

(19)



(10) **LT 98-186 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **98-186** (51) Int. Cl. (2006): **C12N 15/09**
C12N 1/15
(22) Paraiškos padavimo data: **1998 12 17** **C12N 9/02**
C12N 15/53
(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 08 25** **C12P 37/00**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/ES98/00101**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 04 17**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **1998 12 17**
- (30) Prioritetas: **P 9700833, 1997 04 18, ES**
- (71) Pareiškėjas:
ANTIBIOTICOS, S.A., Avenida Antibioticos 59/61, E-24080 Leon, ES
- (72) Išradėjas:
Jose Manuel FERNANDEZ-CANON, ES
Marta RODRIGUEZ-SAIZ, ES
Bruno DIEZ-GARCIA, ES
Jose Luis BARREDO-FUENTE, ES
Alejandro VITALLER-ALBA, ES
Francisco SALTO-MALDONADO, ES
Miguel Angel PENALVA-SOTO, ES
Jose Manuel MINGOT-ASCENCAO, ES
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
—

- (54) Pavadinimas:

Fenilacetato katabolizmo fermentus koduojančių genų inaktyvavimo būdas, su tuo susijusios plazmidės ir jomis transformuoti kamieniai

- (57) Referatas:

Fenilacetato katabolizmo fermentus koduojančių genų inaktyvavimo būdas, su tuo susiję plazmidės ir jomis transformuoti kamieniai. Būdas pirmiausiai taikomas *A. nidulans* phacA ir *P. chrysogenum* pahA genams, kurie koduoja atitinkamai fermentus, konkuruojančius dėl šio substrato su penicilino biosintezės fermentais. Šių fermentų sintezės nebuvimas turi naudingą efektą šio antibiotiko sintezei, didindamas jo išeigą su mažesniu fenilacetato poreikiu kultūros vienetai.

Fenilacetato katabolizmo fermentus koduojančių genų inaktyvavimo būdas, su tuo susijusios plazmidės ir jomis transformuoti kamieniai

Išradimo sritis

Šis išradimas priklauso genų inžinerijos sričiai ir yra susijęs su naujais DNR junginiais ir rekombinantinėmis DNR molekulėmis, kurios koduoja gaunamą iš filamentinių grybų *Aspergillus nidulans* ir *Penicillium chrysogenum* fermentą, fenilacetato 2-hidroksilazę, su transformuotais kamienais ir jų mutantiniais dariniais bei plazmidėmis, inaktyvuojančiomis šių kamienų geną, susijusį su fenilacetato skaldymu. Peniciliną produkujančių kamienų transformacija aukščiau minėtais DNR junginiais leidžia padidinti šio antibiotiko produkcijos išėigą.

Ankstesnės žinios

Paskutinytis benzilpenicilino (penicilino G) biosintezės kelio žingsnis kai kuriuose filamentiniuose grybuose priklauso nuo izopenicilino N pavirtimo į peniciliną G. To priežastis yra transacilinimo reakcija, kurios metu izopenicilino N L-aminoadipato šoninė grandinė pakeičiama viena iš fenilacto rūgščių. Fermentas, kuris katalizuoja šią reakciją (acil-CoA:izopenicilin-N-transferazė) naudoja aktyvuotą fenilacto rūgštį kofermento A (CoA) tioesterio formoje kaip vieną iš savo substratų.

Penicillium chrysogenum, grybas naudojamas pramoninei penicilino gamybai, ir *Aspergillus nidulans* negali sintetinti fenilacetato. Todėl, norint palengvinti penicilino G biosintezę, būtina į pramonines *P. chrysogenum* kultūras pridėti fenilacetato perteklių. Šis perteklius, trukdantis nepageidaujamai kitų penicilinų su alifatinėmis šoninėmis grandinėmis biosintzei, padidina galutinę fermentacijos proceso kainą.

Dalis fenilacetato, dedamo į penicilino gamybos kultūras, gali būti metabolizuota. Tai yra pilnai nustatytas faktas, kad žymus 2-hidroksifenilacetato

kiekis kaupiamas *P. chrysogenum* fermentacijose. Ši šoninių grandinių pirmtakų frakcija aišku negali prisidėti prie penicilino G biosintezės.

Ir *Aspergillus nidulans*, ir *P. chrysogenum* sintetina peniciliną iš trijų pradinių aminorūgščių per tas pačias fermentines stadijas. Be to, panašiai *P. chrysogenum*, *A. nidulans* paverčia fenilacetato frakciją į 2-hidroksifenilacetatą, jeigu kultūroje yra pirmojo junginio perteklius. Be to, paverčiant fenilacetatą 2-hidroksifenilacetatu, *A. nidulans* taip pat gali katabolizuoti pastarąjį junginį ir iš tikrųjų gali panaudoti fenilacetatą kaip vienintelį anglies šaltinį.

Katabolinis *A. nidulans* kelias pavaizduojamas sekančia schema:

Fenilacetatas

↓ fenilacetato hidroksilazė

2-hidroksifenilacetatas

↓ 2-hidroksifenilacetato hidroksilazė

Homogenizatas

↓ homogenizato dioksigenazė

Maleilacetoacetatas

↓ maleilacetoacetato izomerazė

Fumarilacetoacetatas

↓ fumarilacetoacetato hidrolazė

Fumaratas + acetoacetatas

Fenilacetato orto-hidroksilinimas yra pirmasis žingsnis šiame kelyje. Antroji hidroksilinimo reakcija paverčia 2-hidroksifenilacetatą į 2.5-dihidroksifenilacetatą (= homogenizatą). Homogenizatas skaidomas per fumarilacetoacetatą į fumaratą ir acetoacetatą, kuris įjungiamas į Krebso ciklą (žr. Fernandez Canon y Penalva, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9132-9136, 1995).

Aukščiau minėtų filamentinių grybų sugebėjimas pilnai ar dalinai skaldyti fenilacetatą yra žalinga charakteristika penicilino gamyboje. Dėl šios priežasties ši savybė turi būti pilnai ar dalinai pašalinta kamienuose, produkuojančiuose peniciliną G.

Šios nepageidaujamos charakteristikos pašalinimas (būtent sugebėjimo dalinai ar pilnai skaidyti fenilacetatą) iš peniciliną produkuojančių grybų klasikinės

mutagenezės pagalba reikalautų milžiniškų selekcijos pastangų dideliame kamienų skaičiuje. Priešingu atveju, minėta mutagenezė dažnai sukelia antrines mutacijas, kurios gali pašalinti naudingas pradinių kamienų, produkuojančių, pavyzdžiui, auksotrofines mutacijas ar mutacijas, kurios mažina augimo ar sporų susidarymo intensyvumą, kurios yra lemiamos pramoninėse fermentacijose, savybes. Todėl tikslinga naudoti genų inžinerijos techniką, kuri neturi tokių apribojimų, pašalinant sugebėjimą dalinai ar pilnai skaidyti fenilacetatą. Būtina sąlyga genų inžinerijos kryptingam atlikimui – genų, kurie sukelia aukščiau minėtas nepageidaujamas peniciliną produkuojančių grybų savybes, klonavimas ir charakterizavimas.

Detalus išradimo aprašymas

Šio išradimo tikslas – aukštame lygyje išspręsti aukščiau minėtas problemas. Jame charakterizuojamas grybų genas, kuris koduoja fenilacetato 2-hidroksilazę, fermentą, katalizuojantį *Aspergillus* ir *Penicillium* fenilacetato katabolizmo pirmą fermentinę stadiją, ir jo panaudojimas pašalinti geną, esantį peniciliną produkuojančių grybų genome, rekombinantinės DNR pagalba. Šiame išradime aprašoma, kaip šis genas inaktyvuojamas genų inžinerijos būdu sukonstruotame kamienne. Šis kamienas, negalintis skaidyti fenilacetato, gamina daugiau penicilino, negu pradinis kamienas.. Be to, maksimaliai penicilino gamybai šiame rekombinantiniame kamienne reikalingas mažesnis fenilacetato perteklius, negu naudojamas pradiniame kamienne. Fenilacetato katabolizmo inaktyvavimas, naudojant aukščiau minėtus DNR junginius, žymiai pagerina penicilino gamybą.

A.nidulans 1986 bazių porų (bp) genomo DNR fragmento, turinčio naują geną, naudojamo šiame išradime, nukleotidų seka pavaizduota SEQ ID NO: 1. Genas pavadintas *phacA* (*phac*, nes *phenylacetate*) ir koduoja fermentą, kuris ortohidroksilina fenilacetatą (ši reakcija yra *A. nidulans* fenilacetato katabolizmo pirmoji pakopa). Komplementaraus DNR klono (cDNR), apimančio visą

koduojančią sritį, nukleotidų seka ir jos vėlesnis palyginimas su genominės DNR seka atskleidžia sekančias šio geno charakteristikas:

Genas koduoja 518 aminorūgščių polipeptidą. Pirmasis metioninas yra kodojamas ATG tripleto 82 pozicijoje, tuo tarpu galinis kodonas (TAG) nustatytas 1810 pozicijoje. Šios pozicijos suderintos nukleotidų sekoje, kuri pavaizduota SEQ ID NO: 1.

Koduojanti sritis pertraukta trimis 65, 56 ir 53 nukleotidų ilgio intronais (SEQ ID NO: 1).

Nustatytas 518 grupių polipeptidas parodytas žemiau jo atitinkamų egzonų trijų raidžių aminorūgščių kode SEQ ID NO: 1, bei izoliuotas SEQ ID NO: 2. Nustatyto baltymo molekulinė masė 58,495 g/mol. Paieška, atlikta naudojant Nacionalinio Biotechnologijos Instituto centro viešą priėjimo serverį BLAST baltymų sekų duomenų bazėse (t.y. SwissProt ir PIR) ir DNR sekų duomenų bazių (t.y. GenBank ir EMBL duomenų bazės) schematišką interpretavimą šešiuose galimuose skaitymo rėmeliuose parodė, kad aminorūgščių seka buvo panaši į citochromo P450 šeimos (hemotiolinto baltymo) struktūros elementus. Šie baltymai paprastai dalyvauja oksidaciniuose procesuose. Iš tikrųjų, sekos tarp 431 ir 439 liekanų atitinka peptidą, kuris turi aminorūgštį cisteiną, Gly-X-Gly-X-X-X-Cys-X-Gly (kur X bet kokia aminorūgštis), kuri yra susijusi su hemo grupės, būdingos šiems hemotiolintiems baltymams, surišimu.

