen ZAP™-cDNA -synteesipakkausta (Stratagene) valmistajan ohjeiden mukaisesti. cDNA:n liittämisen jälkeen Uni-ZAP XR -vektorikäsivarsiin faagi-DNA pakattiin käyttäen Packagene™-uutteita (Promega). 200 ng cDNA:n liittäminen 1 µg:aan vektorikäsivarsia ja sitä seuraava yhden viideosan reaktioseosta pakkaaminen johtaa primaarikirjastoon, joka sisältää 2 x 10^5 yhdistelmäfaagia. Primaarikirjasto monistettiin käyttäen E. coli PLK-F':a, titrattiin ja varastoitiin 4°C:ssa.

Saadun cDNA-ekspressiokirjaston seulonta suoritettiin pääasiallisesti kuten Young ja Davies ((1983) Science 222, 778) ovat kuvailleet. Lyhyesti sanottuna, 5000 plakin muodostavaa yksikköä (pfu) monistetusta varastosta maljattiin NZYCM-alustalle (1000 ml:aa kohti: 10 g NZ-

amiinia, 5 g NaCl:ia, 5 g hiivauutetta, 1 g kasaminohappoja, 2 g $MgSO_4.7H_2O$:ta, pH 7,5 - maljoille lisättiin 12 g agaria, pinta-agaroosiin 7 g agaroosia) käyttäen E. coli BB4 (Stratagene) -soluja isäntänä 0,6 %:isessa pinta-agaroosissa. Maljoja inkuboitiin 5 tunnin ajan 37°C:ssa, minkä jälkeen ne peitettiin nitroselluloosasuotimilla, joita oli etukäteen huljuteltu 10 mM IPTG:ssä ja ilmakuivattu. Maljoja inkuboitiin sitten vielä 6 tunnin ajan 37°C:ssa. Maljat jäähdytettiin 4°C:seen ja suodinten paikat maljoilla merkittiin ennen niiden poistamista. Suotimia inkuboitiin 15 minuutin ajan liuoksessa, joka sisälsi 0,5 M NaCl:ia, 0,05 % Tween 20:tä (Bio-Rad), 20 mM Tris-HCl:ää pH 7,5, lievästi sekoittaen, tämä toistettiin kertaalleen. Bakteerijäännös poistettiin hankaamalla kevyesti hansikaskäsin. Fuusioproteiinia ilmentävät faagit, jotka sisälsivät osan α-L-arabinofuranosidaasi A (ABF A) -proteiinista, identifioitiin käsittelemällä suotimia anti α-L-arabinofuranosidaasi A -antiseerumin kanssa ja ilmaisemalla sen jälkeen käyttäen alkalinenfosfataasikonjugaattia sen menettelyn mukaisesti, jota on kuvailtu Western-bloteille valmistajan ohjeissa (Bio-Rad). Kahdessa kokeessa 5×10^3 ja 5×10^4 pfu:ta monistetusta kirjastosta seulottiin α-L-arabinofuranosidaasi A cDNA:n ilmentymisen suhteen: kaksi ja vastaavasti yhdeksän positiivista löydettiin. Puhdistamisen ja leikkaamisen yhteydessä plasmidit eristettiin kasvattamalla tuloksena saatuja pesäkkeitä yli yön LB-alustassa (1000 ml:aa kohti: 10 g tryptikaasipeptonia (BBL), 5 g hiivauutetta (BBL), 10 g NaCl:ia, 0,5 mM Tris-HCl:ää pH 7,5), joka sisälsi 100 µg/ml ampisilliiniä. Plasmidi-DNA eristettiin kasvustoista alkalisella hajotusmenetelmällä, jota Maniatis et al. on kuvaillut ((1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 368-369). cDNA-inserttien pituudet määritettiin pilkkomalla EcoRI:llä ja XhoI:llä ja sitä seuraavan agaroosielektroforeesin avulla. Suurimman insertin sisältävä klooni (1,3 ke), merkinnällä pC1X1, analysoitiin rajoite-

tulla restriktioanalyysillä (kuvio 12).

Esimerkki 13.2: A. nigerin genomikirjaston seulonta α-L-arabinofuranosidaasi A -geenin (abfA) suhteen ja geenin eristäminen

Esimerkki 13.2.1: A. nigerin genomikirjaston seulonta abfA-geenin suhteen

A. niger N400:n genomikirjasto konstruoitiin kuten Harmsen et al. on kuvaillut ((1990) edellä). abfA-geenin seulomiseksi kirjastosta 10^4 pfu:ta maljaa kohti maljattiin NZYCM-pinta-agaroosiin, joka sisälsi 0,7 % agaroosia 85 mm:n sisämittaisilla NZYCM (1,2 % agaria) -maljoilla kuten on kuvailtu (Maniatis et al. (1982) edellä, 64).

Plakkihybridisaatio suoritettiin nitroselluloosatoistosuotimia käyttäen seuraavasti: 6 x 10^4 pfu:ta maljattiin E. coli BB4 -solujen kanssa 0,6 %:iseen pinta-agaroosiin. Maljojen yli yön kestäneen inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa kaksi toistoa kustakin maljasta tehtiin nitroselluloosasuotimille kuten Maniatis et al. ((1982) edellä, 320) on kuvaillut. Suotimet kostutettiin ja pestiin 60 minuutin aikana huoneen lämpötilassa 3 x SSC:ssä, minkä jälkeen niitä esihybridisoitiin 68°C:ssa kahden tunnin ajan esihybridisaatiopuskurissa, joka sisälsi: 6 x SSC:tä, 0,5 % SDS:ää, 5 x Denhardtin liuosta ja 100 µg/ml lämpödenaturoitua sillin sperman DNA:ta (Boehringer Mannheim). SSC-liuos valmistettiin 20 x SSC -kantaliuoksesta (1000 ml:aa kohti: 175,3 g NaCl:ia, 107,1 g natriumsitraatti.5,5H_2O:-ta, pH 7,0). 5 x Denhardtin liuos valmistettiin 100 x -kantaliuoksesta (500 ml:aa kohti: 10 g Ficoll-400:aa, 10 g polyvinyylipyrrolidonia, 10 g naudan seerumin albumiinia (Pentax Fraction V)). Kahden tunnin esihybridisaation jälkeen esihybridisaatiopuskuri korvattiin hybridisaatiopuskurilla, joka oli identtinen esihybridisaatiopuskurin kanssa, paitsi että tämä puskuri sisälsi ^{32}P-leimatun 1,0 ke PstI-fragmentin cDNA-kloonista pC1X1 (kuvio 12),

eristettynä ja leimattuna kuten van den Broeck et al. on kuvaillut ((1992 EP-patenttihakemus 0 463 706 A1 - lähemmin esimerkit 2.1 ja 7.1). Suotimia hybridisoitiin 18 tunnin ajan 68°C:ssa. Hybridisaation jälkeen suotimia pestiin kahdesti 68°C:ssa 30 minuutin ajan 2 x SSC/0,1 % SDS-liuoksessa, jota seurasi kaksi 30 minuutin pesujaksoa 68°C:ssa 0,2 x SSC/0,1 % SDS-liuoksessa. Ilmakuivatut suotimet teipattiin Whatman 3MM -paperiarkille, paikkamerkit tehtiin radioaktiivisella musteella ja Whatman-paperi ja suotimet peitettiin Saran Wrap™:llä. Hybridisoituvat plakit identifioitiin valottamalla Kodak XAR -röntgensädefilmille 18 tunnin ajaksi -70°C:ssa käyttäen vahvistusvarjostinta.

18 hybridisoituvaa plakkia, jotka näkyivät kahtena samanlaisena toistosuotimilla, identifioitiin: lambda$_{abf}$A1 - lambda$_{abf}$A18. Kukin positiivinen plakki poimittiin maljalta käyttäen pasteur-pipettiä ja faagit eluoitiin agarpalasta 1 ml:aan SM-puskuria (1000 ml:aa kohti: 5,8 g NaCl:ia, 2,0 g $MgSO_4.7H_2O$:ta, 50 ml 1 M Tris-HCl:ää pH 7,5, 5 ml 20 %:ista gelatiinia), joka sisälsi 20 µl kloroformia kuten Maniatis et al. on kuvaillut ((1982) edellä, 64). Saadut faagit puhdistettiin toistamalla edellä kuvaillut toimenpiteet käyttäen toistosuotimia maljoilta, jotka sisälsivät 50-100 plakkia eristettyjä faageja.

Puhdistamisen jälkeen faageja lisättiin maljaamalla 5 x 10^3 faagia NZYCM-maljoille. Yli yön kestäneen inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa saatiin yhteenkasvaneita maljoja, joista faagit eluoitiin lisäämällä 5 ml SM-puskuria ja säilyttämällä maljoja 2 tunnin ajan 4°C:ssa välillä ravistaen. Supernatantin keräämisen jälkeen pipettiä käyttäen bakteerit poistettiin liuoksesta sentrifugoimalla 4000 x g 10 minuutin ajan 4°C:ssa. Supernatanttiin lisättiin 0,3 % kloroformia ja pfu-määrä määritettiin titraamalla kuten van den Broeck et al. on kuvaillut ((1992, edellä, lähemmin esimerkki 2.4). Nämä faagivarastot sisälsivät suun-

nilleen 10^{10} pfu/ml.

Esimerkki 13.2.2.: DNA:n eristäminen bakteriofagi-lambdasta

Neljää eristettyä faagia (lambda$_{abf}$A1, lambda$_{abf}$A5, lambda$_{abf}$A6 ja lambda$_{abf}$A12) lisättiin yhdistämällä 5 x 10^9 E. coli LE392 -bakteeria (Murray, N. (1977) Mol. Gen. Genet., 150, 53) 300 µl:aan SM-puskuria, joka sisälsi 2 x 10^6 faagia, ja inkuboitiin 37°C:ssa 15 minuutin ajan. Inkubointijakson päätyttyä infektoituja bakteereja käytettiin siirrostettaessa 100 ml:aan esilämmitettyä (37°C) NZYCM-alustaa ja inkuboitiin sen jälkeen 9-12 tuntia 37°C:ssa New Brunswickin pyöriväliikkeisessä ravistelijassa 250 rpm nopeudessa, minkä jakson jälkeen bakteerit hajotettiin. Bakteerijätös poistettiin sentrifugoimalla 10 minuutin ajan nopeudessa 10 krpm 4°C:ssa Sorvallin suurnopeussentrifugissa. Faagit saostettiin saadusta supernatantista (100 ml) lisäämällä 10 g polyetyleeniglykoli-6000:a ja 11,7 g NaCl:ia ja varastoimalla liuosta yli yön 4°C:ssa. Saostuneet faagit otettiin talteen sentrifugoimalla 14 000 x g 4°C:ssa 20 minuutin ajan. Supernatantti poistettiin imemällä, kun taas viimeiset nestejäännökset poistettiin käyttäen paperipyyhettä. Faagit suspendoitiin uudelleen varovasti 4 ml:aan SM-puskuria ja uutettiin kertaalleen yhtä suurella tilavuudella kloroformia.

Ennen kuin DNA uutettiin faagipartikkeleista, hajotetuista bakteereista peräisin oleva DNA ja RNA poistettiin inkuboimalla faagisuspensiota DNaasi I:n ja RNaasi A:n kanssa (kumpiakin 100 µg/ml) 30 minuutin ajan 37°C:ssa. Faagi-DNA vapautettiin sen jälkeen faageista lisäämällä EDTA:aa loppupitoisuuteen 20 mM, kun taas proteiini poistettiin liuoksesta uuttamalla kahdesti yhtä suurella liuostilavuudella fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholia (25:24:1). Faasien erottamisen jälkeen sentrifugoinnin

avulla käyttäen Sorvallin sentrifugia (14 000 x g, 10 minuuttia) vesifaasi uutettiin kertaalleen yhtä suurella liuostilavuudella kloroformi/isoamyylialkoholia (24:1). Faasit erotettiin sentrifugoimalla, minkä jälkeen DNA saostettiin vesifaasista lisäämällä 0,1 tilavuutta 5 M natriumperkloraattia ja 0,1 tilavuutta isopropanolia, jota seurasi inkubointi jäiden päällä 30 minuutin ajan. DNA otettiin talteen sentrifugoimalla 10 minuuttia 4°C:ssa (14 000 x g). Supernatantti poistettiin imemällä, minkä jälkeen DNA suspendoitiin uudelleen 400 µl:aan TE-puskuria. DNA saostettiin vielä kerran tästä liuoksesta lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M natriumasetaattia ja 2 tilavuutta etanolia. DNA otettiin talteen sentrifugoimalla 10 minuuttia 4°C:ssa (14 000 x g). Supernatantti poistettiin imemällä, jäljelle jäänyt pelletti kuivattiin nopeasti alipaineessa, minkä jälkeen DNA resuspendoitiin 125 µl:aan TE-puskuria, joka sisälsi 0,1 µg/ml RNaasi A:ta. Tämä puhdistusmenettely johtaa suunnilleen 50-100 µg:n DNA-eristykseen kustakin faagista.

Esimerkki 13.2.3: abfA:n sisältävien faagien restriktioanalyysi

Faageista lambda$_{abf}$A1, lambda$_{abf}$A5, lambda$_{abf}$A6 ja lambda$_{abf}$A12 eristetty DNA analysoitiin Southern-analyysin avulla. DNA:ta pilkottiin 3 tunnin ajan 37°C:ssa reaktioseoksessa, joka on kokoonpantu seuraavista liuoksista: 5 µl (suunnilleen 1 µg) DNA-liuosta; 2 µl sopivaa 10 x React -puskuria (BRL); 10 yksikköä restriktioentsyymiä (BRL) ja steriiliä tislattua vettä, jotta saadaan lopputilavuudeksi 50 µl. Hydrolyysin jälkeen DNA saostettiin lisäämällä 0,1 tilav. 3 M natriumasetaattia ja 2 tilav. etanolia. DNA otettiin talteen sentrifugoimalla 10 minuutin ajan huoneen lämpötilassa (14 000 x g). Supernatantti poistettiin imemällä ja jäljelle jäänyt pelletti kuivattiin nopeasti alipaineessa ja resuspendoitiin 20 µl:aan steriiliä tislattua vettä. Sen jälkeen kun oli lisätty 4 µl

DNA:n latauspuskuria (0,25 % (paino/tilavuus) bromifenolisinistä, 0,25 % (paino/tilavuus) ksyleenisyanolia, 15 % (paino/tilavuus) Ficoll 400:aa H_2O:ssa), näytteitä inkuboitiin 10 minuutin ajan 65°C:ssa ja jäähdytettiin nopeasti jäiden päällä ennen näytteiden lataamista 0,6 %:iselle agaroosigeelille TAE-puskurissa (50 x TAE-puskuri 1000 ml:aa kohti: 242,0 g Trizma-emästä (Sigma), 57,1 ml jääetikkaa, 100 ml 0,5 M EDTA:aa pH 8,0). DNA-fragmentit erotettiin elektroforeesin avulla jännitteessä 25 V 15-18 tunnin kuluessa.

Elektroforesoinnin jälkeen DNA siirrettiin ja denaturoitiin alkalisella imublottauksella (VacuGene XL, Pharmacia LKB) nailonmembraanille (Gene Bind 45, Pharmacia LKB) kuten ohjemanuaalissa on kuvailtu (ss. 25-26), ja sen jälkeen esihybridisoitiin ja hybridisoitiin käyttäen esimerkissä 13.2.1. kuvailtua ^{32}P-leimattua 1 ke PstI-fragmenttia ja vastaavia hybridisaatio-olosuhteita. Hybridisaatiokuvio saatiin valottamalla Kodak XAR-5 röntgensädefilmi 18 tunnin aikana -70°C:ssa käyttäen vahvistusvarjostinta.

Saatuja restriktiokuvioita käytettiin abfA-geenin genomialueen osittaisen restriktiokartan saamiseksi. 8,5 ke NsiI/XbaI-fragmentti valittiin subkloonaukseen.

Esimerkki 13.2.4: A. nigerin abfA-geenin subkloonaus

Faagi-lambda$_{abf}$A5:stä eristettiin 8,5 ke NsiI/XbaI-fragmentti pilkkomalla faagi-DNA ja sen jälkeen agaroosielektroforesoimalla. Fragmentti leikattiin irti agaroosigeelistä, minkä jälkeen se otettiin talteen agaroosipalasta elektroeluoimalla käyttäen ISCO-kuppeja. Dialyysimembraani asennettiin tämän kupin sekä suureen että pieneen astiaan, kuppi täytettiin 0,005 x TAE-puskurilla ja agaroosipala asetettiin kupin suureen astiaan. Kuppi asetettiin sen jälkeen elektroeluutiolaitteeseen,

suuri astia katodikammiossa sisälsi TAE-puskuria ja pieni astia anodikammiossa sisälsi TAE-puskuria/3 M natriumasetaattia. Fragmentit elektroeluoitiin jännitteessä 100 V 2 tunnin aikana. Tämän jakson jälkeen kuppi otettiin pois elektroeluutiolaitteesta ja puskuri poistettiin suuresta astiasta, samalla kun puskuri poistettiin vain pienen astian yläosasta. Jäljelle jäänyt puskuri (200 µl), joka sisälsi DNA-fragmentit, dialysoitiin kupissa tislattua vettä vastaan 30 minuutin ajanjakson kuluessa. DNA saostettiin lopuksi lisäämällä 0,1 tilav. 3 M natriumasetaattia (pH 5,6) ja 2 tilav. kylmää (-20°C) etanolia. DNA otettiin talteen sentrifugoimalla (Eppendorf-sentrifugi) 30 minuutin ajan nopeudessa 14 000 x g ja 4°C. Supernatantin poistamisen jälkeen DNA-pelletti kuivattiin käyttäen Savant Speedvac -vakuumisentrifugia. DNA liuotettiin 10 µl:aan TE-puskuria ja pitoisuus määritettiin agaroosielektroforeesin avulla käyttäen pitoisuudeltaan tunnettua lambda-DNA:ta vertailuna ja etidiumbromidivärjäystä DNA:n detektoimiseksi.

