



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026479

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 13/22; C12N 15/70

(13) B

(21) 1-2014-02614

(22) 10/01/2013

(86) PCT/KR2013/000214 10/01/2013

(87) WO2013/105800 18/07/2013

(30) 10-2012-0002906 10/01/2012 KR; 10-2013-0002913 10/01/2013 KR

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/11/2014 320A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

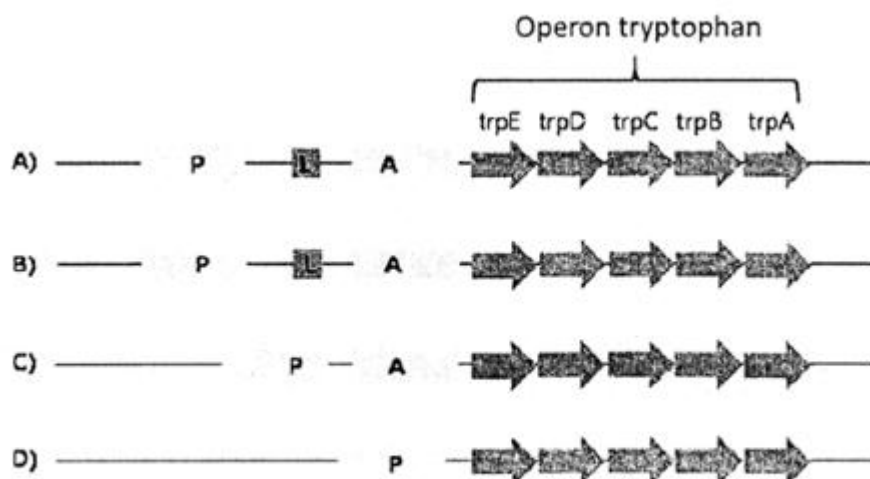
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) LEE, Kwang Ho (KR); PARK, Hye Min (KR); LEE, Hyo Hyung (KR); HWANG, Young Bin (KR); LEE, Seok Myung (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT L-TRYPTOPHAN ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-TRYPTOPHAN SỬ DỤNG CHỦNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Escherichia coli* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường và đến phương pháp sản xuất L-tryptophan sử dụng vi sinh vật này. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến biến thể *Escherichia coli* trong đó việc kiểm soát sự ngăn chặn và sự suy giảm của operon tryptophan được giải phóng và sự tích tụ của anthranilat được giảm và nhờ đó làm tăng cường khả năng sản xuất L-tryptophan. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất L-tryptophan sử dụng biến thể *Escherichia coli*.



P: Trình tự khởi đầu; L: peptit dẫn đầu; A: đoạn suy giảm

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường và phương pháp sản xuất L-tryptophan sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-tryptophan, axit amin thiết yếu, đã được sử dụng một cách rộng rãi làm chất phụ gia thức ăn, vật liệu thô dùng cho dược chất trong y khoa như dung dịch truyền và vật liệu dùng cho thực phẩm bổ dưỡng và được sản xuất bằng quy trình tổng hợp hóa học, phản ứng enzym, lên men, v.v..

Gần đây, việc sản xuất L-tryptophan chủ yếu được thực hiện bằng quy trình lên men vi sinh vật. Trong giai đoạn khởi đầu của sự công nghiệp hóa, các chủng kháng tương đồng thu được bằng sự đột biến hóa học chủ yếu được sử dụng. Tuy nhiên, đối với các công nghệ tái tổ hợp gen được phát triển một cách nhanh chóng vào những năm 1990 và các cơ chế điều hòa được hiểu ở mức phân tử, các chủng *E. coli* và *Corynebacterium* tái tổ hợp thu được bằng các kỹ thuật thao tác di truyền chủ yếu được sử dụng.

Việc sản xuất tryptophan bởi các vi sinh vật bắt đầu với DAHP (3-deoxy-D-arobino-heptulosonat-7-phosphat) được tạo ra bằng quy trình polyme hóa PEP (PhospoEnolPyruvate) mà là chất trung gian của quy trình đường phân, với E4P (erythroza-4-phosphat) mà là chất trung gian của con đường pentoza phosphat. Sau đó, tryptophan được sinh tổng hợp từ chorismat qua con đường sinh tổng hợp thơm thông thường. Cụ thể là, tryptophan được tổng hợp bằng anthranilat synthaza (EC 4.1.3.27) được mã hóa bởi gen *trpE*, anthranilat synthaza (EC 4.1.3.27) và anthranilat PRPP transferaza (EC 2.4.1.28) được mã hóa bởi gen *trpD*, indol-3-glyxerol phosphat

synthaza (EC 4.1.1.48) và phosphoribosylanthranilat isomeraza (EC 5.3.1.24) được mã hóa bởi gen *trpC* và tryptophan synthaza (EC 4.2.1.20) được mã hóa bởi gen *trpB* và gen *trpA*. Nhóm gen *trpEDCBA* mà qua trung gian phản ứng trên đây được đặt vào nhiễm sắc thể và có cấu trúc operon chứa vùng điều hòa đơn lẻ.

Operon tryptophan được phiên mã một cách tích cực để tạo ra lượng đủ của tryptophan được đòi hỏi bởi tế bào. Tuy nhiên, nếu hàm lượng tryptophan trong tế bào là cao, thì chất ức chế gắn kết với tryptophan và sau đó là operon tryptophan được làm bất hoạt bằng sự gắn kết của chất ức chế với vùng điều hòa operon, nhờ đó sự phiên mã được ức chế.

Ngoài ra, các operon đối với quá trình sinh tổng hợp axit amin như threonin, phenylalanin, leuxin, tryptophan và histidin có cơ chế điều hòa khác đã được biết là sự suy giảm (J Bacteriol. (1991) 173, 2328-2340). Như đã được biết đến trong lĩnh vực này đối với sự suy giảm, trong các điều kiện không đủ axit amin, cấu trúc của ARN thông tin (mARN) có vùng trình tự đặc hiệu tương ứng giữa trình tự khởi đầu (promoter) và gen thứ nhất của operon trên nhiễm sắc thể, các thay đổi đối với cấu trúc thuận lợi cho quy trình dịch mã để thúc đẩy sự biểu hiện của gen sinh tổng hợp, nhưng trong các điều kiện giàu axit amin, ARN thông tin được phiên mã ngắn tạo ra cấu trúc ba chiều, cụ thể là “cấu trúc kẹp tóc, để ức chế quy trình dịch mã (J Biol Chem., (1988) 263:609-612).

Trong giai đoạn đầu của sự phát triển các chủng sản xuất L-tryptophan, mục đích chính là làm tăng hiệu quả của quy trình sản xuất thông qua việc tăng cường hoạt tính enzym bằng cách giải phóng sự ức chế ngược của enzym của con đường sinh tổng hợp tryptophan do sản phẩm cuối, tryptophan gây ra hoặc bằng cách làm tăng số lượng bản sao của gen operon tryptophan trên nhiễm sắc thể hoặc ở dạng vector để làm tăng cường sự biểu hiện của enzym sinh tổng hợp tryptophan (Appl. Environ. Microbiol., (1982) 43:289-297; Appl. Microbiol. Biotechnol., (1993) 40:301-305; Trends Biotechnol., (1996) 14:250-256).

Các phương pháp tác động đến khả năng tạo ra L-tryptophan đối với sinh vật bao gồm phương pháp tác động đến khả năng kháng với chất tương tự tryptophan hoặc

anthranilat như sản phẩm trung gian bởi sự đột biến hóa học hoặc phương pháp cải biến vi sinh vật bằng kỹ thuật thao tác di truyền. Ví dụ về phương pháp đột biến hóa học bao gồm các phương pháp được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 1987-0001813, đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 0949312 và tương tự và các ví dụ về phương pháp cải biến dựa trên kỹ thuật thao tác di truyền bao gồm các phương pháp khác nhau mà sử dụng chủng thu được bằng cách làm tăng cường gen *tktA* mã hóa transketolaza hoặc gen *galP* mã hóa galactosa permeaza trong con đường sinh tổng hợp axit amin thơm để làm tăng việc cấp E4P (erythroza4-phosphat) hoặc PEP (phosphoenolpyruvat) và làm giảm sự ức chế ngược của DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat) để làm tăng cường con đường sinh tổng hợp thơm (Trends Biotechnol.,(1996)14:250-256, Microbial Cell Factories (2009) 8:19), hoặc chủng thu được bằng cách đưa bổ sung gen operon tryptophan vào vector hoặc nhiễm sắc thể (Appl. Environ. Microbiol., (1982) 43:289-297, Appl. Microbiol. Biotechnol., (1993) 40:301-305).

Tuy nhiên, thậm chí mặc dù operon tryptophan được đưa vào với việc giải phóng sự ức chế ngược của enzym sinh tổng hợp, các phương pháp này không đạt được việc gia tăng hiệu suất sản xuất tryptophan, do các cơ chế điều hòa như sự ức chế hoặc sự suy giảm gen operon ở mức phiên mã.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp giải phóng sự ức chế hoặc suy giảm gen operon tryptophan ở mức phiên mã trong chủng sản xuất L-tryptophan và phương pháp có khả năng làm tăng cường enzym sinh tổng hợp tryptophan sử dụng vi sinh vật này. Ngoài ra, để giải quyết vấn đề trong đó hiệu suất sản xuất của chủng sản xuất tryptophan không gia tăng do sự kết lắng anthranilat như operon tryptophan được tăng cường, các tác giả sáng chế đã tạo cấu trúc chủng sản xuất tryptophan có hiệu suất sản xuất gia tăng và mức kết lắng anthranilat thấp bằng việc biểu hiện nhóm gen khác với gen mã hóa anthranilat synthaza (TrpE) trong số các gen operon tryptophan như dạng mà được khử nhạy cơ chế điều hòa như sự ức chế ngược hoặc cơ chế ức chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường bằng cách cải biến để khử nhạy sự ức chế hoặc sự suy giảm của operon tryptophan và làm giảm sự lắng đọng của anthranilat.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-tryptophan sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*.

Để hoàn thành các mục đích trên đây, phương án của sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường mà được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh.

Phương án khác của sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất L-tryptophan, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* được mô tả trên đây.

Vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra theo sáng chế loại trừ việc lắng đọng quá mức của anthranilat trong đó và có thể được sử dụng một cách thuận lợi để tạo ra L-tryptophan với hiệu suất cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là hình vẽ theo biểu đồ biểu diễn gen operon tryptophan, vùng điều hòa đối với gen trong nhiễm sắc thể *E. coli* và dạng loại bỏ của gen được mô tả trong sáng chế.

A) Gen operon tryptophan, và vùng điều hòa của nó trong nhiễm sắc thể *E. coli* (Ptrp);

B) Dạng Ptrp;

C) Dạng mà gen *trpL* mã hóa peptit dẫn đầu được loại bỏ (DtrpL); và

D) Dạng mà gen *trpL* mã hóa peptit dẫn đầu và đoạn suy giảm được loại bỏ

(Dtrp_att).

FIG.2 là vector pCL-GFP được sử dụng để đo cường độ của vùng điều hòa sự biểu hiện của operon tryptophan.

FIG.3 là vector pINT17E-Patt-trpDCBA để đưa gen sinh tổng hợp tryptophan *trpDCBA* vào nhiễm sắc thể để làm tăng số lượng bản sao của gen.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường, mà được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “operon tryptophan” hoặc “operon Trp” có nghĩa là toàn bộ operon bao gồm tất cả gen *trpEDCBA*. Operon tryptophan có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9.

Vi sinh vật sản xuất L-tryptophan mà có thể được sử dụng trong sáng chế có thể là vi sinh vật chưa có nhân thật hoặc có nhân thật bất kỳ miễn là chúng có khả năng sản xuất L-tryptophan. Ví dụ về vi sinh vật này có thể bao gồm các vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium* và chi *Brevibacterium*. Cụ thể là, vi sinh vật là vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, và cụ thể hơn là *E. coli*. Cụ thể nhất là, chủng *E. coli* của sáng chế có thể là chủng thu được bằng cách làm tăng cường hoạt tính của enzym sinh tổng hợp tryptophan như anthranilat synthaza (TrpE), anthranilat PRPP transferaza (TrpD), phosphoribosyl anthranilat isomeraza (TrpC) hoặc tryptophan synthaza (TrpA, TrpB) trong khi duy trì 3-deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-phosphat synthaza (*aroG*) mà được giải phóng để ức chế ngược, làm tăng cường hoạt tính của các enzym của con đường sinh tổng hợp thơm như 3-dehydroquinat

synthetaza (AroB), shikimat dehydrogenaza (AroE), shikimat kinaza (AroL), 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (AroA) hoặc chorismat synthaza (AroC), làm tăng cường hoạt tính của phosphoglyxerat dehydrogenaza (SerA) hoặc transketolaza (TktA) để làm tăng cường việc cung cấp của các hợp chất trung gian, serin và PRPP, của con đường sinh tổng hợp tryptophan. Hơn nữa, chủng *E. coli* của sáng chế có thể là chúng thu được bằng cách làm bất hoạt hoạt tính của prephenat dehydrataza và chorismat mutaza (PheA) trong con đường sinh tổng hợp thionin hoặc làm bất hoạt hoạt tính của prephenat dehydrogenaza, chorismat mutaza (tyrA), tryptophanaza (tnaA) và gen vận chuyển tryptophan (tnaB, mtr).

Cụ thể hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp của sáng chế là chủng *E. coli* tái tổ hợp CA04-2004 (số lưu giữ : KCCM11246P).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng điều hòa biểu hiện” của operon tryptophan nội sinh có nghĩa là vùng bao gồm trình tự khởi đầu, peptit dẫn đầu và các đoạn suy giảm nội sinh. Cụ thể là, vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “peptit dẫn đầu” có nghĩa là peptit trọng lượng phân tử thấp mà được mã hóa bởi trình tự dẫn đầu ngược dòng của codon khởi đầu của gen. Cụ thể là, peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, và polypeptit mà được biểu hiện bởi peptit dẫn đầu có thể là trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4. Peptit dẫn đầu có chức năng tạo ra cấu trúc kiểu kẹp tóc khi nồng độ của tryptophan là ở mức cao, nhờ đó thúc đẩy sự hình thành cấu trúc của đoạn suy giảm nội sinh để kết thúc sự phiên mã của gen sinh tổng hợp tryptophan.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “loại bỏ” có nghĩa là loại bỏ một phần hoặc tất cả các trình tự nucleotit ra khỏi codon khởi đầu từ codon ngừng của gen đích hoặc trình tự nucleotit của vùng điều hòa của nó, ra khỏi nhiễm sắc thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi

Escherichia, mà còn được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ vùng suy giảm nội sinh có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 để làm tăng cường khả năng tạo ra L-tryptophan.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đoạn suy giảm nội sinh” có nghĩa là vùng có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, mà loại trừ trình tự khởi đầu và peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa sự biểu hiện mà gây ra cơ chế suy giảm.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, mà còn được cải biến để làm tăng hoạt tính của protein mà được mã hóa bởi operon tryptophan.

