



(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)



1-0028571

(51)⁷ C12N 9/52; C12N 9/54

(13) B

(21) 1-2014-03377

(22) 09/04/2013

(86) PCT/JP2013/061141 09/04/2013

(87) WO/2013/154201 17/10/2013

(30) 2012-089482 10/04/2012 JP; 2013-031995 21/02/2013 JP

(45) 25/06/2021 399

(43) 26/01/2015 322A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8210, Japan

(72) TOHATA, Masatoshi (JP); NISHIMURA, Yumi (JP); WADA, Yasunao (JP);
SAEKI, Katsuhisa (JP); OKUDA, Mitsuyoshi (JP).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN TÍNH TAN CỦA PROTEAZA KIỀM, PROTEAZA KIỀM ĐỘT BIẾN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEAZA KIỀM ĐỘT BIẾN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến proteaza kiềm biểu hiện tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng. Proteaza kiềm đột biến bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, trong đó ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí xác định trước của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó được thế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Proteaza đã được sử dụng từ lâu trong công nghiệp và được áp dụng cho rất nhiều sản phẩm khác nhau như các chất tẩy rửa bao gồm các chất tẩy rửa vải, các tác nhân cải biến sợi, các tác nhân xử lý đồ da, mỹ phẩm, muối tắm, các tác nhân loại bỏ chất rắn và các sản phẩm chữa bệnh. Trong số đó, proteaza được dùng cho chất tẩy rửa được tạo ra với lượng lớn nhất. Ví dụ, Alcalaza, Savinaza (nhãn hiệu được bảo hộ: Novozymes), Maxacal (nhãn hiệu được bảo hộ: Genencor), BLAP (nhãn hiệu được bảo hộ: Henkel) và KAP (Kao Corp.) đã được biết đến phổ biến.

Mục đích bổ sung proteaza cho chất tẩy rửa là để phân hủy vết bẩn có thành phần chủ yếu là protein dính vào vật liệu may quần áo thành các chất có phân tử lượng thấp, nhờ đó tăng tốc độ hòa tan với chất hoạt động bề mặt. Tuy nhiên, vết bẩn trên thực tế là hỗn hợp không chỉ chứa các protein mà bao gồm nhiều thành phần gồm các chất hữu cơ và chất vô cơ (như các lipit có nguồn gốc từ sebum và các hạt rắn) kết hợp. Tiếp đó, đã có khoảng 43.000 proteaza kiềm có trọng lượng phân tử thể hiện hiệu quả tẩy rửa vượt trội trong việc loại bỏ vết bẩn hỗn hợp (tức là, không chỉ chứa protein mà còn cả cặn dầu và các chất khác) đã được phát triển và đã được nộp đơn sáng chế (xem tài liệu sáng chế 1). Các proteaza kiềm khác subtilisin, serin proteaza đã được biết đến theo quy ước có nguồn gốc từ vi khuẩn giống *Bacillus*, có trọng lượng phân tử, cấu trúc sơ cấp và các đặc tính enzym khác nhau, và cụ thể là subtilisin mà proteaza kiềm này

có khả năng kháng chất oxy hóa cực mạnh. Vì vậy, đã có đề xuất phân loại các proteaza kiềm này thành thành phân họ subtilisin mới (tài liệu 1).

Các chất tẩy rửa có thể được phân loại thành chất tẩy rửa bột và chất tẩy rửa lỏng theo dạng của chúng. Chất tẩy rửa lỏng có tính tan vượt trội so với chất tẩy rửa dạng bột. Chất tẩy rửa lỏng có chất lượng tốt do chúng có khả năng sử dụng trực tiếp cho các vết bẩn mà không cần pha loãng. Gần đây, chất tẩy rửa lỏng (còn được gọi là chất tẩy rửa lỏng đậm đặc), có các chức năng tương đương với chất tẩy rửa lỏng thông thường ngay cả khi sử dụng lượng giảm nửa, đã được bán trên thị trường. Do chất tẩy rửa lỏng đậm đặc này được chứa trong vật chứa nhỏ, nên không cần thể tích chứa lớn hoặc tổn nhiên liệu lớn để chuyên chở. Ngoài ra, với lợi ích này, dựa vào việc nghiên cứu chi tiết cơ chế tẩy rửa, nên đã có một số sản phẩm cho thấy hiệu quả tẩy rửa được cải thiện. Theo cách này, có thể giảm thời gian cần để giặt và tiết kiệm nước.

Để duy trì ổn định hoạt tính enzym đã biết của chất tẩy rửa lỏng chứa enzym, thì cần làm ổn định enzym như proteaza được hòa tan trong chất tẩy rửa lỏng. Hơn nữa, để cải thiện khả năng tẩy rửa của chất tẩy rửa này, cần bổ sung enzym vào chất tẩy rửa càng nhiều càng tốt. Tuy nhiên, tồn tại khó khăn về mặt kỹ thuật khi trộn ổn định enzym với chất tẩy rửa lỏng. Ví dụ, việc bảo quản enzym trong chất lỏng ở nhiệt độ bình thường dễ gây ra sự thay đổi tính chất của protein. Ngoài ra, trong chế phẩm lỏng còn có chất hoạt động bề mặt, axit béo, dung môi và các chất khác và pH của chúng ở dạng chất kiềm yếu. Do đó, ngay chất tẩy rửa lỏng cũng là điều kiện môi trường khắc nghiệt cho enzym. Hơn nữa, proteaza là enzym phân giải protein. Do đặc tính của mình, proteaza bị tự phân giải khiến cho việc bảo quản ổn định proteaza trong chế phẩm lỏng trở nên khó khăn hơn. Hơn nữa, hàm lượng nước thấp của chất tẩy rửa lỏng đậm đặc (được làm đặc so với chất tẩy rửa lỏng thông thường) khiến cho khó hòa tan một lượng enzym lớn.

Kỹ thuật để duy trì sự ổn định hoạt tính enzym trong chế phẩm lỏng đã biết đó là bổ sung chất ổn định enzym như ion canxi, borax, axit boric, hợp chất bo,

axit carboxylic như axit formic và polyol. Hơn thế nữa, việc khắc phục sự tự phân giải bằng cách ức chế hoạt tính proteaza đã được nghiên cứu. Các phương pháp ổn định proteaza như là bằng các ức chế nghịch đảo của proteaza bằng cách thế 4-phenyl axit boronic (tài liệu sáng chế 2) và bằng peptit aldehyt cụ thể và chế phẩm Bo (tài liệu sáng chế 3) cũng đã được báo cáo. Hơn nữa, đã có báo cáo cho thấy proteaza cải biến hóa học với dextran có thể được tăng độ ổn định trong dung dịch nước có chứa chất hoạt động bề mặt (tài liệu 2). Ngoài ra, cũng được biết đến là đột biến proteaza được cải thiện về độ ổn định cho chất hoạt động bề mặt (các tài liệu sáng chế 4 đến 6).

Tuy nhiên, cho đến nay kỹ thuật cải thiện tính tan của enzym trong chất tẩy rửa lỏng vẫn chưa được phát triển thêm.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: WO 99/18218 A

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-11-507680

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2000-506933

Tài liệu sáng chế 4: JP-A-2009-034062

Tài liệu sáng chế 5: JP-A-2009-034063

Tài liệu sáng chế 6: WO 2010/126156 A

Tài liệu khác:

Tài liệu 1: Saeki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, 313-319, 2000.

Tài liệu 2: Cosmetics & Toiletries magazine, 111, p79-88, 1996.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Cụ thể hơn, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng, phương pháp bao gồm các

bước, thu nhận proteaza kiểm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, thay thế ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của các Bảng 1-1 và 1-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó, bằng gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 1-1 và 1-2.