Saatu fragmentti liitettiin vektoriin pGEM-7Zf(+), joka pilkottiin NsiI:llä ja XbaI:llä preparoiden seuraavasti: 1 µl (1 µg/µl) pGEM-7Zf(+):a sekoitettiin liuoksen kanssa, joka sisälsi 2 µl 10 x React 1 -liuosta (BRL), 1 µl (10 U/µl) NsiI:tä, 1 µl (10 U/µl) XbaI:tä ja 16 µl steriiliä tislattua vettä. DNA:ta pilkottiin 1 tunnin ajan 37°C:ssa. Vektori eristettiin 0,6 %:isesta agaroosigeelistä kuten edellä on kuvailtu.

8,5 ke NsiI/XbaI-fragmentti liitettiin vektoriin, mistä oli tuloksena plasmidi pIM900 seuraavan menettelyn avulla: 100 ng pGEM-7Zf(+)-fragmenttia sekoitettiin 100 ng:-aan 8,5 ke NsiI/XbaI-fragmenttia ja 4 µl:aan 5 x ligaatiopuskuria (koostumus: 500 mM Tris-HCl:ää (pH 7,6);100 mM $MgCl_2$:ia; 10 mM ATP:tä; 10 mM ditiotreitolia; 25 % PEG-6000:a), ja 1 µl (1,2 U/µl) T_4 DNA -ligaasia (BRL) lisättiin tähän seokseen lopputilavuuteen 20 µl. 16 tuntia

kestäneen inkuboinnin jälkeen 14°C:ssa seos laimennettiin 100 µl:ksi steriilillä vedellä. 10 µl laimennettua seosta käytettiin transformoitaessa kompetenttejä E. coli JM-101 -soluja (Yanish-Perron et al. (1985) Gene, 33, 103), valmistettuna CM1, CM2 -menetelmällä, jota kuvaillaan Pharmacia Manual'issa M13 kloonaus/sekvensointisysteemille. Tuloksena olevista pesäkkeistä kasvatettiin kuuden pesäkkeen valikoimaa yli yön LB-alustassa, joka sisälsi 100 µg/ml ampisilliiniä. Plasmidi-DNA eristettiin kasvustoista alkalisella hajotusmenetelmällä kuten Maniatis et al. on kuvaillut ((1982 edellä, 368), jota käytettiin restriktioanalyysissä halutun plasmidin, pIM900:n, sisältävän kloonin valikoimiseksi. Plasmidi-DNA:ta eristettiin suuressa mitassa 500 ml:sta E. coli JM101:n kasvustoja, jotka sisälsivät pIM900:n. Viljelmiä kasvatettiin LB-alustassa, joka sisälsi 100 µg/ml ampisilliiniä (Maniatis et al. (1982) edellä, 86). Plasmidi puhdistettiin CsCl-sentrifugoinnin avulla, fenolisoitiin, saostettiin etanolilla ja liuotettiin 400 µl:aan TE-puskuria. Suunnilleen 500 µg saatiin.

Plasmidi pIM900 jatkoanalysoitiin käyttäen restriktioentsyymejä, mistä oli tuloksena kuviossa 13 esitettävä restriktiokartta.

abfA-geenin sisältävä plasmidi pIM900 kloonattiin uudelleen E. coli JM109:ään ja talletettiin the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Baarn, Hollanti, 17. maaliskuuta, 1992, talletusnumerolla CBS 187.92).

Esimerkki 13.3: abfA-geenin primaarirakenne

Esimerkki 13.3.1: A. nigerin abfA-geenin sekvenssianalyysi

A. nigerin abfA-geenin, sen promoottorisäätelyalueen, rakennegeenin ja lopetusalueen sekvenssi määritettiin subkloonaamalla fragmentteja pIM900:sta M13mp18/mp19:iin yh-

distettynä spesifisten oligonukleotidien käyttöön alukkeina sekvensointireaktioissa.

Nukleotidisekvenssianalyysiä varten restriktiofragmentteja eristettiin kuten esimerkissä 13.2.4 on kuvailtu ja kloonattiin sitten bakteriofagiin M13mp18/19 RF DNA -vektoreihin (Messing, J. (1983) Methods in Enzymology, 101C, 20; Norrander et al. (1983) Gene, 26, 101), jotka pilkottiin sopivilla restriktioentsyymeillä. Nukleotidisekvenssit määritettiin dideoksinukleotidi-ketjunpysäytysmenetelmällä (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463) käyttäen Pharmacian T7 DNA-polymeraasisekvensointipakkausta. Tietokoneanalyysi suoritettiin käyttäen PC/GENE-ohjelmaa. abfA-geenin määritetty nukleotidisekvenssi annetaan kuviossa 14 (kaava 20). ABF A -proteiinin aminohapposekvenssi, saatuna abfA cDNA -sekvenssistä, annetaan kuviossa 15 (kaava 21).

Esimerkki 13.3.2: abfA-geenin karakterisointi

Sekvenssiä, joka sisältää abfA-rakennegeenin (kuvio 14, kaava 20) edeltää 1246 nukleotidiä pitkä yläpuolinen alue. Oletettua TATA-kehystä (TATA-box) ei havaita, sekvenssi TTAATTT paikassa 1156-1162 muistuttaa eniten sellaista sekvenssiä. Luennan aloituskohdan edessä havaitaan kuitenkin alueita, joissa on erittäin runsaasti CT:tä (Gurr et al. (1987): Gene Structure in Eukaryotic Microbes, vol. 22, Kinghorn, J.R. (toimittaja), IRL Press, Oxford, 93).

abfA-geenin rakenneosa ulottuu paikasta 1247 paikkaan 3483 ja sisältää seitsemän intronia. Introni A on oletettu introni, joka perustuu konsensussekvensseihin sieni-introneille (Gurr et al. (1987) edellä), kuuden muun intronin paikka osoitetaan sekvensoimalla cDNA-fragmentti pC1X1:ssä ja pC2X1:ssä.

abfA-geeni koodittaa 628 aminohappoa pitkää proteiinia (kuvio 15, kaava 21), saatuna abf cDNA -sekvenssistä. N-terminaalista aminohapposekvenssiä, määritettynä esimerkissä 12.1 (kaava 12) edeltää 25 aminohappoa pitkä hydrofobinen sekvenssi. CNBr-peptidistä määritetty aminohapposekvenssi (kaava 13) havaitaan sekvenssissä paikasta 38 paikkaan 52. Toimintavalmis ABF A -proteiini on 603 aminohappoa pitkä ja sen johdettu molekyylipaino on 65378 Da ja teoreettinen IEP 3,7. Johdetun molekyylipainon arvo tälle entsyymille poikkeaa kirjallisuudessa ilmoitetuista arvoista kuten edellä on mainittu (lähemmin Rombouts et al., edellä ja van der Veen et al., edellä). Tämä johtuu todennäköisimmin siitä, että kirjallisuuden arviot tehdään glykosyloituneesta proteiinista, kun taas tässä esimerkissä havaittu ABF A -proteiinin johdettu molekyylipaino perustuu täsmälleen glykosyloitumattomaan proteiiniin.

Esimerkki 14

Kloonatun abfA-geenin ilmentäminen A. nigerissä ja A. nidulansissa

Esimerkki 14.1: abfA-geenin siirtäminen A. niger N593:een ja A. nidulans G191:een kotransformaation avulla

Plasmidi pIM900 siirrettiin A. nigeriin kotransformoimalla A. niger N593 käyttäen A. nigerin pyrA-geeniä, joka sijaitsee plasmidissa pGW613 (Goosen et al. (1987) edellä), valintamarkkerina ja plasmidia pIM900 kotransformoivana plasmidina. Geeni siirrettiin analogisesti A. nidulans G191:een (Balance & Turner (1985) Gene, 36, 321) käyttäen edellä mainittuja plasmideja.

Protoplasteja valmistettiin kummankin kannan rihmastosta, joka saatiin kasvatuksen jälkeen minimaalialustalla, joka sisälsi lisäksi 0,5 % hiivauutetta, 0,2 % kasaminohappoja, 50 mM glukoosia ja 10 mM uridiinia, 20 tunnin aikana 30°C:ssa. Protoplastien valmistus ja transformaatiomenet-

tely suoritettiin kuten Goosen et al. ((1987) edellä) on kuvaillut käyttäen 3 µg pGW613:a ja 50 µg pIM900:aa.

Saadut PYR$^+$-transformantit analysoitiin sitten abfA-geenin ilmenemisen suhteen SDS-PAGE:n avulla, jota seurasi värjääminen Coomassie Brilliant Blue R250:llä tai Western-blot -analyysillä ja määrittämällä aktiivisuus kasvusuodoksesta.

Esimerkki 14.2: Transformanttien seulonta abfA-geenin ilmentymisen suhteen

Esimerkissä 14.1 saaduista transformanteista analysoitiin abfA-geenituotteen, ABF A -proteiinin ilmentyminen. Neljä transformanttia kummastakin kannasta valittiin ja kasvatettiin minimaalialustalla, joka sisälsi lisäksi 0,1 % hiivauutetta, joka sisälsi 1 % sokerijuurikasmassaa ainoana hiilenlähteenä. 24 tunnin kasvatuksen jälkeen 30°C:ssa rihmasto poistettiin suodattamalla ja kasvusuodoksen arabinofuranosidaasiaktiivisuus määritettiin käyttäen para-nitrofenyyli-α-L-arabinofuranosidaasia (PNA) kuten van der Veen et al. ((1991) edellä) on kuvaillut. Kasvusuodos analysoitiin lisäksi SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla (Laemmli, U.K. (1970) Nature, 220, 680) käyttäen geeliä, joka sisälsi 10 % akryyliamidia, jota seurasi värjääminen Coomassie Brilliant Blue R250:llä (A. nidulans -transformanttien tapauksessa), ja jota seurasi Western-blottaus (A. niger -transformanttien tapauksessa). ABF A -proteiini ilmaistiin nitroselluloosalla elektroblottauksen jälkeen ja sen jälkeen, kun oli inkuboitu polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa, jotka oli tehty ABF A -proteiinia vastaan, joka puhdistettiin kuten esimerkissä 12.1 on kuvailtu. Sitoutunut vasta-aine havaittiin inkuboinnin jälkeen vuohen-anti-hiiri -vasta-aineen kanssa konjugoituna alkaliseen fosfataasiin, Bio-Radin ohjemanuaalin mukaisesti.

Kaikki neljä analysoitua transformanttia kummastakin kannasta liikatuottivat ABF A -proteiinia ilmaistuna Coomassie Brilliant Blue -värjäyksellä (kuvio 16A) tai Western-blottauksella (kuvio 16B). Sen lisäksi havaittiin lisääntynyt aktiivisuustaso kummankin kannan kasvusuodoksessa (taulukko 4 ja taulukko 5).

Taulukko 4

PNA:ta hydrolysoiva aktiivisuus Aspergillus nidulans villityypin WG096 kasvualustassa (Uitzetter, J.H.A.A. (1982) "Studies on carbon metabolism in wild type and mutants of Aspergillus nidulans", PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, Hollanti) ja abfA-transformanttien kasvualustassa 24 tunnin kasvun kohdalla sokerijuurikasmassa hiilenlähteenä.

Kanta	Aktiivisuus (U/ml kasvualustaa)
WG096	0,16
G191 :: pIM900-1	1,34
G191 :: pIM900-2	2,64
G191 :: pIM900-3	2,13
G191 :: pIM900-4	2,63

Taulukko 5

PNA:ta hydrolysoiva aktiivisuus Aspergillus niger villityypin N402 ja abfA-transformanttien kasvualustassa 24 tunnin kasvun kohdalla sokerijuurikasmassa hiilenlähteenä.

Kanta	Aktiivisuus (U/ml kasvualustaa)
N402	0,35
N593 :: pIM900-1	2,48
N593 :: pIM900-2	1,25
N593 :: pIM900-3	1,99
N593 :: pIM900-4	1,79

Esimerkki 15

Aspergillus nigerin endo 1,5-α-L-arabinanaasi (abnA) -geenin molekulaarinen kloonaus

Esimerkki 15.1: cDNA-ekspressiokirjaston konstruointi

Esimerkki 15.1.1: mRNA:n indusointi ja eristäminen

A. niger N572:ta esikasvatettiin 24 tunnin ajan minimaalialustalla, joka sisälsi 1 % glukoosia hiilenlähteenä ja lisättynä 0,1 % hiivauutetta ja 1 mg/l nikotiiniamidia, minkä jälkeen rihmasto otettiin talteen suodattamalla ja pestiin steriilillä saliinilla. Rihmasto jaettiin sitten kahdeksaan yhtä suureen osaan ja jokainen osa siirrettiin sen jälkeen 250 ml:n erlenmeyerpulloon, joka sisälsi 50 ml minimaalialustaa ja 1 % arabitolia. Näitä viljelmiä inkuboitiin sen jälkeen 30°C:ssa aikavälit 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ja 7 tuntia. Kunakin ajankohtana rihmasto otettiin talteen, pestiin kylmällä saliinilla, jäädytettiin käyttäen nestetyppeä ja varastoitiin -70°C:ssa. Endo 1,5-α-L-arabinanaasi A:n (ABN A) ja ABF B:n induktiokuvioita tutkittiin Western-blot -analyysin avulla 50 kertaa väkevöidyistä kasvustonäytteistä kunakin otettuna ajankohta-

na. ABF B:tä oli läsnä kasvualustassa 1 tunti siirtämisen jälkeen, kun taas ABN A:ta tavattiin 2 tunnin kuluttua (kuvio 17).

Rihmastosta, joka oli kerätty talteen ajankohtina 1, 2, 3, 4, 5 ja 6 tuntia inkubointia, eristettiin RNA kuten esimerkissä 13.1.1 on kuvailtu.

Esimerkki 15.1.2: cDNA-ekspressiokirjaston konstruointi ja immunokemiallinen seulonta

Puolet RNA:sta kustakin ajankohdasta koottiin yhteen ja yhdistettyä RNA-näytettä käytettiin cDNA:n syntetisoimiseksi ja ekspressiokirjaston konstruoimiseksi kuten esimerkissä 13.1.2 on kuvailtu. cDNA:n liittämisen jälkeen vektoriin ja sitä seuraavan DNA:n pakkaamisen jälkeen saatiin 3 x 10^4 faagia käsittävä primaarikirjasto. Tämä primaarikirjasto monistettiin ja seulottiin käyttäen vasta-aineita, jotka oli tehty ABN A:ta vastaan (van der Veen et al. (1991) edellä), kuten esimerkissä 13.1.2 on kuvailtu. 5 x 10^4 faagin seulonta johti yhden positiivisen kloonin eristämiseen. cDNA-insertin pituus määritettiin pilkkomalla EcoRI/XhoI:llä ja sitä seuraavalla agaroosielektroforeesilla. cDNA-fragmentin pituus oli suunnilleen 700 ep.

Esimerkki 15.2: A. nigerin genomikirjaston seulonta endo 1,5-α-L-arabinanaasi (abnA) -geenin suhteen ja geenin eristäminen

Käyttämällä 550 ep KpnI-fragmenttia (joka saatiin esimerkissä 15.1.2 kuvaillusta cDNA:sta ja eristettiin ja leimattiin kuten esimerkissä 13.2.1 on kuvailtu) A. niger N400:n genomikirjasto seulottiin abnA-geenin suhteen kuten esimerkissä 13.2.1 kuvailtiin. 6 x 10^4 faagin seulonta johti kuuden hybridisoituvan faagin eristämiseen. Nämä faagit puhdistettiin kuten esimerkissä 13.2.1 on

kuvailtu, minkä jälkeen DNA eristettiin kustakin faagista kuten esimerkissä 13.2.2 on kuvailtu. Saatua DNA:ta käytettiin restriktioanalyysiin kuten esimerkissä 13.2.3 on kuvailtu, mikä johti osittaiseen restriktiokarttaan. Käyttämällä tätä restriktiokarttaa, 3,1 ke HindIII-fragmentti valittiin abnA-geenin subkloonaukseen vektoriin pEMBL19 kuten esimerkissä 13.2.4 on kuvailtu, mikä johti plasmidiin pIM950. Tämä plasmidi jatkoanalysoitiin käyttäen restriktioentsyymejä tuottaen kuviossa 18 esitettävän restriktiokartan.

abnA-geenin sisältävä plasmidi pIM950 kloonattiin uudelleen E. coli JM109:ään ja talletettiin the Centraal Bureau voor Schimmelcultures'iin (Baarn, Hollanti, 17. maaliskuuta, 1992, talletusnumerolla CBS 188.92).