Khía cạnh của sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, mà còn được cải biến để làm tăng hoạt tính của protein mà được mã hóa bởi nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan *trpDCBA* loại trừ gen *trpE* mã hóa anthranilat synthaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan” có nghĩa là nhóm gen gồm có tổ hợp của hai hoặc nhiều trong số *trpD*, *trpC*, *trpB* và *trpA* mà là gen operon tryptophan. Cụ thể là, nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan có thể là nhóm gen *trpDCBA* có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10. Trong bản mô tả này, gen *trpD* mã hóa protein có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 37; gen *trpC* mã hóa protein có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 38; gen *trpB* mã hóa protein có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 39; và gen *trpA* mã hóa protein có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 40.

Việc làm tăng cường hoạt tính của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan ngoại trừ đối với anthranilat synthaza mà được mã hóa bởi gen *trpE* của operon tryptophan được thực hiện để giải quyết vấn đề mà hiệu suất sản xuất của tryptophan không gia tăng do sự lắng đọng của anthranilat như operon tryptophan được tăng cường.

Các phương pháp làm gia tăng sự biểu hiện của các gen bao gồm: 1) phương pháp làm tăng số lượng bản sao các gen trong nhiễm sắc thể hoặc nội bào; hoặc 2)

phương pháp thay thế trình tự khởi đầu của gen trong nhiễm sắc thể bằng trình tự khởi đầu ngoại sinh mạnh hoặc cải biến trình tự khởi đầu trong nhiễm sắc thể thành trình tự khởi đầu mạnh.

Ví dụ về phương pháp làm tăng số lượng bản sao bao gồm phương pháp đưa gen vào vector để làm tăng cường sự biểu hiện của gen. Các ví dụ về vector mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các vector plasmit như các plasmit loại pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL và pET. Các vector mà có thể được sử dụng trong sáng chế là không bị giới hạn cụ thể và các vector biểu hiện đã được biết đến bất kỳ có thể được sử dụng. Cụ thể là, các vector pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322 hoặc pMW118 có thể được sử dụng. Cụ thể nhất là, các vector pACYC177, pCL và pCC1BAC có thể được sử dụng.

Trong khi đó, các ví dụ về trình tự khởi đầu ngoại sinh mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự khởi đầu đã được biết đến như các trình tự khởi đầu *trc*, *lac* và *tac*. Ngoài ra, việc cải biến trình tự khởi đầu trong nhiễm sắc thể thành trình tự khởi đầu mạnh có thể được thực hiện bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu và/hoặc loại bỏ tiếp một phần hoặc tất cả các đoạn suy giảm nội sinh như được mô tả trên đây, nhưng không bị giới hạn đến chúng.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật sản xuất L-tryptophan tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* được tạo ra bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh và loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng suy giảm nội sinh có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 để làm tăng khả năng tạo ra L-tryptophan. Ngoài ra, vi sinh vật sản xuất L-tryptophan tái tổ hợp được tạo ra bằng cách làm tăng cường tiếp hoạt tính của protein có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 37, 38, 39 và 40, mà được mã hóa bởi nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan *trpDCBA* loại trừ gen *trpE* mã hóa anthranilat synthaza. Vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra được lưu giữ với số lưu giữ KCCM11246P.

Theo phương án khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất L-tryptophan, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật sản xuất L-tryptophan tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật sản xuất L-tryptophan tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường, mà được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh và để loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng suy giảm nội sinh có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 để làm tăng khả năng tạo ra L-tryptophan, và còn làm tăng hoạt tính của protein mà được mã hóa bởi operon tryptophan bằng cách làm tăng cường sự biểu hiện của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA loại trừ gen trpE mã hóa anthranilat synthaza.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy mà được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế có thể là môi trường và điều kiện mà được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, mà thỏa mãn một cách thích hợp các yêu cầu của vi sinh vật của sáng chế. Cụ thể là, vi sinh vật của sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon thích hợp, nguồn nitơ, axit amin, vitamin và tương tự trong các điều kiện hiếu khí trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH và tương tự.

Nguồn cacbon mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các hydrat cacbon như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, manitol, sorbitol; các rượu như đường rượu, glyxerol, axit pyruvic, axit lactic và axit xitric; và các axit amin như axit hữu cơ, axit glutamic, methionin và lysin. Ngoài ra, các nguồn dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như tinh bột hydrolysat, rỉ đường, mật mía, cám gạo, bột sắn, bã mía và nước ngô có thể được sử dụng. Cụ thể là, các hydrat cacbon như glucoza và rỉ đường được xử lý sơ bộ vô trùng (nghĩa là, rỉ đường được chuyển hóa thành đường khử) có thể được sử dụng.

Ngoài ra, lượng thích hợp của các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng mà không bị giới hạn.

Các nguồn nitơ mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni carbonat và amoni nitrat; các axit amin như axit glutamic, methionin và glutamin; và các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, NZ-amin, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, dịch chiết mạch nha, dịch lỏng ủ ngũ cốc, casein hydrolysate, bột cá hoặc sản phẩm tiêu hóa được của nó, bánh đậu tương được khử béo hoặc sản phẩm tiêu hóa được của nó, v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc trong tổ hợp.

Môi trường có thể chứa, làm nguồn phospho, kali phosphat monobazơ, kali phosphat dibazơ và các muối chứa natri tương ứng. Các hợp chất vô cơ mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat và canxi carbonat. Ngoài ra, môi trường có thể chứa axit amin, vitamin và các tiền chất thích hợp. Các nguồn hoặc tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường theo mẻ hoặc theo cách liên tục.

Các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric có thể được bổ sung vào môi trường theo cách thích hợp trong khi nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, trong khi nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo có thể được sử dụng để ngăn chặn sự hình thành bọt. Hơn nữa, để duy trì môi trường nuôi cấy trong trạng thái ưa khí, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được phun vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, để duy trì môi trường nuôi cấy trong trạng thái kỵ khí hoặc không hiếu khí, không có khí nào được phun, hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon dioxit có thể được phun vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy thường được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 27°C đến 37°C, và cụ thể là nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C. Việc nuôi cấy vi sinh vật có thể được tiếp tục cho đến khi hàm lượng chất hữu ích mong muốn sẽ thu được. Cụ thể là, thời gian nuôi cấy là có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100 giờ.

Phương pháp theo sáng chế còn có thể bao gồm bước tinh chế hoặc thu hồi axit L-amin được tạo ra trong bước nuôi cấy. Quy trình tinh chế hoặc thu hồi có thể được thực hiện bằng cách tinh chế hoặc thu hồi axit L-amin mong muốn từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp, ví dụ, phương pháp nuôi cấy theo mẻ, liên tục hoặc mẻ nạp.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, cần được hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc của vector dung hợp bao gồm GFP và vùng điều hòa sự biểu hiện mà từ đó peptit dẫn đầu được loại bỏ, để giải phóng sự điều hòa biểu hiện đối với quá trình sinh tổng hợp tryptophan

Như được thể hiện trên FIG.1, để tinh chế vùng điều hòa sự biểu hiện bao gồm việc loại bỏ gen *trpL* mã hóa peptit dẫn đầu (L) (vùng điều hòa sự biểu hiện này sau đây được gọi là “DtrpL”, tương ứng với FIG.1C) trong vùng điều hòa sự biểu hiện của operon tryptophan mà gồm có trình tự khởi đầu (P), peptit dẫn đầu (L) và đoạn suy giảm (A), phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là “PCR”) được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *E.coli* W3110 (được mua từ American Type Culture Collection (ATCC); Số lưu giữ tại GenBank AC000091) làm khuôn mẫu.

Cụ thể là, mảnh 155bp có vị trí enzym giới hạn KpnI trong vùng 5’ được khuếch đại bởi PCR với Pfu polymeraza sử dụng các đoạn mồi 1 và 2 trong các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm có sự biến tính ở 94°C trong 1 phút, nung ở 58°C trong 30 giây và sự kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Trong khi đó, mảnh 105bp có vị trí enzym giới hạn *EcoRV* trong vùng 3’ được khuếch đại bởi PCR sử dụng các đoạn mồi 3 và 4 trong các điều kiện được mô tả trên đây. Các mảnh ADN thu được được thu

hồi bằng cách sử dụng kit GeneAll^R ExpinTM GEL SV (Seoul, Korea), và sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu đối với PCR liên kết ngang.

Để tạo ra DtrpL, PCR liên kết ngang có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hai mảnh ADN làm khuôn mẫu và các đoạn môi 1 và 4. Cụ thể là, mảnh 245bp (SEQ ID NO: 5) được khuếch đại bởi PCR trong các điều kiện được mô tả trên đây. Mảnh được khuếch đại được xử lý bằng các enzym giới hạn *KpnI* và *EcoRV*, và sau đó được nối bằng pCL1920GFP (SEQ ID NO: 8) mà được xử lý bằng cùng enzym giới hạn, nhờ đó tạo cấu trúc pCL-DtrpL_GFP.

Để khuếch đại vùng điều hòa sự biểu hiện bao gồm việc loại bỏ các gen mã hóa peptit dẫn đầu (L) và đoạn suy giảm (A) (vùng điều hòa sự biểu hiện sau đây được gọi là “Dtrp_att”) trong vùng điều hòa sự biểu hiện của operon tryptophan, mảnh 148bp (SEQ ID NO: 6) có vị trí enzym giới hạn *KpnI* trong vùng 5’ và vị trí enzym giới hạn *EcoRV* trong vùng 3’ được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *E. coli* W3110 làm khuôn mẫu và các đoạn môi 1 và 5. Mảnh được khuếch đại được xử lý bằng enzym giới hạn *KpnI* và *EcoRV*, và sau đó được nối bằng pCL1920GFP mà được xử lý bằng cùng enzym giới hạn, nhờ đó tạo cấu trúc pCL-Dtrp_att-GFP.

Ngoài ra, để tạo ra vectơ có vùng điều hòa sự biểu hiện kiểu đại để sử dụng làm đối chứng trong các thử nghiệm tiếp theo, mảnh 290bp có vị trí enzym giới hạn *KpnI* trong vùng 5’ và vị trí enzym giới hạn *EcoRV* trong vùng 3’ được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *E.coli* W3110 làm khuôn mẫu và các đoạn môi 1 và 4. Mảnh được khuếch đại được xử lý bằng các enzym giới hạn *KpnI* và *EcoRV*, và sau đó được nối bằng pCL1920GFP mà được xử lý bằng cùng enzym giới hạn, nhờ đó tạo cấu trúc pCL-Ptrp-GFP.

Đoạn môi 1:

5' TTAGGTACCGGCGCACTCCCGTTCTGGATA 3' (SEQ ID NO: 11);

Đoạn môi 2:

5' ACTGCCCCGTTGTCGATACCCTTTTTACGT 3' (SEQ ID NO: 12);

Đoạn mồi 3:

5' TCGACAACGGGCAGTGTATTACCATG 3' (SEQ ID NO: 13);

Đoạn mồi 4:

5' AATGATATCTGTTATTCTCTAATTTTGTT 3' (SEQ ID NO: 14);

Đoạn mồi 5:

5' AATGATATCACCCCTTTTTACGTGAACTTG 3' (SEQ ID NO: 15).

Ví dụ 2: Đo mức biểu hiện của GFP

Mỗi trong số vector pCL-DtrpL_GFP, pCL-Dtrp_att-GFP và pCL-Ptrp_GFP được tạo ra trong Ví dụ 1 được biến nạp vào *E. coli* W3110 kiểu dại và chủng *E. coli* KCCM10812P sản xuất tryptophan và sau đó mức độ GFP trong chủng được đo.

Chủng bố mẹ *E. coli* KCCM10812P (đăng ký patent Hàn quốc số 10-0792095) được sử dụng trong Ví dụ này là chủng thu được từ biến thể *E. coli* có khả năng sản xuất L-phenylalanin (KFCC 10066, công bố patent Hàn quốc số 1985-0001232). Cụ thể là, KCCM10812P là chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng sản xuất L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để phục hồi hiện tượng khuyết dưỡng tryptophan, để làm bất hoạt các gen *pheA*, *trpR*, *mtr* và *tnaAB* và để tạo đột biến gen *aroG* và *trpE*.

Cụ thể là, mỗi trong số các chủng được tiêm vào 25ml môi trường M9 (chứa 0,5% glucoza + 2 g/L dịch chiết nấm men và 0,1g/L tyrosin và 0,1g/L phenylalanin trong trường hợp KCCM10812) trong bình thót cổ 250ml với tỷ lệ thể tích 1/100 (thể tích) và được nuôi cấy ở 37°C cho đến khi đạt được OD. Thu gom các chủng được nuôi cấy bằng việc ly tâm và rửa một lần bằng 1xTE, và đo GFP trong đó bằng cách sử dụng Bộ đọc đa đĩa đa phương thức Synergy HT (Biotek, USA).

Các kết quả của phép đo được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. OD1 và OD3 trong Bảng 1 cho biết giá trị OD được đo ở 600nm sử dụng phổ kế tia cực tím mini-1240 (Shimadzu) sau khi pha loãng mỗi trong số các sản phẩm nuôi cấy đến nồng độ thích hợp.