Naujas DNR junginys, kurio struktūra detaliai aprašyta SEQ ID NO: 1 ir kuris buvo išskirtas iš natūralaus mikroorganizmo, gali būti pilnai sintezuojamas, naudojant automatinį DNR sintezatorių. Be to, dėka išsigimusios genetinio kodo prigimties, baltymas užkoduotas nauju DNR junginiu, gali būti užkoduotas alternatyvia DNR seka. Tai yra įskaityta ir šiame išradime. Iš kitos pusės, bet kuris natūralus genetinis variantas, kilęs iš naujo DNR junginio, aprašyto aukščiau, yra laikomas ekvivalentišku. Šie genetiniai variantai apima homologinius genus organizmuose, artimai susijusiuose su *A. nidulans* evoliucijos eigoje, tokiuose kaip *P. chrysogenum*. Šie genai gali būti lengvai identifikuoti naudojant DNR junginį iš *A. nidulans* kaip hibridizacijos zondą, kaip aprašyta žemiau.

A. nidulans phacA genas gali būti naudojamas kaip molekulinis zondas, hibridizacijos būdu ieškant funkciškai homologiškų genų kitų grybų rūšių genomines DNR ar cDNR bibliotekose. Tuo būdu, pavyzdžiui, šis išradimas aprašo jo panaudojimą *P. chrysogenum* DNR bibliotekos atrankai, parodant, kad *A. nidulans phacA* genui homologinis genas gali būti išskirtas iš pramoninių *P. chrysogenum* kamienų. *P. chrysogenum* 2558 bp DNR sekos fragmentas, išskirtas hibridizuojant su *phacA* geno zonu, parodytas SEQ ID NO: 3. *P. chrysogenum* genas, homologinis *A. nidulans phacA* genui, buvo pažymėtas *pahA* (phenylacetate hydroxylation). *P. chrysogenum phacA* genas koduoja 516 aminorūgščių polipeptidą, kuris rodo 84% identiškumą *PhacA* aminorūgščių sekai, *A. nidulans phacA* geno produktui. *P. chrysogenum pahA* geno produkto seka parodyta SEQ ID NO: 4. Kaip buvo pažymėta anksčiau, šis naujas DNR junginys, išskirtas iš *P. chrysogenum*, taip pat įtrauktas į šį išradimą, kaip ir kiti homologiniai genai, kurie gali būti išskirti iš kitų grybų rūšių panašiu būdu.

Klonuoti genai gali būti naudojami atvirkštinėje genetikoje sukelti mutacijas, panaikinančias geno funkciją. Šiuo tikslu nauja rekombinantinė molekulė gali būti sukonstruota *Escherichia coli* vektoriuje, turinčiame grybo geno sutrumpintą versiją, kuri gali būti naudojama endogeninio geno inaktyvacijai. Pavyzdžiui, ši rekombinantinė plazmidė gali turėti *A. nidulans phacA* geno 5' sritį, o po jos eina modifikacijos *phacA* geno koduojančioje srityje, kurios glūdi 289 bp *NaeI* – *KpnI* fragmento pakeitime 3,2 kb *XbaI* –fragmentu, turinčiu *A. nidulans argB⁺* geną (žr. Fig. 1). Tada *phacA* geno 3' sritis pasidaro prieinama. Šis mutuotas *phacA* genas turėtų ekspresuoti baltymą, kuris nukirptas ties 297 grupe, ir todėl neturi 221 karboksi-galo dalies. Pastarosios grupės, nesančios mutantiniame baltyme, turi anksčiau minėtą peptidą su Cys grupe, kuri dalyvauja hemo grupės surišime ir yra būtina šio tipo baltymų aktyvumui.

Linijinis DNR fragmentas, turintis aukščiau minėtas sritis, gali būti atitinkamomis restriktazėmis atskirtas nuo vektoriaus sekos ir išvalytas standartiniais metodais. Šis linijinis DNR fragmentas gali būti naudojamas *A. nidulans argB⁺* kamieno transformacijai į arginino prototrofą. Kadangi DNR

naudojama transformacijai neturi sekos, reikalingos autonominei replikacijai, prototrofiniai transformantai yra DNR fragmento integracijos į genomą išdava. Vienas iš galimų integracijos metodų, kuris gali sukelti *argB*⁺ fenotipą per dvigubą sukryžminimą linijinės molekulės ir turimo *phacA* lokuso, esančio grybų genome, parodytas fig. 1. Šio dvigubo sukryžminimo išdavoje originalus *phacA* genas pakeičiamas sutrumpintu, *in vitro* sukurtu genu, sukeliančiu *phacA* funkcijos netekimą. Transformantas, turintis šį pakitimą (t.y. su funkcijos praradimo mutacija) gali būti atpažintas jo hibridizacijos būdu, jeigu jo genomo DNR sukarpoma su tam tikrais restrikcijos fermentais ir analizuojama hibridizuojant Southern metodu, naudojant radioaktyviai ³²P pažymėtus *phacA* arba *argB* genus kaip zondus. Tokiu būdu, kitų tipų transformantų hibridizacijos būdai gali būti lengvai atskirti nuo šio, sutinkamai su geno pakeitimu. Transformantas, kuris neturi geno suteikiamos funkcijos, tolimesniems tikslams gali būti išvalytas naudojant standartinius metodus.

Skirtingai nuo laukinio tipo *A. nidulans* kamieno, transformantai, gauti atvirkštinės genetikos būdu, ir neturintys *phacA* geno funkcijos, negali augti terpėje, kur pagrindinis anglies šaltinis yra fenilacetatas. Tačiau jie gali augti terpėje su 2-hidroksifenilacetatu ir 2,5-dihidroksifenilacetatu. Tai rodo, kad naujas DNR darinys (*A. nidulans phacA* genas) koduoja fermentinį aktyvumą, reikalingą fenilacetato ortohidroksilinimui, t.y. pagrindinei *A. nidulans* fenilacetato naudojimo stadijai. *P. chrysogenum* nenaudoja fenilacetato, kaip pagrindinio anglies šaltinio, bet, kaip parodyta anksčiau, turi geną, koduojantį homologą fermentui. Tokiu būdu, naujas DNR darinys suteikia metodą šalutinio metabolinio pavertimo, kuris gali sumažinti fenilacetato kaupimąsi penicilino biosintezės metu.

Panaši į aprašytąją metodiką gali būti naudojama *P. chrysogenum pahA* geno inaktyvavimui, naudojant naują DNR junginį, įtrauktą į šį išradimą, ir bet kokią transformacijos žymę jau turimą *P. chrysogenum*, pavyzdžiui *trpC* geną. Reikėtų pripažinti, kad gali būti naudojamos naujo DNR junginio koduojančios srities pertraukimui ir kitos transformacijos žymės negu *argB* (*A. nidulans*) arba *trpC* (*P. chrysogenum*). Tai galėtų būti auksotrofinės žymės (pvz., *pyrG* arba

riboB) ir atsparumo antibiotikams genai (pvz., genai, kurie suteikia grybams atsparumą fleomicinui arba higromicinui B). Tokie metodai, pagrindinai ekvivalentiški čia naudojamiems, taip pat yra įtraukti į šį išradimą. Fig. 2 pavaizduotas vienas iš šių metodų, kuris gali būti naudojamas *P. chrysogenum* *pahA* geno pakeitimui. Šiuo atveju, inaktyvacijos konstrukte vidinė *pahA* geno sritis pakeista chimeriniu genu, kur *P. chrysogenum* *gdh* geno (geno, kuris koduoja glutamatdehidrogenazę) promotorius reguliuoja bakterinį *ble^R* geną, kuris suteikia atsparumą antibiotikui fleomicinui. Plazmidė, kuri turi inaktyvuojančią konstrukciją, pavadinta pALP696. Transformantai tokiu būdu gali būti atrenkami pagal jų sugebėjimą augti terpėje, turinčioje fleomicino (Kolar, M., Punt, P.J., van del Hondel, C.A.M.J.J. and Schwab, H. Gene 62: 127-134, 1988).

Be to, gali būti naudojamos ir kitos reversinės genetikos strategijos sukelti funkcijos praradimo mutacijas klonuotame ir charakterizuotame gene. Pavyzdžiui, transformacija žiedine plazmide, turinčia vidinį geno-taikinio fragmentą, po vienos transformanto DNR kopijos homologinės integracijos, yra dviejų nepilnų genų kopijų, neturinčių funkcijos, priežastis, jeigu fragmentas, įjungtas į plazmidę yra tinkamai parinktas. Būdai, kurie naudoja šias ar kitas strategijas funkcijos praradimo mutacijų sukėlimui norimame gene reversinės genetikos pagalba, taip pat įjungti į šį išradimą.

Grybų kamienai, kuriuose buvo pašalinti genai, susiję su fenilacetato modifikacija arba metabolizmu, rodė padidintą penicilino gamybos ypatybę. Nepaisant to, jų sugebėjimas augti peniciliną produkuojančioje terpėje neskiriamas nuo pradinio kamieno sugebėjimo. Pavyzdžiui, *A. nidulans* transformantas su *phacA* geno pakeitimu, aprašytu aukščiau (t.y. neturintis fenilacetato 2-hidroksilazinio aktyvumo), produkuoja 3-8 kartus daugiau penicilino, negu pradinis kamienas ir yra mažiau priklausomas nuo įdedamo fenilacetato (žr. fig. 3). Tokiu būdu, kai fenilacetato koncentracija sumažėja nuo 0,125 % (m/t) iki 0,0625 % (m/t), penicilino išeiga laukiniame kamienne žymiai krenta, o transformantai, netekę *phacA* geno funkcijos, produkuoja daug penicilino, esant abiems fenilacetato koncentracijoms.

Pagaliau, šis išradimas liečia ne tik *phacA* geną ir jo homologus. Mes čia naudojome geną, kuris koduoja fenilacetato 2-hidroksilazę, kadangi šis fermentas katalizuoja pirmą žingsnį fenilacetato metabolizmo kelyje, ir *P. chrysogenum* pramoniniai kamieniai sekretuoja didelius 2-hidroksifenilacetato kiekius. Kiti genai, susiję su fenilacetato metabolizmu, gali būti inaktyvuoti naudojant metodą, panašų į čia aprašytą. Šis išradimas, t.y. kad penicilino išeiga grybuose gali būti pagerinta inaktyvuojant individualius fenilacetato metabolizmo genus reversinės genetikos metodais, taip pat apima šias alternatyvias galimybes.

Pavyzdžiai

1 PAVYZDYS. *A. nidulans phacA* GENO KLONAVIMAS IR CHARAKTERIZAVIMAS

cDNR klonai, atitinkantys *phacA* geną, buvo gauti skirtingai atrenkant iš cDNR bibliotekos, taikant žemiau aprašytas stadijas:

a) Gavimas cDNR populiacijos, atitinkančios transkriptus genų, kurie pirmenybiškai ekspresuojami, kai grybai auga esant fenilacetato (kaip "plius" zondas DNR bibliotekos atrinkimui).