Esimerkki 15.3: cDNA-kloonien seulonta, jotka hybridisoituvat abfB-geenin ja abnA-geenin 5'-päähän

Esimerkeissä 15.1.1 ja 15.1.2 kuvailtu cDNA-kirjasto seulottiin käyttäen ^{32}P-leimattuja fragmentteja. abfB-geenistä käytettiin koettimena suunnilleen 550 ep EcoRI/SalI-fragmenttia plasmidista pGBabfB1. abnA-geenistä käytettiin koettimena suunnilleen 300 ep SphI/BamHI-fragmenttia plasmidista pIM950. cDNA-kirjasto maljattiin ja seulottiin leimattujen fragmenttien kanssa kuten esimerkissä 13.2.1 on kuvailtu. 10^4 faagin seulonta johti 36 faagin eristämiseen, jotka hybridisoituivat abnA-fragmenttiin ja 8 faagin eristämiseen, jotka hybridisoituivat abfB-fragmenttiin. Kummankin geenin osalta kolme faagia puhdistettiin, plasmidi leikattiin ja eristettiin kuten esimerkissä 13.1.2 on kuvailtu. Näiden cDNA-fragmenttien 5'-päiden sekvensoinnissa saatiin identtiset 5'-päät jokaiselle kolmelle kloonille sekä abfB- geenistä että abnA-geenistä. abfB-geenin cDNA alkaa paikassa 120 (kuvio 5, kaava 4) ja abnA-geenin cDNA alkaa paikassa 1163 (kuvio 19, kaava 22).

Esimerkki 15.4: abnA-geenin primaarirakenne

Esimerkki 15.4.1: abnA-geenin sekvenssianalyysi

A. nigerin abnA-geenin, sen promoottorisäätelyalueen, rakennegeenin ja lopetusalueen sekvenssi määritettiin subkloonaamalla fragmentit pIM950:stä M13mp18/mp19-, pGEM-7Zf(+)- ja pBluescript-vektoreihin yhdessä spesifisten oligonukleotidien käytön kanssa alukkeina sekvensointireaktioissa.

Nukleotidisekvenssianalyysiä varten restriktiofragmentit eristettiin kuten esimerkissä 13.2.4 on kuvailtu ja kloonattiin sen jälkeen M13mp18/19 RF DNA -vektoreihin (Messing (1983) edellä; Norrander et al. (1983) edellä), jotka oli pilkottu sopivilla restriktioentsyymeillä. Nukleotidisekvenssit määritettiin dideoksinukleotidiketjunpysäytysmenetelmällä (Sanger et al. (1977) edellä) käyttäen Pharmacia T7 DNA -polymeraasisekvensointipakkausta. Tietokoneanalyysi suoritettiin käyttäen PC/GENE-ohjelmaa. Määritetty nukleotidisekvenssi esitetään kuviossa 19 (kaava 22).

Esimerkki 15.4.2: abnA-geenin karakterisointi

abnA-rakennegeenin sisältävää sekvenssiä (kuvio 19, kaava 22) edeltää 1177 nukleotidiä pitkä yläpuolinen alue, joka sisältää oletetun TATA-kehyksen paikassa 1106-1113.

abnA-geenin rakenneosa ulottuu paikasta 1178 paikkaan 2378 ja sisältää kolme intronia. Intronien paikka osoitetaan sekvensoimalla esimerkissä 14.3 saatu cDNA-fragmentti. Nämä intronit tavataan paikoista välillä 1445-1494, 1972-2030 ja 2117-2167.

abnA-geeni koodittaa 346 aminohappoa pitkää proteiinia, jonka molekyylipaino on 37184 Da (kuvio 20, kaava 23), saatuna abnA cDNA -sekvenssistä. Esimerkissä 12.3 (kaava

18) määritettyä N-terminaalista sekvenssiä edeltää 19 aminohappoa pitkä hydrofobinen sekvenssi. Aminohapposekvenssi, määritettynä CNBr-peptidistä (esimerkki 12.3, kaava 19), tavataan paikasta välillä 106-125 aminohapposekvenssissä. Valmis proteiini on 327 aminohappoa pitkä ja sen johdettu molekyylipaino on 35204 Da ja teoreettinen IEP 3,6.

Esimerkki 16

Kloonatun abnA-geenin ilmentäminen A. nigerissä ja A. nidulansissa

Esimerkki 16.1: abnA-geenin siirtäminen A. niger N593:een ja A. nidulans WG191:een kotransformaation avulla

Plasmidi pIM950 siirrettiin A. nigeriin kotransformoimalla A. niger N593 käyttäen A. nigerin pyrA-geeniä, joka sijaitsee plasmidissa pGW613 (Goosen et al. (1989) edellä) valintamerkkigeeninä ja plasmidia pIM950 kotransformoivana plasmidina. Geeni siirrettiin analogisesti A. nidulans G191:een käyttäen edellä mainittuja plasmideja. Kummankin kannan transformaatio suoritettiin kuten esimerkissä 14.1 on kuvailtu.

Esimerkki 16.2: Transformanttien seulonta abnA-geenin ilmentämistä varten

Esimerkissä 16.1 saadut transformantit analysoitiin abnA-geenituotteen, ABN A -proteiinin, ilmentymisen suhteen. Kymmenen A. nidulansin transformanttia ja neljätoista A. nigerin transformanttia valittiin ja kasvatettiin minimaalialustalla, joka sisälsi 1 % sokerijuurikasmassaa ainoana hiilenlähteenä. 24 tunnin kasvatuksen jälkeen 37°C:ssa A. nidulansin osalta ja 30°C:ssa A. nigerin osalta, rihmasto poistettiin suodattamalla ja kasvusuodoksen endo 1,5-α-L-arabinanaasiaktiivisuus mitattiin käyttäen ArabinaZyme-tabletteja (Megazyme Pty. Ltd., North Rocks, New South wales, Australia) valmistajan

ohjeiden mukaisesti. Tulokset kummankin kannan osalta esitetään tiivistettynä taulukossa 6 ja taulukossa 7.

Taulukko 6

Endo 1,5-α-L-arabinanaasiaktiivisuus Aspergillus nidulansin villityypin ja abnA-transformanttien kasvualustassa 24 tunnin kasvun kohdalla sokerijuurikasmassa hiilenlähteenä.

Kanta	Aktiivisuus (U/ml kasvualustaa)
G191 :: pGW635	0,31
G191 :: pIM950-1	0,83
G191 :: pIM950-2	0,83
G191 :: pIM950-6	0,79
G191 :: pIM950-7	1,88
G191 :: pIM950-11	1,17
G191 :: pIM950-12	0,70
G191 :: pIM950-16	0,70
G191 :: pIM950-17	2,34
G191 :: pIM950-18	1,18
G191 :: pIM950-20	2,26

Taulukko 7

Endo 1,5-α-L-arabinanaasiaktiivisuus Aspergillus nigerin villityypin ja abnA-transformanttien kasvualustassa 24 tunnin kasvun kohdalla sokerijuurikasmassa hiilenlähteenä.

Kanta	Aktiivisuus (U/ml kasvualustaa)
N402	0,17
N593 :: pIM950-1	0,91
N593 :: pIM950-2	0,35
N593 :: pIM950-3	0,25
N593 :: pIM950-4	1,13
N593 :: pIM950-5	1,23
N593 :: pIM950-6	0,28
N593 :: pIM950-7	1,13
N593 :: pIM950-8	1,31
N593 :: pIM950-9	1,09
N593 :: pIM950-10	0,22
N593 :: pIM950-11	1,23
N593 :: pIM950-12	0,28
N593 :: pIM950-13	0,32
N593 :: pIM950-14	0,91

Kasvusuodokset analysoitiin lisäksi Western-blottauksen avulla kuten esimerkissä 14.2 on kuvailtu (kuvio 21 A ja B - A. nidulans -transformantit; kuvio 22 A ja B - A. niger -transformantit).

Esimerkki 17

abfB-geenin karakterisointi

abfB-rakennegeenin sisältävää sekvenssiä (kuvio 5, kaava 4), joka tavataan 2,8 ke SacI-fragmentissa (lähemmin esimerkki 7), edeltää 166 nukleotidiä pitkä yläpuolinen

alue. Oletettu TATA-kehys ulottuu paikasta 54 paikkaan 60.

abfB-geenin rakenneosa ulottuu paikasta 167 paikkaan 1666 eikä sisällä yhtään intronia, mikä on määritetty sekvensoimalla esimerkissä 15.3 saatu cDNA-fragmentti.

abfB-geeni koodittaa 499 aminohappoa pitkää proteiinia, jonka johdettu molekyylipaino on 52523 Da (kuvio 6, kaava 5), johdettuna abfB-geenisekvenssistä ja varmistettuna abfB cDNA -sekvenssistä. Esimerkissä 12.2 määritettyä N-terminaalista aminohapposekvenssiä (kaava 14) edeltää 18 aminohappoa pitkä hydrofobinen sekvenssi. CNBr-peptideistä määritetyt aminohapposekvenssit (kaavat 15, 16 ja 17) tavataan sekvenssissä aminohappopaikasta 203 paikkaan 219, paikasta 267 paikkaan 286 ja vastaavasti paikasta 294 paikkaan 312. Valmis ABF B -proteiini on 481 aminohappoa pitkä ja sen johdettu molekyylipaino on 50663 Da ja teoreettinen IEP 3,8. Johdetun molekyylipainon arvo ABF B:lle poikkeaa kirjallisuudessa ilmoitetuista arvoista kuten edellä on mainittu (Rombouts et al., edellä ja van der Veen et al., edellä). Tämän katsotaan mitä todennäköisimmin johtuvan siitä, että kirjallisuusarviot tehdään glykosyloituneesta proteiinista, kun taas tässä esimerkissä havaittu johdettu molekyylipaino perustuu täsmälleen glykosyloitumattomaan proteiiniin.

Esimerkki 18

ABF B:n entsymaattinen aktiivisuus arabinosidiä sisältäviä glukosidiuutteita kohtaan saatuna viinirypäleestä

Glykosidiuute saatiin uuttamalla Muscat de Frontignan -rypälelajikkeen käymätöntä rypälemehua Gunatan et al. ((1989 edellä) kuvaileman menetelmän mukaisesti.

Koetoimintaohjeisto, koskien glykosidiuutteen entsymaattista hydrolyysiä käyttäen ABF B -entsyymiä, oli kuten

Gunata et al. ((1989 edellä) on kuvaillut.

200 µl:aan glykosidiuutetta lisättiin 50 µl (0,15 nkat, määritettynä Gunatan et al. ((1989, edellä) kuvaileman menetelmän mukaisesti, α-arabinosidaasi (ABF B) -liuosta ja inkuboitiin 16 tunnin ajan 40°C:ssa, pH 4,4. Liuosta uutettiin sen jälkeen 5 x 250 µl:lla pentaania. Hydrolyysiä seurattiin ohutlevy- ja kaasukromatografian avulla.

Liuokseen lisättiin myöhemmin 50 µl (0,15 nkat, määritettynä Gunatan (1989) edellä) kuvaileman menetelmän mukaisesti) β-glukosidaasiliuosta. Siten saatua liuosta inkuboitiin 16 tunnin ajan 40°C:ssa, pH 4,4 ja uutettiin 5 x 250 µl:lla pentaania. Hydrolyysiä seurattiin ohutlevy- ja kaasukromatografian avulla.

Saadut tulokset osoittavat, että ABF B -entsyymi kykeni hydrolysoimaan 70 % glykosidiuutteen arabinosyyliglukosidista.

Esimerkki 19

Sokerijuurikasydinmassan in vitro -hydrolysointi β-L-galaktanaasilla ja/tai α-L-arabinofuranosidaasilla

Mallisysteemissä, joka jäljittelee porsaan mahassa ja ohutsuolessa tavattavia olosuhteita, inkuboitiin sokerijuurikasmassaa α-L-arabinofuranosidaasin (ABF B), β-L-galaktanaasin ja vastaavasti kummankin entsyymin seoksen kanssa.

Sokerijuurikasmassaa inkuboitiin ensin kolmen tunnin ajan pH = 3,0:ssa ja T = 39°C (porsaan mahan olosuhteet). Massaa inkuboitiin myöhemmin pH = 6,5:ssä ja T = 39°C (porsaan ohutsuolen olosuhteet).

Entsymaattisen inkuboinnin jälkeen mitattiin ero lähtökuivamassan ja entsymaattisesta hydrolyysistä jäljelle

jääneiden liukenemattomien aineiden välillä (ainetta kuivattiin 24 tuntia 103°C:ssa). Tämän eron kuiva-aineessa katsottiin olevan sokerijuurikasmassan in vitro -hydrolyysin suhteellinen mitta. Yhteenveto koetuloksista esitetään taulukossa 8.

Taulukko 8
Hydrolysoitavuuden prosenttiosuus kuiva-aineesta ilmoitettuna sokerijuurikasmassan entsyymi-inkuboinnin jälkeen sian mahan ja ohutsuolen olosuhteissa.

	Hydrolyysi-%
Sokea	15,9
α-L-arabinofuranosidaasi (ABF B)	15,8
β-L-galaktanaasi	16,0
α-L-arabinofuranosidaasi (ABF B) + β-L-galaktanaasi	24,8

Samankaltaisia tuloksia saatiin vehnänleseistä.

Vaikka tätä keksintöä on kuvailtu viitaten sen erityisiin suoritusmuotoihin, alaa tuntevien henkilöiden tulisi ymmärtää, että erilaisia muutoksia voidaan tehdä ja ekvivalentteja voidaan korvata poikkeamatta keksinnön hengestä ja piiristä. Monia muunnoksia voidaan lisäksi tehdä tietyn tilanteen, aineen, prosessin, prosessivaiheen tai -vaiheiden sovittamiseksi keksinnön kohteeseen, henkeen ja piiriin. Kaikki sellaiset muunnelmat on tarkoitettu sisältyviksi tähän liitettyjen patenttivaatimusten piiriin.

Patenttivaatimukset

1. Puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, joka koodittaa entsyymiä, jolla on arabinaania hajottavaa aktiivisuutta, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on

a) DNA-molekyyli, joka on saatavissa sienikannasta, joka koodittaa entsyymiä, jolla on arabinaania hajottavaa aktiivisuutta;

b) a)-kohdan DNA-molekyylin geneettinen muunnos; tai

c) DNA-molekyyli, joka kykenee hybridisoitumaan edellä olevien joko a)-kohdan tai b)-kohdan mukaisiin DNA-molekyyleihin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että arabinaania hajottava aktiivisuus valitaan ryhmästä, jolla on:

a) kyky katkaista (1->2)-α-L-arabinosidisiä sidoksia;

b) kyky katkaista (1->3)-α-L-arabinosidisiä sidoksia;

c) kyky katkaista (1->5)-α-L-arabinosidisiä sidoksia; tai

d) kyky katkaista 1->6 sidos terminaalisen arabinofuranosyyliyksikön ja monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosidien välissä sijaitsevan (intermediaarisen) glukosyyliyksikön välillä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyylin koodittamalla entsyymillä on ekso-tyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->5)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on

a) DNA-molekyyli, jolla on kuviossa 14 esitetyn sekvenssin mukainen nukleotidisekvenssi;

b) a)-kohdan DNA-molekyylin geneettinen muunnos;

c) DNA-molekyyli, joka kykenee hybridisoitumaan edellä olevien joko a)-kohdan tai b)-kohdan DNA-molekyyleihin; tai

d) DNA-molekyyli, joka koodittaa entsyymiä, jolla on kuviossa 15 esitetyn sekvenssin mukainen aminohapposekvenssi.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on plasmidissa pIM900 (CBS 187.92).

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyylin koodittamalla entsyymillä on ekso-tyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->3)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin ja (1->2)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin. EP 2

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on EP 1

a) DNA-molekyyli, jolla on kuviossa 5 esitetyn sekvenssin mukainen nukleotidisekvenssi;

b) a)-kohdan DNA-molekyylin geneettinen muunnos;

c) DNA-molekyyli, joka kykenee hybridisoitumaan edellä olevien joko a)-kohdan tai b)-kohdan DNA-molekyyleihin;

d) DNA-molekyyli, joka koodittaa entsyymiä, jolla on kuviossa 6 esitetyn sekvenssin mukainen aminohapposekvenssi.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on plasmidissa pGBabfB1 (CBS 156.91).

9. Patenttivaatimuksen 2 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyylin koodittamalla entsyymillä on endo-tyyppistä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta (1->5)-α-L-arabinosidisiin sidoksiin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on

a) DNA-molekyyli, jolla on kuviossa 19 esitetyn sekvenssin mukainen nukleotidisekvenssi;

b) a)-kohdan DNA-molekyylin geneettinen muunnos;

c) DNA-molekyyli, joka kykenee hybridisoitumaan edellä olevien joko a)-kohdan tai b)-kohdan DNA-molekyyleihin;

d) DNA-molekyyli, joka koodittaa entsyymiä, jolla on kuviossa 20 esitetyn sekvenssin mukainen aminohapposekvenssi.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on plasmidissa pIM950 (CBS 188.92).

12. Patenttivaatimuksen 2 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se on saatavissa sienestä, joka valitaan suvuista Aspergillus, Dichoto-

mitus, Corticium, Phytophtora ja Rhodotorula.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on saatavissa Aspergillus-suvun sienestä.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on saatavissa sienilajeista, jotka valitaan ryhmästä Aspergillus niger, Aspergillus niger var. tubigensis, Aspergillus niger var. awamori, Aspergillus aculeatis, Dichotomitus squalens, Corticium rolfsii, Penicillium chrysogenum ja Rhodotorula flava.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen puhdistettu ja eristetty DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että DNA-molekyyli on saatavissa sienistä Aspergillus niger, Aspergillus niger var. tubigensis tai Aspergillus niger var. awamori.