Như được thể hiện trên FIG.1, trong trường hợp chủng W3110 kiểu dại, đối với P_{trp} as 1, cường độ tương đối của D_{trp}_att (bao gồm việc loại bỏ peptit dẫn đầu và đoạn suy giảm) là gấp khoảng 7 lần ở giá trị OD bằng 1 (OD1) và 10 lần ở giá trị OD bằng 3 (OD3), và cường độ tương đối của D_{trp}L bao gồm việc loại bỏ chỉ peptit dẫn đầu cao hơn gấp khoảng từ 1,5 đến 2 lần so với cường độ của vùng điều hòa kiểu dại (P_{trp}). Khi so sánh với trường hợp này, trong trường hợp chủng sản xuất L-tryptophan KCCM 10812P, đối với trường hợp của P_{trp} được lấy là 1, cường độ tương đối của D_{trp}_att (bao gồm việc loại bỏ peptit dẫn đầu và đoạn suy giảm) là gấp khoảng 19 lần ở giá trị OD bằng 1 (OD1) và 27 lần ở giá trị OD bằng 3 (OD3), và cường độ tương đối của D_{trp}L bao gồm việc loại bỏ chỉ peptit dẫn đầu cao hơn gấp khoảng 4 lần so với vùng điều hòa kiểu dại (P_{trp}). Các kết quả này cho biết rằng việc loại bỏ peptit dẫn đầu hoặc đoạn suy giảm dẫn đến việc gia tăng sự biểu hiện, thậm chí qua việc gia tăng sự biểu hiện này trong chủng kiểu dại là yếu hơn so với trong chủng sản xuất L-tryptophan.

Bảng 1

Chủng	Trình tự khởi đầu	Đo GFP (lần)	
		OD1	OD3
W3110	D _{trp} _att	6,5±0,7	9,6±1,1
	D _{trp} L	1,5±0,2	2,4±0,3
	P _{trp}	1	1
KCCM10812P	D _{trp} _att	18,9±1,3	27±2,0
	D _{trp} L	3,8±0,5	3,9±0,8
	P _{trp}	1	1

Ví dụ 3: Tạo cấu trúc vector có operon tryptophan (trpEDCBA) mà vùng điều hòa sự biểu hiện của chúng được thay thế

Dựa trên các kết quả của Ví dụ 2, để tạo cấu trúc chủng *E. coli* mà gen operon tryptophan của chúng được tăng cường bằng cách sử dụng vector, mảnh 6564bp (SEQ ID NO: 9) được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng bố mẹ *E. coli* KCCM10812P làm khuôn mẫu và các đoạn mồi 6 và 7 trong các điều kiện PCR được mô tả trên đây.

Mảnh ADN được khuếch đại được thu gom bằng cách sử dụng kit GeneAll^R ExpinTM GEL SV (Seoul, Korea), và sau đó được xử lý bằng enzym giới hạn EcoRV và *Hind*III. Để tạo dòng với mảnh ADN được tạo ra, mỗi trong số vector pCL-Dtrp_att-GFP, pCL-DtrpL_GFP và pCL-Ptrp_GFP được xử lý bằng EcoRV và *Hind*III để loại bỏ vùng GFP, nhờ đó thu được các mảnh 4291bp. Mỗi trong số các vector được tạo ra được nối bằng việc xen vào và sau đó được đưa vào *E. coli* DH5a nhờ sự biến nạp, nhờ đó tạo cấu trúc vector pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, pCL-DtrpL_trpEDCBA và pCL-Ptrp_trpEDCBA.

Đoạn mồi 6:

5' CCCGATATCATGCAAACACAAAAACCGAC 3' (SEQ ID NO: 16);

Đoạn mồi 7:

5' GGGAAGCTTAAAGGATCCGTGGGATTAAGTGC GCGTCGCCGCTTT
3' (SEQ ID NO: 17).

Ví dụ 4: Tạo cấu trúc vector mà vùng điều hòa sự biểu hiện của chúng được thay thế và có nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan (trpDCBA) loại trừ trpE

Để tạo cấu trúc vector bằng cách thay thế vùng GFP của các vector pCL-Dtrp_att-GFP, pCL-DtrpL_GFP và pCL-Ptrp_GFP được tạo ra trong Ví dụ 1 với trpDCBA, mỗi trong số các vector pCL Dtrp_att-GFP, pCL-DtrpL_GFP và pCL-

P_{trp}-GFP được xử lý bằng EcoRV và *Hind*III để loại bỏ vùng GFP, nhờ đó thu được các mảnh 4291bp.

Sau đó, để tạo cấu trúc chủng *E. coli* mà các gen *trp*DCBA của chúng chứa operon tryptophan được tăng cường bằng cách sử dụng vector, mảnh 5002-bp (SEQ ID NO: 10) được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng bố mẹ *E. coli* KCCM10812P làm khuôn mẫu và các đoạn môi 7 và 8.

Mảnh ADN được khuếch đại được thu gom bằng cách sử dụng kit GeneAll^R ExpinTM GEL SV (Seoul, Korea), và sau đó được xử lý bằng enzym giới hạn EcoRV và *Hind*III. Vector được tạo ra và vật xen được nối với nhau và sau đó được đưa vào *E. coli* DH5a nhờ sự biến nạp, nhờ đó tạo cấu trúc các vector pCL-D_{trp}-att-*trp*DCBA, pCL-D_{trp}L-*trp*DCBA và pCL-P_{trp}-*trp*DCBA.

Đoạn môi 8:

5' AAAGATATCATGGCTGACATTCTGCTGCT 3' (SEQ ID NO: 18).

Ví dụ 5: Tạo cấu trúc vector có số lượng bản sao gen operon tryptophan thấp có các vùng điều hòa sự biểu hiện khác nhau

Vector thông thường mà được biểu hiện với số lượng bản sao gen thấp trong *E. coli* là pCC1BAC (Epicentre, USA). Để biểu hiện gen operon tryptophan với số lượng bản sao thấp sử dụng vector này, pCL-D_{trp}-att-*trp*EDCBA, pCL-D_{trp}L-*trp*EDCBA, pCL-P_{trp}-*trp*EDCBA, pCL-D_{trp}-att-*trp*DCBA, pCL-D_{trp}L-*trp*DCBA và pCL-P_{trp}-*trp*DCBA được tạo ra trong các Ví dụ 3 và 4 được phân giải bằng enzym giới hạn *Hind*III.

Các mảnh ADN thu được được điện di trên agarosa, và sau đó cắt theo kích cỡ của chúng và thu hồi bằng cách sử dụng kit GeneAll^R ExpinTM GEL SV (Seoul, Korea). Tiếp theo, mỗi trong số các mảnh được nối bằng vector pCC1BAC (được phân giải ở vị trí *Hind*III), và sau đó được đưa vào *E. coli* DH5a bằng sự biến nạp.

Mỗi trong số các chủng được biến nạp được lấy mẫu thử trên môi trường dạng rắn LB Cm (LB + đĩa aga chloramphenicol), và các chủng có khả năng kháng Cm được chọn, nhờ đó tạo cấu trúc các vector pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA, pBAC-DtrpL_trpEDCBA, pBAC-Ptrp_trpEDCBA, pBAC-Dtrp_att-trpDCBA, pBAC-DtrpL_trpDCBA và pBAC-Ptrp_trpDCBA.

Ví dụ 6: Tạo cấu trúc chủng *E. coli* trong đó gen *pheA* được làm bất hoạt

Để tạo cấu trúc chủng gần với chủng sản xuất tryptophan từ chủng *E. coli* W3110 kiểu dại, gen *pheA* (gen NCBI ID: 12934467) mã hóa chorismat mutaza/prephenat dehydrataza (CM-PDT) được làm bất hoạt nhờ việc loại bỏ thông qua sự tái tổ hợp tương đồng. CM-PDT là enzym trong bước thứ nhất sản xuất phenylalanin từ chorismat và loại bỏ gen *pheA* được sử dụng để ức chế con đường sinh tổng hợp phenylalanin. Đối với việc loại bỏ này, phương pháp bất hoạt một bước (được phát triển bởi Datsenko KA et al.), kỹ thuật đột biến gen sử dụng recombinaza đỏ lambda, được sử dụng (Sự hoạt hóa một bước của gen nhiễm sắc thể trong *Escherichia coli* K-12 sử dụng các sản phẩm PCR, Datsenko KA, Wanner BL., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5). Để làm chất đánh dấu để xác nhận việc xen vào gen, gen kháng chloramphenicol của pUCprmfmloxP là được sử dụng (Công bố patent Hàn quốc số 2009-0075549).

Mảnh gen khoảng 1200bp được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng vector pUCprmfmloxP làm khuôn mẫu và các đoạn mồi 9 và 10, mà có phần gen *pheA* và phần trình tự nucleotit của gen kháng chloramphenicol của vector pUCprmfmloxP.

Đoạn mồi 9:

5'-

GGCCTCCCAAATCGGGGGGCCTTTTTTATTGATAACAAAAAGGCAACACT
AGGTGACACTATAGAACGCG - 3' (SEQ ID NO: 19);

Đoạn mồi 10:

5'-

AACAGCCCAATACCTTCATTGAACGGGTGATTTCCCCTAACTCTTTCAATT
AGTGGATCTGATGGGTACC -3' (SEQ ID NO: 20).

Mảnh ADN thu được bằng sự khuếch đại PCR được điện di trên gel agarosa 0,8% và sau đó được pha loãng và được sử dụng làm khuôn mẫu trong PCR thứ hai. PCR thứ hai được thực hiện sao cho các vùng 5' và 3' của mảnh ADN sơ cấp có 20 cặp bazơ nucleotit bổ sung. Ngoài ra, mảnh gen khoảng 1300bp được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng sản phẩm PCR sơ cấp được pha loãng và các đoạn mồi 11 và 12, mà bao gồm các vùng 5' và 3' của gen *pheA*. Mảnh ADN thu được được điện di trên gel agarosa 0,8% và sau đó được pha loãng và được sử dụng trong tái tổ hợp.

Đoạn mồi 11:

5'-

GAATGGGAGGCGTTTCGTCGTGTGAAACAGAATGCGAAGACGAACAATAA
GGCCTCCCAAATCGGGGGGC -3' (SEQ ID NO: 21);

Đoạn mồi 12:

5-

GGCACCTTTTCATCAGGTTGGATCAACAGGCACTACGTTCTCACTTGGGTA
ACAGCCCAATACCTTCATT -3' (SEQ ID NO: 22).

Theo phương pháp được phát triển bởi Datsenko KA et al., chủng W3110 *E. coli* được biến nạp với vectơ pKD46 được tạo ra ở trạng thái khả biến và sau đó được biến nạp với mảnh gen 1300bp thu được bằng PCR. Chủng có khả năng kháng với chloramphenicol được chọn trên môi trường LB. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi 13 và 14, và sản phẩm khuếch đại PCR có kích cỡ khoảng 2500bp, cho biết rằng gen *pheA* được loại bỏ trong chủng.

Đoạn mồi 13:

5'- TTGAGTGTATCGCCAACGCG -3' (SEQ ID NO: 23);

Đoạn môi 14:

5'- AAAGCCGCGTGTATTGCGT -3' (SEQ ID NO: 24).

Vector pKD46 được loại bỏ ra khỏi chủng tái tổ hợp sơ cấp có khả năng kháng chloramphenicol và sau đó vector pJW168 được đưa vào chủng và gen đánh dấu chloramphenicol được loại bỏ ra khỏi chủng (Gene, (2000) 247,255-264). Chủng thu được là sản phẩm khuếch đại khoảng 500bp thu được bằng PCR sử dụng các đoạn môi 13 và 14, cho biết rằng việc loại bỏ gen đích đạt được. Chủng được tạo cấu trúc được đặt tên là “*E. coli* W3110 trpΔ1”.

Ví dụ 7: Tạo cấu trúc của chủng *E. coli* mà từ đó gen *tnaAB* được làm bất hoạt

Từ chủng *E. coli* W3110 trpΔ1 được tạo cấu trúc trong Ví dụ 6, *tnaAB* operon (gen NCBI ID: 12933600, 12933602) gồm có gen *tnaA* mã hóa tryptophanaza và gen *tnaB* mã hóa gen nhập tryptophan được loại bỏ bằng việc tái tổ hợp đồng nhất. Do việc loại bỏ này, con đường thoái hóa tryptophan sau khi sản xuất của nó có thể được cản trở và dòng tryptophan mà được tiết vào môi trường ngấm vào tế bào có thể được ngăn ngừa, nhờ đó tác động đến các đặc tính của chủng sản xuất tryptophan. Đối với việc loại bỏ này, mảnh gen khoảng 1200bp được khuếch đại bằng PCR theo cùng cách như được mô tả trong Ví dụ 6 sử dụng vector pUCprmfloxP làm khuôn mẫu cùng với các đoạn môi 15 và 16, mà có phần gen *tnaAB* và phần trình tự nucleotit của gen kháng chloramphenicol của vector pUCprmfloxP. Ngoài ra, mảnh ADN thu được bằng việc khuếch đại PCR còn được khuếch đại bằng PCR theo cùng cách như được mô tả trong Ví dụ 6 bằng cách sử dụng các đoạn môi 17 và 18, nhờ đó thu được mảnh gen 1300bp.

Đoạn môi 15:

5'-

TTAGCCAAATTTAGGTAACACGTTAAAGACGTTGCCGAACCAGCACAAAA
AGGTGACACTATAGAACGCG - 3' (SEQ ID NO: 25);

Đoạn mồi 16:

5'-

ATGAAGGATTATGTAATGGAAAACCTTTAAACATCTCCCTGAACCGTTCCGT
AGTGGATCTGATGGGTACC -3' (SEQ ID NO: 26);

Đoạn mồi 17:

5'-

TGATTTCTGAGAGGCAAGAAGCCAGCGAATGGCTGGCTTCTTGAAGGAT
TTAGCCAAATTTAGGTAACA -3' (SEQ ID NO: 27);

Đoạn mồi 18:

5'-

AATCGGTATAGCAGATGTAATATTCACAGGGATCACTGTAATTAAAATAA
ATGAAGGATTATGTAATGGA -3' (SEQ ID NO: 28).

Để loại bỏ các gen *tnaAB*, chủng *E. coli* W3110 trpΔ1 mà vector pKD46 được đưa vào được tạo ra khả biến được tạo cấu trúc theo cùng cách được mô tả trong Ví dụ 6, và sau đó mảnh gen 1300bp thu được bằng PCR được biến nạp vào chủng *E. coli*. Chủng này có khả năng kháng với chloramphenicol được chọn trên môi trường LB. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi 19 và 20, và sản phẩm khuếch đại PCR có kích cỡ khoảng 5400bp, chỉ ra rằng gen *tnaAB* được loại bỏ trong chủng này.