A. nidulans A26 kamienas iš Grybų genetikos kamienų centro kolekcijos (Mikrobiologijos departamentas, Kanzaso universiteto Medicinos centras) buvo auginamas 37 °C temperatūroje atitinkamai praturtintoje minimalioje terpėje, turinčioje (g/l) KPO_4H_2 , 13,6; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 ir 0,3% (m/t) gliukozės, kaip anglies šaltinio. Laikas, kai gliukozė buvo išnaudota, buvo nustatomas analizuojant gliukozės koncentraciją augimo terpėje (naudojant fermentų rinkinius). Tai paprastai būdavo po 18 valandų inkubacijos, pastoviai maišant. Po dviejų valandų į kultūrą buvo įvedamas fenilacetatas iki galutinės koncentracijos 10 mM, ir kultūra maišoma toliau 1 valandą 37 °C temperatūroje siekiant indukuoti nustatytų genų ekspresiją. Po šio laiko tarpo micelis buvo surinktas filtruojant, perplautas vandeniu, užšaldytas skystame azote, liofilizuotas

ir naudojamas suminės RNR išskyrimui. Šis suminės RNR preparatas buvo naudojamas poly(A⁺) mRNR išskyrimui oligo-dT celiuliozės afinine chromatografija. Viengrandė cDNR buvo gaunama naudojant paukščių mieloblastozės viruso atvirkštinę transkriptazę (komercinės kilmės), matrica naudojant 2 µg aukščiau minėtos mRNR, išskirtos iš micelio indukavus fenilacetatu, ir oligo-dT (15-mer) pradmenį. Reakcijos mišinys buvo inkubuojamas 1 valandą 42 °C temperatūroje buferyje, turinčiame 10 mM Tris-HCl, pH8,8 (25 °C), 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP ir 0,5 vieneto RN-azino. Susintetinus pirmą grandinę, RNR matrica buvo pašalinama inkubuojant 1 valandą 60 °C temperatūroje su 3M NaOH. Neutralizavus acto rūgštimi, viengrandė DNR buvo regeneruota išsodinant 2,5 tūrio absoliutaus etanolio 2 valandas –80 °C temperatūroje ir centrifuguojama. Ši cDNR buvo pašalinta su 30-kartiniu pertekliumi poly(A⁺)RNR, išskirtos iš micelio, regenuorant tuo metu, kai gliukozė išnaudota, naudojant būdą, aprašytą Sargent, T.D., Methods Enzymol. 152: 423-432, 1987. Hibridinės cDNR–RNR molekulės buvo atskirtos hidroksiapatito chromatografija 68 °C temperatūroje ir pašalintos. Likusi cDNR buvo hibridizuota įprastai, su poly(A⁺)RNR pertekliumi iš micelio kultūros nesant fenilacetato. Hibridinės cDNR – RNR molekulės buvo pašalintos vėl kaip įprasta, ir susidariusi surinkta viengrandės cDNR populiacija, kurios atstovaujamų genų transkriptai pirmenybiškai ekspresuojami esant fenilacetato. Ši cDNR buvo vienodai pažymėta [α-³²P]dCTP ir visų likusių dNTP pertekliui, naudojant DNR polimerazės Klenovo fragmentą ir atsitiktines nukleotidų sekas kaip pradmenis. Gauta ³²P pažymėta cDNR populiacija (specifinis aktyvumas > 10⁸ ipm/mg) buvo naudojama kaip zondas atrenkant cDNR biblioteką, sukonstruotą kaip aprašyta skyriuje c).

b) Gavimas cDNR zondo, atitinkančio genus, transkribuojamus nesant fenilacetato ("minus" zondas).

Viengrandė cDNR buvo sintetinama ir žymima ^{32}P kaip aprašyta paragrafe a), bet naudojant mRNR iš micelio, kuris kultivuojamas tol, kol augimo terpėje išnaudojama gliukozė, ir dar inkubuojama 1 valandą ilgiau 37 °C temperatūroje nesant fenilacetato.

c) cDNR bibliotekos konstravimas λ gt10 vektoriuje, naudojant cDNR išskirtą iš micelio, auginamo esant 10 mM fenilacetato, kaip vienintelio anglies šaltinio.

Šių cDNR bibliotekų konstravime pirmosios cDNR grandinės sintezės reakcija buvo atliekama kaip aprašyta anksčiau. Išskirtas cDNR–RNR hibridas buvo paverstas į dvigrandę cDNR, įvedant į RNR grandinę su RN-aze H atsitiktinius trūkius, kurie buvo naudojami kaip pradiniai taškai *Escherichia coli* DNR polimerazei I. Prie šio cDNR bukų galų preparato norint pridėti *EcoRI* galus, sintetiniai adaptorai, kurie turi buką fosforilintą galą ir *EcoRI* išsikišusį (“lipnų”) galą, ir dvigrandė DNR buvo inkubuojama su T4 ligaze. cDNR su *EcoRI* galu po to buvo išgrynintos ir fosforilintos, naudojant T4 polinukleotidkinazę ir ATP. Fosforilinta cDNR buvo sumaišyta su λ gt10 vektoriumi, kuris prieš tai buvo sukarpytas su *EcoRI* ir defosforilintas, ir mišinys inkubuojamas su T4 DNR ligaze. Rekombinantinės DNR molekulės supakuotos *in vitro*, naudojant komercinius pokavimo ekstraktus. Rekombinantiniai fagai, kuriuose cDNR tarpai inaktyvavo *cl* geną (kuriuose yra *EcoRI* kirpimo vieta) buvo atrinkti pagal jų lyzės fenotipą *E. coli* hf1 kamieno (*F*-, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, *hflA150*, [chr::Tn10]).

d) cDNR bibliotekų atrinkimas.

cDNR bibliotekos buvo išsėtos ant *E. coli* C600 kamieno ir susidarę lyzės dėmės buvo perkeltos dviem egzemplioriais ant nitroceliuliozės filtrų. Viena iš kopijų buvo hibridizuota su “plius” cDNR zonu (aprašyta a)), o antroji kopija buvo hibridizuota su “minus” cDNR zonu (aprašyta b)). Klonai, kurie hibridizavosi su “plius” zonu ir nesihibridizavo su “minus” zonu, buvo atrinkti ir išgryninti.

e) cDNR, atitinkančios *phacA* geną, identifikavimas.

cDNR intarpas buvo iškirptas iš vektoriaus, veikiant endonukleaze *NotI*, naudojant *NotI* kirpimo vietas, esančias adaptoriuje. Atrinktų klonų intarpai buvo perklonuoti į pBluescript SK(+) plazmidę, sukarpyti su *NotI* ir po to sekvenuoti standartiniais metodais. cDNR intarpų sekos buvo schematiškai interpretuotos šešiuose skaitymo rėmeliuose ir sulygintos naudojant algoritmą BLAST su schematiniu (abstrakčiu) interpretavimu šešiuose skaitymo rėmeliuose viešai prieinamų DNR sekų duomenų bankų GenBank ir EMBL arba su baltymų sekų duomenų bazėmis SwissProt ir PIR. Viena iš cDNR intarpo sekų duoda ekstensyvų atvirą skaitymo rėmelį, nepertraukiamą terminacijos kodonais. Išvestoji aminorūgščių seka rodo žymų tapatumą su citochromo P450 šeimos baltymų, kurie paprastai susiję su oksidacijos reakcijomis, aminorūgščių sekomis. Kaip bus parodyta vėliau (žr. 3 pavyzdį), atviras skaitymo rėmelis koduoja fenilacetato 2-hidroksilazę. Šis cDNR intarpas buvo panaudotas hibridizacijos būdu gauti naujus cDNR klonus, atitinkančius šį geną. Šie klonai buvo sekvenuoti nuo abiejų grandinių ir gauta 1554 bp nukleotidų seka, pavaizduota atviru skaitymo rėmeliu, kuris koduoja 518 aminorūgščių polipeptidą (SEQ ID NO: 2). Šios sekos identiškumas su citochromo P450 šeimos baltymais neabejotinai įrodo, kad šis nustatytas baltymas atstovauja naują šios šeimos narį.

f) *phacA* geno klonavimas.

A.nidulans DNR genomo biblioteka, sukonstruota λEMBL4 vektoriuje, buvo atrenkama su ³²P žymėtu cDNR zonu, atitinkančiu beveik pilną transkriptą. Teigiami klonai buvo išvalyti ir jų intarpai charakterizuoti pagal skaidymą restrikcijos fermentais ir hibridizaciją aukščiau minėtu zonu. Tokiu būdu buvo pažymėta dviejų gretimų 2,4 ir 1,9 kb ilgio *BamHI* fragmentų hibridizacijos zona. Fig. 4 parodytas genomo srities, turinčios šiuos fragmentus, restrikcijos žemėlapis. Šie *BamHI* fragmentai buvo perklonuoti į pBluescript SK (+).

Rekombinantinė plazmidė, turinti 2,4 kb *BamHI* fragmentą, pavadinta pBS-FG4A, o plazmidė, turinti 1,9 kb *BamHI* fragmentą, pavadinta pBS-FG4B.

2 PAVYZDYS. *P. chrysogenum pahA* GENO, KURIS YRA FUNKCIŠKAI HOMOLOGIŠKAS *A. nidulans phacA* GENUI, KLONAVIMAS IR CHARAKTERIZAVIMAS.

a) *P. chrysogenum pahA* geno klonavimas ir jo nukleotidų sekos nustatymas.

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 genomo biblioteka, sukonstruota dalinius *Sau3A* fragmentus klonavus į λ EMBL4 *BamHI* kirpimo vietą, buvo atrenkama su radioaktyviai žymėtu (^{32}P) cDNR zondų, atitinkančiu beveik pilną *phacA* geną. Naudojant standartines technikas, maždaug 12 000 klonų buvo perkelta ant celiuliozės filtrų. Po to jie buvo 24 valandas hibridizuoti 37°C buferyje, turinčiame 50 % formamido, 5 × Denhard tirpalo, 5 × SSC, 0,1 % SDS, 50 μM/ml ultragarsintos silkių spermos viengrandės DNR ir 50 ng žymėto zondo. Galutinis hibridizuotų filtrų plovimas buvo atliekamas 0,2 × SSC ir 0,1 % SDS 37°C temperatūroje. Šiuo būdu buvo išvalyta dešimt klonų ir išskirta jų DNR. Šių klonų tarpai po to buvo charakterizuoti karpant restrikcijos fermentais ir hibridizuojant su anksčiau minėtu zondų. Hibridizacijos sritis buvo lokalizuota 2,55 kb *XhoI* fragmente, kurio restrikcijos žemėlapis parodytas fig. 5. Šis DNR fragmentas buvo perklonuotas į plazmidę pBluescript SK(+), gaunant plazmidę pALP520. *XhoI* fragmento, turinčio *pahA* geną, nukleotidų seka (fig. 5) buvo nustatyta didezoksinukleotidų metodu (Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463-5467).

b) *P. chrysogenum* cDNR bibliotekos iš išvalytos RNR konstravimas, esant penicilino gamybos sąlygoms. cDNR, atitinkančios *pahA* geną, charakterizavimas.