16. DNA-rakenne, joka kykenee ohjaamaan arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavaa entsyymiä koodittavan DNA-molekyylin tehostuneen ilmentymisen, **tunnettu** siitä, että jonkin patenttivaatimuksista 1-15 mukainen DNA-molekyyli on toimivasti kytketty säätelyalueisiin, jotka kykenevät ohjaamaan arabinaania hajottavan entsyymin tehostuneen ilmentymisen sopivassa isännässä.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen DNA-rakenne, **tunnettu** lisäksi siitä, että säätelyalueet sisältävät promoottorin, joka on toimivasti kytketty patenttivaatimuksen 1 mukaiseen DNA-molekyyliin, jolloin promoottori on saatavissa seuraavista geeneistä: sienen endo α-L-arabinanaasi (abnA) -geeni; sienen α-L-arabinofuranosidaasi A (abfA) -geeni; sienen α-L-arabinofuranosidaasi B (abfB) -geeni; sienen ksylanaasi (xlnA) -geeni; sienen fytaasigeeni; sienen ATP-syntetaasigeeni; sienen alayksikkö 9 (oliC) -geeni; sienen trioosifosfaatti-isomeraasi (tpi) -geeni;

sienen alkoholidehydrogenaasi (adhA) -geeni; sienen α-amylaasi (amy) -geeni; sienen amyloglukosidaasi (glaA) -geeni; sienen asetamidaasi (amdS) -geeni; sienen glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (gpd) -geeni; hiivan alkoholidehydrogenaasigeeni; hiivan laktaasigeeni; hiivan 3-fosfoglyseraattikinaasigeeni; hiivan trioosifosfaatti-isomeraasigeeni; bakteerinen α-amylaasigeeni; bakteerinen Spo2-geeni ja bakteeriset ekstrasellulaariset proteaasigeenit.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen DNA-rakenne, **tunnettu** lisäksi siitä, että säätelyalueet sisältävät erityksen ohjaussekvenssin, jolloin erityksen ohjaussekvenssi on saatavissa seuraavista geeneistä: sienen amyloglukosidaasi (glaA) -geenin 18 aminohappoinen AG-ohjaussekvenssi; sienen amyloglukosidaasi (glaA) -geenin 24 aminohappoinen AG-ohjaussekvenssi; hiivan α-tekijägeeni ja bakteerinen α-amylaasigeeni.

19. Vektori, **tunnettu** siitä, että vektori sisältää patenttivaatimuksen 16 mukaisen DNA-rakenteen.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen vektori, **tunnettu** lisäksi siitä, että vektori on plasmidi.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että plasmidi valitaan joukosta pAGabfB3, pAGabfB4, pAGabfB5, pIM900-1, pIM900-2, pIM900-3, pIM900-4, pIM950-1, pIM950-2, pIM950-3, pIM950-4, pIM950-5, pIM950-6, pIM950-7, pIM950-8, pIM950-9, pIM950-10, pIM950-11, pIM950-12, pIM950-13, pIM950-14, pIM950-16, pIM950-17, pIM950-18 ja pIM950-20.

22. Transformoitu mikrobi-isäntä, joka kykenee tehostuneesti ilmentämään entsyymiä, jolla on arabinaania hajottavaa aktiivisuutta, **tunnettu** siitä, että mikrobi-isäntä sisältää patenttivaatimuksen 16 mukaisen DNA-ra-

kenteen.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen transformoitu mikrobi-isäntä, **tunnettu** lisäksi siitä, että mikrobi-isäntä valitaan suvuista Aspergillus, Kluyveromyces, Trichoderma, Saccharomyces ja Bacillus.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen transformoitu mikrobi-isäntä, **tunnettu** lisäksi siitä, että mikrobi-isäntä valitaan lajeista Aspergillus niger, Aspergillus niger var. awamori, Aspergillus niger var. tubigensis, Aspergillus aculeatus, Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Kluyveromyces lactis ja Saccharomyces cerevisiae.

25. Menetelmä arabinaania hajottavan aktiivisuuden omaavan entsyymin tehostuneeksi ilmentämiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

a) viljellään patenttivaatimuksen 22 mukaista mikrobi-isäntää olosuhteissa, jotka vaikuttavat arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavan entsyymin ilmentymiseen; ja

b) arabinaania hajottavaa entsyymiaktiivisuutta omaava entsyymi otetaan talteen.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavan entsyymin tehostuneeksi ilmentämiseksi, **tunnettu** siitä, että mikrobi-isäntä sisältää DNA-rakenteen, joka vuorostaan sisältää patenttivaatimuksen 3 mukaisen DNA-molekyylin.

27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavan entsyymin tehostuneeksi ilmentämiseksi, **tunnettu** siitä, että mikrobi-isäntä sisältää DNA-rakenteen, joka vuorostaan sisältää patentti-

vaatimuksen 6 mukaisen DNA-molekyylin.

28. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavan entsyymin tehostuneeksi ilmentämiseksi, **tunnettu** siitä, että mikrobi-isäntä sisältää DNA-rakenteen, joka vuorostaan sisältää patenttivaatimuksen 9 mukaisen DNA-molekyylin.

29. Jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisella menetelmällä valmistetun arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavan entsyymin käyttö arabinaania sisältävän substraatin hajotuksessa.

30. Menetelmä "arabinaanisameuden" eliminoimiseksi hedelmä- tai vihannesmehusta, **tunnettu** siitä, että hedelmä- tai vihannesmehua käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisesti valmistetulla, arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavalla entsyymillä, jonka määrä on tehokas eliminoimaan arabinaanisameuden.

31. Menetelmä viskositeetin alentamiseksi hedelmä- tai vihannesmehussa, **tunnettu** siitä, että

a) hedelmä- tai vihannesmehua käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisesti valmistetulla, arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavalla entsyymillä, jonka määrä on tehokas hajottamaan hedelmä- tai vihannesmehun sisältämiä arabinogalaktaaneja;

b) desarabinosyloituja galaktaaneja käsitellään galaktanaasientsyymillä, jonka määrä on riittävä hajottamaan galaktaanipolymeerejä.

32. Menetelmä terpenyyliaromikomponenttien vapauttamiseksi hedelmä- tai vihannesmehusta, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

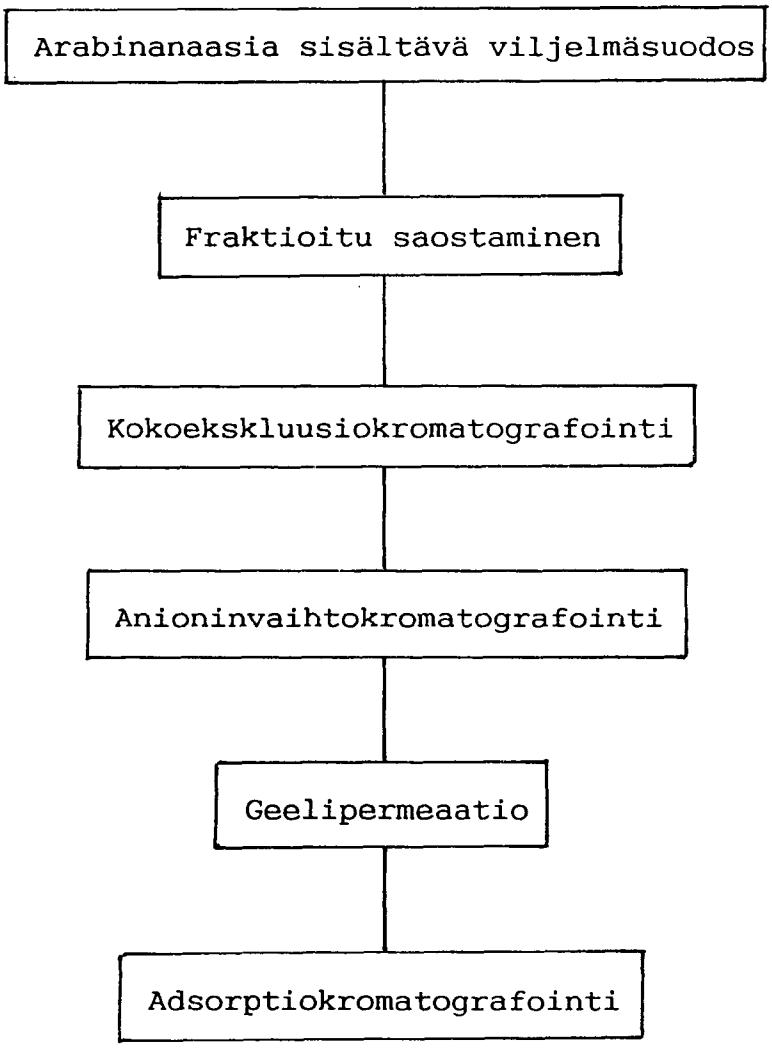
a) hedelmä- tai vihannesmehua käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisesti valmistetulla, arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavalla entsyymillä, jonka määrä on tehokas katalysoimaan arabinoositähteiden vapautumista hedelmä- tai vihannesmehun sisältämistä monoterpenyyli α-L-arabinofuranosyyliglukosideista;

b) tuloksena olevaa desarabinosyloitua monoterpenyyliglukosidia käsitellään β-glukosidaasientsyymillä, jonka määrä riittää vapauttamaan terpenyyliaromikomponentit.

33. Menetelmä kasviravinteiden in vivo sisäänoton ja hyväksikäytön parantamiseksi eläimellä, **tunnettu** siitä, että arabinaania sisältävää rehukoostumusta käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisesti valmistetulla, arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavalla entsyymillä.

34. Menetelmä ligniinien ja terpenoidien poistamisen parantamiseksi puun, puumassan tai puun johdannaistuotteen arabinaania sisältävän hemiselluloosarungon selluloosa- ja hemiselluloosatähteistä, **tunnettu** siitä, että puuta, puumassaa tai puun johdannaistuotetta käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 26-28 mukaisesti valmistetulla, arabinaania hajottavaa aktiivisuutta omaavalla entsyymillä, jonka määrä on tehokas katalysoimaan hemiselluloosarungon hajotusta.

Kaavioesitys puhdistusmenettelystä α-L-arabinofuranosidaasi (ekso B) -entsyymin saamiseksi A. nigeristä.



Kuvio 1

A. nigerin ekso B -entsyymin N-pään aminohapposekvenssi ja oligonukleotidiseoksen AB17619 nukleotidisekvenssi, joka on johdettu tämän sekvenssin aminohappo 4:stä (Asp) aminohappoon 11 (Thr).

```
 1               5                   10                  15
Gly-Pro-Xaa-Asp-Ile-Tyr-Glu-Ala-Gly-Asp-Thr-Pro-Xaa-Val-Ala-Ala
```

(Kaava 1)

```
AB1719:   5' IGTATCICCIGCTTCATAAATATC  3'
               G        C  G  G  G
```

Kuvio 2

Ekso B -proteiinin 15 kDA CNBr-fragmentin N-pään aminohapposekvenssi ja oligonukleotidiseoksen AB2306 nukleotidisekvenssi saatuna tämän sekvenssin aminohaposta 6 (Ile) aminohappoon 13 (Asp).

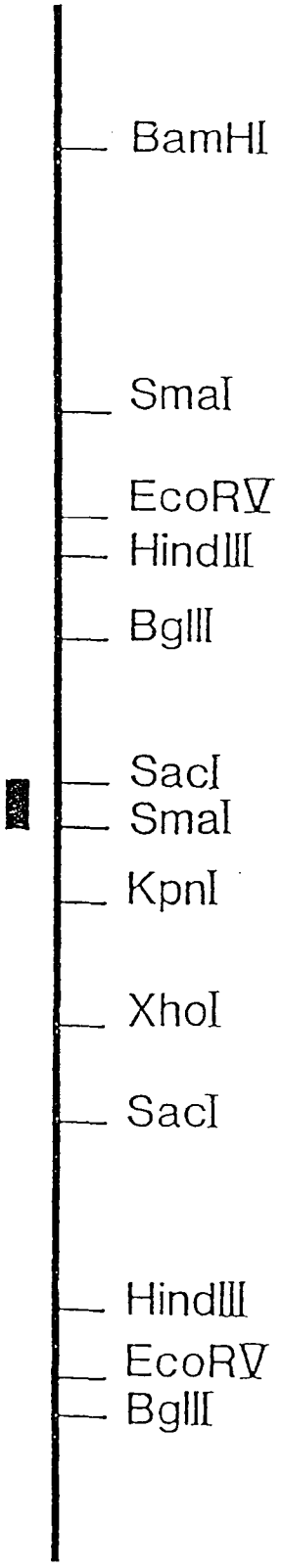
```
 1               5                  10                  15
Xaa-Lys-Glu-Xaa-Ala-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Gly-Gly-Asp-Xaa-Xaa-Asn-Gly-Ala
```

(Kaava 3)

```
AB2306:  5' TCICCICCAATICCIAGAATAAT 3'
                  G        G  G
```

Kuvio 3

Hybridisoituvan faagiklooni 7:n osittainen restriktioentsyymikartta. Oligonukleotidiseoksen AB1719 kanssa hybridisoituva fragmentti osoitetaan vahvennetulla viivalla.



Kuvio 4

FIGURE 5 (page 1 of 3)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 2753 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Aspergillus niger
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 161..1660
(C) IDENTIFICATION METHOD: experimental
(D) OTHER INFORMATION: /codon_start= 161
/product= "alpha-L-arabinofuranosidase B"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "exoB"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 161..214
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 215..1660

(Formula 4)

GAGCTCGATC TTGCATTTCA TGCATAGGCA CTGACTGCAG TAAAGAATAT AAATAAGCCT 60

CCCTTCGCAC CCTAGTAGCA TGATTTCTTT CTCCAAGCGG CCTATCTCAC TGTCTCCTCT 120

CCTAGCCCAG AACTTACTGA GCAGGCAGTA ATCCTCCACC ATGTTCTCCC GCCGAAACCT 180

CGTCGCCCTA GGGCTGGCAG CCACCGTCAG CGCCGGCCCC TGTGACATCT ACGAAGCCGG 240

CGACACGCCC TGCGTAGCCG CGCACAGCAC CACCCGCGCC CTATACAGCT CCTTCAGCGG 300

CGCCCTCTAC CAGCTCCAAC GTGGCTCCGA CGACACCACC ACCACCATCT CCCCGCTCAC 360

AGCCGGCGGC GTCGCCGACG CCTCCGCCCA AGACACCTTC TGTGCCAACA CCACCTGCTT 420

GATCACCATC ATCTACGACC AATCCGGCAA CGGCAACCAC CTGACCCAAG CACCCCCGGG 480

AGGCTTCGAC GGCCCCGACG TCGACGGCTA CGACAACCTC GCCAGCGCCA TCGGCGCCCC 540

CGTCACCCTC AATGGCCAAA AGGCCTACGG CGTGTTCATG TCCCCCGGCA CGGGCTACCG 600

FIGURE 5 (page 2 of 3)

```
TAACAACGAA GCCACCGGCA CCGCCACCGC CGACGAACCC GAAGGCATGT ACGCCGTCCT    660
GGACGGCACG CACTACAACG ACGCCTGCTG CTTCGACTAC GGCAACGCCG AGACCAGCAG    720
CACCGACACT GGCGCCGGCC ACATGGAGGC CATCTACCTC GGGAACAGCA CCACCTGGGG    780
CTACGGCGCC GGTGACGGGC CCTGGATCAT GGTCGATATG GAGAACAACC TCTTCTCCGG    840
TGCTGATGAG GGATATAACT CCGGAGATCC CTCGATCAGC TACAGCTTTG TCACTGCCGC    900
GGTCAAGGGC GGGGCTGATA AGTGGGCTAT TCGCGGTGGT AATGCTGCCT CTGGGTCCCT    960
CTCTACTTAC TACAGCGGCG CTCGCCCGGA TTACTCCGGC TATAACCCCA TGAGCAAGGA   1020
GGGCGCTATC ATCCTGGGTA TCGGCGGTGA CAACAGCAAC GGCGCCCAGG GTACCTTCTA   1080
CGAGGGTGTC ATGACCTCCG GCTACCCGTC GGACGATGTC GAGAACTCCG TCCAGGAGAA   1140
CATCGTGGCT GCGAAATACG TCTCCGGCTC GCTGGTCAGC GGCCCGTCGT TCACCTCCGG   1200
AGAGGTGGTC TCGCTGCGTG TCACTACCCC CGGTTACACG ACGCGGTATA TTGCGCACAC   1260
TGACACCACT GTGAACACGC AGGTCGTGGA CGACGATAGT TCCACCACGC TGAAGGAGGA   1320
GGCTAGCTGG ACCGTGGTGA CAGGTCTGGC TAATAGTCAG TGCTTCTCGT TCGAGTCGGT   1380
TGATACCCCT GGTAGCTATA TCCGGCATTA CAACTTTGAG TTGCTGCTTA ATGCCAACGA   1440
TGGCACGAAG CAGTTCCATG AGGATGCTAC TTTCTGTCCT CAGGCGCCGT TGAATGGAGA   1500
AGGTACTTCG TTGAGATCGT GGAGTTATCC GACCAGGTAT TTCAGGCATT ATGAGAATGT   1560
CCTGTATGCT GCTAGTAATG GTGGTGTGCA GACGTTTGAT TCCAAGACGT CGTTTAATAA   1620
TGATGTTAGC TTTGAGATTG AGACGGCGTT TGCTTCGTAA GGGGGGAATT GGGGGTTGTT   1680
```