Đoạn mồi 19:

5'- CGGGATAAAGTAAAACCAGG -3' (SEQ ID NO: 29);

Đoạn mồi 20:

5'- CGGCGAAGGTAAGTTGATGA -3' (SEQ ID NO: 30).

Vector pKD46 được loại bỏ ra khỏi chủng tái tổ hợp sơ cấp có khả năng kháng chloramphenicol theo phương pháp tương tự như được mô tả trong Ví dụ 6, và sau đó gen đánh dấu chloramphenicol được loại bỏ ra khỏi chủng. Chủng thu được là sản phẩm khuếch đại khoảng 550bp thu được bằng PCR sử dụng các đoạn mồi 19 và 20, chỉ ra rằng việc loại bỏ gen mong muốn là đạt được. Chủng được tạo cấu trúc được đặt tên là “*E. coli* W3110 trpΔ2”.

Ví dụ 8: Nhận biết khả năng sản xuất L-tryptophan của các chủng có operon tryptophan có các kiểu biểu hiện khác nhau

Các chủng *E. coli* được biến nạp với các vector được tạo ra theo các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ 3, 4 và 5. Các tác dụng của biến thể *E. Coli* được đánh giá bằng cách sử dụng W3110 trpΔ2 được tạo ra trong các Ví dụ 6 và 7 làm chủng bố mẹ và nguồn cacbon của nó là glucoza.

Để đánh giá độ chuẩn, mỗi chủng được cấy bằng vòng platin và được nuôi cấy qua đêm trên môi trường dạng rắn LB. Sau đó, một vòng platin của mỗi chủng được cấy vào 25mL môi trường chứa glucoza, thành phần của môi trường được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Sau khi cấy, mỗi chủng được ủ ở 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Tất cả các kết quả được ghi là giá trị trung bình của các kết quả từ ba bình thốt cổ.

Bảng 2

Chế phẩm	Nồng độ (/lit)
Glucosa	2g
KH ₂ PO ₄	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12g
NaCl	1g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	5g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1g
MnSO ₄ ·H ₂ O	15mg

CuSO ₄ ·H ₂ O	3mg
ZnSO ₄ ·H ₂ O	30mg
Natri xitrat	1g
Dịch chiết nấm men	1g
Phenylalanin	0,15g
Độ pH	6,8

Bảng 3

Chủng bố mẹ		Vector		L-tryptophan (g/L)**	Anthranilat (mg/L)**
W3110 Δ2	trp	pCL1920	pCC1BAC	0,1	13
		pCL-Ptrp_trpEDCB A	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	0,4	56
			pBAC-DtrpL_trpEDCBA	0,4	53
			pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	0,5	61
		pCL-DtrpL_trpED CBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	0,4	68
			pBAC-DtrpL_trpEDCBA	0,5	73
			pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	0,4	74
		pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	0,6	89
			pBAC-DtrpL_trpEDCBA	0,5	95
			pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	0,7	98

		trpEDCBA		
	pCL-Ptrp-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	0,5	34
		pBAC-DtrpL_trpEDCBA	0,6	35
		pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	0,6	40
	pCL-DtrpL-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpDCBA	0,5	45
		pBAC-DtrpL_trpDCBA	0,5	42
		pBAC-Dtrp_att-trpDCBA	0,6	38
	pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpDCBA	0,7	36
		pBAC-DtrpL_trpDCBA	0,8	28
		pBAC-Dtrp_att-trpDCBA	1,0	29

Như có thể được nhìn thấy từ các kết quả trong Bảng 3 trên đây, trong trường hợp trong đó chủng bố mẹ *E. coli* W3110 trp Δ 2 được biến nạp với tổ hợp của các vector khác nhau, nếu chỉ có operon tryptophan được tăng cường một cách liên tục, thì không có tác dụng tích cực nào lên hiệu suất sản xuất của tryptophan được xuất hiện trong khi anthranilat được tích tụ. Trái lại, chủng được cải biến để làm tăng cường Trp operon và trpDCBA thể hiện tác dụng tích cực lên hiệu suất sản xuất tryptophan cùng với việc giảm sự tích tụ của anthranilat, so với chủng trong đó chỉ có operon tryptophan được tăng cường. Do đó, được xác nhận rằng việc giảm sự tích tụ của anthranilat là cách có hiệu quả để làm tăng hiệu suất sản xuất L-tryptophan trong chủng sản xuất tryptophan.

Ví dụ 9: Nhận dạng sản lượng L-tryptophan của chủng có operon tryptophan có các mẫu biểu hiện khác nhau

Các vector được tạo cấu trúc theo các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ 3, 4 và 5 được đưa vào chủng bố mẹ sản xuất L-tryptophan *E. coli* KCCM10812P theo tổ hợp được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây. Độ chuẩn của các chủng được đánh giá bằng cách sử dụng glucoza làm nguồn cacbon. Kết quả là, dường như rằng không chỉ có sự tăng cường trpDCBA, mà cũng có sự tăng cường operon tryptophan, là quan trọng, tương tự với các kết quả của Ví dụ 8. Do đó, tác dụng đối với các chủng sản xuất tryptophan được đánh giá.

Để đánh giá độ chuẩn, mỗi chủng được cấy bằng vòng platin và được nuôi cấy qua đêm trên môi trường dạng rắn LB. Sau đó, một vòng platin của mỗi chủng được cấy vào 25mL môi trường chứa glucoza, thành phần của môi trường được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây. Sau khi cấy, mỗi chủng được ủ ở 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây. Tất cả các kết quả được ghi là giá trị trung bình của các kết quả từ ba bình thốt cổ.

Bảng 4

Chế phẩm	Nồng độ (/lít)
Glucoza	60g
K ₂ HPO ₄	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10g
NaCl	1g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1g
Natri xitrat	5g
Dịch chiết nấm men	2g
Canxi carbonat	40g
Natri xitrat	5g
Phenylalanin	0,15g
Tyrosin	0,1g
Độ pH	6,8

Bảng 5

Vector		OD	Sự tiêu thụ glucoza (g/L)*	L-tryptophan (g/L)**	Anthranilat (mg/L)**
pCL	pBAC				
pCL1920	pCC1BAC	13,5	53,0	7,0	1005
pCL-Ptrp_trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	14,0	52,1	7,2	1053
	pBAC-DtrpL_trpEDCBA	14,2	51,0	7,5	1157
	pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	13,8	52,6	7,1	1263
pCL-DtrpL_trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	13,9	50,0	7,5	1170
	pBAC-DtrpL_trpEDCBA	13,7	51,6	7,3	1290
	pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	13,6	49,8	7,8	1485
pCL-Ptrp_att-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpEDCBA	13,8	49,8	7,5	1358
	pBAC-DtrpL_trpEDCBA	13,1	47,6	7,6	1501
	pBAC-Dtrp_att-trpEDCBA	12,7	45,3	7,5	1853
pCL-Ptrp_trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpDCBA	14,2	52,1	7,5	950
	pBAC-DtrpL_trpDCBA	14,6	51,3	7,2	813
	pBAC-Dtrp_att-	14,3	52,7	7,1	687

	trpDCBA				
pCL-DtrpL_trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpDCBA	13,9	50,6	7,5	953
	pBAC-DtrpL_trpDCBA	13,7	51,7	7,6	852
	pBAC-Dtrp_att-trpDCBA	13,6	51,3	7,7	715
pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	pBAC-Ptrp_trpDCBA	13,2	51,6	8,0	1085
	pBAC-DtrpL_trpDCBA	13,9	50,9	8,6	867
	pBAC-Dtrp_att-trpDCBA	13,5	51,2	9,5	783

* được đo ở 33 giờ

** được đo ở 48 giờ

Như có thể được nhìn thấy từ các kết quả trong Bảng 5 trên đây, trong trường hợp mà trong đó chủng bố mẹ *E.coli* KCCM10812P được biến nạp với tổ hợp của các vector khác nhau, nếu chỉ có operon tryptophan được tăng cường một cách liên tục, không có tác dụng tích cực lên hiệu suất sản xuất tryptophan xuất hiện trong khi anthranilat được tích tụ. Trái lại, rõ ràng là chủng được cải biến bằng cách làm tăng cường operon bằng cách sử dụng vector pCL và làm tăng cường trpDCBA bằng cách sử dụng vector pBAC thể hiện tác dụng tích cực lên hiệu suất sản xuất tryptophan cùng với việc làm giảm sự tích tụ của anthranilat, được so với chủng mà trong đó chỉ có operon tryptophan được tăng cường. Do đó, được xác nhận rằng việc giảm sự tích tụ của anthranilat là con đường hữu hiệu để làm tăng hiệu suất sản xuất L-tryptophan trong chủng sản xuất tryptophan.

Ví dụ 10: Tạo cấu trúc chủng trong đó số lượng bản sao của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA trong nhiễm sắc thể được gia tăng và sự tích tụ anthranilat giảm

Dựa trên các kết quả của Ví dụ 9, để gia tăng số lượng bản sao của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA trong nhiễm sắc thể, vector được tạo cấu trúc.

Cụ thể là, pCL-Dtrp_att-trpDCBA được mô tả trong Ví dụ 5 được phân cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI* và *BamHI* để thu được Dtrp_att-trpDCBA, và sau đó được nối với pINT17E được xử lý bằng cùng các enzym giới hạn, nhờ đó thu được pINT17E-Patt-trpDCBA. Để đưa pINT17E-Patt-trpDCBA vào chủng bố mẹ sản xuất tryptophan *E. coli* KCCM10812P để làm tăng số lượng bản sao của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA, pKD46 mà được sử dụng trong phương pháp bất hoạt một bước (được phát triển bởi Datsenko KA et al.), kỹ thuật đột biến gen bằng cách sử dụng recombinaza đỏ lambda, theo Ví dụ 6. Đối với chất đánh dấu để xác nhận việc xen vào gen, gen kháng chloramphenicol của pUCprmflox_C được sử dụng. Cụ thể là, chủng bố mẹ, mà trong đó pKD46 được xen vào, được biến nạp với pINT17E-Patt-trpDCBA, và sau đó được nuôi cấy ở 37°C trong từ 1 đến 2 ngày để thu được các khuẩn lạc. Để xác nhận nếu pINT17E-Patt-trpDCBA được xen một cách chính xác vào nhiễm sắc thể của khuẩn lạc thu được, mảnh khoảng 2000-bp được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi 21 và 22.

Đoạn mồi 21:

5' TATTGCTGTCACGAGCAGG 3' (SEQ ID NO: 31);

Đoạn mồi 22:

5' AGTTCCGGCATAACAACCGGCTT 3' (SEQ ID NO: 32).

pKD46 được loại bỏ khỏi chủng tái tổ hợp sơ cấp có khả năng kháng chloramphenicol và sau đó plasmit pJW168 được đưa vào để loại bỏ gen đánh dấu chloramphenicol ra khỏi chủng (Gene, (2000) 247, 255-264). Sản phẩm gen khuếch đại khoảng 5000-bp thu được bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi 23 và 24, và

sản phẩm khuếch đại khoảng 6500-bp thu được bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi 25 và 26, đã chứng tỏ rằng trpDCBA được đặt liên tục sau operon tryptophan mà đặt theo cách nội sinh lên nhiễm sắc thể. Chúng này được gọi là “KCCM10812P/trpDCBA”.

Đoạn mồi 23:

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' (SEQ ID NO: 33);

Đoạn mồi 24:

5' CTGTTGGGCGGAAAAATGAC 3' (SEQ ID NO: 34);

Đoạn mồi 25:

5' TGATCGCCAGGGTGCCGACG 3' (SEQ ID NO: 35);

Đoạn mồi 26:

5' CCCTATAGTGAGTCGTATTA 3' (SEQ ID NO: 36).

Để xen tiếp một bản sao vào chủng được tạo ra trên đây trong đó số lượng bản sao của trpDCBA được gia tăng, pKD46 được đưa vào chủng KCCM10812P/trpDCBA được tạo ra trên đây. Sau đó, vector pINT17E-Patt-trpDCBA được đưa vào KCCM10812P/trpDCBA/pKD46, nhờ đó tạo cấu trúc chủng có hai bản sao trpDCBA được xen vào nhiễm sắc thể. Chủng được tạo cấu trúc này được gọi là “KCCM10812P/2trpDCBA”. Chủng này được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật của Hàn quốc (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea), Cơ quan lưu giữ quốc tế, vào ngày 29 tháng 12 năm 2011 với số lưu giữ KCCM11246P.

Ví dụ 11: Thử nghiệm tác dụng của chủng sản xuất L-tryptophan có hoạt tính protein được gia tăng mà được mã hóa bởi nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA

Theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 10, độ chuẩn của KCCM10812P/trpDCBA được đánh giá bằng cách sử dụng glucoza làm nguồn cacbon.

KCCM10812P/trpDCBA thu được bằng cách đưa tiếp trpDCBA vào chủng sản xuất tryptophan *E. coli* KCCM10812P để làm tăng cường hoạt tính của một số enzym của con đường sinh tổng hợp tryptophan.

Để đánh giá độ chuẩn, mỗi chủng được cấy bằng vòng platin và được nuôi cấy qua đêm trên môi trường dạng rắn LB. Sau đó, một vòng platin của mỗi chủng được cấy vào 25mL môi trường chứa glucoza, thành phần của môi trường được thể hiện trong Bảng 4 ở trên. Sau khi cấy, mỗi chủng được ủ ở 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Tất cả các kết quả được ghi là giá trị trung bình của các kết quả từ ba bình thốt cổ.

Bảng 6

Chủng	OD	Sự tiêu thụ glucoza (g/L)*	L-tryptophan (g/L)**	Anthranilat (mg/L)
KCCM10812P	14,0	54,0	7,2	1020
KCCM10812P/ trpDCBA	14,5	54,5	7,9	630
KCCM10812P/2 trpDCBA	13,3	55,2	8,2	320

* được đo ở 33 giờ

** được đo ở 48 giờ

Như có thể được nhìn thấy trong Bảng 6 trên đây, khi một bản sao của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA được xen vào nhiễm sắc thể, thì nồng độ của anthranilat được giảm 39% so với nồng độ của chủng bố mẹ. Tuy nhiên, hai bản sao được xen vào nhiễm sắc thể, nồng độ của anthranilat được giảm 69% so với nồng độ trong chủng bố mẹ.