Bảng 1-1

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(A)	405	leuxin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin, prolin hoặc valin
(B)	81	leuxin, prolin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin hoặc glutamin
(C)	40	isoleuxin, phenylalanin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(D)	191	leuxin, valin, phenylalanin, isoleuxin hoặc tryptophan
(E)	59	valin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(F)	11	glyxin, asparagin hoặc serin
(G)	16	isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(H)	20	alanin
(I)	22	tryptophan
(J)	23	asparagin
(K)	37	threonin
(L)	41	isoleuxin
(M)	52	glyxin hoặc serin
(N)	53	alanin, isoleuxin hoặc valin
(O)	56	valin
(P)	60	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(Q)	63	axit aspartic hoặc leuxin
(R)	80	alanin hoặc histidin
(S)	82	glutamin
(T)	91	xystein
(U)	100	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(V)	101	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(W)	109	phenylalanin, isoleuxin hoặc leuxin
(X)	113	leuxin hoặc tryptophan
(Y)	120	phenylalanin, isoleuxin, tryptophan hoặc tyrosin
(Z)	135	leuxin
(AA)	140	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AB)	151	phenylalanin
(AC)	166	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(AD)	194	tyrosin
(AE)	200	tryptophan
(AF)	204	isoleuxin, leuxin, valin hoặc metionin
(AG)	212	leuxin, valin hoặc tryptophan

Bảng 1-2

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(AH)	233	isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(AI)	238	leuxin
(AJ)	243	isoleuxin, leuxin hoặc tyrosin
(AK)	246	phenylalanin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(AL)	275	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AM)	277	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin
(AN)	297	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AO)	326	tryptophan
(AP)	330	phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(AQ)	332	glyxin, threonin, hoặc valin
(AR)	334	leuxin
(AS)	342	axit glutamic, leuxin, threonin hoặc tryptophan
(AT)	343	threonin
(AU)	357	leuxin
(AV)	359	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc glyxin

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(AW)	361	isoleuxin, valin hoặc tryptophan
(AX)	376	tryptophan
(AY)	378	leuxin hoặc tryptophan
(AZ)	385	metionin, prolin hoặc tyrosin
(BA)	386	alanin, isoleuxin, leuxin hoặc metionin
(BB)	387	phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, metionin, valin hoặc tryptophan
(BC)	390	phenylalanin, glyxin, serin, threonin hoặc tyrosin
(BD)	393	glutamin
(BE)	396	glyxin
(BF)	403	lysin hoặc threonin
(BG)	406	phenylalanin, valin hoặc tryptophan
(BH)	407	xystein hoặc glyxin
(BI)	408	isoleuxin, asparagin, tryptophan hoặc tyrosin
(BJ)	409	tryptophan hoặc tyrosin
(BK)	411	alanin, leuxin, prolin hoặc valin
(BL)	427	valin
(BM)	433	leuxin

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến proteaza kiểm soát biến bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều, trong đó ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của Bảng 2-1 và Bảng 2-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 2-1 và 2-2.

Bảng 2-1

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(A')	405	leuxin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin, prolin hoặc valin
(B')	81	leuxin, prolin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin hoặc glutamin
(C')	40	isoleuxin, phenylalanin, leuxin, valin hoặc tryptophan

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(D')	191	leuxin, valin, phenylalanin, isoleuxin hoặc tryptophan
(E')	59	valin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(F')	11	glyxin, asparagin hoặc serin
(G')	16	leuxin hoặc tryptophan
(H')	20	alanin
(I')	22	tryptophan
(J')	23	asparagin
(K')	37	threonin
(L')	41	isoleuxin
(M')	52	glyxin hoặc serin
(N')	53	alanin, isoleuxin hoặc valin
(O')	56	valin
(P')	60	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(Q')	63	axit aspartic hoặc leuxin
(R')	80	alanin hoặc histidin
(S')	91	xystein
(T')	100	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(U')	109	phenylalanin, isoleuxin hoặc leuxin
(V')	113	leuxin hoặc tryptophan
(W')	120	phenylalanin, isoleuxin, tryptophan hoặc tyrosin
(X')	135	leuxin
(Y')	140	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(Z')	151	phenylalanin
(AA')	166	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(AB')	200	tryptophan
(AC')	204	leuxin hoặc metionin
(AD')	212	leuxin, valin hoặc tryptophan
(AE')	233	isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(AF')	238	leuxin
(AG')	243	isoleuxin, leuxin hoặc tyrosin

Bảng 2-2

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(AH')	246	phenylalanin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(AI')	275	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AJ')	277	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin
(AK')	297	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AL')	326	tryptophan
(AM')	330	phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(AN')	332	glyxin, threonin, hoặc valin
(AO')	334	leuxin
(AP')	343	threonin
(AQ')	357	leuxin
(AR')	359	phenylalanin hoặc glyxin
(AS')	361	isoleuxin, valin hoặc tryptophan
(AT')	376	tryptophan
(AU')	378	leuxin hoặc tryptophan
(AV')	385	metionin, prolin hoặc tyrosin
(AW')	386	alanin, isoleuxin, leuxin hoặc metionin
(AX')	387	phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, metionin, valin hoặc tryptophan
(AY')	390	phenylalanin, glyxin, serin, threonin hoặc tyrosin
(AZ')	393	glutamin
(BA')	396	glyxin
(BB')	403	lysin hoặc threonin
(BC')	406	phenylalanin, valin hoặc tryptophan
(BD')	407	xystein hoặc glyxin
(BE')	408	isoleuxin, asparagin, tryptophan hoặc tyrosin
(BF')	409	tryptophan hoặc tyrosin
(BG')	411	alanin, leuxin, prolin hoặc valin
(BH')	427	valin
(BI')	433	leuxin

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến gen mã hóa proteaza kiềm đột biến.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến vector tái tổ hợp chứa gen này.

Theo phương án khác, sáng chế cung cấp tế bào chuyển gen chứa vector tái tổ hợp này.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập phương pháp sản xuất proteaza kiềm đột biến bằng cách sử dụng tế bào chuyển gen này.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập chế phẩm tẩy rửa lỏng chứa proteaza kiềm đột biến.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, "gốc axit amin" đề cập đến axit amin bất kỳ trong số 20 gốc axit amin tạo thành protein bao gồm alanin (Ala hoặc A), arginin (Arg hoặc R), asparagin (Asn hoặc N), axit aspartic (Asp hoặc D), cystein (Cys hoặc C), glutamin (Gln hoặc Q), axit glutamic (Glu hoặc E), glyxin (Gly hoặc G), histidin (His hoặc H), isoleuxin (Ile hoặc I), leuxin (Leu hoặc L), lysin (Lys hoặc K), metionin (Met hoặc M), phenylalanin (Phe hoặc F), prolin (Pro hoặc P), serin (Ser hoặc S), threonin (Thr hoặc T), tryptophan (Trp hoặc W), tyrosin (Tyr hoặc Y) và valin (Val hoặc V).

Theo sáng chế, "mức độ tương đồng (của các trình tự axit amin)" đề cập đến tỷ lệ (%) tổng vị trí mà tại đó gốc axit amin giống nhau có mặt trong hai trình tự axit amin tương ứng với tổng số các gốc axit amin có trên toàn bộ chiều dài khi hai trình tự axit amin được so sánh để thu được sự tương đồng nhất lớn nhất. Cụ thể hơn, tỷ lệ có thể được tính theo phương pháp của Lipman-Pearson (Science, 227, 1435, (1985)) và thu được bằng máy tính nhờ chương trình phân tích trình tự (tìm kiếm so sánh) của phần mềm xử lý thông tin di truyền, Genetyx-Win (Phiên bản 5,1,1; Software Development) bằng việc thiết lập cỡ đơn vị để so sánh (ktup) bằng 2.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng và proteaza kiềm đột biến thể hiện tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng này. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm tẩy rửa lỏng bao gồm proteaza kiềm đột biến.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng tính tan trong chế phẩm lỏng của proteaza kiềm KP43 có trọng lượng phân tử khoảng 43.000 được cải thiện bằng việc thay thế gốc axit amin cụ thể biết trước bằng gốc axit amin khác.