FIGURE 5 (page 3 of 3)

```
TGGTGGTTTG GGTGTGGGGT TGTATCTGCC TGTGTTGGCG GGGAGAGTGG TTTGTAAATA   1740
GGTCATTTTT GGTATATAGC ATACGAATAC TATACGATAG TATACATGAT AGTGGTTGTT   1800
TCATGTAATC GAGAAATTAT TCAAGGCTTG CAATACAATA TCTTATTACT GTATCTCGTG   1860
GAGCATTCAC AGACTGAACG GCTGCACAAT GATTCTTATG CGGTGATATT GACTGTGATT   1920
AGATGATATA TTCAGGTGTG CTATTTTTCT TGTATTTATG CTTCATGCGA ATATATGTAT   1980
TTCACGACAG ACAGAGAGGT TAAACAAAGC ATACTAACGA GCGATTCAGA TATGGCATGT   2040
ATGAATAAGA CAAAAGTACT GCGACACTCA AGACCAACAC AAACCAGTAT ACTTCATAAC   2100
AATATATGCT AGGCAGTACC TCCGATTCTA CGATGAGCTT TACCAGAAAA TGGATTTCTT   2160
TGTCCCTCGT CATTCTCAAT TTTTGGGCCT TCCACGGCTG CGGCAACCTG TTGAGCAAGA   2220
CGTGTTCTCT CGTACGGATG GACGTTGATC TTCTTCTCGA GCAGGTCCAA TTGCTCTTTC   2280
TCCAAATGGC GGACTCTGAC CTCACCGGAG GAATCACTCG GCAAGCATAT CTGGTAAGTC   2340
GCTGAAAATT TCTTCTCGAA ACTGGCGTAG CTTGGTGGCC ACTGCGGGAA GCGTCGGAAG   2400
TATTTGCCTG TCCAGACGGT CAATATGAAT GAGTCGGATA CTTCAATGCC CGCCTGCCTT   2460
CTACGGTCGA AGAAATGCTG GCCGATGCTT CTCACGGAGG CATAGTTTAT AACAGGCTTG   2520
ATGGGGTTTT GTATGTCGAG GAGACCTAAT TCAAAGTGCA TAGATAGGCT CCTGAGATTG   2580
TGAAAACCGG TTGCTAGTTT GTCGAAGACG TCGTTGGGCT GTTGTGTGGT TATAGTTCAG   2640
TTCATGGGAT GTACTAAGAG GATTCTTTGG CTTACCCATT GATCGTTCTC TCTCTTGACT   2700
CCCACCTGCA GTGACTTCAG TTTGGGACAG CTAACATCGA GGTGGCTGAG CTC          2753
```

FIGURE 6 (page 1 of 2)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 499 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(Formula 5)

```
Met Phe Ser Arg Arg Asn Leu Val Ala Leu Gly Leu Ala Ala Thr Val
-18         -15                 -10                  -5

Ser Ala Gly Pro Cys Asp Ile Tyr Glu Ala Gly Asp Thr Pro Cys Val
 -1  +1                 5                  10

Ala Ala His Ser Thr Thr Arg Ala Leu Tyr Ser Ser Phe Ser Gly Ala
 15                  20                  25                  30

Leu Tyr Gln Leu Gln Arg Gly Ser Asp Asp Thr Thr Thr Thr Ile Ser
                 35                  40                  45

Pro Leu Thr Ala Gly Gly Val Ala Asp Ala Ser Ala Gln Asp Thr Phe
             50                  55                  60

Cys Ala Asn Thr Thr Cys Leu Ile Thr Ile Ile Tyr Asp Gln Ser Gly
         65                  70                  75

Asn Gly Asn His Leu Thr Gln Ala Pro Pro Gly Gly Phe Asp Gly Pro
     80                  85                  90

Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Leu Ala Ser Ala Ile Gly Ala Pro Val
 95                  100                 105                 110

Thr Leu Asn Gly Gln Lys Ala Tyr Gly Val Phe Met Ser Pro Gly Thr
                115                 120                 125

Gly Tyr Arg Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Asp Glu Pro
            130                 135                 140

Glu Gly Met Tyr Ala Val Leu Asp Gly Thr His Tyr Asn Asp Ala Cys
        145                 150                 155

Cys Phe Asp Tyr Gly Asn Ala Glu Thr Ser Ser Thr Asp Thr Gly Ala
    160                 165                 170

Gly His Met Glu Ala Ile Tyr Leu Gly Asn Ser Thr Thr Trp Gly Tyr
175                 180                 185                 190

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ile Met Val Asp Met Glu Asn Asn Leu
                195                 200                 205

Phe Ser Gly Ala Asp Glu Gly Tyr Asn Ser Gly Asp Pro Ser Ile Ser
            210                 215                 220
```

FIGURE 6 (page 2 of 2)

```
Tyr Ser Phe Val Thr Ala Ala Val Lys Gly Gly Ala Asp Lys Trp Ala
        225                 230                 235

Ile Arg Gly Gly Asn Ala Ala Ser Gly Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Ser
    240                 245                 250

Gly Ala Arg Pro Asp Tyr Ser Gly Tyr Asn Pro Met Ser Lys Glu Gly
255                 260                 265                 270

Ala Ile Ile Leu Gly Ile Gly Gly Asp Asn Ser Asn Gly Ala Gln Gly
                275                 280                 285

Thr Phe Tyr Glu Gly Val Met Thr Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Asp Val
            290                 295                 300

Glu Asn Ser Val Gln Glu Asn Ile Val Ala Ala Lys Tyr Val Ser Gly
        305                 310                 315

Ser Leu Val Ser Gly Pro Ser Phe Thr Ser Gly Glu Val Val Ser Leu
    320                 325                 330

Arg Val Thr Thr Pro Gly Tyr Thr Thr Arg Tyr Ile Ala His Thr Asp
335                 340                 345                 350

Thr Thr Val Asn Thr Gln Val Val Asp Asp Asp Ser Ser Thr Thr Leu
                355                 360                 365

Lys Glu Glu Ala Ser Trp Thr Val Val Thr Gly Leu Ala Asn Ser Gln
            370                 375                 380

Cys Phe Ser Phe Glu Ser Val Asp Thr Pro Gly Ser Tyr Ile Arg His
        385                 390                 395

Tyr Asn Phe Glu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Asp Gly Thr Lys Gln Phe
    400                 405                 410

His Glu Asp Ala Thr Phe Cys Pro Gln Ala Pro Leu Asn Gly Glu Gly
415                 420                 425                 430

Thr Ser Leu Arg Ser Trp Ser Tyr Pro Thr Arg Tyr Phe Arg His Tyr
                435                 440                 445

Glu Asn Val Leu Tyr Ala Ala Ser Asn Gly Gly Val Gln Thr Phe Asp
            450                 455                 460

Ser Lys Thr Ser Phe Asn Asn Asp Val Ser Phe Glu Ile Glu Thr Ala
        465                 470                 475

Phe Ala Ser
    480
```

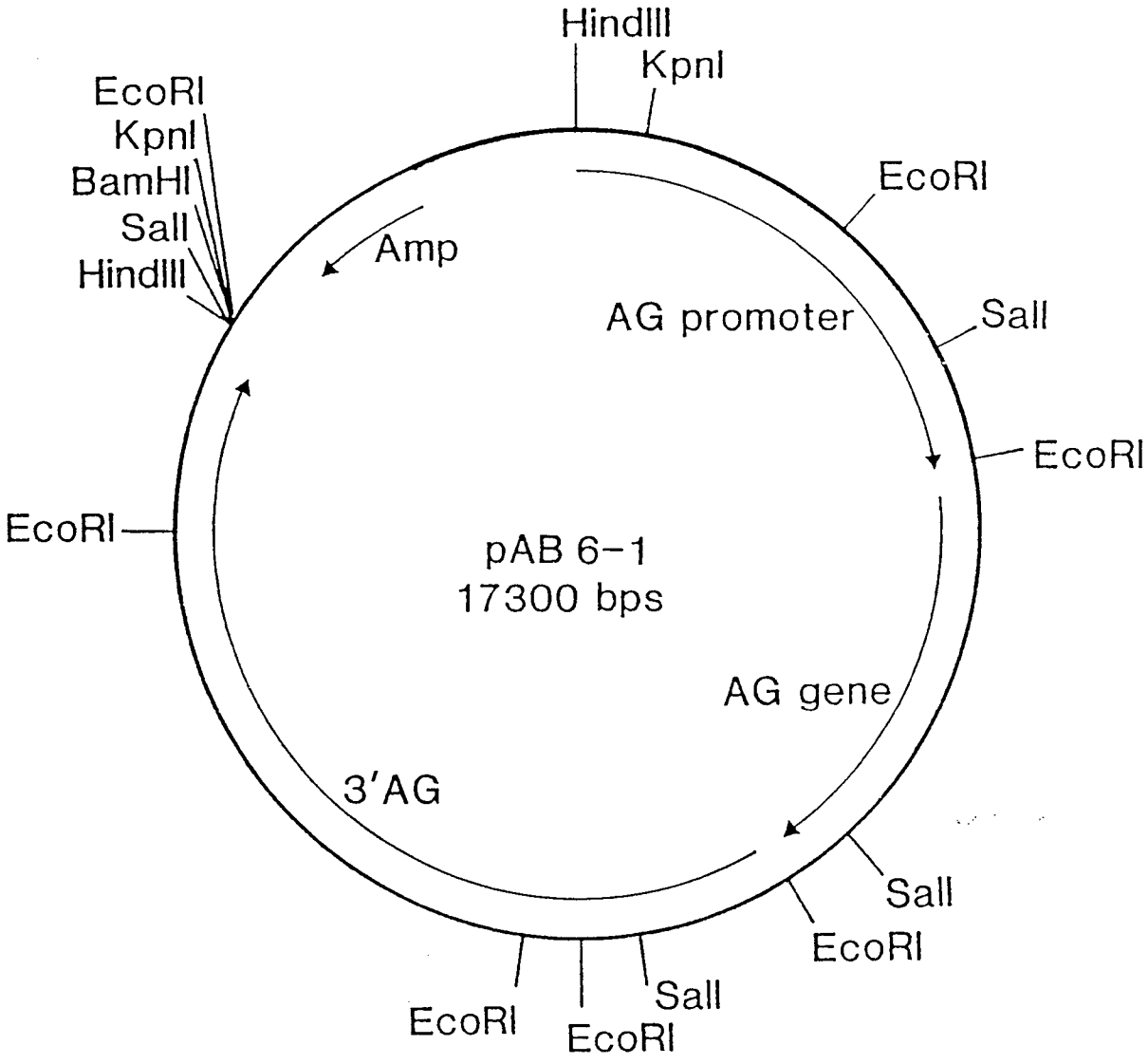

HindIII
KpnI
EcoRI
KpnI
BamHI
SalI
HindIII
Amp
EcoRI
AG promoter
SalI
EcoRI
EcoRI
pAB 6-1
17300 bps
AG gene
3'AG
SalI
EcoRI
SalI
EcoRI
EcoRI

Figure 7

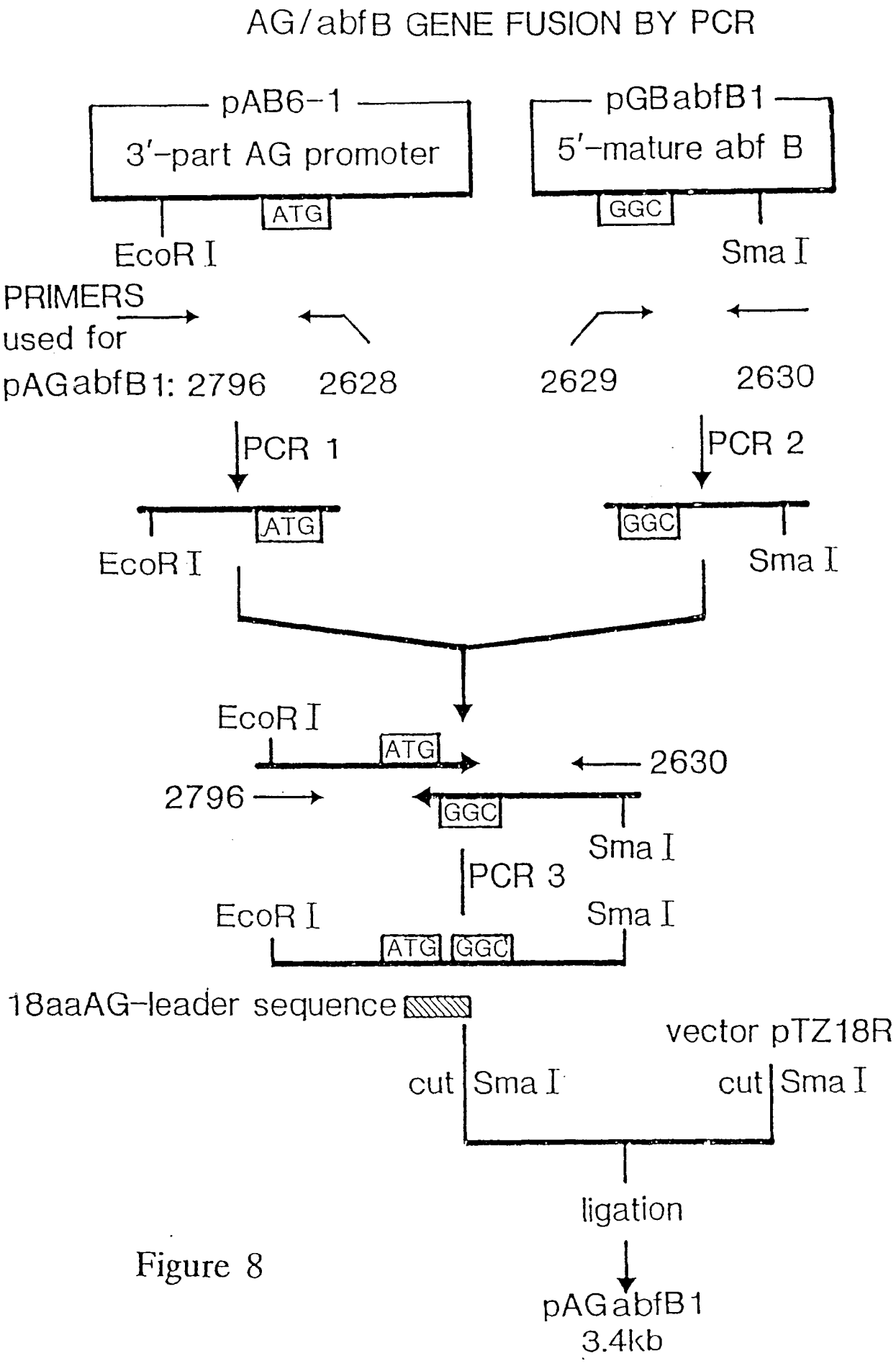

AG/abfB GENE FUSION BY PCR
pAB6-1
3'-part AG promoter
ATG
EcoR I
pGBabfB1
5'-mature abf B
GGC
Sma I
PRIMERS
used for
pAGabfB1: 2796
2628
2629
2630
PCR 1
PCR 2
ATG
GGC
EcoR I
Sma I
EcoR I
ATG
2630
2796
GGC
Sma I
PCR 3
EcoR I
Sma I
ATG
GGC
18aaAG-leader sequence
vector pTZ18R
cut
Sma I
cut
Sma I
ligation
pAGabfB1
3.4kb

Figure 8

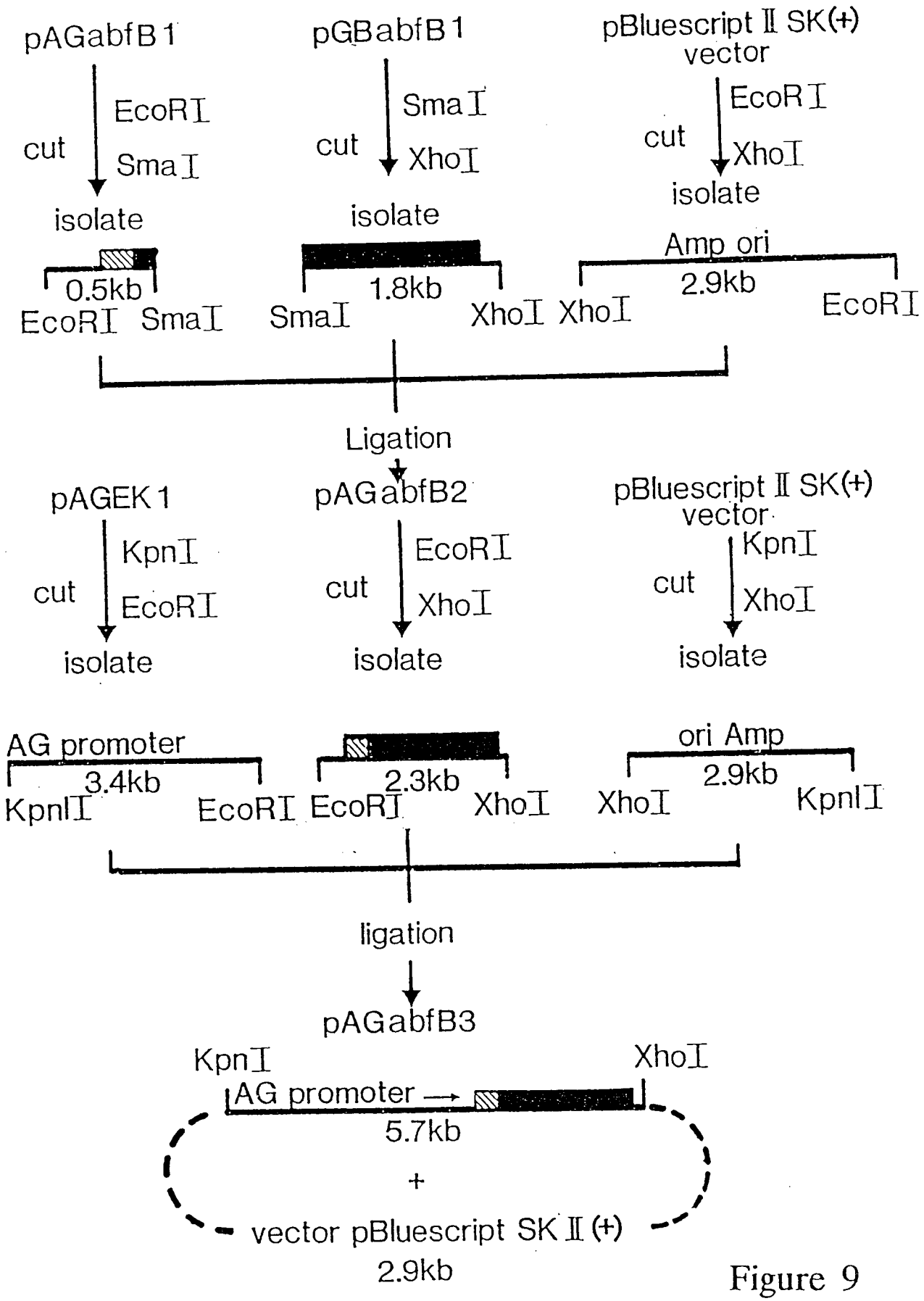

pAGabfB1
cut
EcoRI
SmaI
isolate
0.5kb
EcoRI SmaI
pGBabfB1
cut
SmaI
XhoI
isolate
1.8kb
SmaI XhoI
pBluescript II SK(+)
vector
cut
EcoRI
XhoI
isolate
Amp ori
2.9kb
XhoI EcoRI
Ligation
pAGEK1
cut
KpnI
EcoRI
isolate
pAGabfB2
cut
EcoRI
XhoI
isolate
pBluescript II SK(+)
vector
cut
KpnI
XhoI
isolate
AG promoter
3.4kb
KpnI EcoRI
2.3kb
EcoRI XhoI
ori Amp
2.9kb
XhoI KpnI
ligation
pAGabfB3
KpnI
XhoI
AG promoter
5.7kb
+
vector pBluescript SK II (+)
2.9kb