Ngoài ra, nồng độ của L-tryptophan trong hai chủng lần lượt được tăng 10% và 13%. Như được thể hiện trong Bảng 6 trên đây, khi số lượng bản sao của trpDCBA được gia tăng, thì tốc độ tiêu thụ glucoza được giảm một cách không đáng kể trong

một số trường hợp, nhưng sự tăng cường của nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan có tác dụng tích cực lên sự gia tăng về nồng độ của L-tryptophan và giảm nồng độ anthranilat.

Trong khi sáng chế được mô tả kèm tham chiếu đến các phương án minh họa cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà sáng chế liên quan có thể hiểu rằng sáng chế được bao gồm ở dạng cụ thể khác mà không tách rời đặc điểm thiết yếu của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả trên đây được xét đến là minh họa trong tất cả các khía cạnh và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, tốt hơn là phần mô tả chi tiết và sẽ được hiểu rằng tất cả các biến đổi và biến thể nhận được từ các nghĩa và phạm vi của sáng chế và các thể tương đương của nó được bao gồm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Số lưu giữ

Cơ quan có thẩm quyền lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh Hàn quốc (quốc tế)

Số lưu giữ : KCCM11246P

Ngày lưu trữ: ngày 29 tháng 12 năm 2011

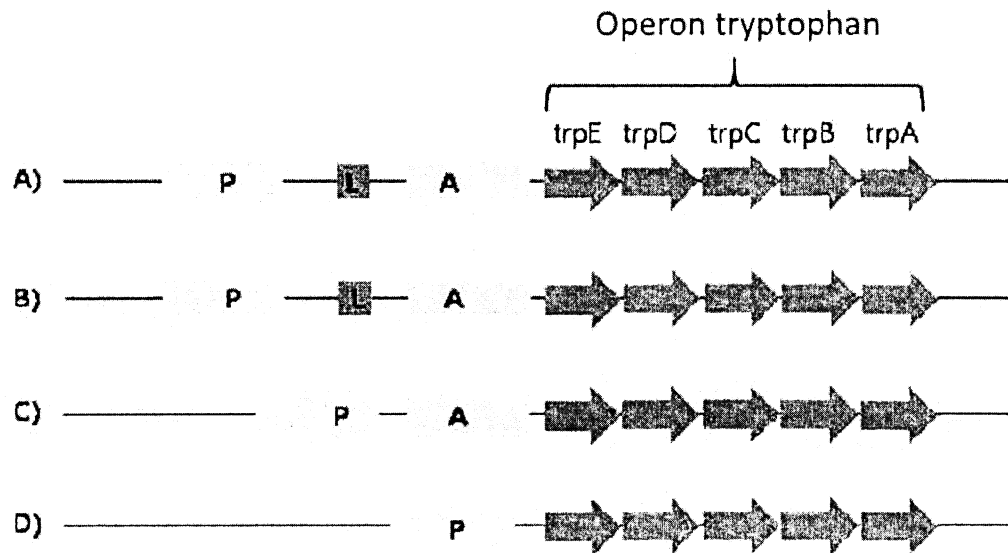
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng *Escherichia coli* tái tổ hợp có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường, trong đó chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh và để tăng cường hơn nữa hoạt tính của các protein mà được mã hóa bởi nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA.
2. Chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp còn được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ vùng suy giảm nội sinh có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1.
3. Chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA mã hóa các protein có trình tự axit amin lần lượt được biểu thị bởi các SEQ ID NO: 37, 38, 39 và 40.
4. Chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp theo điểm 3, trong đó hoạt tính của các protein được tăng cường bằng phương pháp làm tăng số lượng bản sao gen trong nhiễm sắc thể hoặc nội bào mã hóa các protein, phương pháp thay thế vùng điều hòa sự biểu hiện của gen trên nhiễm sắc thể bằng trình tự khởi đầu mạnh, hoặc phương pháp cải biến vùng điều hòa sự biểu hiện thành vùng điều hòa sự biểu hiện có hoạt tính được tăng cường.
5. Phương pháp sản xuất L-tryptophan, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản xuất L-tryptophan được tăng cường, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ peptit dẫn đầu có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 trên operon tryptophan nội sinh của vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* và để tăng cường hơn nữa hoạt tính của các protein mà được mã hóa bởi nhóm gen sinh tổng hợp tryptophan trpDCBA

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp còn được cải biến để làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ vùng suy giảm nội sinh có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 trong vùng điều hòa sự biểu hiện có trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Escherichia* là chủng *E. coli*.

Fig. 1



P: Trình tự khởi đầu; L: peptit dẫn đầu; A: đoạn suy giảm

Fig. 2

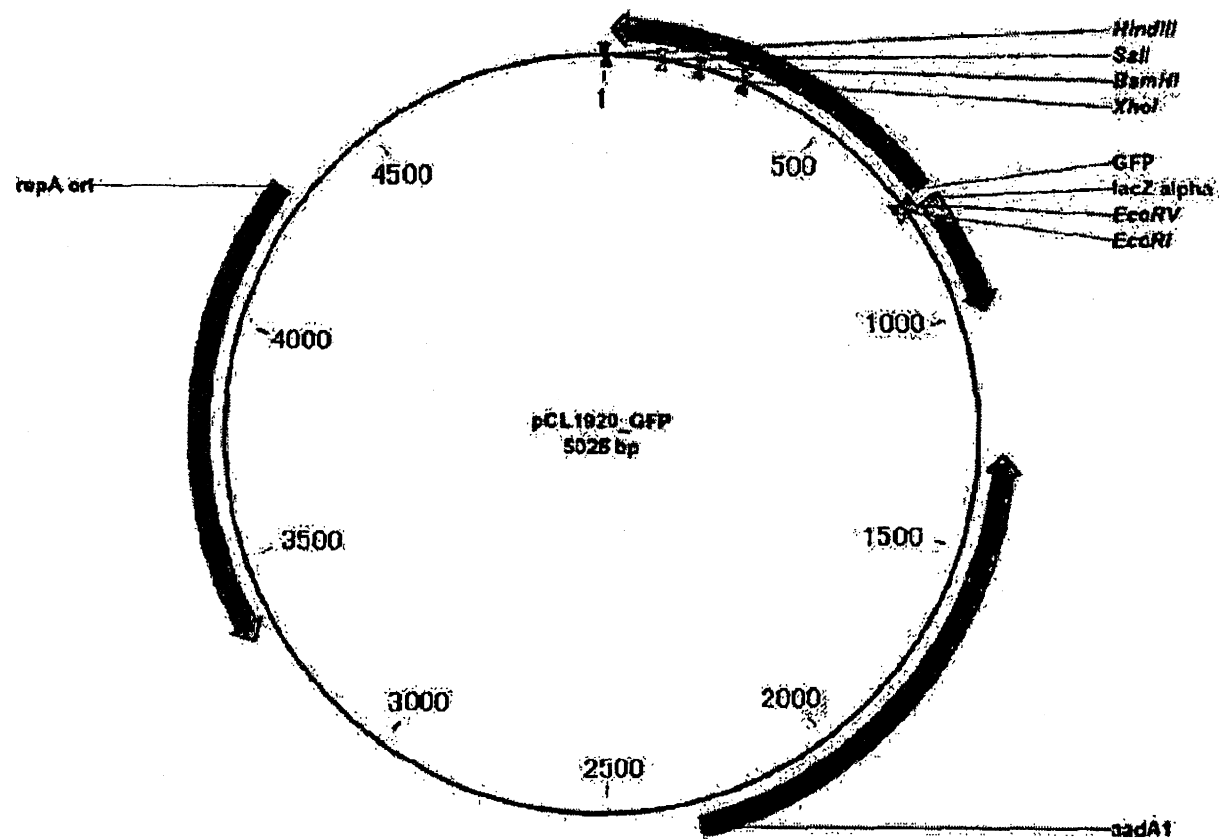
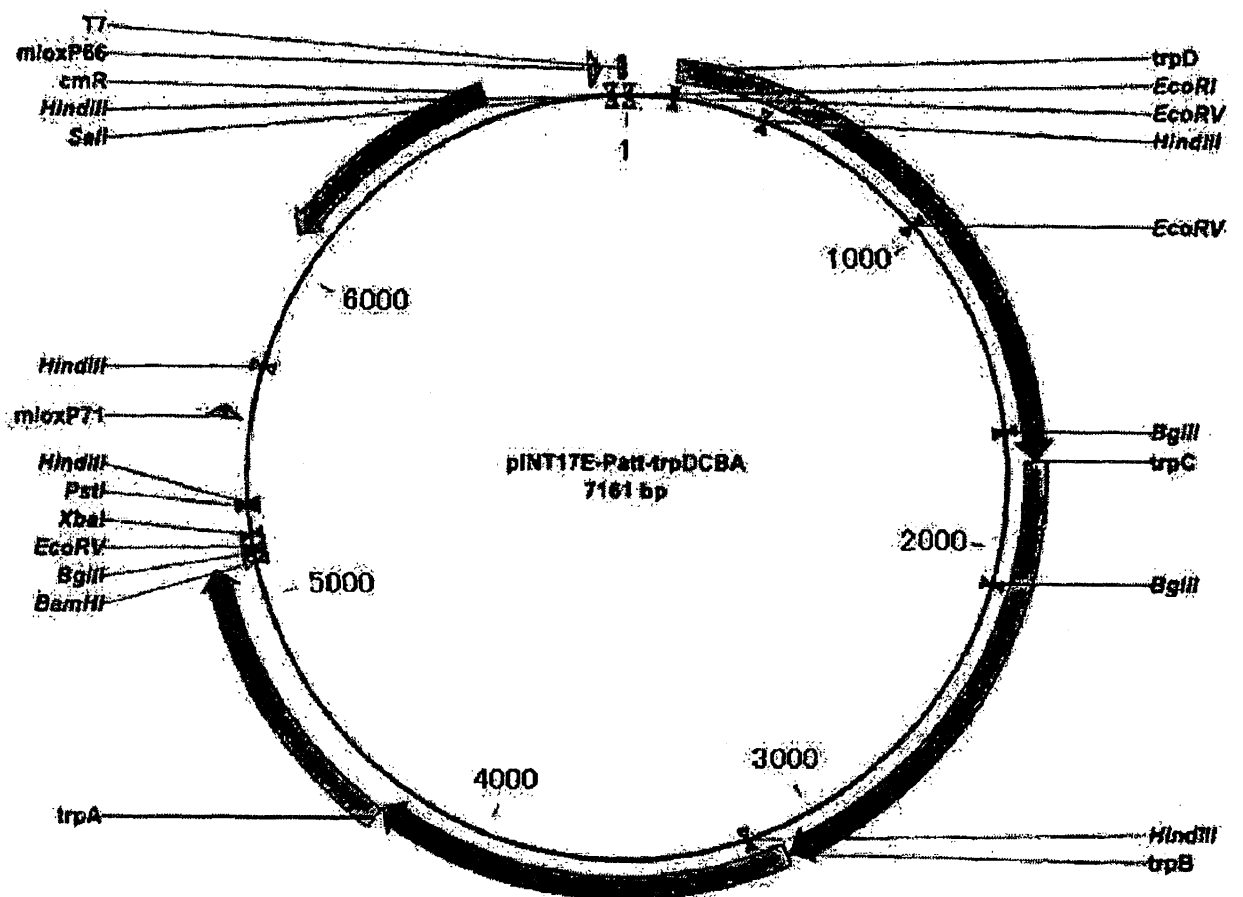


Fig. 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ Cheiljedang Corporation	
<120>	CHỦNG <i>ESCHERICHIA COLI</i> CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT L-TRYPTOPHAN ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-TRYPTOPHAN SỬ DỤNG CHỦNG VI SINH VẬT NÀY	
<130>	PCT-KR2013-000214	
<150>	10-2012-0002906	
<151>	2012-01-10	
<160>	40	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	273	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	1	
	ggcgcactcc cggtctggat aatgtttttt ggcgcgacat cataacgggt ctggcaaata	60
	ttctgaaatg agctgttgac aattaatcat cgaactagtt aactagtacg caagttcacg	120
	taaaaagggt atcgacaatg aaagcaattt tcgtactgaa aggttggtgg cgcacttcct	180
	gaaacgggca gtgtattcac catgcgtaaa gcaatcagat acccagcccg cctaattgagc	240
	gggctttttt ttgaacaaaa ttagagaata aca	273
<210>	2	
<211>	45	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	2	
	atgaaagcaa ttttcgtact gaaaggttgg tggcgcactt cctga	45
<210>	3	
<211>	91	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	3	
	aacgggcagt gtattcacca tgcgtaaagc aatcagatac ccagcccgcc taatgagcgg	60
	gctttttttt gaacaaaatt agagaataac a	91
<210>	4	

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 4
 Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Thr Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 245
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của DtrpL

<400> 5
 ttaggtaccg gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacgggtc 60
 tggcaaatat tctgaaatga gctggtgaca attaatcatc gaactagtta actagtagcg 120
 aagttcacgt aaaaagggtg tgcacaacgg gcagtgtatt caccatgcgt aaagcaatca 180
 gatacccagc ccgcctaatt agcgggcttt tttttgaaca aaattagaga ataacagata 240
 tcatt 245

<210> 6
 <211> 148
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của Dtrp_att

<400> 6
 ttaggtaccg gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacgggtc 60
 tggcaaatat tctgaaatga gctggtgaca attaatcatc gaactagtta actagtagcg 120
 aagttcacgt aaaaagggtg atatcatt 148

<210> 7
 <211> 290
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự của Ptrp

<400> 7
 ttaggtaccg gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc 60
 tggcaaatat tctgaatgag ctgttgacaa ttaatcatcg aactagttaa ctagtacgca 120
 agttcacgta aaaaggggat cgacaatgaa agcaattttc gtactgaaag gttgggtggcg 180
 cacttcctga aacgggcagt gtattcacca tgcgtaaagc aatcagatac ccagcccgcc 240
 taatgagcgg gctttttttt gaacaaaatt agagaataac agatatcatt 290

<210> 8
 <211> 5025
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự của pCL1920GFP