Theo sáng chế, có thể cung cấp proteaza kiềm dễ hòa tan trong chế phẩm lỏng. Proteaza kiềm đột biến của sáng chế có tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng, cụ thể là, trong chất tẩy rửa lỏng đậm đặc và có thể được bổ sung với lượng lớn vào các chất tẩy rửa này. Vì vậy, chất tẩy rửa lỏng bao gồm proteaza kiềm của sáng chế có hoạt tính enzym cao hơn so với chất tẩy rửa lỏng thông thường và có thể biểu hiện khả năng tẩy rửa cao.

Sáng chế đề cập đến phương pháp để cải thiện tính tan của proteaza kiềm. Proteaza kiềm thích hợp sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% với nó. Theo sáng chế, đôi khi được đề cập đến như “proteaza kiềm gốc”. Theo cách khác, “proteaza kiềm gốc” theo sáng chế là proteaza kiềm cần được biến đổi thành proteaza kiềm đột biến thể hiện tính tan cải thiện bằng việc cung cấp đột biến xác định trước cho gốc axit amin của chúng.

Proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, ví dụ, proteaza kiềm có nguồn gốc từ KP43 (*Bacillus* sp. KSM-KP43 (FERM BP-6532)) có thể được đề cập đến trong WO 99/18218 A.

Proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, proteaza kiềm có trình tự axit amin, mà khác trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 nhưng có mức độ tương đồng về trình tự 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 85% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, tốt

hơn nữa là 97% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 97,5% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn và còn tốt hơn là 99% hoặc nhiều hơn, so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2; và proteaza kiểm được điều chế bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc chèn một đến một vài axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, được đề cập. Theo sáng chế, thuật ngữ "một đến một vài" đề cập đến một số từ 1 đến 40, thích hợp là 1 đến 20, và tốt hơn là 1 đến 10.

Các ví dụ về proteaza kiểm gốc bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 bao gồm proteaza KP9860 (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. KSM-KP9860 (FERM BP-6534), WO99/18218, số truy cập GenBank AB046403); proteaza E-1 (có nguồn gốc từ *Bacillus* No. D-6 (FERM P-1592), JP-A-49-71191, số truy cập GenBank AB046402); Proteaza Ya (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. Y (FERM BP-1029), JP-A-61-280268, số truy cập GenBank AB046404); proteaza SD521 (có nguồn gốc từ *Bacillus* SD521 (FERM P-11162), JP-A-3-191781, số truy cập GenBank AB046405); proteaza A-1 (có nguồn gốc từ NCIB12289, WO88/01293, số truy cập GenBank AB046406); proteaza A-2 (có nguồn gốc từ NCIB12513, WO98/56927); và proteaza 9865 (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566), số truy cập GenBank AB084155).

Các ví dụ khác về proteaza kiểm gốc bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 bao gồm các proteaza kiểm đột biến được tạo ra bằng cách đưa ít nhất một trong các đột biến được mô tả trong JP-A-2002-218989, JP-A-2002-306176, JP-A-2003-125783, JP-A-2004-000122, JP-A-2004-057195, JP-A-2004-0305175, JP-A-2004-305176, JP-A-2006-129865, JP-A-2008-212084, JP-A-2009-034063, JP-A-2009-034062, JP-A-2010-273672 hoặc JP-A-2010-273673, vào proteaza kiểm có nguồn gốc từ dòng KP-43.

Thích hợp là, trong proteaza kiểm gốc bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, ít nhất gốc axit amin tương ứng với vị trí 30 của trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID No: 2 là axit aspartic, gốc axit amin tương ứng với vị trí 68 của chúng là histidin và gốc axit amin tương ứng với vị trí 255 của chúng là serin. Được ước lượng là các gốc axit amin đó là các axit amin cơ bản cho proteaza kiềm (Saeki et al., Journal of bioscience and Bioengineering, 103, 501-508, 2007).

Tốt hơn là, trong proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, gốc axit amin tại vị trí tương ứng với từng vị trí được mô tả trong cột (i) của Bảng 3 dưới đây của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 là gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của Bảng 3. Các vị trí được chỉ ra trong cột (i) của Bảng 3 dưới đây là các vị trí của các gốc axit amin được bảo tồn cao giữa các proteaza kiềm gốc nêu trên (Saeki et al., Journal of bioscience and Bioengineering, 103, 501-508, 2007) từ đó các vị trí của các gốc axit amin được mô tả trong các tài liệu sáng chế nêu trên và các gốc axit amin của sáng chế được loại trừ.

Bảng 3

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin		(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(a)	10	alanin	(y)	161	glyxin
(b)	18	glyxin	(z)	162	asparagin
(c)	21	glyxin	(aa)	164	glyxin
(d)	26	valin	(ab)	173	prolin
(e)	27	alanin	(ab)	182	valin
(f)	28	valin	(ad)	183	glyxin
(g)	30	axit aspartic	(ae)	184	alanin
(h)	32	glyxin	(af)	203	alanin
(i)	64	axit aspartic	(ag)	206	serin
(j)	68	histidin	(ah)	209	glyxin
(k)	69	glyxin	(ai)	223	prolin
(l)	70	threonin	(aj)	224	glyxin
(m)	72	valin	(ak)	225	threonin
(n)	73	alanin	(al)	229	serin

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin		(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(o)	74	glyxin	(am)	248	tyrosin
(p)	85	glyxin	(an)	254	threonin
(q)	87	alanin	(ao)	255	serin
(r)	88	prolin	(ap)	258	threonin
(s)	92	leuxin	(aq)	259	prolin
(t)	118	alanin	(ar)	261	valin
(u)	129	serin	(as)	262	alanin
(v)	131	glyxin	(at)	263	glyxin
(w)	145	valin	(au)	266	alanin
(x)	159	alanin	(av)	289	leuxin

Ngoài ra, proteaza kiềm có một trong các đặc tính enzym dưới đây trong đó proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 là thích hợp hơn như proteaza kiềm gốc của sáng chế có: 1) biểu hiện kháng chất oxy hóa, hoạt tính biểu hiện trong điều kiện kiềm (pH=8 hoặc cao hơn) và ổn định. Cụm từ "biểu hiện kháng chất oxy hóa" nghĩa là biểu hiện ít nhất 50% hoạt tính proteaza kiềm gốc sau khi cấy proteaza kiềm trong 50 mM hydro peroxit (chứa 5 mM canxi clorua) dung dịch (20 mM đệm Britton-Robinson, pH=10) ở 20°C trong 20 phút (phương pháp chất nền tổng hợp). 2) biểu hiện 80% hoặc nhiều hơn của hoạt tính gốc sau khi xử lý proteaza kiềm ở 50°C, pH=10 trong 10 phút. 3) được ức chế bằng axit diisopropyl flophosphoric (DFP) và phenyl metan sulfonyl florit (PMSF). 4) có trọng lượng phân tử được xác định bằng SDS-PAGE là $43.000 \pm 2,000$.

Trong phương pháp của sáng chế, tính tan của proteaza kiềm được cải thiện bằng cách thay thế gốc axit amin tại vị trí đích của proteaza kiềm bằng gốc axit amin khác. Cụ thể, trong proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, ít nhất một trong các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả trong các Bảng 4-1 đến 4-3 dưới đây được thế bằng gốc axit amin sau đột biến được thể hiện trong các bảng. Ngoài ra, trong proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID No: 2, ít nhất một trong các gốc axit amin tại các vị trí tương ứng với các vị trí được mô tả trong các Bảng 4-1 đến 4-3 dưới đây được thể bằng gốc axit amin sau đột biến được thể hiện ở các bảng. Proteaza kiềm đột biến có sự thay thế về axit amin nêu trên có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Proteaza kiềm đột biến biểu hiện hoạt tính proteaza kiềm và tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng, tốt hơn chất tẩy rửa lỏng đậm đặc so với proteaza kiềm ban đầu.