Micelis iš pramoninio *P. chrysogenum* kamieno fermentatoriaus kultūros, augančios penicilino gamybos sąlygomis, buvo surinktas po 100, 124 ir 148 valandų inkubacijos ir naudojamas išskirti poly(A⁺) mRNR, naudojant Poly (A) Quick mRNR Kit (Stratagene). Ši poly(A⁺) mRNR buvo naudojama kaip matrica konstruojant cDNR biblioteką, naudojant Zap-cDNR Synthesis Kit (Stratagene), sutinkamai su gamintojo instrukcijomis. Dvigrandė cDNR buvo įterpta į vektoriaus λ ZAP *EcoRI* ir *XhoI* kirpimo vietas, transkripto 5' galui esant *EcoRI* kirpimo vietos pusėje. cDNR biblioteka buvo supakuota naudojant Gigapack II Gold pokavimo ekstraktą (Stratagene), pagaminant apie 10⁶ nepriklausomų klonų.

Šios cDNR bibliotekos atrinkimas buvo vykdomas standartiniais metodais (Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), naudojant 1174 bp *EcoRV* fragmentą su *pahA* genu kaip zondą (fig. 5). Šiuo būdu buvo išskirta dvylika teigiamų rekombinantinių klonų (pavadinti #1 iki #12) ir klonas su didžiausiu intarpu (maždaug 1600 bp) buvo atrinktas charakterizavimui. Buvo nustatyta šio klono pilna nukleotidų seka. Pastebėta, kad ji turi 1548 bp atvirą skaitymo rėmelį (ORF), kuris koduoja 516 aminorūgščių polipeptidą, turintį 58112 Da molekulinę masę ir 84 % aminorūgščių sekos identiškumą su *A. nidulans phacA* geno koduojamu baltymu. Kaip ir homologinio *A. nidulans* geno atveju, duomenų bazės tyrimas parodė žymų identiškumą tarp *PahA* baltymo ir P450 baltymų šeimos narių. *PahA* baltymas turi seką Gly-X-Gly-X-X-X-Cys-X-Gly (liekanos 430-438, SEQ ID NO: 4), kuri charakterizuoja šį baltymų tipą (žiūrėti detalų šio išradimo aprašymą). Iš šių rezultatų daroma išvada, kad *P. chrysogenum pahA* genas yra homologinis *A. nidulans phacA* genui.

3 PAVYZDYS. *A. nidulans phacA* GENO INAKTYVAVIMAS REVERSINE GENETIKA

A. nidulans phacA geno laukinis alelis buvo pakeistas mutantiniu aleliu, kuriame dalis koduojančios srities, matyt esminės jos funkcijai (liekanos 298-392

sekoje SEQ ID NO:1), buvo supresuota, pakeičiant *argB*⁺ genu. Tokiu būdu ši genetinė manipuliacija nukirpo *phacA* geną ties 297 kodonu, pagamindama nulinį mutantinį alelį.

Be to iš plazmidės pBS-FG4B (fig. 4) buvi išskirtas *KpnI-EcoRI* fragmentas ir perklonuotas į pUC18, sukarpytą šiais dviem fermentais, gaunant plazmidę pUCB. Po to iš plazmidės pBS-FG4A (fig. 4) buvo išskirtas 1,9 kb *NaeI* fragmentas ir klonuotas į pBluescript SK(+), sukarpytą *SmaI*. Buvo atrinkta plazmidė, kurioje nepilno *phacA* geno (prasidedančio nuo *NaeI* kirpimo vietos) koduojanti grandinė buvo rasta toje pačioje orientacijoje, kaip genas, koduojantis β-galaktozidazę vektoriuje. Ši plazmidė pavadinta pBSA. Iš pBSA išskirtas *XbaI-HindIII* DNR fragmentas, įstatytas į pUCB, sukarpytą *XbaI-HindIII*, gaunant plazmidę pUCA-B. Galiausiai, 3,2 kb DNR fragmentas, turintis *A. nidulans argB*⁺ geną, buvo įterptas pUCA-B *XbaI* kirpimo vietoje, gaunant *phacA::argB*⁺. Pradedant nuo pUC18 *lacZ* promotoriaus, *phacA::argB* turi 0,94 kb *phacA* geno 5' srities fragmentą, einantį nuosekliai ties pirmais 297 jo genomo sekos kodonais, 3,2 kb fragmentą, turintį *argB* geną, *phacA* geno genomo seką, atitinkančią 393-518 kodonus, ir 1,2 kb *phacA* geno 3' srities. Linijinis fragmentas, turintis visas šias sritis, gali būti išskirtas iš plazmidės, kerpant ją *EcoRI* (fig. 6).

Taip pat transformacija gali būti naudojama konstruoti *A. nidulans* kamieną, kuris turi *phacA* gene skaldymo-delecijos mutaciją, naudojant šį linijinį fragmentą ir taikant apibenrintą strategiją, aprašytą aukščiau. Šiuo tikslu *A. nidulans biA1*, *methG1*, *argB2* kamienų protoplastai buvo transformuoti 2 μg šio DNR fragmento pagal Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. ir Daves, R.W.(1983) Gene 26: 205-211. Transformantai buvo atrinkti pagal arginino prototrofiškumą, naudojant tinkamą selektyvią terpę ir po to išvalyti. DNR buvo išskirta iš atitinkamos transformatų serijos micelio, sukarpyta su *PstI* ir analizuota Sauthern'o hibridizacijos būdu, naudojant specifinius *phacA* ir *argB* genų zondus. Transformantų, kurie rodė hibridizaciją ir iš kurių buvo tikimasi sėkmingo dvigubo susikryžminimo, skaičius parodytas fig.1. Pavyzdžiui, naudojant zondų *phacA* geno 0,9 kb *PstI* fragmentą (žr. fig. 4),

surasta, kad atskira 0.9 kb hibridizacijos grupė receptoriaus kamienne gali būti pakeista 3,8 kb grupe transformantuose, kurių atskleistas integracijos tipas parodytas fig. 1. Ši grupė taip pat hibridizuojasi su *argB* zonu. Du iš šių transformantų buvo atrinkti vėlesniam charakterizavimui ir pavadinti Δ *phacA* #1 ir Δ *phacA* #2. Šie transformuoti kamienai galėjo augti terpėse su fenilalaninu, 2-hidroksifenilacetatu arba 2,5-dihidroksifenilacetatu kaip vieninteliu anglies šaltiniu, bet priešingai jie negalėjo augti terpėje su fenilacetatu, kaip anglies šaltiniu. Tai parėmė išvadą, kad fermentas citochromas P450, koduojamas *A. nidulans phacA* geno (arba koduojamas *P. chrysogenum pahA* geno), turi aktyvumą, kuris hidroksilina fenilacetatą iki 2-hidroksifenilacetato, šis aktyvumas katalizuoja *A. nidulans* fenilacetato panaudojimo kelio pirmą pakopą (žr. Ankstesnės žinios). *A. nidulans* Δ *phacA* #1 kamienas, kuris fenotipiškai neatskiriamas nuo Δ *phacA* #2 kamieno 1996 m. birželio 19 d. buvo atiduotas saugoti į Spanish Collection of Type Cultures (CECT), University of Valencia, Research Building, Burjassot Campus, 46100, Valencia, kaip *A. nidulans biA1 veA1 methG1 argB2 phacA :: [pPhacA :: argB⁺]* su registracijos numeriu CECT 20195. *P. chrysogenum* transformantų su inaktyvuotu *pahA* genu išskyrimas yra labai aiškus kvalifikuotam šios srities specialistui. *P. chrysogenum pahA* geno išskyrimas yra paprastas hibridizuojant su *A. nidulans phacA* genu, esančiu transformantų CECT 20195 arba pasirinktinai hibridizuojant su sintetiniais oligonukleotidais, esančiais SEQ ID NO: 1. Vėliau, naudojant plazmidę pALfleo7 (1997 m. vasario 20 d. atiduotą saugoti į Spanish Collection of Type Cultures (CECT), University of Valencia su registracijos numeriu CECT 4849), buvo sukonstruota plazmidė pALP696, kaip parodyta šio patento fig. 7.

4 PAVYZDYS. BANDYMAS INAKTYVUOTI *phacA* GENO FUNKCIJĄ IR PADIDINTI PENICILINO IŠEIGĄ.

Norint nustatyti kas pagerina penicilino išėigą, reikia pašalinus geno *phacA* koduojamą fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą eksperimentiškai išmatuoti Δ

phacA kamieno produkuojamą penicilino lygį ir palyginti jį su kamieno *phac*⁺. Abu kamienai buvo palyginti pagal fermentaciją kolbose minimalioje terpėje, turinčioje 2,5 % (m/t) laktozės, kaip svarbiausias anglies šaltinis ir 2,5 % (m/t) grūdų ekstrakto agaro, su skirtingais kiekiais natrio fenilacetato (m/t) kaip pažymėta. Kultūros buvo inokuliuojamos lygiu skaičiumi gyvų konidiosporų (2×10^6 /ml) ir inkubuojama 37° C temperatūroje su sukamuoju maišymu (250 aps/min.). Mėginiai buvo imami skirtingu laiku, filtruojami per Miracloth, ir supernatantai buvo naudojami matuoti biopavyzdyje produkuotam penicilinui.

Biomėginiams 1ml *Micrococcus luteus* kultūros auginama iki OD₆₀₀ = 6, sumaišyta su 1l terpės Antibiotic No. 1 (Difco) 50 °C. Šis mišinys buvo išpilstytas į 13,6 cm Petri lėkšteles (65 ml/lėkšt.). 100 µl mėginiai su atitinkamu supernatantu iš kultūros (tinkamai praskiesti 10 mM natrio fosfato buferiu, pH 6,8) buvo sudėti į 8 mm diametro indelius. Pripildytos lėkštelės buvo inkubuojamos 2 valandas 4 °C temperatūroje ir toliau 22 valandas 37 °C temperatūroje. Po to, buvo išmatuotos bakterijų augimo inhibicijos zonos, susidariusios dėl penicilino buvimo pavyzdžiuose, ir nustatomas antibiotiko kiekis palyginant su kalibracine tiese, gauta su skirtingais penicilino G kalio kiekiais.