<400> 8
 aagcttttcg atcccttatt tgtagagctc atccatgcca tgtgtaatcc cagcagcagt 60
 tacaaaactca agaaggacca tgtggtcacg cttttcgttg ggatctttcg aaagggcaga 120
 ttgtgtcgac aggtaatggg tgtctggtaa aaggacaggg ccatcgccaa ttggagtatt 180
 ttgttgataa tgggtctgcta gttgaacgga tccatcttca atgttgtggc gaattttgaa 240
 gttagctttg attccattct tttgtttgtc tgccgtgatg tatacattgt gtgagttata 300
 gttgtactcg agtttgtgtc cgagaatgtt tccatcttct ttaaaatcaa taccttttaa 360
 ctcgatacga ttaacaaggg tatcaccttc aaacttgact tcagcacgcg tcttgtagtt 420
 cccgtcatct ttgaaagata tagtgcgctc ctgtacataa ccttcgggca tggcactctt 480
 gaaaaagtca tgccgtttca tatgatccgg ataacgggaa aagcattgaa caccataaga 540
 gaaagtagtg acaagtgttg gccatggaac aggtagtttt ccagtagtgc aaataaattt 600
 aagggttaagt tttccgtatg ttgcatcacc ttcaccctct ccaactgacag aaaatttgtg 660
 cccattaaca tcaccatcta attcaacaag aattgggaca actccagtga aaagttcttc 720
 tcctttactc atgatatcgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc 780
 gtgactggga aaaccctggc gttaccaaac ttaatcgctt tgcagcacat ccccttttcg 840
 ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc ttccaacag ttgcgagcc 900
 tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac 960

accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc	1020
gacacccgcc aacacccgct gacgagctta gtaaagccct cgctagattht taatgcggat	1080
gttgcgatta cttcgccaac tattgcgata acaagaaaaa gccagccttht catgatatat	1140
ctcccaattht gtgtagggct tattatgcac gcttaaaaaat aataaaagca gacttgacct	1200
gatagtttggt ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcactta acgcttgagt taagccgcgc	1260
cgcgaaagcgg cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ccttggtgat	1320
ctcgccttht acgtagtggg caaatctctc caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc	1380
ttcttcttgt ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat actgggcccgg	1440
caggcgctcc attgcccagt cggcagcgac atccttcggc gcgattttgc cggttactgc	1500
gctgtaccaa atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag ccagtcggg	1560
cggcgagttc catagcgtha aggtttcatt tagcgctca aatagatcct gttcaggaac	1620
cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgctatgtt ctcttgcttht	1680
tgtcagcaag atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac ctgcaagaat	1740
gtcattgcgc tgccattctc caaatgcag ttcgcgctta gctggataac gccacggaat	1800
gatgtcgctg tgcacaacaa tggtgacttc tacagcgcgg agaatctgc tctctccagg	1860
ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctgc cgcgttgtht catcaagcct	1920
tacggtcacc gtaaccagca aatcaatatc actgtgtggc ttcaggccgc catccactgc	1980
ggagccgtac aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga tgacgccaac	2040
tacctctgat agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct tccctcatga tgtttaactt	2100
tgttttaggg cgactgcctt gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca tcaaacatcg	2160
acccacggcg taacgcgctt gctgcttgga tgcccaggc atagactgta ccccaaaaaa	2220
acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgtha ccaccgctgc gttcggthca	2280
ggttctggac cagttgcgtg agcgcatacg ctacttgcat tacagcttac gaaccgaaca	2340
ggcttatgtc cactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggaac	2400
cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtcctggctg gcgaacgagc gcaaggtht	2460
ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg	2520
cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcg ccgtcgcggc gcttgccggt	2580

ggtgctgacc ccggatgaag tggttcgcac cctcgggttt ctggaaggcg agcatcgttt	2640
gttcgcccag cttctgtatg gaacgggcat gcggatcagt gagggtttgc aactgcgggt	2700
caaggatctg gatttcgatc acggcacgat catcgctgcg gagggcaagg gctccaagga	2760
tcgggccttg atgttaccg agagcttggc acccagcctg cgcgagcagg ggaattaatt	2820
cccacgggtt ttgctgcccg caaacgggct gttctggtgt tgctagtttg ttatcagaat	2880
cgcagatccg gcttcagccg gtttgccggc tgaaagcgct atttcttcca gaattgccat	2940
gattttttcc ccacgggagg cgtcactggc tcccgtgttg tcggcagctt tgattcgata	3000
agcagcatcg cctgtttcag gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtaac aagttgtctc	3060
aggtgttcaa tttcatgttc tagttgcttt gttttactgg ttccacctgt tctattaggt	3120
gttacatgct gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc tttgaatgca	3180
ccaaaaactc gtaaaagctc tgatgtatct atctttttta caccgttttc atctgtgcat	3240
atggacagtt ttccctttga tatgtaacgg tgaacagttg ttctactttt gtttgtagt	3300
cttgatgctt cactgataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatttagc	3360
cagtatgttc tctagtgtgg ttcgttgttt ttgcgtgagc catgagaacg aaccattgag	3420
atcatactta ctttgcatgt cactcaaaaa ttttgcttca aaactgggtga gctgaatttt	3480
tgcagttaaa gcatcgtgta gtgtttttct tagtccgtta tgtaggtagg aatctgatgt	3540
aatggttgtt ggtattttgt caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa gttcgggttac	3600
gagatccatt tgtctatcta gttcaacttg gaaaatcaac gtatcagtcg ggcggcctcg	3660
cttatcaacc accaatttca tattgctgta agtggtttaa tctttactta ttggtttcaa	3720
aaccatttgg ttaagccttt taaactcatg gtagttattt tcaagcatta acatgaactt	3780
aaattcatca aggctaactc ctatatattgc cttgtgagtt ttcttttgtg ttagttcttt	3840
taataaccac tcataaatcc tcatagagta tttgttttca aaagacttaa catgttccag	3900
attatatattt atgaattttt ttaactggaa aagataaggc aatatctctt cactaaaaac	3960
taattctaatt ttttcgcttg agaacttggc atagtttgtc cactggaaaa tctcaaagcc	4020
tttaaccaa ggattcctga tttccacagt tctcgtcatc agctctctgg ttgctttagc	4080
taatacacca taagcatttt ccctactgat gttcatcatc tgagcgtatt gggtataagt	4140
gaacgatacc gtccgttctt tcctttagg gttttcaatc gtgggggttga gtagtgccac	4200

acagcataaa attagcttgg tttcatgctc cgtaaagtca tagcgactaa tcgctagttc 4260
 atttgctttg aaaacaacta attcagacat acatctcaat tgggtctaggt gatthtaate 4320
 actataccaa ttgagatggg ctagtcaatg ataattacta gtccttttcc tttgagttgt 4380
 gggatatctgt aaattctgct agacctttgc tggaaaactt gtaaattctg ctagaccctc 4440
 tgtaaattcc gctagacctt tgtgtgtttt ttttgtttat attcaagtgg ttataattta 4500
 tagaataaag aaagaataaa aaaagataaa aagaatagat cccagccctg tgtataactc 4560
 actacttttag tcagttccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt ttgctcctct 4620
 acaaaacaga ccttaaaacc ctaaaggctt aagtagcacc ctgcgaagct cgggcaaate 4680
 gctgaatatt ccttttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt tttcgtgaca 4740
 ttcagttcgc tgcgctcacg gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgcc 4800
 ttttatggat tcatgcaagg aaactacca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct 4860
 cagggcgttt tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct gttcagcagt 4920
 tcctgccttc tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag gtcattcaga 4980
 ctggctaattg caccagtaa ggcagcggta tcatcaacag gctta 5025

<210> 9
 <211> 6564
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 9
 cccgatatca tgcaaacaca aaaaccgact ctgcaactgc taacctgcga aggcgcttat 60
 cgcgacaatt ccaccgcgct ttttcaccag ttgtgtgggg atcgtccggc aacgctgctg 120
 ctggaatccg cagatatcga cagcaaagat gatttaaaaa gcctgctgct ggtagacagt 180
 gcgctgcgca ttacagcttt aggtgacact gtcacaatcc aggcactttc cggcaacggc 240
 gaagccctcc tggcactact ggataacgcc ctgcctgcgg gtgtggaaag tgaacaatca 300
 ccaaactgcc gtgtgctgcg cttccccct gtcagtccac tgctggatga agacgcccgc 360
 ttatgctccc tttcggtttt tgacgctttc cgtttattgc agaactctgtt gaatgtaccg 420
 aaggaagaac gagaagccat gttcttcggc ggctgttct cttatgacct tgtggcggga 480
 tttgaagatt taccgcaact gtcagcggaa aataactgcc ctgatttctg tttttatctc 540

gctgaaacgc tgatggtgat tgaccatcag aaaaaaagca cccgtattca ggccagcctg	600
tttgctccga atgaagaaga aaaacaacgt ctactgctc gcctgaacga actacgtcag	660
caactgaccg aagccgcgcc gccgctgcca gtggtttccg tgccgcatat gcgttgtgaa	720
tgtaatcaga gcgatgaaga gttcggtggc gtagtgcggt tggtgcaaaa agcgattcgc	780
gctggagaaa ttttccaggt ggtgccatct cgccgtttct ctctgccctg cccgtcaccg	840
ctggcggcct attacgtgct gaaaaagagt aatcccagcc cgtacatggt ttttatgcag	900
gataatgatt tcaccctatt tggcgcgtcg ccggaaagct cgctcaagta tgatgccacc	960
agccgccaga ttgagatcta cccgattgcc ggaacacgcc cacgcggtcg tcgcgccgat	1020
ggttcaactgg acagagatct cgacagccgt attgaactgg aaatgcgtac cgatcataaa	1080
gagctgtctg aacatctgat gctggttgat ctgcccgtat atgatctggc acgcatttgc	1140
acccccggca gccgctacgt cgccgatctc accaaagttg accgttattc ctatgtgatg	1200
cacctcgtct ctgcgtagt cggcgaactg cgtcacgata ttgacgcctt gcacgcttat	1260
cgcgcttgta tgaatatggg gacgttaagc ggtgcgccga aagtacgcgc tatgcagtta	1320
attgccgagg cggaaggctg tcgccgcggc agctacggcg gcgcggtagg ttatttcacc	1380
gcgcgatggcg atctcgacac ctgcattgtg atccgctcgg cgctggtgga aaacggtatc	1440
gccaccgtgc aagcgggtgc tgggtgtagtc cttgattctg ttccgcagtc ggaagccgac	1500
gaaacccgta acaaagcccg cgctgtactg cgcgctattg ccaccgcgca tcatgcacag	1560
gagactttct gatggctgac attctgctgc tcgataatat cgactctttt acgtacaacc	1620
tggcagatca gttgcgcagc aatgggcata acgtggtgat ttaccgcaac catattccgg	1680
cgcaaaccct aattgaacgc ctggcgacca tgagcaatcc ggtgctgatg ctttctcctg	1740
gccccggtgt gccgagcgaa gccggttgta tgccggaact cctcaccgcg ttgctgtggc	1800
agctgccccat tattggcatt tgccctggac atcaggcgat tgtcgaagct tacgggggct	1860
atgtcggtea ggcgggcgaa attctccacg gtaaagcctc cagcattgaa catgacggtc	1920
aggcgatggt tgccggatta acaaaccgcg tgccggtggc gcgttatcac tcgctggttg	1980
gcagtaacat tccggccggt ttaaccatca acgcccattt taatggcatg gtgatggcag	2040
tacgtcacga tgccgatacg gtttgtggat tccagttcca tccggaatcc attctcacca	2100
cccagggcgc tcgctgctg gaacaaacgc tggcctgggc gcagcagaaa ctagagccag	2160

ccaacacgct gcaaccgatt ctggaaaaac tgtatcaggc gcagacgctt agccaacaag	2220
aaagccacca gctgttttca gcggtggtgc gtggcgagct gaagccggaa caactggcgg	2280
cggcgctggt gagcatgaaa attcgcggtg agcacccgaa cgagatcgcc ggggcagcaa	2340
ccgcgctact ggaaaacgca gcgccgttcc cgcgcccgga ttatctgttt gctgatatcg	2400
tcggtactgg cggtgacggc agcaacagta tcaatatattc taccgccagt gcgtttgtcg	2460
ccgcggcctg tgggctgaaa gtggcgaaac acggcaaccg tagcgtctcc agtaaactcg	2520
gttcgtccga tctgctggcg gcgttcggta ttaatcttga tatgaacgcc gataaatcgc	2580
gccaggcgct ggatgagtta ggtgtatgtt tcctctttgc gccgaagtat cacaccggat	2640
tccgccacgc gatgccggtt cgccagcaac tgaaaacccg caccctgttc aatgtgctgg	2700
ggccattgat taaccggcg catccgcgc tggcgtaaat tggtgtttat agtccggaac	2760
tggtgctgcc gattgccgaa accttgcgcg tgctggggta tcaacgcgcg gcggtggtgc	2820
acagcggcgg gatggatgaa gtttcattac acgcgccgac aatcgttgcc gaactgcatg	2880
acggcgaaat taaaagctat cagctcaccg cagaagactt tggcctgaca ccctaccacc	2940
aggagcaact ggcaggcgga acaccggaag aaaaccgtga cattttaaca cgtttgttac	3000
aaggtaaagg cgacgccgcc catgaagcag ccgtcgctgc gaacgtcgcc atgttaatgc	3060
gcctgcatgg ccatgaagat ctgcaagcca atgcgcaaac cgttcttgag gtactgcgca	3120
gtggttccgc ttacgacaga gtcaccgcac tggcggcacg agggtaaattg atgcaaaccg	3180
ttttagcgaa aatcgtcgca gacaaggcga tttgggtaga agcccgcaaa cagcagcaac	3240
cgctggccag ttttcagaat gaggttcagc cgagcacgcg acatttttat gatgcgctac	3300
agggtgcgcg cacggcgttt attctggagt gcaagaaagc gtcgccgtca aaaggcgtga	3360
tccgtgatga tttcgatcca gcacgcattg ccgccattta taaacattac gcttcggcaa	3420
tttcggtgct gactgatgag aaatatattc aggggagctt taatttcctc cccatcgta	3480
gccaaatcgc cccgcagccg attttatgta aagacttcat tatcgaccct taccagatct	3540
atctggcgcg ctattaccag gccgatgcct gcttattaat gctttcagta ctggatgacg	3600
accaatatcg ccagcttgcc gccgtcgctc acagtctgga gatgggggtg ctgaccgaag	3660
tcagtaatga agaggaacag gagcgcgcca ttgcattggg agcaaaggte gttggcatca	3720
acaaccgcga tctgcgtgat ttgtcgattg atctcaaccg taccgcgag cttgcgccga	3780