Bảng 4-1

Vị trí	Gốc axit amin trong SEQ ID No: 2	Gốc axit amin sau đột biến
405	asparagin	leuxin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin, prolin hoặc valin
81	serin	leuxin, prolin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin hoặc glutamin
40	serin	isoleuxin, phenylalanin, leuxin, valin hoặc tryptophan
191	serin	leuxin, valin, phenylalanin, isoleuxin hoặc tryptophan
59	threonin	valin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
11	axit aspartic	glyxin, asparagin hoặc serin
16	serin	isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
20	tyrosin	alanin
22	glutamin	tryptophan
23	glyxin	asparagin
37	arginin	threonin
41	serin	isoleuxin
52	alanin	glyxin hoặc serin
53	leuxin	alanin, isoleuxin hoặc valin
56	leuxin	valin
60	asparagin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
63	asparagin	axit aspartic hoặc leuxin

Vị trí	Gốc axit amin trong SEQ ID No: 2	Gốc axit amin sau đột biến
80	glyxin	alanin hoặc histidin
82	threonin	glutamin
91	asparagin	xystein
100	serin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
101	glyxin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
109	serin	phenylalanin, isoleuxin hoặc leuxin
113	threonin	leuxin hoặc tryptophan

Bảng 4-2

Vị trí	Gốc axit amin trong SEQ ID No: 2	Gốc axit amin sau đột biến
120	serin	phenylalanin, isoleuxin, tryptophan hoặc tyrosin
135	asparagin	leuxin
140	threonin	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
151	lysin	phenylalanin
166	asparagin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
194	serin	tyrosin
200	asparagin	tryptophan
204	glutamin	isoleuxin, leuxin, valin hoặc metionin
212	lysin	leuxin, valin hoặc tryptophan
233	serin	isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
238	serin	leuxin
243	asparagin	isoleuxin, leuxin hoặc tyrosin
246	serin	phenylalanin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
275	asparagin	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
277	glyxin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin
297	glyxin	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan

Vị trí	Gốc axit amin trong SEQ ID No: 2	Gốc axit amin sau đột biến
326	serin	tryptophan
330	serin	phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
332	lysin	glyxin, threonin hoặc valin
334	threonin	leuxin
342	glyxin	axit glutamic, leuxin, threonin hoặc tryptophan
343	lysin	threonin
357	serin	leuxin
359	threonin	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc glyxin

Bảng 4-3

Vị trí	Gốc axit amin trong SEQ ID No: 2	Gốc axit amin sau đột biến
361	serin	isoleuxin, valin hoặc tryptophan
376	asparagin	tryptophan
378	threonin	leuxin hoặc tryptophan
385	phenylalanin	metionin, prolin hoặc tyrosin
386	threonin	alanin, isoleuxin, leuxin hoặc metionin
387	serin	phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, metionin, valin hoặc tryptophan
390	asparagin	phenylalanin, glyxin, serin, threonin hoặc tyrosin
393	tryptophan	glutamin
396	arginin	glyxin
403	phenylalanin	lysin hoặc threonin
406	alanin	phenylalanin, valin hoặc tryptophan
407	prolin	xystein hoặc glyxin
408	glutamin	isoleuxin, asparagin, tryptophan hoặc tyrosin
409	serin	tryptophan hoặc tyrosin
411	threonin	alanin, leuxin, prolin hoặc valin
427	threonin	valin
433	valin	leuxin

Theo phương pháp của sáng chế, vị trí của gốc axit amin cần được thể trong proteaza kiềm gốc thích hợp là bao gồm ít nhất một vị trí được chọn từ vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2; tốt hơn là bao gồm ít nhất hai trong các vị trí nêu trên; và tốt hơn là bao gồm ít nhất ba trong các vị trí nêu trên.

Cũng thích hợp là, vị trí cần được thể bao gồm ít nhất một sự kết hợp của vị trí 405 và vị trí 81, vị trí 40 hoặc vị trí 191; và tốt hơn là, bao gồm sự kết hợp của vị trí 405 và vị trí 81, và vị trí 40, vị trí 191 hoặc vị trí 59. Còn tốt hơn nữa là, các vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 được thể.

Trong trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, vị trí cần được thể thích hợp là bao gồm ít nhất một vị trí được chọn từ các vị trí tương ứng với vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của SEQ ID No: 2; tốt hơn là, bao gồm ít nhất hai trong các vị trí nêu trên; và tốt hơn là bao gồm ít nhất ba trong các vị trí nêu trên.

Cũng thích hợp là, các vị trí cần được thể bao gồm ít nhất một sự kết hợp của vị trí tương ứng với vị trí 405 và vị trí tương ứng với bất kỳ trong số vị trí 81, vị trí 191 và vị trí 40; và tốt hơn là, bao gồm sự kết hợp của các vị trí tương ứng với vị trí 405 và vị trí 81 và vị trí tương ứng với bất kỳ trong số vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59. Còn tốt hơn là, mọi vị trí tương ứng với vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 được thể.

Bổ sung cho sự thay thế đơn, sự thay thế kép hoặc đa thay thế của vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 hoặc các vị trí tương ứng với nó, gốc các axit amin tại các vị trí khác được thể hiện ở các Bảng 4-1 đến 4-3 hoặc các phần tương ứng với nó có thể được thể.

Gốc axit amin được thể tại vị trí 405 hoặc vị trí tương ứng với nó thích hợp là leuxin hoặc tryptophan; leuxin, prolin, tyrosin hoặc tryptophan thích hợp là tại vị trí 81 hoặc vị trí tương ứng với nó; isoleuxin, phenylalanin hoặc leuxin thích hợp là tại vị trí 40 hoặc vị trí tương ứng với nó; leuxin hoặc valin thích hợp là tại

vị trí 191 hoặc vị trí tương ứng với nó; và valin, isoleuxin hoặc leuxin thích hợp là tại vị trí 59 hoặc vị trí tương ứng với nó.

Theo sáng chế, "gốc axit amin tại vị trí tương ứng" được xác định bằng cách so sánh trình tự axit amin mong muốn với trình tự tham khảo (trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2) bằng cách sử dụng thuật toán và so sánh đã biết của trình tự để các gốc axit amin bảo tồn có mặt trong trình tự axit amin của từng proteaza kiểm thể hiện mức độ tương đồng tối đa. Bằng cách so sánh các trình tự axit amin của các proteaza kiểm bằng phương pháp này, ngay cả khi các trình tự axit amin được chèn và loại bỏ, vị trí của gốc axit amin tương đồng trong các trình tự của từng proteaza kiểm có thể được xác định. Việc so sánh có thể được thực hiện thủ công, ví dụ, dựa vào phương pháp Lipman-Pearson nêu trên; tuy nhiên, có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình so sánh đa trình tự Clustal W (Thompson, J. D. et al., (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, p. 4673-4680) với các thông số mặc định. Chương trình so sánh đa trình tự Clustal W được cung cấp bởi các trang web: ví dụ, European Bioinformatics Institute: (EBI, (www.ebi.ac.uk/index.html)) và DNA Data Bank of Japan (DDBJ, (www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html)) do National Institute of Genetics quản lý.

Kết quả so sánh trên trên có thể được điều chỉnh phù hợp nếu cần để thu được so sánh tối ưu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. So sánh tối ưu thích hợp là được xác định xét về mức độ tương đồng của các trình tự axit amin và tần suất chèn khoảng trống. Sự đồng dạng của các trình tự axit amin đề cập đến như sau. Khi hai trình tự axit amin được so sánh, tỷ lệ (%) của số các vị trí ở đó gốc axit amin giống nhau hoặc tương tự có mặt ở cả hai trình tự tương ứng với số các gốc axit amin có toàn bộ chiều dài được đề cập đến như sự đồng dạng. Các gốc axit amin tương tự đề cập đến các gốc axit amin của 20 axit amin tạo thành protein có các đặc tính tương tự với nhau theo chiều phân cực và điện tích, cụ thể hơn, có khả năng gây ra thay thế bảo tồn. Các nhóm gốc axit amin tương tự này là, mà đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin và

lysine hoặc glutamine; axit glutamic và axit aspartic hoặc glutamine; serine và threonine hoặc alanine; glutamine và asparagine hoặc arginine; và leucine và isoleucine.