Figure 9

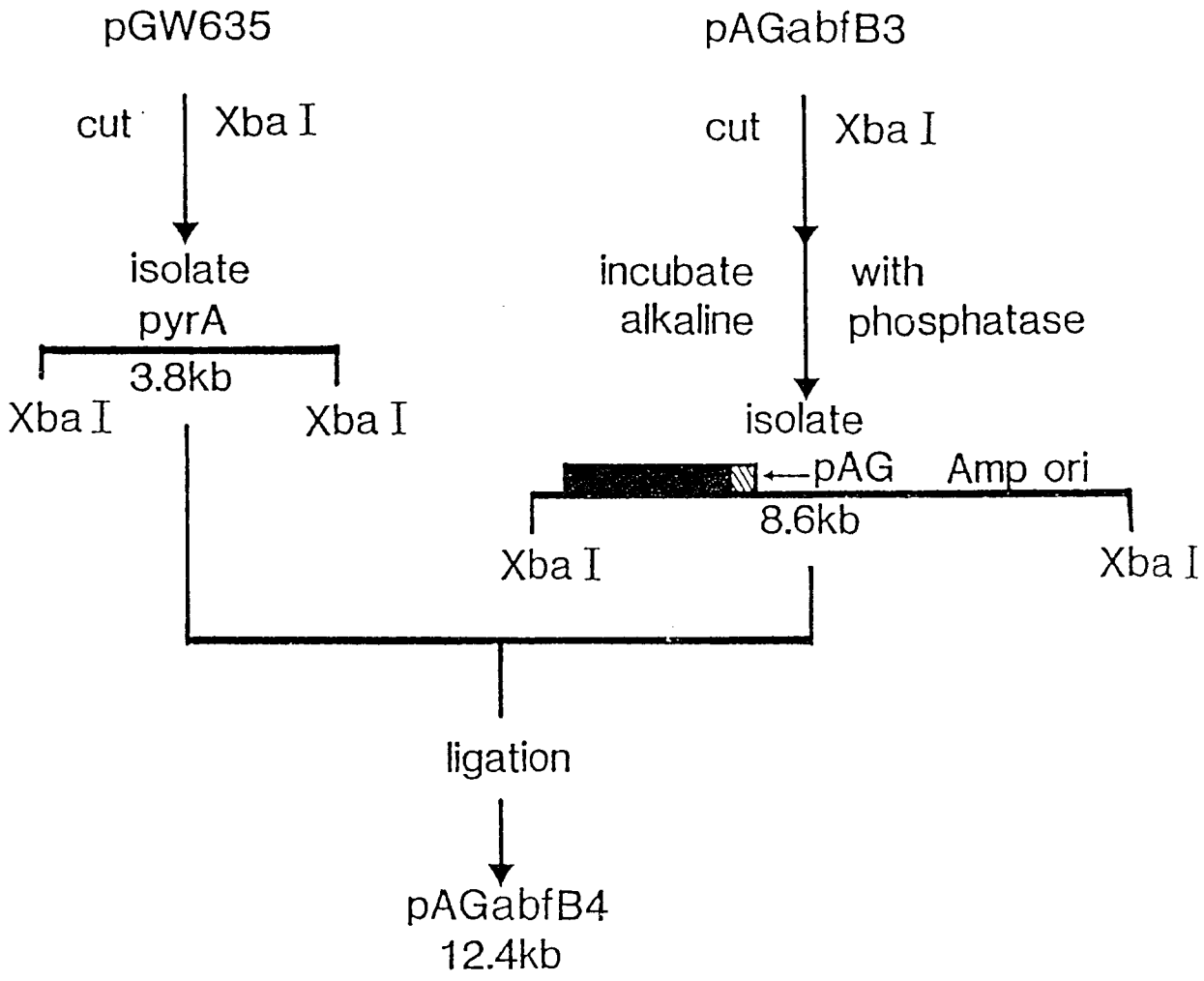

pGW635
cut
Xba I
isolate
pyrA
3.8kb
Xba I
Xba I
pAGabfB3
cut
Xba I
incubate
alkaline
with
phosphatase
isolate
pAG
Amp ori
8.6kb
Xba I
Xba I
ligation
pAGabfB4
12.4kb

Figure 10

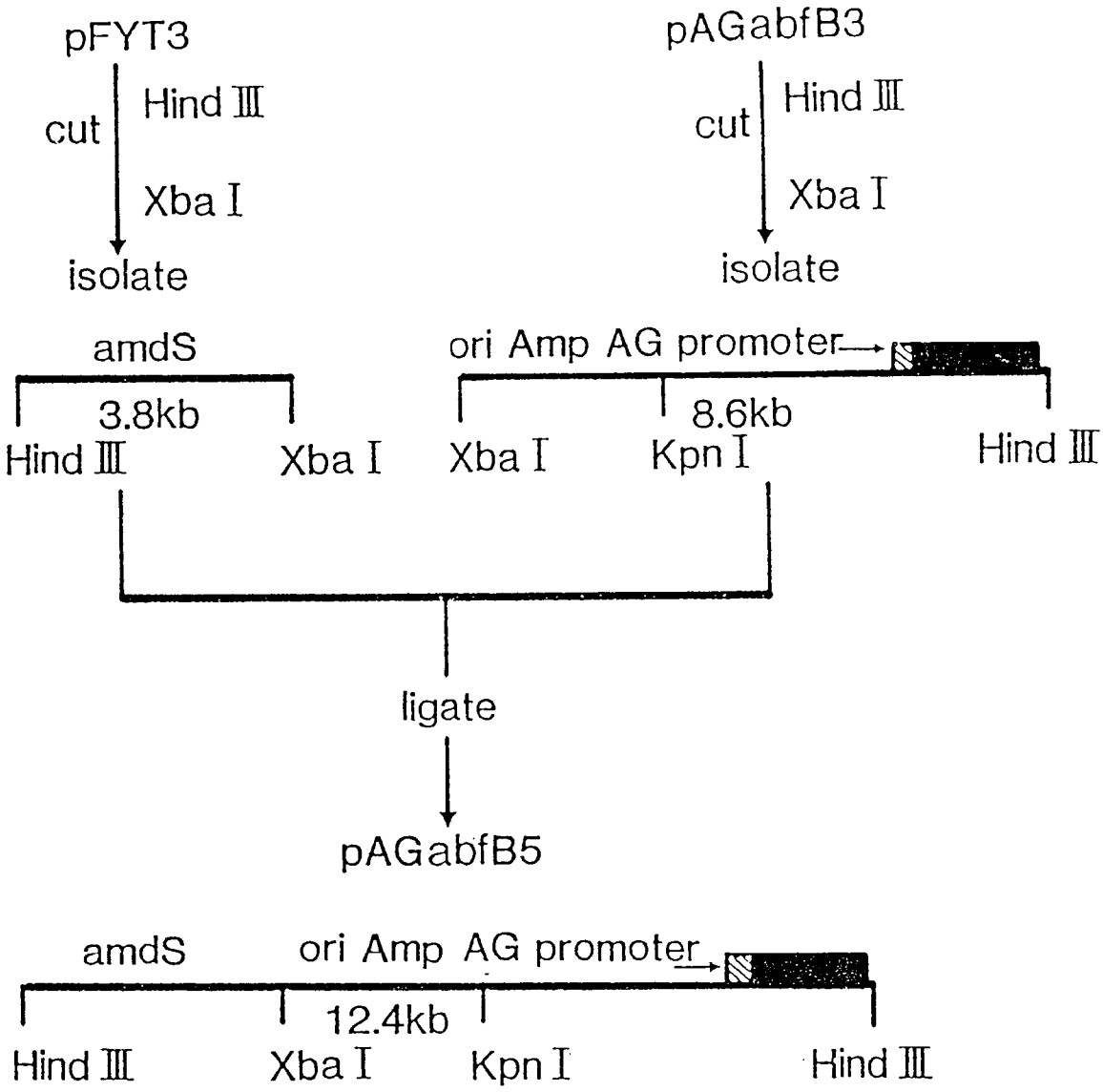

pFYT3
cut
Hind III
Xba I
isolate
pAGabfB3
cut
Hind III
Xba I
isolate
amdS
3.8kb
Hind III
Xba I
ori Amp AG promoter
8.6kb
Xba I
Kpn I
Hind III
ligate
pAGabfB5
amdS
ori Amp AG promoter
12.4kb
Hind III
Xba I
Kpn I
Hind III

Figure 11

pC1X1

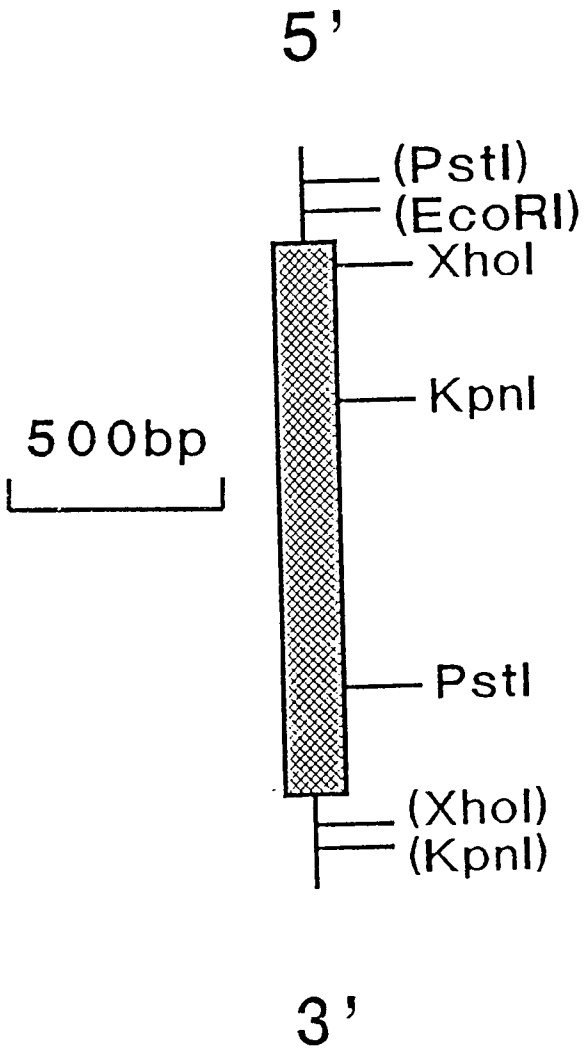


Figure 12

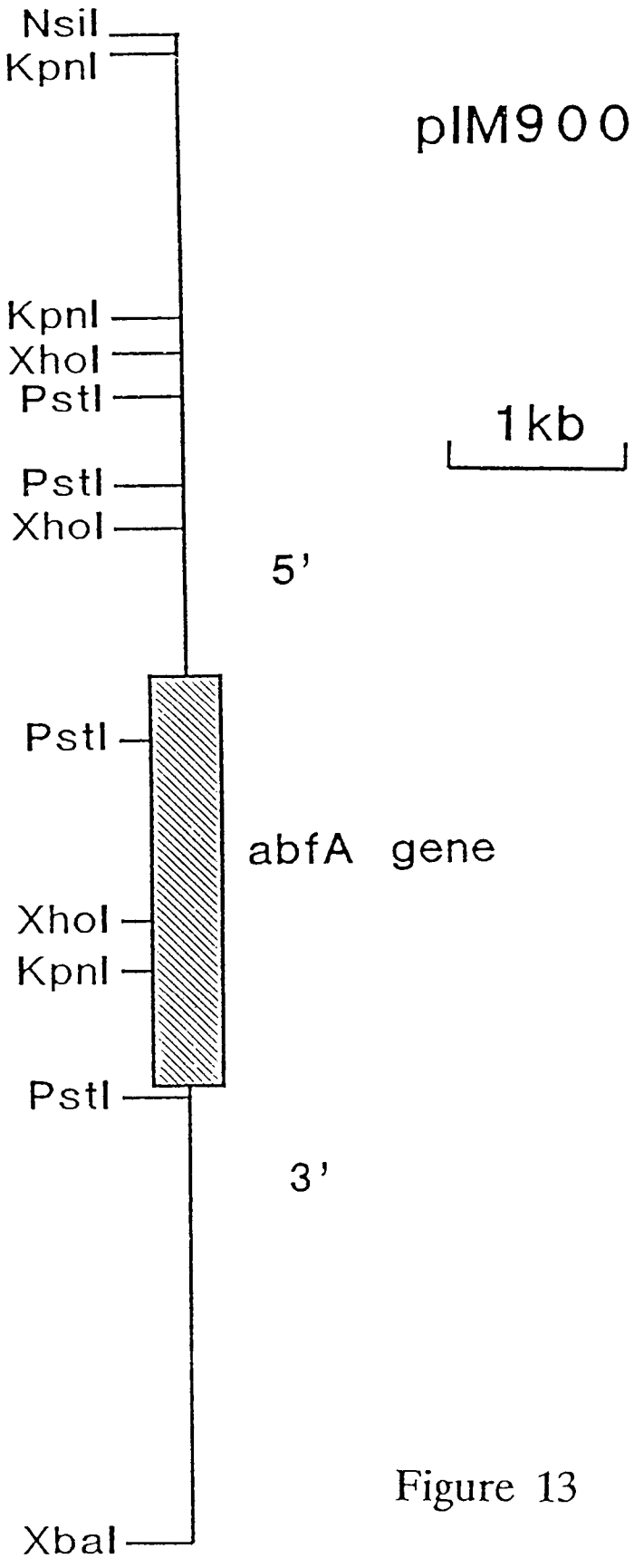

NsiI
KpnI
pIM900
KpnI
XhoI
PstI
1kb
PstI
XhoI
5'
PstI
abfA gene
XhoI
KpnI
PstI
3'
XbaI

Figure 13

FIGURE 14 (page 1 of 5)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 3958 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Aspergillus niger
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 1247..1390
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 1391..1442
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 1443..1957
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 1958..2005
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2006..2089
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 2090..2137
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2138..2214
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 2215..2262
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2263..2295
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 2296..2346
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2347..2498

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 2499..2548
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2549..3037
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 3038..3092
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 3093..3485

FIGURE 14 (page 2 of 5)

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: join(1247..1390, 1443..1957, 2006..2089, 2138..2214, 2263..2295, 2347..2498, 2549..3037, 3093..3485)
(C) IDENTIFICATION METHOD: experimental
(D) OTHER INFORMATION: /codon_start= 1247
/product= "alpha-L-arabinofuranosidase A"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "exoA"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1247..1321
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 1322..3485

(Formula 20)