aactggggca caacgtgacg gtaatcagcg aatccggcat caatacttac gctcaggtgc	3840
gcgagttaag ccacttcgct aacgggttttc tgattgggtc ggcgttgatg gcccatgacg	3900
atttgcacgc cgccgtgcmc cggggtgttg tggggtgagaa taaagtatgt ggcctgacgc	3960
gtgggcaaga tgctaaagca gcttatgacg cgggcgcgat ttacgggtggg ttgatttttg	4020
ttgcgacatc accgcgttg gtcaacgttg aacaggcgcga ggaagtgatg gctgcggcac	4080
cgttgacagta tgttggcgtg ttccgcaatc acgatattgc cgatgtgggtg gacaaagcta	4140
aggtgttatc gctggcggca gtgcaactgc atggtaatga agaacagctg tatatcgata	4200
cgctgcgtga agctctgcca gcacatgttg ccatctggaa agcattaagc gtcggtgaaa	4260
ccctgcccgc ccgcgagttt cagcacgttg ataaatatgt tttagacaac ggccagggtg	4320
gaagcgggca acgttttgac tggtcactat taaatgggtc atcgcttggc aacgttctgc	4380
tggcgggggg cttaggcgcga gataactgcg tggaagcggc acaaaccggc tgcgccggac	4440
ttgattttaa ttctgctgta gagtcgcaac cgggcatcaa agacgcacgt cttttggcct	4500
cggttttcca gacgctgcmc gcatattaag gaaaggaaca atgacaacat tacttaacc	4560
ctattttggt gagtttggcg gcatgtacgt gccacaaatc ctgatgctg ctctgcgcca	4620
gctggaagaa gcttttgtca gtgcgcaaaa agatcctgaa tttcaggctc agttcaacga	4680
cctgctgaaa aactatgccg ggcgtccaac cgcgctgacc aaatgccaga acattacagc	4740
cgggacgaac accacgctgt atctcaagcg tgaagatttg ctgcacggcg gcgcgcataa	4800
aactaaccag gtgctggggc aggcgttgct ggcgaagcgg atgggtaaaa ccgaaatcat	4860
cgccgaaacc ggtgccggtc agcatggcgt ggcgtcggcc cttgccagcg cctgctcgg	4920
cctgaaatgc cgtatttata tgggtgccaa agacgttgaa cgccagtcgc ctaacgtttt	4980
tcgtatgcgc ttaatgggtg cggaagtgat cccggtgcat agcggttccg cgacgctgaa	5040
agatgcctgt aacgaggcgc tgcgcgactg gtccggtagt tacgaaaccg cgcactatat	5100
gctgggcacc gcagctggcc cgcacacctta tccgaccatt gtgcgtgagt ttcagcggat	5160
gattggcgaa gaaaccaaag cgcagattct ggaaagagaa ggtcgcttgc cggatgccgt	5220
tatcgctgt gttggcggcg gttcgaatgc catcggcgat tttgctgatt tcatcaatga	5280
aaccaacgtc ggcctgattg gtgtggagcc aggtggtcac ggtatcgaaa ctggcgagca	5340
cggcgcaccg ctaaaacatg gtcgcgtggg tatctatttc ggtatgaaag cgccgatgat	5400

gcaaaccgaa gacgggcaga ttgaagaatc ttactccatc tccgccggac tggatttccc 5460
 gtctgtcggc ccacaacacg cgtatcttaa cagcactgga cgcgctgatt acgtgtctat 5520
 taccgatgat gaagcccttg aagccttcaa aacgctgtgc ctgcacgaag ggatcatccc 5580
 ggcgctggaa tcctcccacg ccttggccca tgcgttgaaa atgatgcgcg aaaacccgga 5640
 taaagagcag ctactggtgg ttaacctttc cggtcgcggc gataaagaca tcttcaccgt 5700
 tcacgatatt ttgaaagcac gaggggaaat ctgatggaac gctacgaatc tctgtttgcc 5760
 cagttgaagg agcgcaaaga aggcgcattc gttcctttcg tcacgctcgg tgatccgggc 5820
 attgagcagt cattgaaaat tatcgatacg ctaattgaag ccggtgctga cgcgctggag 5880
 ttaggtatcc ccttctccga cccactggcg gatggcccga cgattcaaaa cgccactctg 5940
 cgcgcctttg cggcaggtgt gactccggca caatgttttg aaatgctggc actgattcgc 6000
 cagaaacacc cgaccattcc cattggcctg ttgatgtatg ccaatctggt gtttaacaaa 6060
 ggcattgatg agttttatgc ccagtgcgaa aaagtcggcg tcgattcggg gctggttgcc 6120
 gatgtgccag ttgaagagtc cgcgcccttc cgccaggccg cgttgctca taatgtcgca 6180
 cctatcttca tctgcccgc aaatgccgat gacgacctgc tgcgccagat agcctcttac 6240
 ggtcgtgggt acacctatct gctgtcacga gcaggcgtga ccggcgcaga aaaccgcgc 6300
 gcgttacccc tcaatcatct ggttgcaag ctgaaagagt acaacgctgc acctccattg 6360
 cagggatttg gtatttcgc cccggatcag gtaaaagcag cgattgatgc aggagctgcg 6420
 ggcgcgattt ctggttcggc cattgttaa atcatcgagc aacatattaa tgagccagag 6480
 aaaatgctgg cggcactgaa agtttttgta caaccgatga aagcggcgac gcgcagttaa 6540
 tcccacggat cctttaagct tccc 6564

<210> 10
 <211> 5002
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 10
 aaagatatca tggctgacat tctgctgctc gataatatcg actcttttac gtacaacctg 60
 gcagatcagt tgcgcagcaa tgggcataac gtggtgattt accgcaacca tattccggcg 120
 caaaccttaa ttgaacgcct ggcgaccatg agcaatccgg tgctgatgct ttctcctggc 180
 cccggtgtgc cgagcgaagc cggttgtatg ccggaactcc tcaccgcgtt gcgtggcaag 240

ctgcccatta ttggcatttg cctcggacat caggcgattg tcgaagctta cgggggctat	300
gtcggtcagg cgggcgaaat tctccacggg aaagcctcca gcattgaaca tgacggtcag	360
gcgatgtttg ccggattaac aaaccgcgtg ccgggtggcg gttatcactc gctgggtggc	420
agtaacattc cggccggttt aaccatcaac gcccatTTta atggcatggg gatggcagta	480
cgtcacgatg cggatcgcggt ttgtggattc cagttccatc cggaatccat tctcaccacc	540
cagggcgctc gcctgctgga acaaacgctg gcctggggcg agcagaaact agagccagcc	600
aacacgctgc aaccgattct ggaaaaactg tatcaggcg agacgcttag ccaacaagaa	660
agccaccagc tgttttcagc ggtggtgctg ggcgagctga agccggaaca actggcgggc	720
gcgctggtga gcatgaaaat tcgcggtgag caccggaacg agatcgccgg ggcagcaacc	780
gcgctactgg aaaacgcagc gccgttcccg cgcccggtt atctgtttgc tgatatcgtc	840
ggtactggcg gtgacggcag caacagtatc aatatttcta ccgccagtgc gtttgctgcc	900
gcggcctgtg ggctgaaagt ggcgaaacac ggcaaccgta gcgtctccag taaatctggt	960
tcgtccgac tcgtggcggc gttcgggtatt aatcttgata tgaacgccga taaatcgcg	1020
caggcgctgg atgagttagg tgtatgtttc ctctttgcgc cgaagtatca caccggattc	1080
cgccacgcga tgccggttcg ccagcaactg aaaaccgcga ccctgttcaa tgtgctgggg	1140
ccattgatta acccggcgca tccgcgcgtg gcgttaattg gtgtttatag tccggaactg	1200
gtgctgccga ttgccgaaac cttgcgcgtg ctgggggtatc aacgcgcggc ggtggtgcac	1260
agcggcggga tggatgaagt ttcattacac gcgccgacaa tcgttgccga actgcatgac	1320
ggcgaaatta aaagctatca gtcaccgcga gaagactttg gcctgacacc ctaccaccag	1380
gagcaactgg caggcggaac accggaagaa aaccgtgaca ttttaacacg tttgttacia	1440
ggtaaaggcg acgccgcca tgaagcagcc gtcgctgcga acgtcgccat gttaatgcgc	1500
ctgcatggcc atgaagatct gcaagccaat gcgcaaaccg ttcttgaggt actgcgcagt	1560
ggttccgctt acgacagagt caccgcactg gcggcacgag ggtaaagtat gcaaaccggt	1620
ttagcgaaaa tcgtcgcaga caaggcgatt tgggtagaag cccgcaaaca gcagcaaccg	1680
ctggccagtt ttcagaatga ggttcagccg agcacgcgac atttttatga tgcgctacag	1740
ggtgcgcgca cggcgtttat tctggagtgc aagaaagcgt cgccgtcaaa aggcgtgatc	1800
cgtgatgatt tcgatccagc acgcattgcc gccatttata aacattacgc ttcggcaatt	1860

tcggtgctga ctgatgagaa atattttcag gggagcttta atttcctccc catcgtcagc	1920
caaatcgccc cgcagccgat tttatgtaaa gacttcatta tcgaccctta ccagatctat	1980
ctggcgcgct attaccaggc cgatgctgc ttattaatgc tttcagtact ggatgacgac	2040
caatatcgcc agcttgccgc cgtcgctcac agtctggaga tgggggtgct gaccgaagtc	2100
agtaatgaag aggaacagga gcgcgccatt gcattgggag caaaggctcg tggcatcaac	2160
aaccgcgatc tgcgtgattt gtcgattgat ctcaaccgta cccgcgagct tgcgccgaaa	2220
ctgggggcaca acgtgacggg aatcagcgaa tccggcatca atacttacgc tcagggtgcgc	2280
gagttaagcc acttcgctaa cggttttctg attgggtcgg cgttgatggc ccatgacgat	2340
ttgcacgccg ccgtgcgccg ggtgttgctg ggtgagaata aagtatgtgg cctgacgcgt	2400
gggcaagatg ctaaagcagc ttatgacgcg ggcgcgattt acgggtgggtt gatttttgtt	2460
gcgacatcac cgcgttgctg caacgttgaa caggcgcagg aagtgatggc tgcggcaccg	2520
ttgcagtatg ttggcgtgtt ccgcaatcac gatattgccg atgtggtgga caaagctaag	2580
gtgttatcgc tggcggcagt gcaactgcat ggtaatgaag aacagctgta tatcgatacg	2640
ctgcgtgaag ctctgccagc acatgttgcc atctggaaag cattaagcgt cggtgaaacc	2700
ctgcccgcgc gcgagtttca gcacgttgat aaatatgttt tagacaacgg ccagggtgga	2760
agcgggcaac gttttgactg gtcactatta aatggtcaat cgcttggtgaa cgttctgctg	2820
gcggggggct taggcgcaga taactgcgtg gaagcggcac aaaccggctg cgccggactt	2880
gattttaatt ctgctgtaga gtcgcaaccg ggcaccaaag acgcacgtct tttggcctcg	2940
gttttccaga cgctgcgcgc atattaagga aaggaacaat gacaacatta cttaaccctt	3000
attttgggtga gtttggcggc atgtacgtgc cacaaatcct gatgcctgct ctgcgccagc	3060
tggaagaagc ttttgtcagt gcgcaaaaag atcctgaatt tcaggctcag ttcaacgacc	3120
tgctgaaaaa ctatgccggg cgtccaaccg cgctgaccaa atgccagaac attacagccg	3180
ggacgaacac cacgctgtat ctcaagcgtg aagatttgct gcacggcggc gcgcataaaa	3240
ctaaccaggt gctggggcag gcgttgctgg cgaagcggat gggtaaaacc gaaatcatcg	3300
ccgaaaccgg tgccggtcag catggcgtgg cgtcggccct tgccagcgcc ctgctcggcc	3360
tgaaatgccg tatttatatg ggtgccaaag acgttgaacg ccagtcgcct aacgtttttc	3420
gtatgcgctt aatgggtgcg gaagtgatcc cggtgcatag cggttccgcg acgctgaaag	3480

atgcctgtaa cgaggcgctg cgcgactggg ccggtagtta cgaaaccgcg cactatatgc	3540
tgggcaccgc agctggcccg catccttata cgaccattgt gcgtgagttt cagcggatga	3600
ttggcgaaga aaccaaagcg cagattctgg aaagagaagg tcgcctgccg gatgccgtta	3660
tcgcctgtgt tggcggcggt tcgaatgcca tcggcatgtt tgctgatttc atcaatgaaa	3720
ccaacgtcgg cctgattggg gtggagccag gtggtcacgg tatcgaaact ggcgagcacg	3780
gcgcaccgct aaaacatggg cgcgtgggta tctatttcgg tatgaaagcg ccgatgatgc	3840
aaaccgaaga cgggcagatt gaagaatctt actccatctc cgccggactg gatttcccg	3900
ctgtcggccc acaacacgcg tatcttaaca gcaactggac cgctgattac gtgtctatta	3960
ccgatgatga agcccttgaa gccttcaaaa cgctgtgcct gcacgaaggg atcatcccg	4020
cgctggaatc ctcccacgcc ctggcccatg cgttgaaaat gatgcgcgaa aaccgcgata	4080
aagagcagct actggtgggt aacctttccg gtcgcggcga taaagacatc ttcaccgttc	4140
acgatatttt gaaagcacga ggggaaatct gatggaacgc tacgaatctc tgtttgccca	4200
gttgaaggag cgcaaagaag gcgcattcgt tcctttcgtc acgctcgggtg atccgggcat	4260
tgagcagtca ttgaaaatta tcgatacgct aattgaagcc ggtgctgacg cgctggagtt	4320
aggatatccc ttctccgacc cactggcgga tggcccgacg attcaaaacg ccactctgcg	4380
cgcctttgcg gcaggtgtga ctccggcaca atgttttgaa atgctggcac tgattcgcca	4440
gaaacacccg accattccca ttggcctgtt gatgtatgcc aatctggtgt ttaacaaagg	4500
cattgatgag ttttatgccc agtgcgaaaa agtcggcgtc gattcgggtc tggttgccga	4560
tgtgccagtt gaagagtcg cgcccttcg ccaggccgcg ttgcgtcata atgtcgcacc	4620
tatcttcata tgcgcgcaa atgccgatga cgacctgctg cgccagatag cctcttacgg	4680
tcgtgggttac acctatttgc tgtcacgagc aggcgtgacc ggcgcagaaa accgcgccgc	4740
gttacccttc aatcatctgg ttgcgaagct gaaagagtac aacgctgcac ctccattgca	4800
gggatttggt atttccgccc cggatcaggt aaaagcagcg attgatgcag gagctgcggg	4860
cgcgatttct ggttcggcca ttgttaaaat catcgagcaa catattaatg agccagagaa	4920
aatgctggcg gcactgaaag tttttgtaca accgatgaaa gcggcgacgc gcagttaatc	4980
ccacggatcc tttaagcttc cc	5002