Vị trí của gốc axit amin của trình tự axit amin mong muốn được so sánh với vị trí tương ứng với vị trí bất kỳ của trình tự tham khảo bằng cách so sánh xem xét như "vị trí tương ứng" với vị trí bất kỳ. Gốc axit amin được đề cập đến như "gốc axit amin tại vị trí tương ứng".

Cụ thể hơn, theo phương pháp trên, có thể định rõ các gốc axit amin tại các vị trí tương ứng là: (a) gốc axit amin (gốc asparagine) tại vị trí 405, (b) gốc axit amin (gốc serine) tại vị trí 81, (c) gốc axit amin (gốc serine) tại vị trí 40, (d) gốc axit amin (gốc serine) tại vị trí 191 và (e) gốc axit amin (gốc threonine) tại vị trí 59 ví dụ, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, như (a) gốc asparagine tại vị trí 405, (b) gốc alanine tại vị trí 81, (c) gốc serine tại vị trí 40, (d) gốc serine tại vị trí 191 và (e) gốc threonine tại vị trí 59 trong proteaza KP9860.

Các ví dụ cụ thể về các gốc axit amin tại các vị trí tương ứng với (a) vị trí 405, (b) vị trí 81, (c) vị trí 40, (d) vị trí 191, (e) vị trí 59 của trình tự axit amin (SEQ ID No: 2) của proteaza KP43 và các vị trí tương ứng với nó proteaza KP9860, proteaza 9865, proteaza E-1, proteaza Ya, proteaza SD521, proteaza A-1 và proteaza A-2 nêu trên được thể hiện dưới đây (Bảng 5). Các gốc axit amin tại các vị trí đó được bảo tồn cao hoặc được bảo tồn như các gốc axit amin tương ứng.

Bảng 5

Vị trí	Protease							
	KP43	KP9860	9865	E-1	Ya	SD521	A-1	A-2
(a)	Asn405	Asn405	Asn405	Asn404	Asn404	Asn404	Asn405	Asn404
(b)	Ser81	Ala81	Ser81	Ala80	Ala80	Ala80	Thr81	Ala80
(c)	Ser40	Ser40	Ser40	Ser40	Ser40	Ser40	Ser40	Ser40
(d)	Ser191	Ser191	Ser191	Ser190	Ser190	Ser190	Ser191	Ser190
(e)	Thr59	Thr59	Thr59	Thr59	Thr59	Thr59	Thr59	Thr59

Hơn thế nữa, ví dụ, trong proteaza kiềm đột biến có gốc axit amin đơn được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 của proteaza kiềm nêu trong SEQ ID No: 2, như được mô tả trong JP-A-2006-129865 nêu trên, các vị trí tương ứng xuôi dòng từ vị trí 134 của trình tự của SEQ ID No: 2 được thay đổi bằng cách chèn một gốc.

Do đó, "vị trí tương ứng" xác định thể hiện mức độ tương đồng trình tự axit amin cao và vị trí không gian ba chiều của chúng được tiên đoán là cần được bảo tồn giữa các proteaza kiềm protein. Do đó, các đột biến giống nhau của gốc axit amin có mặt tại các vị trí tương ứng tác động đến cùng các chức năng proteaza cụ thể.

Protease kiềm đột biến thu được bằng phương pháp của sáng chế có thể tùy ý, thêm vào các thay thế của các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả trong các Bảng 4-1 đến 4-3 hoặc các phần tương ứng với nó, sự đột biến (ví dụ, loại bỏ, thay thế, thêm vào, chèn) tại vị trí khác, để hiệu quả về sự cải thiện tính tan trong chế phẩm lỏng không bị cản trở. Sự đột biến có thể xảy ra đột biến tự nhiên hoặc đột biến được đưa vào nhân tạo.

Theo phương pháp của sáng chế, như các phương pháp thay thế gốc axit amin của proteaza kiềm, các kỹ thuật khác nhau về quy trình đột biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Ví dụ, trong gen proteaza kiềm mã hóa trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc (sau đây, được đề cập đến như gen proteaza kiềm gốc), trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin cần được thể được biến đổi bằng cách thay thế bằng trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin mong muốn được đưa vào bằng cách thay thế; và tiếp theo, proteaza kiềm đột biến được biểu hiện từ gen đột biến để thu được proteaza kiềm đột biến có trình tự axit amin trong đó gốc axit amin được thể bằng gốc axit amin mong muốn.

Việc đưa sự đột biến mong muốn vào trong gen proteaza kiềm gốc có thể được thực hiện, ví dụ, bằng các phương pháp đột biến hướng đích khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào sự khuếch đại PCR sử dụng gen proteaza kiềm gốc như ADN khuôn và sự khuếch

đại của chúng bằng các loại polymeraza ADN khác nhau. Đột biến hướng đích có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp như phương pháp PCR đảo và phương pháp ử ("Revised 4th Edition, New Gene Engineering Handbook" edited by Muramatsu et al., published by Yodosha, p. 82-88). Nếu cần, kit đột biến hướng đích có sẵn trên thị trường như Kit đột biến hướng đích QuickChange II, Kit đột biến hướng đa vị trí QuickChange từ Stratagene và các nhà cung cấp khác có thể được sử dụng.

Đột biến hướng đích trong gen proteaza kiềm gốc nhìn chung có thể được thực hiện phần lớn bằng việc sử dụng đoạn môi đột biến có chứa sự đột biến nucleotit. Như đoạn môi đột biến có thể được so sánh theo cách này để có thể ử với vùng có chứa trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin cần được biến đổi bằng cách thay thế trong gen proteaza kiềm gốc, và nó chứa trình tự nucleotit (codon) mã hóa gốc axit amin cần được đưa vào bằng cách thay thế. Các trình tự nucleotit (codon) mã hóa gốc axit amin cần được biến đổi bằng cách thay thế và gốc axit amin cần được đưa vào bằng cách thay thế có thể được nhận dạng và chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào các giao thức chung và các giao thức khác.

Theo sáng chế, phương pháp SOE (ghép bằng cách kéo dài đoạn trùng lặp)-PCR (Horton R. M. et al., Gene (1989) 77 (1), p. 61-68) có thể được sử dụng, trong đó hai đoạn môi đột biến bổ sung cho nhau có chứa đột biến nucleotit cần được đưa vào được sử dụng để khuếch đại các phần ADN của phần ngược chiều và phần xuôi chiều của vị trí đột biến riêng rẽ, mà được thất trong một phần. Quá trình đưa sự đột biến vào sử dụng phương pháp SOE-PCR được mô tả cụ thể hơn trong các ví dụ (được mô tả bên dưới).

ADN khuôn bao gồm gen proteaza kiềm gốc có thể được thu được từ vi khuẩn như *Bacillus* sp. KSM-KP43 (FERM BP-6532), *Bacillus* sp. KSM-KP9860 (FERM BP-6534), *Bacillus* No. D-6 (FERM P-1592), *Bacillus* sp. Y (FERM BP-1029), *Bacillus* SD521 (FERM P-11162) và *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566) nêu trên, hoặc các đột biến của chúng, bằng cách chiết ADN

của bộ gen theo phương pháp thông thường hoặc bằng cách chiết ARN và cADN tổng hợp bằng cách sao chép ngược. Ngoài ra, dựa vào trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc, trình tự nucleotit tương ứng có thể được tổng hợp và được sử dụng như ADN khuôn.

ADN của bộ gen có thể thu được từ dòng của loài *Bacillus* nêu trên bằng phương pháp, ví dụ, được mô tả trong Pitcher et al., Lett. Appl. Microbiol., 1989, 8: p. 151-156. ADN khuôn bao gồm gen proteaza kiềm gốc có thể thu được bằng cách chèn cADN hoặc phần ADN bao gồm gen proteaza kiềm gốc cải biến thu được từ ADN của bộ gen trong vector phù hợp.