AAGGGACTGA CTGAACTCAG TGAGATGTGC CGCGAAGTAA CTAAGCGCTG TGCCTGCAGT 60

GAGGCGTGAT GGAACACTGC ATCCGATCTC CAAGACCCCG ATATGAACCT TAATGACAAT 120

GGTCTAAGTT TTTTTGTCAT CTCGCATAGC ACGGTAGGCG ACTAAGTTGA AGGATAAAGA 180

GAGCAGGATT AGGATGGCTC GAGATCAAAT TGAAAGTAAT AGAGTAACAG GGGAAAACTC 240

TAACAGTTGG CTATGACGAA GGTGGCAGCG ACTTCCCGGA GAGAGATTAA GCCGGGTAGA 300

ACCAAGGGAC GGCTGTGGCT GGATCAGGAA CCCAAATCTA TTCCAGTATC GGAGGATACT 360

CAGGGGTCCC GCCGGGGTTT TCCCTTGATC GGAGAACATC AACCACATCA AAATGCGGAG 420

TAACGATGAG GGGGAAGTGC ACGGCCGACG TCAGAGTTTC GCTTGGGTGG ATCTGCAATG 480

TTTAGGCGGC CGACTAGACC GACAGTCCAG CACCTGCCCT GGGAGTTCAA GACAGTGGTT 540

TGACCATCTT TTGAGAAGAC TGAAATTCCC GTAGATTCCA TCAAGATTAT TCATGTATCA 600

CTAGCGACTC AGCACTGGGT AAGCTGCACC CACGGATTTT CTCAGCTATC TGAATGTATC 660

AGAGACAAAG ATCTTCGTGG ATGGAGGCCA TCAACCGAGC TTTAATGCGC CAAACCTACT 720

GTATGACTGA ATAATGGATG GATCGGCATG TCGTACGATC GGGTAAGGGT CCTAAAAATG 780

FIGURE 14 (page 3 of 5)

GAGGGCCGGG GAATTCTGGG GTTAGCCGTC GGGATTATTT CGGTACGACA AACTCACTGT 840

TCACTTTGAT CTCGGCGTGG TTGCGGCTAA AAAGATGACC TTGAAGGTGG AGCGAACAAC 900

TGGAGGTGCT CGGAGGGACG CGGAGAAGAG AGGATCCAAG ACATCGGGGC AGGGAAGTCC 960

ATGCCGCGTG CAGTCACGCT TTTCCTCCCT CTGCTCTCTT CTCCTCCACA TTCCACATTC 1020

CACCTCCACA CTCCTCCACT CTTCCTCTGG CACCTTCCTC TTCCTCGATT TCTTGGCTTC 1080

TCGGTTGATT GTCTTCGACC TCGTTGCGAT GACCCCACCG CATTTTCTGC TGCCTTGGCC 1140

TGTCTGATGC CCCGGTTAAT TTCACGAAAG TCCGGTCATA AAAGGCGTTG TATCCTCCCT 1200

TTGCAACAAT GACACCAGGC TCAGCTTCCT CCAGACAGCC GGCAACATGG TGGCCTTTTC 1260

AGCTCTTTCG GGCGTCAGCG CCGTTTCTTT ACTACTATCC CTCGTTCAAA ATGCACACGG 1320

AATCTCCTTG AAGGTCTCCA CCCAGGGTGG CAACTCATCC AGCCCCATCC TATATGGCTT 1380

CATGTTTGAG GTAGGCCGCA GACTAAGCAG TAAAAGACAA TTGGTTCTCT GACGGTGATT 1440

AGGATATCAA TCACTCAGGA GATGGAGGAA TTTATGGGCA AATGCTGCAG AACCCTGGCC 1500

TTCAGGGAAC GGCGCCTAAT CTGACTGCCT GGGCGGCTGT CGGTGACGCT ACCATCGCCA 1560

TTGATGGCGA CAGTCCATTG ACCTCTGCCA TCCCCAGCAC CATCAAGCTT AATATTGCGG 1620

ACGATGCTAC CGGTGCGGTG GGTCTCACCA ATGAGGGATA TTGGGGCATC CCAGTCGATG 1680

GCAGCGAATT CCATAGTTCC TTCTGGATAA AGGGAGATTA CTCCGGCGAC ATCACCGTCC 1740

GACTGGTTGG AAACTACACC GGCACGGAGT ACGGCTCTAC CACTATCACC CATACGTCCA 1800

CAGCAGACAA CTTCACCCAA GCCTCCGTCA AGTTCCCCAC CACCAAGGCT CCAGATGGCA 1860

FIGURE 14 (page 4 of 5)

```
ACGTTTTGTA CGAGCTCACA GTTGATGGAA GCGTGGCTGC TGGCTCGTCT TTGAACTTCG   1920
GCTACTTGAC GCTTTTTGGC GAAACCTATA AGTCAAGGTT TGCTTCCCTA TACTCCGAAG   1980
AGTGAATTAG GGGCTAATTG TGTAGGGAAA ATGGCCTGAA GCCCCAGCTT GCCAATGTGT   2040
TGGATGATAT GAAAGGATCC TTCCTGAGAT TTCCCGGCGG TAACAACCTG TAAGTCTCAG   2100
CTCGCCCGGT AAGTGTATAG AAGCTCATCA GAGGTAGTGA GGGAAACAGC GCAGAAAACC   2160
GCTGGAAGTG GAACGAGACA ATCGGCGATC TTTGTGATCG TCCCGGACGT GAAGGTATGT   2220
CTCATTATTA GGATTGAAGC ATTCATCCCT GACGGTATAT AGGCACTTGG ACTTACTATA   2280
ACACCGACGG ACTGGGTAAG TAAAGGGCTA TATACAAGTA CCTAGATACT GTACTAACGC   2340
TTGTAGGCCT TCACGAATAC TTTTACTGGT GTGAGGATTT GGGGCTCGTA CCGGTGCTCG   2400
GTGTCTGGGA TGGGTTCGCT CTGGAGTCGG GTGGCAACAC CCCCCTCACG GGCGACGCAC   2460
TGACCCCTTA TATCGACGAT GTCTTGAACG AGCTCGAGGT ATGTTGAGCG GCATATCAAA   2520
TTGATAGCTG AAGCTAACCC ATTGGCAGTA CATCTTGGGT GATACGAGCA CGACCTATGG   2580
AGCGTGGCGC GCGGCAAACG GACAGGAGGA GCCGTGGAAC CTTACCATGG TCGAGATTGG   2640
CAATGAGGAC ATGCTGGGAG GCGGATGCGA GTCCTACGCG GAACGTTTCA CTGCCTTCTA   2700
TGATGCGATT CATGCTGCTT ATCCGGACCT TATCCTGATT GCCAGCACCA GCGAGGCGGA   2760
TTGCTTGCCC GAGTCAATGC CCGAGGGTAG CTGGGTCGAC TACCACGACT ACAGCACGCC   2820
TGATGGACTG GTGGGCCAGT TCAACTACTT CGACAATTTA AACCGCTCGG TACCATACTT   2880
CATCGGCGAG TACTCGCGCT GGGAGATTGA CTGGCCCAAC ATGAAGGGAT CGGTCGCTGA   2940
```

FIGURE 14 (page 5 of 5)

AGCCGTCTTC ATGATCGGGT TCGAGAGGAA CAGCGACGTG GTGAAGATGG CGGCGTATGC 3000

GCCTTTGCTC CAGCTAATCA ACTCGACTCA GTGGACGGTA AGTCACGACT GAGCAGCGGG 3060

GTTTCAGGTA TGAATGAGCT AACGAGTGGT AGCCGGACCT GATCGGATAC ACGCAGTCAC 3120

CCGGTGACAT TTTCCTGTCG ACCAGCTACT ACGTGCAGGA GATGTTCTCG CGCAACCGGG 3180

GTGATACAAT TAAGGAGGTG ACGTCGGACA GCGACTTCGG ACCGTTGTAC TGGGTTGCGT 3240

CGAGCGCCGG GGACTCGTAC TACGTGAAGC TGGCCAACTA TGGCTCCGAG ACGCAAGACC 3300

TCACGGTGAG CATCCCAGGA ACGAGCACAG GCAAGTTGAC GGTGCTGGCG GACAGTGATC 3360

CGGATGCGTA TAACTCGGAC ACCCAGACGC TGGTCACGCC GAGTGAATCG ACGGTGCAGG 3420

CGAGCAATGG CACTTTTACC TTTAGTTTGC CGGCATGGGC GGTGGCTGTC CTGGCGGCGA 3480

ACTAGCGTTG ATTGGGGCGA GCTCGTATGG GCGGCAAGTC GAATATTATC TGCAGGTGTG 3540

GTGTCATGTA CTGCAGTATT TCTGATTAAC GATAGAGAGA TAGATCCATG CTATATACCT 3600

GCTTGTATAT CCAAGGCATT TATCCAATGA TAGGCAACGC CACCACACGT GGCTATGCAC 3660

ATACTAGTCA GGAGGTAGTA GAGTGACTGA CTGCTATGTA GCGGTCGGCC GGGGATAGCA 3720

GTTGAATGAC CCCAATTAAC AGAACCGCCT GACTCTCCAA CGTGTACCTC TAGGTTATTT 3780

TATATTTCTT GTTAAAGCCC CCCAGAAACA CAACCGAAGA ATCAATGGAT GCGATGAAAA 3840

CAAGGCACTG GTAAGCGAAG GAGGGAAAAA CAAGCGGATT GGTTGGTTGT GGCCCGATGC 3900

AAACGGGCGG CCTCTCCACT CGAATTGGAC AGAAGCGAAG GCCGTGCGCC GAGACGGG 3958

FIGURE 15 (page 1 of 3)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 628 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: protein

(Formula 21)

```
Met Val Ala Phe Ser Ala Leu Ser Gly Val Ser Ala Val Ser Leu Leu
-24                 -20                 -15                 -10

Leu Ser Leu Val Gln Asn Ala His Gly Ile Ser Leu Lys Val Ser Thr
            -5                  -1  +1              5

Gln Gly Gly Asn Ser Ser Ser Pro Ile Leu Tyr Gly Phe Met Phe Glu
    10                  15                  20

Asp Ile Asn His Ser Gly Asp Gly Gly Ile Tyr Gly Gln Met Leu Gln
25                  30                  35                  40

Asn Pro Gly Leu Gln Gly Thr Ala Pro Asn Leu Thr Ala Trp Ala Ala
                45                  50                  55

Val Gly Asp Ala Thr Ile Ala Ile Asp Gly Asp Ser Pro Leu Thr Ser
            60                  65                  70

Ala Ile Pro Ser Thr Ile Lys Leu Asn Ile Ala Asp Asp Ala Thr Gly
        75                  80                  85

Ala Val Gly Leu Thr Asn Glu Gly Tyr Trp Gly Ile Pro Val Asp Gly
    90                  95                  100

Ser Glu Phe His Ser Ser Phe Trp Ile Lys Gly Asp Tyr Ser Gly Asp
105                 110                 115                 120

Ile Thr Val Arg Leu Val Gly Asn Tyr Thr Gly Thr Glu Tyr Gly Ser
                125                 130                 135

Thr Thr Ile Thr His Thr Ser Thr Ala Asp Asn Phe Thr Gln Ala Ser
            140                 145                 150

Val Lys Phe Pro Thr Thr Lys Ala Pro Asp Gly Asn Val Leu Tyr Glu
        155                 160                 165

Leu Thr Val Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Ser Ser Leu Asn Phe Gly
    170                 175                 180

Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Glu Thr Tyr Lys Ser Arg Glu Asn Gly Leu
185                 190                 195                 200

Lys Pro Gln Leu Ala Asn Val Leu Asp Asp Met Lys Gly Ser Phe Leu
                205                 210                 215

Arg Phe Pro Gly Gly Asn Asn Leu Glu Gly Asn Ser Ala Glu Asn Arg
            220                 225                 230
```

FIGURE 15 (page 2 of 3)

```
Trp Lys Trp Asn Glu Thr Ile Gly Asp Leu Cys Asp Arg Pro Gly Arg
        235                 240                 245

Glu Gly Thr Trp Thr Tyr Tyr Asn Thr Asp Gly Leu Gly Leu His Glu
    250                 255                 260

Tyr Phe Tyr Trp Cys Glu Asp Leu Gly Leu Val Pro Val Leu Gly Val
265                 270                 275                 280

Trp Asp Gly Phe Ala Leu Glu Ser Gly Gly Asn Thr Pro Leu Thr Gly
                285                 290                 295

Asp Ala Leu Thr Pro Tyr Ile Asp Asp Val Leu Asn Glu Leu Glu Tyr
            300                 305                 310

Ile Leu Gly Asp Thr Ser Thr Thr Tyr Gly Ala Trp Arg Ala Ala Asn
        315                 320                 325

Gly Gln Glu Glu Pro Trp Asn Leu Thr Met Val Glu Ile Gly Asn Glu
    330                 335                 340

Asp Met Leu Gly Gly Gly Cys Glu Ser Tyr Ala Glu Arg Phe Thr Ala
345                 350                 355                 360

Phe Tyr Asp Ala Ile His Ala Ala Tyr Pro Asp Leu Ile Leu Ile Ala
                365                 370                 375

Ser Thr Ser Glu Ala Asp Cys Leu Pro Glu Ser Met Pro Glu Gly Ser
            380                 385                 390

Trp Val Asp Tyr His Asp Tyr Ser Thr Pro Asp Gly Leu Val Gly Gln
        395                 400                 405

Phe Asn Tyr Phe Asp Asn Leu Asn Arg Ser Val Pro Tyr Phe Ile Gly
    410                 415                 420

Glu Tyr Ser Arg Trp Glu Ile Asp Trp Pro Asn Met Lys Gly Ser Val
425                 430                 435                 440

Ala Glu Ala Val Phe Met Ile Gly Phe Glu Arg Asn Ser Asp Val Val
                445                 450                 455

Lys Met Ala Ala Tyr Ala Pro Leu Leu Gln Leu Ile Asn Ser Thr Gln
            460                 465                 470

Trp Thr Pro Asp Leu Ile Gly Tyr Thr Gln Ser Pro Gly Asp Ile Phe
        475                 480                 485

Leu Ser Thr Ser Tyr Tyr Val Gln Glu Met Phe Ser Arg Asn Arg Gly
    490                 495                 500

Asp Thr Ile Lys Glu Val Thr Ser Asp Ser Asp Phe Gly Pro Leu Tyr
505                 510                 515                 520
```

FIGURE 15 (page 3 of 3)

```
Trp Val Ala Ser Ser Ala Gly Asp Ser Tyr Tyr Val Lys Leu Ala Asn
                525                 530                 535

Tyr Gly Ser Glu Thr Gln Asp Leu Thr Val Ser Ile Pro Gly Thr Ser
            540                 545                 550

Thr Gly Lys Leu Thr Val Leu Ala Asp Ser Asp Pro Asp Ala Tyr Asn
        555                 560                 565

Ser Asp Thr Gln Thr Leu Val Thr Pro Ser Glu Ser Thr Val Gln Ala
    570                 575                 580

Ser Asn Gly Thr Phe Thr Phe Ser Leu Pro Ala Trp Ala Val Ala Val
585                 590                 595                 600

Leu Ala Ala Asn
            604
```