Fig. 3 rodo, kad aukščiausias penicilino lygis, atitinkantis kontrolinį kamieną *phacA*⁺, buvo išskirtas po 24 valandų, naudojant 0,125 % fenilacetato auginimo terpėje. Išeiga, pasiekta per šį laiką, buvo 1,8 µg/ml penicilino. Sumažinus fenilacetato koncentraciją, sumažėja maksimalus šio kamieno produkuojamas penicilino lygis iki 1,1 µg/ml.

Fig. 3 taip pat rodo žymų skirtumą tarp aukščiausio penicilino lygio Δ *phacA* kamieno kultūroje, kuris siekia 5,6 µg/ml, t.y. 3,1 karto aukštesnis negu pradiniam kamienė. Be to, kaip *phacA* geno inaktyvavimo rezultatas, penicilino produkcijos padidėjimas nebuvo veikiamas pradinės fenilacetato koncentracijos sumažėjimo iki 0,0625 %.

Daroma išvada, kad skilimo-delecijos mutacija *phacA* gene, koduojančiame fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą, gaunama reversinės

genetikos technika, kaip parodyta fig. 1, turi mažiausiai du pritaikymus penicilino gamyboje iš *A. nidulans* : (I) penicilino lygis yra žymiai padidėjęs ir (II) penicilino gamyba mažiau priklauso nuo išorinio fenilacetato tiekimo.

Detalus figūrų aprašymas

Fig. 1: Strategija, naudojama skilimo-delecijos mutacijos įvedimui į *A. nidulans* *phacA* geną homologinės rekombinacijos būdu. Tiriamas sukryžminimas parodytas dideliais paryškintais kryžiais.

Fig. 2: Strategija, naudojama skilimo-delecijos mutacijos įvedimui į *P. chrysogenum* *pahA* geną homologinės rekombinacijos būdu. Tiriamas sukryžminimas parodytas dideliais punktyrinėmis linijomis kryžiais.

Fig. 3: Penicilino išeiga *A. nidulans* transformuotame kamienne *phacA::argB* palyginus su laukinio tipo kamieniu (*phacA*⁺). Abscisių ašyje: laikas valandomis (h); ordinačių: penicilino išeiga (μg/ml). Ištinė linija: fenilacetato koncentracija 0,125 %; punktyrinė linija: fenilacetato koncentracija 0,0625 %.

Fig. 4: *A. nidulans* genomo srities, turinčios *phacA* geną, restrikcinis žemėlapis, rodantis fragmentus, kurie buvo perklonuoti sukuriant plazmidę pFG4A ir pFG4B. Tamsi zona yra 3 intronai.

Fig. 5: *P. chrysogenum* genomo srities, turinčios *pahA* geną, restrikcinis žemėlapis, rodantis 2,55 kb *XhoI* fragmentą, kuris buvo perklonuotas sukuriant plazmidę pALP520. Tamsi zona yra 3 intronai.

Fig. 6: pPhacA :: *argB*⁺ inaktyvacijos konstrukto *argB* restrikcinis žemėlapis ir svarbios charakteristikos. Tamsi zona yra sekos sritis, turinti *phacA* geną; šviesi zona – šoninės zonos prieš ir už *phacA* geno; dryžuota zona yra *argB*⁺ sritis.

Fig. 7: pALP696 inaktyvacijos konstrukto restrikcinis žemėlapis ir svarbios charakteristikos. Tamsi zona yra sekos sritis, turinti *pahA* geną, (1745 bp); balta sritis – šoninės zonos prieš ir už *pahA* geno (4143 bp); dryžuota zona yra *ble*^R geno fleomicino rezistentiškumo sritis (2048 bp).

135

SEKŲ SĄRAŠAS

PAGRINDINĖ INFORMACIJA:

PAREIŠKĖJAS:

PAVADINIMAS: ANTIBIOTICOS S.A.U.

GATVĖ: Avda. de Burgos, 8 –A

MIESTAS: Madridas

VALSTIJA ARBA PROVINCIJA: Madridas

ŠALIS: Ispanija

PAŠTO KODAS: 28036

TELEFONAS: 91-3841200

FAKSAS: 91-3841220

PAVADINIMAS: "FENILACETATO KATABOLIZMO FERMENTUS
KODUOJANČIŲ GENŲ INAKTYVAVIMO BŪDAS, SU TUO
SUSIJĘ PLAZMIDĖS IR JOMIS TRANSFORMUOTI
KAMIENAI"

SEKŲ SKAIČIUS: 4

KORESPONDENCIJOS ADRESAS:

ADRESAS: ANTIBIOTICS, S.A.U.

GATVĖ: Avda. de Burgos, 8 –A

MIESTAS: Madridas

VALSTIJA ARBA PROVINCIJA: Madridas

ŠALIS: Ispanija

PAŠTO KODAS: 28036

KOMPIUTERIU NUSKAITOMA FORMA:

LAIKMENOS TIPAS: 3,5 colio diskelis

KOMPIUTERIS: PC

OPERACINĖ SISTEMA: WINDOWS

PROGRAMINĖ ĮRANGA: WORD

INFORMACIJA APIE JURISTĄ/AGENTĄ:

PAVARDĖ: ALBERTO DE ELZABURU

REGISTRACIJOS NUMERIS: 232/1

INFORMACIJOS/REGISTRACIJOS NUMERIS: PTC-42

TELEKOMUNIKACINĖ INFORMACIJA:

TELEFONAS: 91 7009400

FAKSAS: 91 3193810

TELEKSAS ARBA ELEKTRONINIS PAŠTAS: elzaburu@elzaburu.es

INFORMACIJA SEQ ID NO: 1

SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

ILGIS: 1986 bazių poros

TIPAS: nukleotidai

VIJIŠKUMAS: 2

KONFIGŪRACIJA: linijinė

MOLEKULIŲ TIPAS: genominė DNR

HIPOTETIŠKUMAS: NĖRA

ANTISENSIŠKUMAS: NĖRA

ORIGINALUS ŠALTINIS: *Aspergillus nidulans*TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidė pPhacA::argB⁺

PADĖTIS GENOME: nežinoma

CHARAKTERISTIKOS:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti sritis

VIETA: 82...1810

KITA INFORMACIJA: phacA genas

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO: 1

```

CCTTAGACGA CTTGATCTTA CTCTGGTTTC TAAAAGTTCA CTGATTATCG CAAGGTATCC 81
ATG TCT CTT CAA ACA ATC GGG ATC GCC GCT GTC GCG GTG GTC TAT TTT 129
Met Ser Leu Gln Thr Ile Gly Ile Ala Ala Val Ala Val Val Tyr Phe
5 10 15
CTC ATC CGC TAC TTC AAC CGC ACA GAC ATC CCA AAG ATC AAG GGT CTC 177
Leu Ile Arg Tyr Phe Asn Arg Thr Asp Ile Pro Lys Ile Lys Gly Leu
20 25 30
CCT GAA GTT CCA GGC GTA CCG ATC TTT GGC AAC CTC ATC CAG CTC GGT 225
Pro Glu Val Pro Gly Val Pro Ile Phe Gly Asn Leu Ile Gln Leu Gly
35 40 45
GAC CAG CAC GCG ACC GTA GCG CAG AAA TGG GCG AAG AAA TTT GGA CCT 273
Asp Gln His Ala Thr Val Ala Gln Lys Trp Ala Lys Lys Phe Gly Pro
50 55 60
GTT TTC CAG GTT CGC ATG GGG AAT AAA GTGAGTTCRG TGTCTGCATT TGTAAC 326
Val Phe Gln Val Arg Met Gly Asn Lys
65 70
AGAC GACAATATTG CGAGAATAAT TCTGACCTAA CACAG CGC GTT GTC TTC GCA 380
Arg Val Val Phe Ala
75
AAC ACC TTC GAC TCT GTC CGT CAG CTA TGG ATC AAA GAT CAG TCC GCG 428
Asn Thr Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys Asp Gln Ser Ala
80 85 90
CTC ATC TCC CGG CCG ACC TTT CAC ACC TTC CAC AGT GTA GTT TCC AGC 476
Leu Ile Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His Ser Val Val Ser Ser
95 100 105 110
TCT CAG GGA TTC ACC ATC GGA ACG TCG CCG GAC GAG TCG TGC AAG 524
Ser Gln Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro Trp Asp Glu Ser Cys Lys
115 120 125
CGT CGT CGG AAG GCT GCA GCT ACA GCC TTG AAC CGC CCG GCT ACC CAG 572
Arg Arg Arg Lys Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asn Arg Pro Ala Thr Gln
130 135 140
TCG TAT ATG CCT ATT ATC GAT CTT GAG TCG ATG TCG AGT ATC CGG GAA 620
Ser Tyr Met Pro Ile Ile Asp Leu Glu Ser Met Ser Ser Ile Arg Glu
145 150 155
TTG CTC AGG GAT AGC GCG AAT GGA ACA ATG GAT ATC AAC CCG ACA GCG 668
Leu Leu Arg Asp Ser Ala Asn Gly Thr Met Asp Ile Asn Pro Thr Ala
160 165 170
TAC TTC CAG CGG TTC GCG TTG AAC ACG AGC TTA ACA TTG AAC TAT GGA 716
Tyr Phe Gln Arg Phe Ala Leu Asn Thr Ser Leu Thr Leu Asn Tyr Gly
175 180 185 190
ATC CGA ATC GAG GGC AAT GTG AAC GAT GAG CTT TTG CGC GAA ATT GTC 764
Ile Arg Ile Glu Gly Asn Val Asn Asp Glu Leu Leu Arg Glu Ile Val
195 200 205
GAT GTC GAG CGC GGG GTG TCG AAC TTC CGG AGT ACC AGC AAC CAG TGG 812
Asp Val Glu Arg Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Gln Trp
210 215 220