Đoạn môi có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp oligonucleotit đã biết như phương pháp phosphoramidit (Nucleic Acids Research, 17, 7059-7071, 1989). Sự tổng hợp của đoạn môi này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, chất tổng hợp oligonucleotit có sẵn trên thị trường (ví dụ, được sản xuất bởi ABI). Sử dụng tập hợp đoạn môi bao gồm đoạn môi đột biến và gen proteaza kiềm gốc như một ADN mẫu, đột biến hướng đích như đã nêu trên được thực hiện để thu được gen proteaza kiềm đột biến có sự đột biến mong muốn được đưa vào. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến gen proteaza kiềm đột biến thu được. Lưu ý rằng "gen proteaza kiềm đột biến" theo sáng chế đề cập đến phần nucleotit (bao gồm ví dụ, ADN, mARN và axit nucleic nhân tạo) mã hóa trình tự axit amin của proteaza kiềm đột biến. "Gen" theo sáng chế có thể chứa trình tự nucleotit khác như vùng không dịch mã (UTR) gắn vào khung đọc mở (ORF).

Gen proteaza kiềm đột biến thu được được chèn trong một vector và được gắn theo phương pháp thông thường. Theo cách này, có thể thu được vector tái tổ hợp. Vector cần được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn bởi vector cụ thể và vector bất kỳ, như plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, virus, vector YAC và vector con thoi đều có thể được sử dụng. Như vector này, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector có khả năng khuếch đại trong vi khuẩn, ví dụ, trong vi khuẩn giống *Bacillus*, tốt hơn là, và vector biểu hiện có khả năng gây ra sự biểu

hiện của gen ưu tiên được đưa vào các vi khuẩn thuộc loài *Bacillus*. Trong đó, vectơ con thoi, mà có thể sao chép ở cả vi khuẩn thuộc loài *Bacillus* và sinh vật khác, tốt hơn là có thể sử dụng để tạo ra proteaza kiềm đột biến bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Các ví dụ về vectơ được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vectơ con thoi như pHA3040SP64 (được mô tả bên dưới), plasmid pHSP64R hoặc pASP64 (JP-B-3492935), pPHY300PLK (vectơ biểu hiện có khả năng chuyển gen vào cả *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*; Ishikawa, H. and Shibahara, H., Jpn. J. Genet, (1985) 60, p. 235-243) và PAC3 (Moriyama, H. et al., Nucleic Acids Res. (1988) 16, p. 8732); các plasmid sẵn sàng để chuyển gen vào vi khuẩn *Bacillus*, như pUB110 (Gryczan, T. J. et al., J. Bacteriol. (1978) 134, p. 318-329) và PTA10607 (Bron, S. et al., Plasmid, 18 (1987) p. 8-15); và các vectơ tiết có khả năng cung cấp tín hiệu tiết cho protein tái tổ hợp (Yamane, et. al., "Fusion Protein by *Bacillus subtilis* Secretion Vector", Starch Science, 34. (1987), p. 163-170). Hơn thế nữa, các plasmid có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (ví dụ, pET22b (+), pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19 và PBluescript) có thể được sử dụng.

Để tạo ra proteaza kiềm đột biến bằng kỹ thuật tái tổ hợp, vectơ cần được sử dụng thích hợp là vectơ biểu hiện. Vectơ biểu hiện có thể chứa, ngoài các yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện trong sinh vật chủ, như trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự kết thúc, vị trí gắn kết ribosom, các trình tự hữu ích như gen đánh dấu chọn lọc, yếu tố cis chứa vùng đa nối (polylinker) và trình tự tăng cường, tín hiệu bổ sung poly-A và trình tự gắn kết ribosom (trình tự SD), nếu cần.

Tế bào chuyển gen có thể thu được bằng cách sử dụng vectơ tái tổ hợp bao gồm gen proteaza kiềm đột biến. Theo sáng chế, vectơ tái tổ hợp (cụ thể là, vectơ biểu hiện tái tổ hợp) bao gồm gen proteaza kiềm đột biến theo sáng chế được đưa vào trong tế bào chủ để tạo ra tế bào chuyển gen (tế bào được biến đổi), được cấy trong điều kiện giúp biểu hiện của protein tái tổ hợp để tạo ra proteaza kiềm đột biến.

Đối với tế bào chủ mà vector tái tổ hợp cần được đưa vào, các vi sinh vật bao gồm vi khuẩn như *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* và các tế bào nấm men có thể được sử dụng. Ngoài ra, tế bào bất kỳ như tế bào côn trùng và tế bào động vật (ví dụ, các tế bào động vật có vú) và các tế bào thực vật có thể được sử dụng. Ví dụ, trong sáng chế, sử dụng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus* như *Bacillus subtilis* là thích hợp.

Đối với việc chuyển gen, ví dụ, kỹ thuật chuyển gen đã biết như phương pháp canxi phosphat, phương pháp điện di, phương pháp chuyển nạp thông qua hạt mỡ, phương pháp súng bắn gen và phương pháp PEG có thể được sử dụng. Ví dụ, như phương pháp chuyển gen có thể áp dụng cho vi khuẩn *Bacillus*, phương pháp chuyển gen tế bào toàn vẹn (Bott. K. F. and Wilson, G. A., J. Bacteriol. (1967) 93, 1925), phương pháp điện chuyển (Brigidi. P. et al., FEMS Microbiol. Lett. (1990) 55, 135), phương pháp dung nạp nguyên sinh tế bào (Chang, S. and Cohen, S. N., Mol. Gen. Genet., (1979) 168, p. 111-115) và phương pháp Tris-PEG (Takahashi W. et al., J. Bacteriol. (1983) 156, p. 1130-1134) được đề cập.

Tế bào chuyển gen để tạo ra protein tái tổ hợp có thể được nuôi cấy theo phương pháp chung đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với môi trường để cấy, ví dụ, tế bào chuyển gen sử dụng vi sinh vật như *Escherichia coli* và tế bào nấm men làm vật chủ, có thể là môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp có thể được sử dụng vì các môi trường này chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, các muối vô cơ và các thành phần khác mà có thể hữu ích bởi vi sinh vật chủ mà tế bào chuyển gen có thể được nuôi cấy một cách hiệu quả trong môi trường này. Đối với môi trường, ví dụ, ampicilin và tetracyclin có thể được thêm vào theo loại chất đánh dấu được chọn nếu được sử dụng. Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật được biến đổi gen bởi vector biểu hiện sử dụng trình tự cảm ứng, thì chất cảm ứng, nếu cần, có thể được bổ sung vào môi trường. Cụ thể hơn, ví dụ khi nuôi cấy, vi khuẩn được biến đổi bằng vector biểu hiện thì có thể sử dụng trình tự khởi đầu Lac, ví dụ, isopropyl-1-thio- β -D-galactozit (IPTG) để bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Trong khi nuôi cấy vi sinh vật được biến đổi bằng vector biểu hiện sử dụng trình tự khởi đầu trp, ví dụ, có thể bổ sung axit indoleacetic (IAA) vào môi trường nuôi cấy. Mặc dù các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, tốt hơn là việc nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện phù hợp với tế bào chuyển gen. Ví dụ, để nuôi cấy tế bào chuyển gen *Bacillus subtilis* để thu protein tái tổ hợp, ví dụ, môi trường LB, môi trường 2 × YT, môi trường 2 × L-maltoza, hoặc môi trường lên men CSL có thể được sử dụng.

Theo phương pháp của sáng chế, proteaza kiềm đột biến có thể được biểu hiện bằng hệ thống phiên mã không chứa tế bào từ gen proteaza kiềm đột biến hoặc sản phẩm phiên mã của chúng. "Hệ thống phiên mã không chứa tế bào" đề cập đến hệ thống biên dịch phiên mã *in vitro* hoặc hệ thống biên dịch *in vitro*, được tạo ra bằng cách bổ sung các chất phản ứng như các axit amin cần cho sự biên dịch protein trong dung dịch huyền phù thu được bởi tế bào chủ đồng hóa theo cùng cơ chế. Proteaza kiềm đột biến được biểu hiện này có thể thu được từ dung dịch nuôi cấy, tế bào đồng nhất hoặc hệ thống phiên mã không chứa tế bào bằng các phương pháp chung được sử dụng để tinh chế protein, ví dụ, bằng cách ly tâm, kết tủa amôni sulfat, sắc ký gel, sắc ký trao đổi ion và sắc ký ái lực (các phương pháp này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp thích hợp). Dung dịch như dịch nổi nuôi cấy hoặc dịch nổi nuôi cấy ly giải được phân tách hoặc được làm cô đặc bằng cách ly tâm và lọc bằng máy siêu lọc có thể được sử dụng trực tiếp như dung dịch enzym thô. Nếu proteaza kiềm đột biến biểu hiện không được giải phóng ra khỏi các tế bào, thì tế bào có thể được đồng nhất tiếp đó là tách và tinh chế protein.