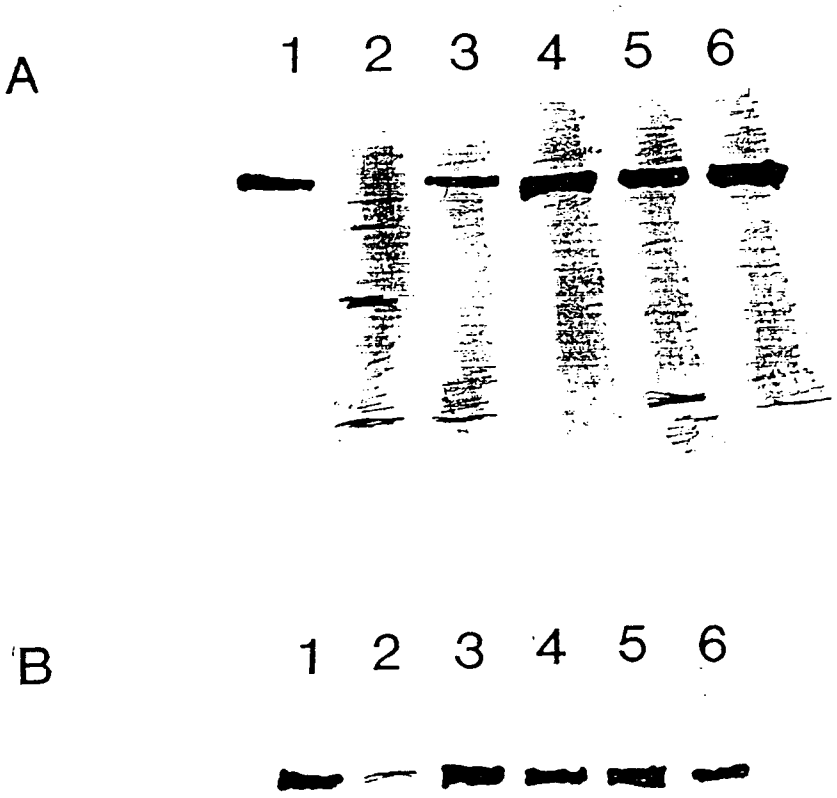


Figure 16

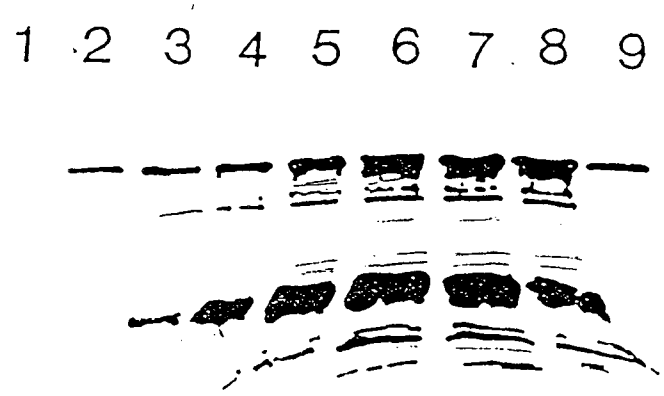


Figure 17

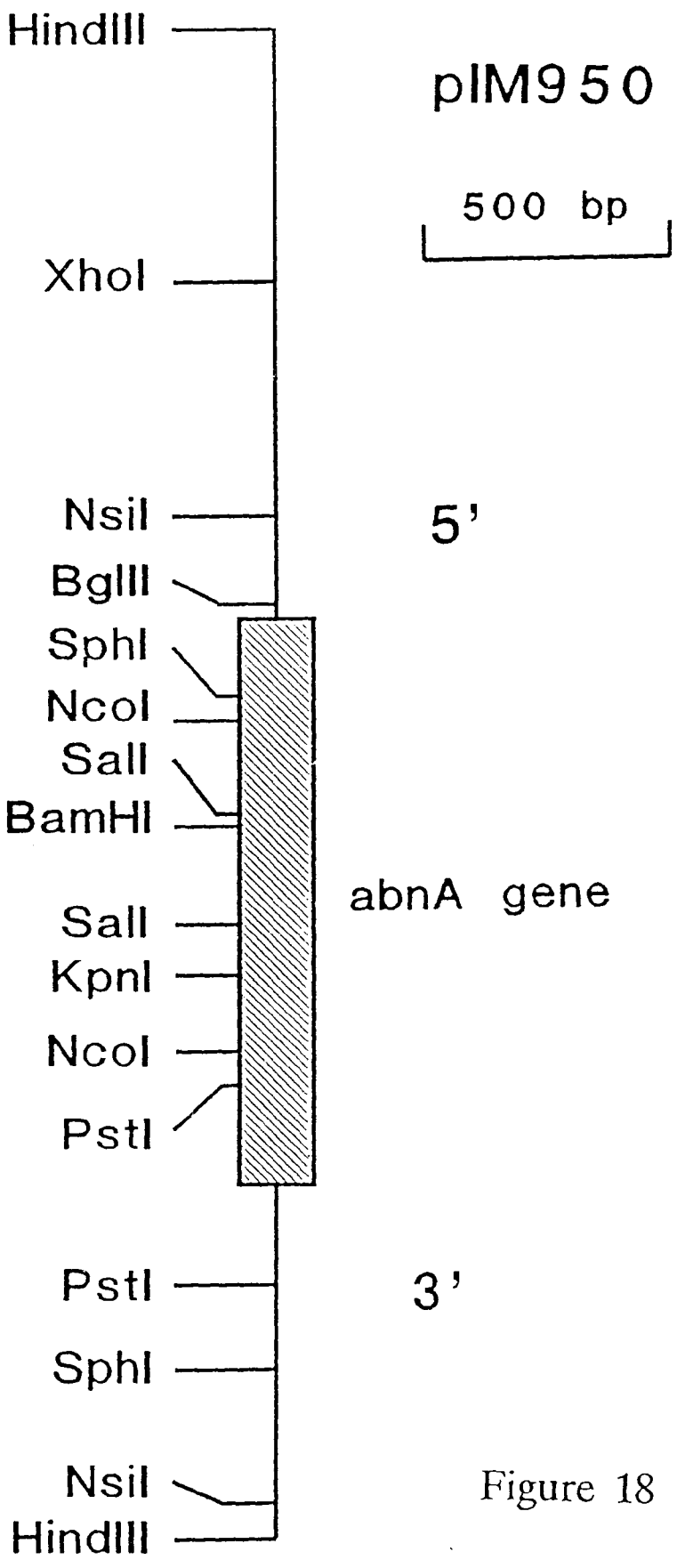

HindIII
pIM950
500 bp
XhoI
NsiI
5'
BglII
SphI
NcoI
SalI
BamHI
abnA gene
SalI
KpnI
NcoI
PstI
PstI
3'
SphI
NsiI
HindIII

Figure 18

FIGURE 19 (page 1 of 4)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 3147 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Aspergillus niger
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 1178..1444
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 1445..1494
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 1495..1971
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 1972..2030
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2031..2116
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 2117..2167
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: exon
(B) LOCATION: 2168..2378
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: join(1178..1444, 1495..1971, 2031..2116, 2168..2378)
(C) IDENTIFICATION METHOD: experimental
(D) OTHER INFORMATION: /codon_start= 1178
/product= "endo 1,5-alpha-arabinanase"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "abnA"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1178..1234
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 1235..2378

(Formula 22)

AAGCTTGGTC GTGTCCGCGG TAGTACTACC TCCGTAGAGA CTCTCTCTGG ATCTTCTCAA 60

AAGGGGGTTT CGTGTTCTGG TACAGACTCT TCTAGTTCTC GCTTACGGCT CCACCCATTG 120

FIGURE 19 (page 2 of 4)

```
CTGAAGAACC CCACTCCTGC TGTTTCCCAT TTATGTTCCG GTCTAACGAT GGCTTCTCCA   180
CCAAGAAATG GAAGTGTGCT CTCCTCTCAA AACTCTCCAA TTCTGGTTTG ATCGATGTGA   240
GCTTACCAAG AAAGAGCGAA GACTTCCATC TTGTACTTAC GGACCCGATT AGCTATGCTT   300
CCTACACGTT NAANGACGAT NGACATATNN TGCTACCTGT TACTTGTCAG ATGGTCTCTC   360
TAACGCTGGC GGNATGTGGA CCAGATTCTC TTCAAAGTTA TGCCAAGATT CGCATGGGCC   420
AATCCTGAAA AGCGAAAAGC GCAAGGAGGC GCAGCTGAGA CAGAATCCCC TTTCTGCGAG   480
TCACATCTCG AGTCCCTTAA GGCCACCGTC GAGTGGTGGG CGATAAACTC CGCATATCTG   540
CCACCTGAAA AATATCGGTC AATACATCTA TGGCCTAATG AGACCAGTGG TCAGAATACG   600
CCTAAGGCCG GAAACTACTC CCGCAAATTG CTGCGACGAA GACGAGGGGG GCGTAGTCAT   660
AAATTTGCGT GTCGTGTGCC TATGATAATT TCTTGGGGTC CGAAGAGCAC GCTAGGGATG   720
TCAGAACAAC TAATGTTGCA GGATTGGTCT CCATCTCATC CCTGTCACTG ACATCATATT   780
ACTTCCTAGT ATATCATGTT CACCATTGTA TAGAGAGACG CGCCCATCGC AACGCACGTG   840
TTGGTGAGCA CCTCCACTAA AAGTGTCACT GTTGTCTACA CACCACTCGT TTCACGCTGA   900
TGTGCCGAAT CATACTACAT GCATCGGCCA TCGGCTTATA CCACCAGGTG CCTCCGGAAT   960
TTTGCTGTTT CAAAATGTTC TTTGTAACTC CCTGAAACGA CCAAAGTATC ACGGAGGTAG  1020
CTCCGGACAG GCGGAAAACA CAACCACTTT GTCCACGAAT CGACACAGTA GTCTTCCGGT  1080
GGGTTTAGTT GTCGCTTCAT GATAGTATAT ATAGTAATAG TAGATCTGGA TGCTTGGGAT  1140
AAGTCATCCA GTGGTGACAG CGCCTACCTA AATCGTCATG TATCAACTCC TATCAGTTGC  1200
```

FIGURE 19 (page 3 of 4)

```
CTCGGTTCCT CTGCTGGCCA GCCTCGTGCA TGGCTATGCT GACCCCGGAG CATGCTCGGG   1260
TGTTTGTACC ACCCATGACC CCGGTTTGAT CCGGAGAGAG TCGGACGGTA CATACTTCCT   1320
CTTCTCTACA GGAAACAAAA TCTCCTACGT CTCTGCATCA TCCATCGAAG GACCATGGAC   1380
CAGCGTTGGG TCTATGCTGC CGGATGGATC GTCCATCGAC CTCGATGGCA ACGATGATCT   1440
TTGGGTAACT ATGTCCCACT GCAAACATGA TTGGCCTGTC TGACACTAGC CCAGGCCCCG   1500
GATGTCTCCT ATGTAGATGG TCTCTATTAT GTATACTACG CTGTGTCGAC CTTTGGATCC   1560
CAAGATTCCG CCATCGGACT TGCAACGTCC GAGACGATGG AATATGGCTC TTGGACGGAT   1620
CATGGCTCCA CTGGCATTGC GTCTTCCTCA GCCAAGATTT ATAATGCGAT CGACCCCAAC   1680
CTGATCTACG CCGATGGCAC CTACTACATC AACTTTGGGT CGTTCTGGGA TGACATTTAC   1740
CAAGTCCCGA TGAAGTCGAC CCCAACGGCA GCTGCCTCTT CCTCCTACAA TCTTGCGTAT   1800
GACCCGTCGG GTACCCATGC GGAGGAGGGT TCCTATATGT TTCAGTACGG TGACTACTAC   1860
TACCTCTTTT ACTCGGCAGG TATCTGCTGT GGATACGATA CATCCATGCC CGCTTCCGGA   1920
GAGGAGTATC ATATCAAGGT CTGCCGTTCG ACTTCGCCCA CGGGTGATTT CGTAAGTATA   1980
TCCGACATTT AGAGAAAATA CTAAGTAGGG AAAGCTAACC TGGTGCTAAG GTTGACTCCG   2040
ACGGTACGGC GTGCACGGAT GGCGGGGGCA CGATGGTGCT CGAAAGCCAT GGAGAAGTCT   2100
ATGGCCCTGG CGGACAGTAA GTGATTCTGC AGCTGCCCCA CCGATATTTA TGCTTATCAT   2160
GTTTTAGGGG TGTGTATGAC GATCCCAACC TTGGTCCGGT TCTTTACTAC CACTACATGA   2220
ACACCACGAT TGGATACGCG GATTCTGACG CGCAGTTTGG GTGGAACACG ATCGACTTCT   2280
```

FIGURE 19 (page 4 of 4)

CTGACGGATG GACCGGTTGT ATAAGCATCT TGGTTGGCGA TGGAAATGGT GCTGCCTACG 2340

AGAGGGTCTA CAAGTTGTAT ATAGGATTGC GGCTATGAAC TCGGCCGAGA TATAGTTAGT 2400

TAGTAACTAC ATAGTGGAAT CGTTAGTCAC TAATGCAGCC CGCATGAGTG CTCTGCCTGA 2460

GGCTTCAGTA CTGTCCCTCA ATTTCTGTTT CTGTTTTTAG TTTAAGCTCT GCAGCTGCTC 2520

CCCACCCATT CATCCACTCA TTTGGTGAAG ACATTCATTC TTCCCTTCAA CCACTCTATT 2580

AGAGCATTTC CATCTTCTCA CACTGATCAT CGTAATGCAG ATTCAAGATC AGTTTGGATT 2640

GAGATCCCTA CTGCATGCAC TGTGTGCGTG ACAGAAGCTG GAACTGGTAC TCGCTCGATC 2700

CGTGCAGCGC GAGTCAGTCA CATCCGCCCT GCGCTTCAGA CTAGCCTGCC AATAGTGACT 2760

ATCACAAGGG CCGTACTAAG ATCGAATAAC AGCTTTCCTA ACAACATCGC GTTAACGTGT 2820

TACTTTCCTC CAGCTTACAT TTTGCTATTG AAGCCATATA CGATCCCTTC GATGCGCTCG 2880

GTTTAACTTC TGCCACGATC ACCCGTTCAT CGAAGATTCT GGGAGTCTGT CGGTCTTCAT 2940

GCCAGCAAAG ATCGACTCAA ATACACACAG TCAGCAACAT CTGTTGCTTG TTACGGATGG 3000

TGCCTATTAT AATGCATGAA TAGGGGACCA AGCAATTCTC CGCTGTCGGC GATGTTGAAT 3060

TAAGGAGGGA TAATATTTGA TCGAATGACA AAGGGAAGAA TTGTGCGACA CGAGGGAACC 3120

TTATACTTGT CTACGGCCTA GCAGCAA 3147

FIGURE 20 (page 1 of 2)

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 346 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: protein

(Formula 23)

```
Met Tyr Gln Leu Leu Ser Val Ala Ser Val Pro Leu Leu Ala Ser Leu
-19                 -15                 -10                  -5

Val His Gly Tyr Ala Asp Pro Gly Ala Cys Ser Gly Val Cys Thr Thr
        -1  +1              5                  10

His Asp Pro Gly Leu Ile Arg Arg Glu Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
    15                  20                  25

Phe Ser Thr Gly Asn Lys Ile Ser Tyr Val Ser Ala Ser Ser Ile Glu
30                  35                  40                  45

Gly Pro Trp Thr Ser Val Gly Ser Met Leu Pro Asp Gly Ser Ser Ile
                50                  55                  60

Asp Leu Asp Gly Asn Asp Asp Leu Trp Ala Pro Asp Val Ser Tyr Val
            65                  70                  75

Asp Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Tyr Ala Val Ser Thr Phe Gly Ser Gln
        80                  85                  90

Asp Ser Ala Ile Gly Leu Ala Thr Ser Glu Thr Met Glu Tyr Gly Ser
    95                  100                 105

Trp Thr Asp His Gly Ser Thr Gly Ile Ala Ser Ser Ser Ala Lys Ile
110                 115                 120                 125

Tyr Asn Ala Ile Asp Pro Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Thr Tyr Tyr
                130                 135                 140

Ile Asn Phe Gly Ser Phe Trp Asp Asp Ile Tyr Gln Val Pro Met Lys
            145                 150                 155

Ser Thr Pro Thr Ala Ala Ala Ser Ser Ser Tyr Asn Leu Ala Tyr Asp
        160                 165                 170

Pro Ser Gly Thr His Ala Glu Glu Gly Ser Tyr Met Phe Gln Tyr Gly
    175                 180                 185

Asp Tyr Tyr Tyr Leu Phe Tyr Ser Ala Gly Ile Cys Cys Gly Tyr Asp
190                 195                 200                 205

Thr Ser Met Pro Ala Ser Gly Glu Glu Tyr His Ile Lys Val Cys Arg
                210                 215                 220
```

FIGURE 20 (page 2 of 2)

```
Ser Thr Ser Pro Thr Gly Asp Phe Val Asp Ser Asp Gly Thr Ala Cys
            225                 230                 235

Thr Asp Gly Gly Gly Thr Met Val Leu Glu Ser His Gly Glu Val Tyr
        240                 245                 250

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Val Tyr Asp Asp Pro Asn Leu Gly Pro Val
    255                 260                 265

Leu Tyr Tyr His Tyr Met Asn Thr Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Asp
270                 275                 280                 285

Ala Gln Phe Gly Trp Asn Thr Ile Asp Phe Ser Asp Gly Trp Thr Gly
                290                 295                 300

Cys Ile Ser Ile Leu Val Gly Asp Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Arg
            305                 310                 315

Val Tyr Lys Leu Tyr Ile Gly Leu Arg Leu
        320                 325
```

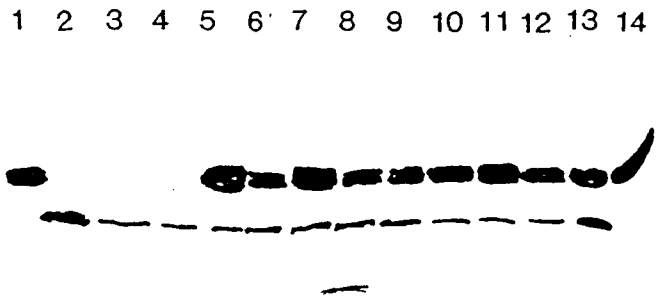


Figure 21

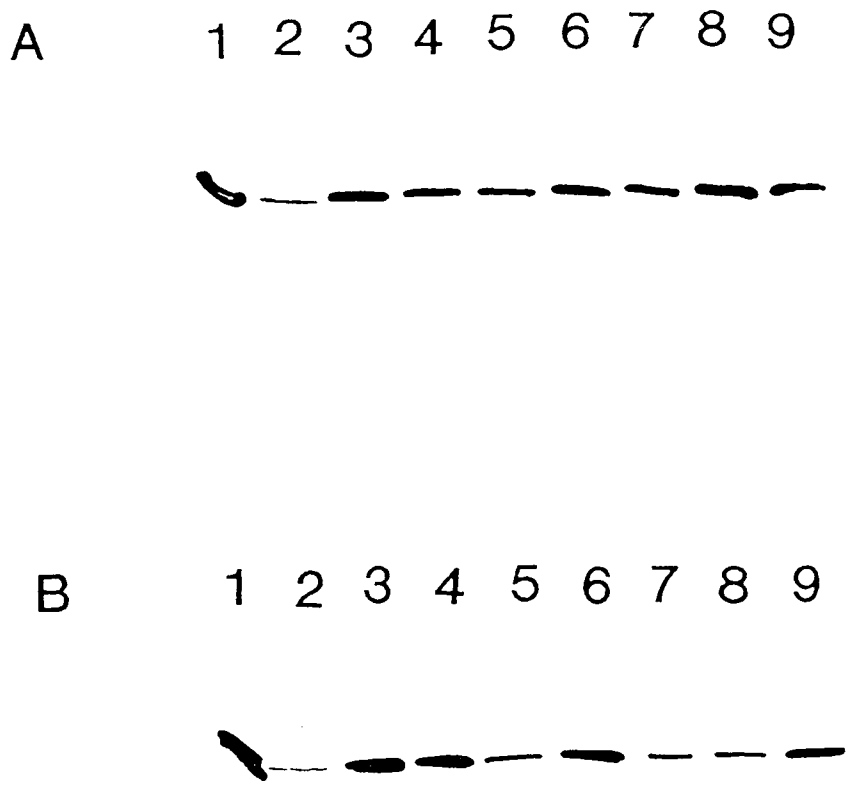


Figure 22