```

CAG	GAC	TAT	ATC	CCG	CTC	CTG	AGA	ATC	TTC	CCG	AAG	ATG	AAC	CGC	GAG	860
Gln	Asp	Tyr	Ile	Pro	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Pro	Lys	Met	Asn	Arg	Glu	
	225						230					235				
GCT	GAG	GAG	TTC	CGG	GTG	CGG	AGA	GAC	AAG	TAT	CTT	ACC	TAT	CTT	TTG	908
Ala	Glu	Glu	Phe	Arg	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Leu	
	240					245					250					
GAT	GTT	CTC	AAG	GAT	CGC	ATT	GCA	AAG	GGA	ACC	GAC	AAG	CCC	TGT	ATT	956
Asp	Val	Leu	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Lys	Gly	Thr	Asp	Lys	Pro	Cys	Ile	
255				260					265					270		
ACT	GGA	AAC	ATC	CTC	AAA	GAC	CCT	GAG	GCT	AAG	CTC	AAT	GAT	G	GTATG	1004
Thr	Gly	Asn	Ile	Leu	Lys	Asp	Pro	Glu	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp			
			275					280								
CCGTC	CGGTCCTGTC	CGCGCTTGAA	GGAAAATAAA	GATTAACAGA	GTCTAG	CC	GAG									1060
							Ala	Glu								
							285									
ATT	AAA	TCG	ATC	TGC	TTG	ACC	ATG	GTC	TCC	GCC	GGC	CTC	GAT	ACT	GTT	1108
Ile	Lys	Ser	Ile	Cys	Leu	Thr	Met	Val	Ser	Ala	Gly	Leu	Asp	Thr	Val	
			290					295					300			
CCG	GGC	AAC	TTG	ATC	ATG	GGC	ATC	GCG	TAC	CTC	GCC	TCC	GAA	GAC	GGC	1156
Pro	Gly	Asn	Leu	Ile	Met	Gly	Ile	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Gly	
		305					310					315				
CAA	AGG	ATC	CAG	AAG	CGC	GCC	CAC	GAC	GAG	ATC	ATG	AAA	GTC	TAC	CCG	1204
Gln	Arg	Ile	Gln	Lys	Arg	Ala	His	Asp	Glu	Ile	Met	Lys	Val	Tyr	Pro	
	320					325					330					
GAC	GGC	GAT	GCA	TGG	GAG	AAA	TGC	CTG	CTC	GAA	GAG	AAA	GTC	CCC	TAC	1252
Asp	Gly	Asp	Ala	Trp	Glu	Lys	Cys	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Pro	Tyr	
335				340						345				350		
GTC	ACA	GCT	TTG	GTC	AAA	GAA	ACC	CTC	CGC	TTC	TGG	ACT	GTC	ATT	CCC	1300
Val	Thr	Ala	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Phe	Trp	Thr	Val	Ile	Pro	
			355					360					365			
ATC	TGT	CTG	CCT	AGA	GAA	AAC	ACC	AAG	GAT	ATT	GTC	TGG	AAC	GGA	GCC	1348
Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Glu	Asn	Thr	Lys	Asp	Ile	Val	Trp	Asn	Gly	Ala	
		370						375					380			
GTT	ATC	CCT	AAG	GGA	ACG	ACC	TTT	TTC	ATG	AAC	GCC	TAC	GCT	GCA	GAC	1396
Val	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Thr	Phe	Phe	Met	Asn	Ala	Tyr	Ala	Ala	Asp	
		385					390					395				
TAC	GAC	GAA	ACA	CAC	TTC	ACC	AAT	CCA	CAC	GCC	TTT	GAA	CCA	GAA	CGC	1444
Tyr	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Thr	Asn	Pro	His	Ala	Phe	Glu	Pro	Glu	Arg	
	400					405					410					
TAC	CTC	ACC	GCC	TCA	TCT	GAC	GGC	TCC	GGC	ACT	CCA	CAC	TAC	GGC	TAC	1492
Tyr	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Pro	His	Tyr	Gly	Tyr	
415					420				425				430			
GGC	GCG	GGC	TCG	CGC	ATG	GTACCTCCCC	CACAACCCAC	ATGTTATATA	GACAAT							1546
Gly	Ile	Gly	Ser	Arg	Met											
			435													
ACTG	ATTTATTATG	AAG	TGC	GCT	GGC	TCG	CAT	CTT	GCG	AAC	CGC	GAG	CTC			1596
			Cys	Ala	Gly	Ser	His	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu			
						440					445					
TTC	ACC	GCT	TAC	GTC	CGT	CTG	ATC	ACA	GCA	TTT	ACC	ATG	CAT	CCA	GCT	1644
Phe	Thr	Ala	Tyr	Val	Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	Thr	Met	His	Pro	Ala	
		450					455					460				
AAG	AGG	GCT	GAG	GAT	CGG	CCG	ATC	CTC	GAT	GCG	ATT	GAG	TGT	AAT	GCG	1692
Lys	Arg	Ala	Glu	Asp	Arg	Pro	Ile	Leu	Asp	Ala	Ile	Glu	Cys	Asn	Ala	
	465					470					475					
ATC	CCG	ACC	GCT	TTG	ACG	ACG	GAG	CCG	AAG	CCC	TTC	AAG	GTT	GGG	TTT	1740
Ile	Pro	Thr	Ala	Leu	Thr	Thr	Glu	Pro	Lys	Pro	Phe	Lys	Val	Gly	Phe	
480					485					490					495	

AAA CCG AGA GAT CCT GTC TTG GTA AGG AAA TGG ATT GCG GAG AGT GAG 1788
 Lys Pro Arg Asp Pro Val Leu Val Arg Lys Trp Ile Ala Glu Ser Glu
 500 505 510
 GAG AGG ACG AAG CAC CTG AAT TAGTTTTTCT TTTCTTTCTT GCGTGCAAGT TAC 1842
 Glu Arg Thr Lys His Leu Asn
 515
 AGCGCAATTT ATACTTAGCT GGGACATGGT CGATTGGAGT ATACTGATTT CAGCAACAGC 1902
 GCAAATAAAA ATAAGGCAAC CAATAGAAAT GCAACAATAT GCAATCTCCC AAGACCATTA 1962
 AATGGTTGAT CAGATGATCC CAAG 1986

INFORMACIJA SEQ ID NO: 2

SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

ILGIS: 518 amino rūgščių

VIJŠKUMAS: 1

KONFIGŪRACIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

ORIGINALUS ŠALTINIS; *Aspergillus nidulans*

CHARAKTERISTIKOS;

KITA INFORMACIJA: fermento fenilacetato 2-hidroksilazės amino rūgščių seka

CHARAKTERISTIKOS:

KITA INFORMACIJA: Molekulinis svoris 58495 Da.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO: 2

Met Ser Leu Gln Thr Ile Gly Ile Ala Ala Val Ala Val Val Tyr
 5 10 15
 Phe Leu Ile Arg Tyr Phe Asn Arg Thr Asp Ile Pro Lys Ile Lys
 20 25 30
 Gly Leu Pro Glu Val Pro Gly Val Pro Ile Phe Gly Asn Leu Ile
 35 40 45
 Gln Leu Gly Asp Gln His Ala Thr Val Ala Gln Lys Trp Ala Lys
 50 55 60
 Lys Phe Gly Pro Val Phe Gln Val Arg Met Gly Asn Lys Arg Val
 65 70 75
 Val Phe Ala Asn Thr Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys
 80 85 90
 Asp Gln Ser Ala Leu Ile Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His
 95 100 105
 Ser Val Val Ser Ser Ser Gln Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro
 110 115 120
 Trp Asp Glu Ser Cys Lys Arg Arg Arg Lys Ala Ala Ala Thr Ala

	125		130		135
Leu Asn Arg Pro	Ala Thr Gln Ser Tyr	Met Pro Ile Ile Asp	Leu		
	140		145		150
Glu Ser Met Ser	Ser Ile Arg Glu Leu	Leu Arg Asp Ser Ala	Asn		
	155		160		165
Gly Thr Met Asp	Ile Asn Pro Thr Ala	Tyr Phe Gln Arg Phe	Ala		
	170		175		180
Leu Asn Thr Ser	Leu Thr Leu Asn Tyr	Gly Ile Arg Ile Glu	Gly		
	185		190		195
Asn Val Asn Asp	Glu Leu Leu Arg Glu	Ile Val Asp Val Glu	Arg		
	200		205		210
Gly Val Ser Asn	Phe Arg Ser Thr Ser	Asn Gln Trp Gln Asp	Tyr		
	215		220		225
Ile Pro Leu Leu	Arg Ile Phe Pro Lys	Met Asn Arg Glu Ala	Glu		
	230		235		240
Glu Phe Arg Val	Arg Arg Asp Lys Tyr	Leu Thr Tyr Leu Leu	Asp		
	245		250		255
Val Leu Lys Asp	Arg Ile Ala Lys Gly	Thr Asp Lys Pro Cys	Ile		
	260		265		270
Thr Gly Asn Ile	Leu Lys Asp Pro Glu	Ala Lys Leu Asn Asp	Ala		
	275		280		285
Glu Ile Lys Ser	Ile Cys Leu Thr Met	Val Ser Ala Gly Leu	Asp		
	290		295		300
Thr Val Pro Gly	Asn Leu Ile Met Gly	Ile Ala Tyr Leu Ala	Ser		
	305		310		315
Glu Asp Gly Gln	Arg Ile Gln Lys Arg	Ala His Asp Glu Ile	Met		
	320		325		330
Lys Val Tyr Pro	Asp Gly Asp Ala Trp	Glu Lys Cys Leu Leu	Glu		
	335		340		345
Glu Lys Val Pro	Tyr Val Thr Ala Leu	Val Lys Glu Thr Leu	Arg		
	350		355		360
Phe Trp Thr Val	Ile Pro Ile cys Leu	Pro Arg Glu Asn Thr	Lys		
	365		370		375
Asp Ile Val Trp	Asn Gly Ala Val Ile	Pro Lys Gly Thr Thr	Phe		
	380		385		390
Phe Met Asn Ala	Tyr Ala Ala Asp Tyr	Asp Glu Thr His Phe	Thr		
	395		400		405
Asn Pro His Ala	Phe Glu Pro Glu Arg	Tyr Leu Thr Ala Ser	Ser		
	410		415		420
Asp Gly Ser Gly	Thr Pro His Tyr Gly	Tyr Gly Ala Gly Ser	Arg		
	425		430		435
Met Cys Ala Gly	Ser His Leu Ala Asn	Arg Glu Leu Phe Thr	Ala		
	440		445		450
Tyr Val Arg Leu	Ile Thr Ala Phe Thr	Met His Pro Ala Lys	Arg		
	455		460		465
Ala Glu Asp Arg	Pro Ile Leu Asp Ala	Ile Glu Cys Asn Ala	Ile		
	470		475		480
Pro Thr Ala Leu	Thr Thr Glu Pro Lys	Pro Phe Lys Val Gly	Phe		
	485		490		495
Lys Pro Arg Asp	Pro Val Leu Val Arg	Lys Trp Ile Ala Glu	Ser		
	500		505		510
Glu Glu Arg Thr	Lys His Leu Asn				
	515				