Các thao tác để điều chế mARN, điều chế cADN, PCR, RT-PCR, điều chế thư viện, gắn vào vector, chuyển gen tế bào, xác định trình tự ADN cơ sở, tổng hợp hóa học axit nucleic, xác định trình tự axit amin đầu N của protein, gây đột biến và phiên mã protein được sử dụng theo sáng chế có thể được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong các quy trình chung. Các quy trình này, ví dụ, có thể được đề cập trong Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, (2001) 3rd Ed., (Sambrook, J. & Russell, DW. Cold Spring Harbor

Laboratory Press). Cụ thể là, đối với thử nghiệm tái tổ hợp gen cho *Bacillus subtilis*, ví dụ, có thể sử dụng quy trình chung trong thao tác gen đối với *Bacillus subtilis* như nêu trong "hệ 7,2 *Bacillus subtilis*", "Biochemical Experiment Course, Part II, 1. Gene Study Method II", được viết bởi Hirofumi Yoshikawa, (1986) Tokyo Kagaku Dojin (Tokyo), p. 150-169.

Do đó, proteaza kiềm đột biến thu được bằng phương pháp theo sáng chế biểu hiện tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng, tốt hơn là, chất tẩy rửa lỏng đậm đặc, so với proteaza kiềm ban đầu. Vì vậy, sáng chế còn đề cập đến proteaza kiềm đột biến được điều chế bằng phương pháp theo sáng chế để cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng, gen (polynucleotit) mã hóa đột biến, vectơ bao gồm gen, tế bào chuyển gen chứa bao gồm vectơ và phương pháp sản xuất proteaza kiềm đột biến sử dụng tế bào chuyển gen này.

Hơn nữa, proteaza kiềm đột biến theo sáng chế thể hiện tính tan cải thiện trong chế phẩm lỏng so với proteaza kiềm ban đầu. Vì vậy, proteaza kiềm đột biến theo sáng chế là hữu ích như enzym cần được bổ sung vào các chất tẩy rửa dạng bột, tốt hơn là hữu ích như enzym cần được bổ sung vào các chất tẩy rửa lỏng, và tốt hơn là, hữu ích như enzym cần được bổ sung vào các chất tẩy rửa lỏng đậm đặc. Chất tẩy rửa lỏng bao gồm proteaza kiềm đột biến theo sáng chế có thể chứa một lượng proteaza kiềm lớn hơn so với chất tẩy rửa lỏng thông thường, và do đó có thể sở hữu hoạt tính proteaza cao hơn hoạt tính thông thường, kết quả là thu được khả năng tẩy rửa cao hơn do enzym có thể được biểu hiện. Vì vậy, sáng chế còn cung cấp chế phẩm tẩy rửa lỏng chứa proteaza kiềm đột biến theo sáng chế.

Trong chế phẩm chất tẩy rửa lỏng theo sáng chế, hàm lượng proteaza kiềm đột biến theo sáng chế cụ thể là không bị giới hạn miễn là proteaza kiềm này thể hiện hoạt tính. Thích hợp là hàm lượng từ 0,1 đến 25000 U cho mỗi kg chế phẩm chất tẩy rửa, tốt hơn là 0,1 đến 5000 U và tốt hơn là 0,1 đến 2500 U.

Hoạt tính proteaza kiềm được xác định bằng phương pháp sau: A 1/15 M đệm phosphat, pH 7,4 (0,9 mL) và 40 mM dung dịch Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-p-

nitroanilit/dimetyl sulfoxit (0,05 mL) được thêm vào ống nghiệm và được duy trì ở 30°C trong 5 phút. Bổ sung vào hỗn hợp này, enzym lỏng (0,05 mL) và sau đó cho phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, 5% (w/v) bổ sung dung dịch axit xitric chứa nước (2,0 mL) để kết thúc phản ứng. Sự hấp thụ sóng ở 420 nm được đo bằng quang phổ kế. Ở đây, một đơn vị (U) của enzym được xác định như lượng enzym để tạo ra 1 μmol của p-nitroanilin trong 1 phút trong phản ứng trên.

Chế phẩm chất tẩy rửa lỏng theo sáng chế bao gồm chất hoạt động bề mặt và dung dịch proteaza kiềm đột biến khác theo sáng chế. Đối với chất hoạt động bề mặt, các chất hoạt động bề mặt như chất hoạt động bề mặt anion, chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt lưỡng tính và chất hoạt động bề mặt cation có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp của hai hoặc nhiều loại.

Đối với chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt không ion bất kỳ có thể được sử dụng miễn là có chứa C8 đến C22 nhóm hydrocacbon nhìn chung có trong chế phẩm lỏng và C2 nhóm oxyalkylen ở lượng vài mol hoặc nhiều hơn được thêm vào nhóm hydrocacbon. Ví dụ, các chất hoạt động bề mặt không ion được đề cập dưới đây:

$R_1O-(AO)_m-H$ ($R_1 = \text{C8-C22 hydrocacbon}$, $AO = \text{C2-C5 nhóm oxyalkylen}$, $m = 16 \text{ đến } 35$) (JP-A-2010-275468);

$R_1O-(EO)_l-(AO)_m-(EO)_n-H$ ($R_1 = \text{C8-C18 hydrocacbon}$, $EO = \text{C2 nhóm oxyalkylen}$, $AO = \text{C3-C5 nhóm oxyalkylen}$, $l = 3 \text{ đến } 30$, $m = 1 \text{ đến } 5$, $l + n = 14 \text{ đến } 50$) (JP-A-2010-265445, JP-A-2011-63784);

$R_1O-(EO)_m/(AO)_n-H$ ($R_1 = \text{C8-C22 hydrocacbon}$, $EO = \text{C2 nhóm oxyalkylen}$, $AO = \text{C3-C5 nhóm oxyalkylen}$, $m = 10 \text{ đến } 30$, $n = 0 \text{ đến } 5$, EO và AO được liên kết hạn chế hoặc ngẫu nhiên) (JP-A-2010-189551);

$R_1(CO)_lO-(EO)_m/(AO)_n-R_2$ ($R_1 = \text{C8-C22 hydrocacbon}$, $EO = \text{C2 nhóm oxyalkylen}$, $AO = \text{C3-C5 nhóm oxyalkylen}$, $l = 0 \text{ đến } 1$, $m = 14 \text{ đến } 50$, $n = 1 \text{ đến } 5$, $R_2 = \text{hydrogen (} l = 0 \text{) hoặc A C1-C3 nhóm alkyl}$, EO và AO được liên kết hạn chế hoặc ngẫu nhiên) (JP-A-2010-229385);

$R_1O-(EO)_m-(AO)_n-H$ ($R_1 = C8-C22$ hydrocacbon, $EO = C2$ nhóm oxyalkylen, $AO = C3-C5$ nhóm oxyalkylen, $m = 15$ đến 30 , $n = 1$ đến 5) (JP-A-2010-229387);

$R_1O-(AO)_m/(Gly)_n-H$ và/hoặc $R_2-COO-(AO)_p/(Gly)_q-H$ ($R_1 = C8-C22$ nhóm hydrocacbon, $R_2 = C7-C21$ nhóm hydrocacbon, $AO = C2-C3$ nhóm oxyalkylen, $Gly =$ nhóm glyxerol, $m = 0$ đến 5 , $n = 2$ đến 10 , $p = 0$ đến 5 , $q = 2$ đến 10 , AO và Gly được liên kết hạn chế hoặc ngẫu nhiên) (JP-A-2010-254881);