<210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 1

<400> 11
 ttaggtaccg gcgcactccc gttctggata

30

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 2

<400> 12
 actgcccgtt gtcgataccc tttttacgt

29

<210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 3

<400> 13
 tcgacaacgg gcagtgtatt caccatg

27

<210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 4

<400> 14
 aatgatattct gttattctct aattttggt

29

<210> 15
 <211> 29

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 5

<400> 15
 aatgatatca cccttttttac gtgaacttg

29

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 6

<400> 16
 cccgatatca tgcaaacaca aaaaccgac

29

<210> 17
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 7

<400> 17
 gggaagctta aaggatccgt gggattaact gcgcgctcgcc gcttt

45

<210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 8

<400> 18
 aaagatatca tggctgacat tctgctgct

29

<210> 19
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 9

<400> 19

ggcctcccaa atcggggggc cttttttatt gataacaaaa aggcaacact aggtgacact 60

atagaacgcg 70

<210> 20

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 10

<400> 20

aacagcccaa taccttcatt gaacgggtga tttcccctaa ctctttcaat tagtggatct 60

gatgggtacc 70

<210> 21

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 11

<400> 21

gaatgggagg cgtttcgtcg tgtgaaacag aatgcgaaga cgaacaataa ggcctcccaa 60

atcggggggc 70

<210> 22

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 12

<400> 22

ggcacctttt catcaggttg gatcaacagg cactacgttc tcacttgggt aacagcccaa 60

taccttcatt 70

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 13

<400> 23
 ttgagtgtat cgccaacgcg

20

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 14

<400> 24
 aaagccgcgt gttattgcgt

20

<210> 25
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 15

<400> 25
 ttagcctaat ttaggtaaca cgttaaagac gttgccgaac cagcacaaaa aggtgacact

60

atagaacgcg

70

<210> 26
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 16

<400> 26
 atgaaggatt atgtaatgga aaactttaaa catctcctg aaccgttcg tagtgatct

60

gatgggtacc

70

<210> 27

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 17

<400> 27

tgatttcttg agaggcaaga agccagcgaa tggctggctt cttgaaggat ttagccaaat

60

ttaggtaaca

70

<210> 28

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 18

<400> 28

aatcggtata gcagatgtaa tattcacagg gatcactgta attaaaataa atgaaggatt

60

atgtaatgga

70

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 19

<400> 29

cgggataaag taaaaccagg

20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 20

<400>	30	
cggcgaaggt aagttgatga		20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 21	
<400>	31	
tatttgctgt cacgagcagg		20
<210>	32	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 22	
<400>	32	
agttccggca tacaaccggc tt		22
<210>	33	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 23	
<400>	33	
taatacgact cactataggg		20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 24	

<400> 34
ctgttgggcg gaaaaatgac

20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 25

<400> 35
tgatcgccag ggtgccgacg

20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 26

<400> 36
ccctatagtg agtcgtatta

20

<210> 37
<211> 531
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 37
Met Ala Asp Ile Leu Leu Leu Asp Asn Ile Asp Ser Phe Thr Tyr Asn
1 5 10 15

Leu Ala Asp Gln Leu Arg Ser Asn Gly His Asn Val Val Ile Tyr Arg
20 25 30

Asn His Ile Pro Ala Gln Thr Leu Ile Glu Arg Leu Ala Thr Met Ser
35 40 45

Asn Pro Val Leu Met Leu Ser Pro Gly Pro Gly Val Pro Ser Glu Ala
50 55 60

Gly Cys Met Pro Glu Leu Leu Thr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Pro Ile
65 70 75 80

Ile Gly Ile Cys Leu Gly His Gln Ala Ile Val Glu Ala Tyr Gly Gly
85 90 95

Tyr	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Glu	Ile	Leu	His	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ile	
			100					105					110			
Glu	His	Asp	Gly	Gln	Ala	Met	Phe	Ala	Gly	Leu	Thr	Asn	Pro	Leu	Pro	
		115					120					125				
Val	Ala	Arg	Tyr	His	Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	
	130					135					140					
Thr	Ile	Asn	Ala	His	Phe	Asn	Gly	Met	Val	Met	Ala	Val	Arg	His	Asp	
145					150					155					160	
Ala	Asp	Arg	Val	Cys	Gly	Phe	Gln	Phe	His	Pro	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	
				165					170					175		
Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Gln	Thr	Leu	Ala	Trp	Ala	Gln	Gln	
			180					185					190			
Lys	Leu	Glu	Pro	Ala	Asn	Thr	Leu	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Leu	Tyr	
		195					200					205				
Gln	Ala	Gln	Thr	Leu	Ser	Gln	Gln	Glu	Ser	His	Gln	Leu	Phe	Ser	Ala	
	210					215					220					
Val	Val	Arg	Gly	Glu	Leu	Lys	Pro	Glu	Gln	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Val	
225					230					235					240	
Ser	Met	Lys	Ile	Arg	Gly	Glu	His	Pro	Asn	Glu	Ile	Ala	Gly	Ala	Ala	
				245					250					255		
Thr	Ala	Leu	Leu	Glu	Asn	Ala	Ala	Pro	Phe	Pro	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	
			260					265					270			
Phe	Ala	Asp	Ile	Val	Gly	Thr	Gly	Gly	Asp	Gly	Ser	Asn	Ser	Ile	Asn	
		275					280					285				
Ile	Ser	Thr	Ala	Ser	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Lys	Val	
	290					295					300					
Ala	Lys	His	Gly	Asn	Arg	Ser	Val	Ser	Ser	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Asp	
305				310						315					320	
Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Gly	Ile	Asn	Leu	Asp	Met	Asn	Ala	Asp	Lys	Ser	
				325					330					335		
Arg	Gln	Ala	Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Val	Cys	Phe	Leu	Phe	Ala	Pro	Lys	
			340					345					350			
Tyr	His	Thr	Gly	Phe	Arg	His	Ala	Met	Pro	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Lys	
		355					360					365				
Thr	Arg	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Leu	Gly	Pro	Leu	Ile	Asn	Pro	Ala	His	
	370					375					380					

Pro Pro Leu Ala Leu Ile Gly Val Tyr Ser Pro Glu Leu Val Leu Pro
385 390 395 400

Ile Ala Glu Thr Leu Arg Val Leu Gly Tyr Gln Arg Ala Ala Val Val
405 410 415

His Ser Gly Gly Met Asp Glu Val Ser Leu His Ala Pro Thr Ile Val
420 425 430

Ala Glu Leu His Asp Gly Glu Ile Lys Ser Tyr Gln Leu Thr Ala Glu
435 440 445

Asp Phe Gly Leu Thr Pro Tyr His Gln Glu Gln Leu Ala Gly Gly Thr
450 455 460

Pro Glu Glu Asn Arg Asp Ile Leu Thr Arg Leu Leu Gln Gly Lys Gly
465 470 475 480

Asp Ala Ala His Glu Ala Ala Val Ala Ala Asn Val Ala Met Leu Met
485 490 495

Arg Leu His Gly His Glu Asp Leu Gln Ala Asn Ala Gln Thr Val Leu
500 505 510

Glu Val Leu Arg Ser Gly Ser Ala Tyr Asp Arg Val Thr Ala Leu Ala
515 520 525

Ala Arg Gly
530

<210> 38
<211> 452
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 38
Met Gln Thr Val Leu Ala Lys Ile Val Ala Asp Lys Ala Ile Trp Val
1 5 10 15

Glu Ala Arg Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Ser Phe Gln Asn Glu Val
20 25 30

Gln Pro Ser Thr Arg His Phe Tyr Asp Ala Leu Gln Gly Ala Arg Thr
35 40 45

Ala Phe Ile Leu Glu Cys Lys Lys Ala Ser Pro Ser Lys Gly Val Ile
50 55 60

Arg Asp Asp Phe Asp Pro Ala Arg Ile Ala Ala Ile Tyr Lys His Tyr
65 70 75 80

Ala Ser Ala Ile Ser Val Leu Thr Asp Glu Lys Tyr Phe Gln Gly Ser
85 90 95

Phe	Asn	Phe	Leu	Pro	Ile	Val	Ser	Gln	Ile	Ala	Pro	Gln	Pro	Ile	Leu	100	105	110
Cys	Lys	Asp	Phe	Ile	Ile	Asp	Pro	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Leu	Ala	Arg	Tyr	115	120	125
Tyr	Gln	Ala	Asp	Ala	Cys	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Val	Leu	Asp	Asp	Asp	130	135	140
Gln	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	His	Ser	Leu	Glu	Met	Gly	Val	145	150	155
Leu	Thr	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	165	170	175
Gly	Ala	Lys	Val	Val	Gly	Ile	Asn	Asn	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	180	185	190
Ile	Asp	Leu	Asn	Arg	Thr	Arg	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Leu	Gly	His	Asn	195	200	205
Val	Thr	Val	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ala	Gln	Val	Arg	210	215	220
Glu	Leu	Ser	His	Phe	Ala	Asn	Gly	Phe	Leu	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Met	225	230	235
Ala	His	Asp	Asp	Leu	His	Ala	Ala	Val	Arg	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Glu	245	250	255
Asn	Lys	Val	Cys	Gly	Leu	Thr	Arg	Gly	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Tyr	260	265	270
Asp	Ala	Gly	Ala	Ile	Tyr	Gly	Gly	Leu	Ile	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Pro	275	280	285
Arg	Cys	Val	Asn	Val	Glu	Gln	Ala	Gln	Glu	Val	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	290	295	300
Leu	Gln	Tyr	Val	Gly	Val	Phe	Arg	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Val	305	310	315
Asp	Lys	Ala	Lys	Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	His	Gly	Asn	325	330	335
Glu	Glu	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Thr	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	Pro	Ala	His	340	345	350
Val	Ala	Ile	Trp	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	355	360	365
Glu	Phe	Gln	His	Val	Asp	Lys	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Gln	Gly	Gly	370	375	380

Ser Gly Gln Arg Phe Asp Trp Ser Leu Leu Asn Gly Gln Ser Leu Gly
385 390 395 400

Asn Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Gly Ala Asp Asn Cys Val Glu Ala
405 410 415

Ala Gln Thr Gly Cys Ala Gly Leu Asp Phe Asn Ser Ala Val Glu Ser
420 425 430

Gln Pro Gly Ile Lys Asp Ala Arg Leu Leu Ala Ser Val Phe Gln Thr
435 440 445

Leu Arg Ala Tyr
450

<210> 39

<211> 397

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 39

Met Thr Thr Leu Leu Asn Pro Tyr Phe Gly Glu Phe Gly Gly Met Tyr
1 5 10 15

Val Pro Gln Ile Leu Met Pro Ala Leu Arg Gln Leu Glu Glu Ala Phe
20 25 30

Val Ser Ala Gln Lys Asp Pro Glu Phe Gln Ala Gln Phe Asn Asp Leu
35 40 45

Leu Lys Asn Tyr Ala Gly Arg Pro Thr Ala Leu Thr Lys Cys Gln Asn
50 55 60

Ile Thr Ala Gly Thr Asn Thr Thr Leu Tyr Leu Lys Arg Glu Asp Leu
65 70 75 80

Leu His Gly Gly Ala His Lys Thr Asn Gln Val Leu Gly Gln Ala Leu
85 90 95

Leu Ala Lys Arg Met Gly Lys Thr Glu Ile Ile Ala Glu Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Gln His Gly Val Ala Ser Ala Leu Ala Ser Ala Leu Leu Gly Leu
115 120 125

Lys Cys Arg Ile Tyr Met Gly Ala Lys Asp Val Glu Arg Gln Ser Pro
130 135 140

Asn Val Phe Arg Met Arg Leu Met Gly Ala Glu Val Ile Pro Val His
145 150 155 160

Ser Gly Ser Ala Thr Leu Lys Asp Ala Cys Asn Glu Ala Leu Arg Asp

165										170					175				
Trp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Ala	His	Tyr	Met	Leu	Gly	Thr	Ala	Ala				
			180					185					190						
Gly	Pro	His	Pro	Tyr	Pro	Thr	Ile	Val	Arg	Glu	Phe	Gln	Arg	Met	Ile				
		195					200					205							
Gly	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Ile	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro				
	210					215					220								
Asp	Ala	Val	Ile	Ala	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ala	Ile	Gly	Met				
225					230					235					240				
Phe	Ala	Asp	Phe	Ile	Asn	Glu	Thr	Asn	Val	Gly	Leu	Ile	Gly	Val	Glu				
				245					250					255					
Pro	Gly	Gly	His	Gly	Ile	Glu	Thr	Gly	Glu	His	Gly	Ala	Pro	Leu	Lys				
			260					265					270						
His	Gly	Arg	Val	Gly	Ile	Tyr	Phe	Gly	Met	Lys	Ala	Pro	Met	Met	Gln				
	275						280					285							
Thr	Glu	Asp	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Ser	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ala	Gly	Leu				
	290					295					300								
Asp	Phe	Pro	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ser	Thr	Gly				
305					310					315					320				
Arg	Ala	Asp	Tyr	Val	Ser	Ile	Thr	Asp	Asp	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Phe				
				325					330					335					
Lys	Thr	Leu	Cys	Leu	His	Glu	Gly	Ile	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser				
			340					345					350						
His	Ala	Leu	Ala	His	Ala	Leu	Lys	Met	Met	Arg	Glu	Asn	Pro	Asp	Lys				
	355						360					365							
Glu	Gln	Leu	Leu	Val	Val	Asn	Leu	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Lys	Asp	Ile				
	370					375					380								
Phe	Thr	Val	His	Asp	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Gly	Glu	Ile							
385					390					395									

<210> 40
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 40
 Met Glu Arg Tyr Glu Ser Leu Phe Ala Gln Leu Lys Glu Arg Lys Glu
 1 5 10 15

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