INFORMACIJA SEQ ID NO: 3

SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

ILGIS: 2558 bazių porų

TIPAS: nukleotidai

VIJIŠKUMAS: 2

KONFIGŪRACIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: genominė DNR

HIPOTETIŠKUMAS: NĖRA

ANTIPRASMIŠKUMAS: NĖRA

ORIGINALUS ŠALTINIS: *Penicillium chrysogenum*

TIESIOGINIS ŠALTINIS: plazmidė pALP520

PADETIS GENOME: nežinoma

CHARAKTERISTIKOS:

PAVADINIMAS/RAKTAS: koduojanti seka

PADETIS: 371...2094

CHARAKTERISTIKOS:

KITA INFORMACIJA: pahA genas

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO: 3

```

CTCGAGAAGG TCTGTTGACA CGAGTCCACA AGATGTTGCG AAGTATATAA TATGAGAAAT 60
GGATATACAG CGGAAAATTG AAGTTTCATT CCGCGGGGGC GGGGAACAAG AGGAAGCGCG 120
GAATGAACAT TCCGTCTATG CGCGGTGGAG AGATCTTCGL ACTGGGGACT TGTGGACTTG 180
GACCTATGAG AGAGCTGCCT TTAGTGATTC TGGGACTTGT GGCCAATGAA ACATGTCATG 240
GATGTTACAG CTTTCTTTAT GCGACTCTCT AAACTCGGAA ATATGCCGTA GCCGAAATGC 300
AGGAAAGGCT GGGCTATAAG AGATGCATGC TCCCACCGAA CGTCTGCAAT TCCTTGTTTC 360
ACTCTATATC ATG GCC ATC CAA ACA CTC GCA GTC GCC GTG ATC ACG GTG GTC 412
          Met Ala Ile Gln Thr Leu Ala Val Ala Val Ile Thr Val Val
                    5                                10
TAT TTC GTC ATT CGA TAC TTC AAC CGC ACT GAT ATC CCT AAG ATT AAA 460
Tyr Phe Val Ile Arg Tyr Phe Asn Arg Thr Asp Ile Pro Lys Ile Lys
  15                20                25                30
GGC CTC CCG GAG ATT CCT GGT ATA CCC ATA TTT GGC AAT CTA TTG CAG 508
Gly Leu Pro Glu Ile Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Asn Leu Leu Gln
                    35                40                45
CTA GGA GAT CAA CAT GCC ACA GTC ACG GGG AAA TGG GCA AAG AAA TTT 556
Leu Gly Asp Gln His Ala Thr Val Thr Gly Lys Trp Ala Lys Lys Phe
          50                55                60

```

GGC CCA GTT TTC CAA GTG CGC ATG GGA AAC AAG GTAAGTAATC AAATAATCTT 609
 Gly Pro Val Phe Gln Val Arg Met Gly Asn Lys
 65 70
 TTAAATCGGA CATTCTGATA ATCTAATGCC CTTTATAG CGC ATC GTG TTC GCC AAC 664
 Arg Ile Val Phe Ala Asn
 75
 GGC TTT GAC TCC GTT CGT CAA TTG TGG ATT AAG GAC TCG TCG GCT CTG 712
 Gly Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys Asp Ser Ser Ala Leu
 80 85 90 95
 ATC TCC CGC CCA ACT TTC CAC ACT TTC CAC AGC GTC GTC TCC AGT TCA 760
 Ile Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His Ser Val Val Ser Ser Ser
 100 105 110
 CAG GGC TTC ACG ATC GGA ACT TCC CCG TGG GAT GAT TCC TGT AAG AAA 808
 Gln Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro Trp Asp Asp Ser Cys Lys Lys
 115 120 125
 CGT CGC AAG GCA GCT GCC ACT GCG CTG AAT CGA CCG GCC GTG CAA TCG 856
 Arg Arg Lys Ala Ala Ala Thr Leu Asn Arg Pro Ala Val Gln Ser
 130 135 140
 TAT ATG CCC ATC ATC GAT CTT GAA TCC AAT TCC AGC ATC AAA GAA CTG 904
 Tyr Met Pro Ile Ile Asp Leu Glu Ser Asn Ser Ser Ile Lys Glu Leu
 145 150 155
 TAC CGG GAC AGC CAA AAT GGC AAA CGT GAT GTG AAT CCC ACT GCA TAC 952
 Tyr Arg Asp Ser Gln Asn Gly Lys Arg Asp Val Asn Pro Thr Ala Tyr
 160 165 170 175
 TTC CAG CGA TAC GCT TTC AAC ACC AGT TTG ACT TTG AAC TAT GGA TTC 1000
 Phe Gln Arg Tyr Ala Phe Asn Thr Ser Leu Thr Leu Asn Tyr Gly Phe
 180 185 190
 CGC ATC GAG GGC AAT GTG GAT GAT ACG CTG CTG CAT GAG ATT GTG GAT 1048
 Arg Ile Glu Gly Asn Val Asp Asp Thr Leu Leu His Glu Ile Val Asp
 195 200 205
 GTG GAG CGT GGT GTG TCC AAC TTC CGC AGC ACT TCG AAC AAC TGG CAG 1096
 Val Glu Arg Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Asn Trp Gln
 210 215 220
 GAC TAC ATT CCC CTA TTG CGC ATT TTC CCC AAG ATG AAC AAT GAG GCC 1144
 Asp Tyr Ile Pro Leu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Met Asn Asn Glu Ala
 225 230 235
 GCT GAC TTC CGG GGT CGC CGT GAT AAA TAT CTG ACC TAC TTG CTC GAT 1192
 Ala Asp Phe Arg Gly Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Thr Tyr Leu Leu Asp
 240 245 250 255
 ATG CTC AAG GAT CGA ATC GCC AAG GGA ACC GAT AAG CCT TGC ATC ACT 1240
 Met Leu Lys Asp Arg Ile Ala Lys Gly Thr Asp Lys Pro Cys Ile Thr
 260 265 270
 GGT AAT ATC TTG AAG'GAT CCC GAG GCT AAG CTG AAT GAT G GTGAGTTACA 1290
 Gly Asn Ile Leu Lys Asp Pro Glu Ala Lys Leu Asn Asp
 275 280
 AA□TCTCGCG AAATCTTTGT GAATGTTGGT ATTGAGTACT CATCTATCGT CTAG CC 1346
 Ala
 285
 GAG GTG AAA TCG ATC TGT TTG ACT ATG GTG TCG GCT GGC CTT GAC ACC 1394
 Glu Val Lys Ser Ile Cys Leu Thr Met Val Ser Ala Gly Leu Asp Thr
 290 295 300
 GTT CCG GGC AAC TTG ATT ATG GGA ATT GCC TAC CTG GCA TCT GAA GAC 1442
 Val Pro,Gly Asn Leu Ile Met Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Ser Glu Asp
 305 310 315
 GGC CAA AGA ATT CAG AAA AAG GCC TAT GAT GCA ATC ATG GAG GTA TAC 1490
 Gly Gln Arg Ile Gln Lys Lys Ala Tyr Asp Ala Ile Met Glu Val Tyr
 320 325 330

CCG GAC GGC GAT GCT TGG GAG AAA TGT TTG GTG GAG GAG AAG GTC CCT 1538
 Pro Asp Gly Asp Ala Trp Glu Lys Cys Leu Val Glu Glu Lys Val Pro
 335 340 345
 TAT GTG ACG GCA CTG GTC AAG GAG GTC TTG CGC TTC TGG ACG GTC ATT 1586
 Tyr Val Thr Ala Leu Val Lys Glu Val Leu Arg Phe Trp Thr Val Ile
 350 355 360 365
 CCT ATT TGT CTG CCA CGC GAG AGC ACC AAG GAT ATC CAG TGG AAT GGA 1634
 Pro Ile Cys Leu Pro Arg Glu Ser Thr Lys Asp Ile Gln Trp Asn Gly
 370 375 380
 GCT ACA ATC CCT GCC GGG ACG ACC TTT TTC ATG GTATGTTGCG CCTTGCTTCT 1687
 Ala Thr Ile Pro Ala Gly Thr Thr Phe Phe Met
 385 390
 GTCCCT'□TCG GGACGTTGCT AACAGGATCT GATAG AAT GTT TGG GCT GCC GAT 1740
 Asn Val Trp Ala Ala Asp
 395
 TAC GAT GAA GAT CAC TTT AAG GAT GCC GAT AAA TTC ATC CCG GAG CGT 1788
 Tyr Asp Glu Asp His Phe Lys Asp Ala Asp Lys Phe Ile Pro Glu Arg
 400 405 410
 TAT TTG GAG GCC AGT GAG GGT GCA GGC ACT CCA CAC TAT GCA TAT GGA 1836
 Tyr Leu Glu Ala Ser Glu Gly Ala Gly Thr Pro His Tyr Ala Tyr Gly
 415 420 425 430
 GCG GGA TCA CGT ATG TGT GCA GGC TCA CAT CTC GCC AAT CGC GAG CTG 1884
 Ala Gly Ser Arg Met Cys Ala Gly Ser His Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 435 440 445
 TTC ACT GCT TTT ATC CGC CTC GTC ACT GCT TTC AAC ATG cAc AcG GcG 1932
 Phe Thr Ala Phe Ile Arg Leu Val Thr Ala Phe Asn Met His Thr Ala
 450 455 460
 AAG GAG ACG GCC GAC.CGA CCG ATT CTG AAT GCA ATT GAG TGC AAT TTG 1980
 Lys Glu Thr Ala Asp Arg Pro Ile Leu Asn Ala Ile Glu Cys Asn Leu
 465 470 475
 ATT CCG ACA GCC TTG ACA ACC GAG CCG AAG CCA TTC AAG GTT GGC TTT 2028
 Ile Pro Thr Ala Leu Thr Thr Glu Pro Lys Pro Phe Lys Val Gly Phe
 480 485 490
 AGT GCA CGC GAC CCT AAG AAG CTT GAG CAG TGG ATT GCT GAG AGC GAT 2076
 Ser Ala Arg Asp Pro Lys Lys Leu Glu Gln Trp Ile Ala Glu Ser Asp
 495 500 505 510
 GAA CGG ACC AAA GAT CTA TAAGAGGAAG TTTTATCTGA TATGATTCCC TTTTTTTTTT
 Glu Arg Thr Lys Asp Leu
 515
 TCGGAGGCTA TTTATGTATC TACTTGAATA TATGTGAAAT AAAGGCAATG AAGTATAGAT 2194
 ATAGACCTGC CCAGGTGAGA CCTACATGTA TGTAATCGAC GTCTCCCAGT ACCTATTTAG 2254
 GAACCGAATA GAAATTTGAG TGATGAAGGG TGAAGAATAA CCTCAGAGAA CATAGGTCTA 2314
 CTAAGATCTG CTAATTCCTTA GACTCCTTTC CCTGAATTAT TGCCAATTTC CCCAGTTGTC 2374
 TCTCTCCTCT ATGACTCCCG GCCTTGTCAC ACCGGCGGAA TCTCCCCGCA TTTTCCTCGA 2434
 CCTCACCCTT TTCTTCCTCT TCACCCTCTC CCCATCCACT TGAAATGAAC CTCTGATCGC 2494
 AATCAATTGC ATCCCGAAGT CATTTTGGAT GATGAATAAT CCGCAGATGT ACCCTGTCCT 2554
 CGAG 2558

INFORMACIJA SEQ ID NO: 4

SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

ILGIS: 516 bazių porų

TIPAS: amino rūgštys

VIJIŠKUMAS: 1

KONFIGŪRACIJA: linijinė

MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

CHARAKTERISTIKOS:

KITA INFORMACIJA: fermento fenilacetato 2-hidroksilazės amino rūgščių seka

CHARAKTERISTIKOS:

KITA INFORMACIJA: molekulinis svoris 58112 Da.

SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID NO:

Met	Ala	Ile	Gln	Thr	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Val	Tyr	Phe
1			5						10					15	
Val	Ile	Arg	Tyr	Phe	Isn	Arg	Thr	Asp	Ile	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu
			20					25					30		
Pro	Glu	Ile	Pro	Gly	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly
		35					40					45			
Asp	Gln	His	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Trp	Ala	Lys	Lys	Phe	Gly	Pro
	50					55					60				
Val	Phe	Gln	Val	Arg	Met	Gly	Asn	Lys	Arg	Ile	Val	Phe	Ala	Asn	Gly
65					70					75					80
Phe	Asp	Ser	Val	Arg	Gln	Leu	Trp	Ile	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Leu	Ile
				85					90					95	
Ser	Arg	Pro	Thr	Phe	His	Thr	Phe	His	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gln
			100					105					110		
Gly	Phe	Thr	Ile	Gly	Thr	Ser	Pro	Trp	Asp	Asp	Ser	Cys	Lys	Lys	Arg
		115					120					125			
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Asn	Arg	Pro	Ala	Val	Gln	Ser	Tyr
	130					135					140				
Met	Pro	Ile	Ile	Asp	Leu	Glu	Ser	Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	Glu	Leu	Tyr
145					150					155					160
Arg	Asp	Ser	Gln	Asn	Gly	Lys	Arg	Asp	Val	Asn	Pro	Thr	Ala	Tyr	Phe
				165					170					175	
Gln	Arg	Tyr	Ala	Phe	Asn	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Tyr	Gly	Phe	Arg
		180						185					190		
Ile	Glu	Gly	Asn	Val	Asp	Asp	Thr	Leu	Leu	His	Glu	Ile	Val	Asp	Val
		195					200					205			
Glu	Arg	Gly	Val	Ser	Asn	Phe	Arg	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Trp	Gln	Asp
	210					215					220				
Tyr	Ile	Pro	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Pro	Lys	Met	Asn	Asn	Glu	Ala	Ala
225					230					235					240
Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Leu	Asp	Met
				245					250					255	
Leu	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Lys	Gly	Thr	Asp	Lys	Pro	Cys	Ile	Thr	Gly
			260					265					270		
Asn	Ile	Leu	Lys	Asp	Pro	Glu	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Glu	Val	Lys
		275					280					285			

[illegible]

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Mikroorganizmų genų, koduojančių fenilacetato katabolizmo fermentus ir konkuruojančių su penicilino biosintezės fermentais dėl šio junginio, inaktyvavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima integruotą transformaciją per homologinę rekombinaciją tarp bent vieno egzogeninio DNR junginio ir bent dalies inaktyvuojamo geno sekos.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuotas DNR junginys yra žiedinė molekulė, kuri turi bent vieną geno, kuris turėtų būti inaktyvuojamas, ekspresuojamą fragmentą.
3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuotas DNR junginys yra linijinė molekulė, kuri turi bent vieną DNR fragmentą, neįjungtą į seką geno, kuris turėtų būti inaktyvuojamas, bet kuris turi bent vieną transformacijos žymę, kuri pertraukia jo koduojančią seką.
4. Būdas pagal ankstesnius punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuota DNR molekulė turi, pilnai ar dalinai, kopiją sekos to geno, kuris turėtų būti inaktyvuojamas mutacija, geriau skaitymo rėmelio pasislinkimo mutacija, panaikinančia prasmę, arba delecija, kuri panaikina minėto geno funkcijos fenotipą.
5. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformacijos, kuria inaktyvuojamas genas, objektu esantis mikroorganizmas, gali produkuoti peniciliną G arba V.
6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mikroorganizmas, produkuojantis peniciliną G arba V, yra grybas.
7. Būdas pagal 1-6 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuojamas mikroorganizmas yra *Aspergillus nidulans*.
8. Būdas pagal 1-6 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuojamas mikroorganizmas yra *Penicillium chrysogenum*.

9. Būdas pagal 1-7 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas transformuotas DNR junginys yra pilnai ar dalinai įjungtas į vektorių, geriau į plazmidę pPhacA::argB.
10. Būdas pagal 1-6 ir 8 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas transformuotas DNR junginys yra pilnai ar dalinai įjungtas į vektorių, geriau į plazmidę pALP696.
11. Būdas pagal 1-7 ir 9 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inaktyvuotas genas yra atvaizduotas SEQ ID NO: 1, jo mutoto geno sekos ir/arba homologiniai genai.
12. Būdas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inaktyvuotas genas koduoja polipeptidą, pavaizduotą SEQ ID NO: 2, ar panašias sekas, kurios ekspresuoja P450 fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą.
13. Būdas pagal 1-6, 8 ir 10 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inaktyvuojamas genas yra atvaizduotas SEQ ID NO: 3, jo mutoto geno sekos ir/arba homologiniai genai.
14. Būdas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inaktyvuojamas genas koduoja polipeptidą, atvaizduotą SEQ ID NO: 4, ar panašias sekas, kurios ekspresuoja P450 fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą.
15. Transformuotas *Aspergillus nidulans* kamienas ir iš jo gauti mutantiniai dariniai, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad juose yra bent vienas egzogeninis DNR junginys, kuris susideda iš sutrumpintos, nepilnos arba inaktyvuotos sekos bent vieno geno, kuris koduoja fenilacetato katabolizmo fermentą ir kuris inaktyvuoja endogeninį geną po jo integracijos per homologinę rekombinaciją.
16. Transformuotas *A. nidulans* kamienas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas, kuris turėtų būti inaktyvuojamas, koduoja fermentą, tarpininkaujantį fenilacetato hidroksilimui.
17. Transformuotas *A. nidulans* kamienas pagal 15 ir 16 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas, kuris turėtų būti inaktyvuojamas, yra *phacA*, kurio seka ir šoninės sritys yra pavaizduotos SEQ ID NO: 1, jo mutotų ir homologinių genų sekos.

18. Transformuotas *A. nidulans* kamienas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inaktyvuojamas genas yra homologinis *phacA*, kurio skirtinga negu *A. nidulans* kilmė ir homologija su *A. nidulans phacA* DNR seka yra pakankama homologinei rekombinacijai su endogeniniu *A. nidulans* lokusu.
19. Transformuotas kamienas pagal 15-18 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas, kuris yra inaktyvuotas, koduoja polipeptidą, pavaizduotą baltymo seka SEQ ID NO: 2, ar panašiomis sekomis, kurios ekspresuoja P450 fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą.
20. Transformuotas kamienas pagal 15-19 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra grynas *A. nidulans* CECT20195 kamienas, jo mutantai ir/arba transformuoti dariniai.
21. Plazmidė pPhacA::argB inaktyvuojanti *A. nidulans phacA* geną, kaip parodyta fig. 6 esančiame restrikciniame žemėlapyje, sudaryta iš plazmidės pUC18, turinčios 6,8 kb *EcoRI* intarpą, kuris turi *A. nidulans phacA* geną, inaktyvuotą įterpus 3,2 kb fragmentą, kuris savo ruožtu turi *A. nidulans argB* geną.
22. Transformuotas *Penicillium chrysogenum* kamienas ir iš jo gauti mutantiniai dariniai, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad turi DNR junginį, kuris susideda iš sutrumpintos, nepilnos arba inaktyvuotos sekos geno, kuris koduoja fenilacetato katabolizmo fermentą ir kuris inaktyvuoja endogeninį geną po jo integracijos per homologinę rekombinaciją.
23. Transformuotas *P. chrysogenum* kamienas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas, kuris turėtų būti inaktyvuojamas, koduoja fermentą, tarpininkaujantį fenilacetato hidroksilinimui.
24. Transformuotas *P. chrysogenum* kamienas pagal 22 ir 23 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra *phacA* genas, kurio seka ir šoninės sritys yra pavaizduotos SEQ ID NO: 3, jo mutuoto geno ir/arba homologinio geno sekos.
25. Transformuotas *P. chrysogenum* kamienas pagal 22 ir 24 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas, kuris yra inaktyvuotas, koduoja polipeptidą,

pavaizduotą baltymo seka SEQ ID NO: 4, ar panašiomis sekomis, kurios koduoja apibrėžtą P450 fenilacetato 2-hidroksilazinį aktyvumą.

26. Transformuotas *P. chrysogenum* kamienas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genas yra *A. nidulans phacA* arba bet kuris kitas homologinis DNR junginys, išskirtas iš skirtingo negu *P. chrysogenum* šaltinio ir kurio homologija su *P. chrysogenum pahA* DNR seka yra pakankama vykti homologinei rekombinacijai su *P. chrysogenum* endogeniniu lokusu.

27. Plazmidė pPALP696 inaktyvuoja *P. chrysogenum pahA* geną, kaip parodyta fig. 7 esančiame restrikciniame žemėlapyje, sudaryta iš plazmidės pBC KS⁺, turinčios 7,9 kb *Sall* intarpą, kuris turi *P. chrysogenum pahA* geną, inaktyvuotą įterpus 2,0 kb fragmentą, kuris savo ruožtu turi *S. hindustanus ble^R* geną, reguliuojamą *P. chrysogenum gdh* promotoriumi.