$R_1-COO-(PO)_m/(EO)_n-R_2$ ($R_1 = C7-C21$ nhóm hydrocacbon, $COO =$ nhóm cacbonyloxy, $R_2 = C1-C3$ nhóm alkyl, $PO =$ nhóm oxypropylen, $EO =$ nhóm oxyetylen, $m = 0,3$ đến 5 , $n = 8$ đến 25 , PO và EO được liên kết hạn chế hoặc ngẫu nhiên) (JP-A-2010-265333);

$R_1O-(EO)_l-(PO)_m-(EO)_n-H$ ($R_1 = C8-C20$ hydrocacbon, $EO = C2$ nhóm oxyalkylen, $PO =$ nhóm oxypropylen, $l \geq 1$, $n \geq 1$, $0 < m < l + n$, EO và PO được liên kết hạn chế) (WO98/24865);

$R_1O-(EO)_m-(PO)_n-H$ ($R_1 = C10-C16$ nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl, $EO =$ nhóm etylen oxit, $PO =$ nhóm propylen oxit, $m = 5$ đến 15 , $n = 1$ đến 3) (JP-A-8-157867);

$R_1(CO)-(EO)_m-OR_2$ ($R_1 = C11-C13$ nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, $R_2 = C1-C3$ nhóm alkyl, $EO =$ nhóm etylen oxit, $m = 10$ đến 20) (JP-A-2008-7706, JP-A-2009-7451, JP-A-2009-155594, JP-A-2009-155606);

$R_1(CO)-(AO)_m-OR_2$ ($R_1 = C9-C13$ nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, $AO = C2-C4$ nhóm oxyalkylen, $R_2 = C1-C3$ nhóm alkyl, $m = 5$ đến 30) (JP-A-2009-144002, JP-A-2009-173858, JP-A-2010-189612); và

axit béo alkanol amit, axit béo alkanol glucamit, và alkyl polyglucozit.

Đối với chất hoạt động bề mặt anion, chất hoạt động bề mặt anion cacboxylat, chất hoạt động bề mặt anion este của axit sulfuric hoặc axit sulfonic,

chất hoạt động bề mặt anion gốc không phải xà phòng, alkyl benzen axit sulfonic chuỗi thẳng, benzene axit sulfonic hoặc muối của chúng, muối este của polyoxyetylen alkyl axit sulfuric, muối của axit α -olefin sulfonic, muối của axit alkyl benzen sulfonic, muối của α -sulfo axit béo, xà phòng axit béo, chất hoạt động bề mặt gốc muối este của axit phosphoric, axyl alaninat, axyl taurat, alkyl ete của axit carboxylic, este của cồn axit sulfuric và các thành phần khác được đề cập. Tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt amôni bậc bốn có nhóm alkyl chuỗi dài đơn có 8 đến 22 nguyên tử cacbon và amin thứ ba có nhóm alkyl chuỗi dài đơn có 8 đến 22 nguyên tử cacbon được đề cập.

Đối với chất hoạt động bề mặt cation, ví dụ, muối amôni bậc bốn có nhóm alkyl chuỗi dài, amin thứ ba có nhóm alkyl chuỗi dài đơn, muối amôni của alkyltrimetyl, muối amôni của dialkyldimetyl và muối alkylpyridinium được đề cập. Như chất hoạt động bề mặt lưỡng tính, loại alkyl betain, loại alkyl amit betain, loại imidazolin, loại alkyl amino sulfon, loại alkyl amino axit carboxylic, loại alkyl amit axit carboxylic, các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính loại amit axit amin hoặc loại axit phosphoric như alkylaxetic axit betain, alkanol amit propylaxetic axit betain, alkyl imidazolin và alkyl alanin, được đề cập. Thích hợp là, sulfobetain hoặc carbobetain có nhóm alkyl có từ 10 đến 18 nguyên tử cacbon có thể được đề cập.

Chế phẩm chất tẩy rửa lỏng theo sáng chế thích hợp là chế phẩm chất tẩy rửa lỏng đậm đặc. Theo sáng chế, "chất tẩy rửa lỏng đậm đặc" đề cập đến chất tẩy rửa lỏng bao gồm chất hoạt động bề mặt có nồng độ 40% khối lượng hoặc nhiều hơn và nước ở nồng độ ít hơn 60% khối lượng, thích hợp là, chất tẩy rửa lỏng bao gồm tác nhân hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 40 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 60% khối lượng, tốt hơn là, chất tẩy rửa lỏng bao gồm tác nhân hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 45 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 55% khối lượng, tốt hơn là, chất tẩy rửa lỏng bao gồm tác nhân hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 50% khối lượng, và thích hợp hơn nữa là, chất tẩy rửa

lông bao gồm tác nhân hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 30% khối lượng.

Chế phẩm chất tẩy rửa lông theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần thường được sử dụng trong chế phẩm lông, như polyme hòa tan nước, dung môi hữu cơ có thể trộn với nước, tác nhân kiềm, tác nhân chelat hóa, axit hữu cơ hoặc muối của chúng, enzym khác ngoài proteaza kiềm đột biến của sáng chế, tác nhân ổn định enzym, tác nhân huỳnh quang, tác nhân khử mùi, tác nhân hướng đích, tác nhân tẩy trắng như hydro peroxit, chất chống oxy hóa, chất điều chỉnh pH, chất đệm, chất bảo quản, hương vị, muối, cồn và sacarit.

Các ví dụ về polyme hòa tan trong nước bao gồm hợp chất polyme (JP-A-2010-275468, JP-A-10-060496) có (i) gốc chuỗi polyete bao gồm đơn vị trùng hợp có nguồn gốc từ epoxit có 2 đến 5 nguyên tử cacbon và (ii) gốc chuỗi polyme bao gồm đơn vị trùng hợp có nguồn gốc từ ít nhất một đơn phân axit cacboxylic không bão hòa được chọn từ axit acrylic, axit metacrylic và axit maleic, và cấu trúc ghép trong đó hoặc (i) hoặc (ii) đóng vai trò như chuỗi xương sống và cấu trúc còn lại đóng vai trò như chuỗi nhánh; và polyme hòa tan nước (JP-A-2009-155606) có đơn vị alkylen terephthalat và/hoặc đơn vị alkylen isophthalat, và đơn vị oxyalkylen và/hoặc đơn vị polyoxyalkylen.

Các ví dụ về dung môi hữu cơ có thể phối trộn với nước bao gồm các alkylen glycol của các alkanol, glyxerin, các polyalkylen glycol, các (poly)alkylen glycol (mono hoặc di) alkylete, các alkylglyxeryl ete và các ete thơm của các (poly)alkylen glycol. Alkylen glycol có 2 đến 6 nguyên tử cacbon, như etylen glycol, propylene glycol, butylen glycol hoặc hexylen glycol, glyxerin, polyetylen glycol monophenyl ete, etylen glycol monobenzyl ete, dietylen glycol monobenzyl ete hoặc thành phần tương tự là thích hợp. Trong chế phẩm chất tẩy rửa lông theo sáng chế, hàm lượng dung môi hữu cơ có thể phối trộn với nước là 1 đến 40% khối lượng, và thích hợp là, từ 1 đến 35% khối lượng.

Các ví dụ về tác nhân kiềm bao gồm alkanol amin có từ 1 đến 3 C2-C4 alkanol như monoetanol amin, dietanol amin, trietanol amin, polyoxyalkylen amin và dimetyl aminopropyl amin. Monoetanol amin hoặc trietanol amin là thích hợp. Trong chế phẩm chất tẩy rửa lỏng của sáng chế, hàm lượng tác nhân kiềm là từ 0 đến 20% khối lượng, và thích hợp là từ 0 đến 10% khối lượng.

Đối với tác nhân chelat hóa, ví dụ, các axit aminopolyaxetic như axit nitrilotriaxetic, axit iminodioxetic, axit etylen-diaminaxetic, axit dietylen-triamin-pentaaxetic, axit glycoletherdiamintetraaxetic, axit hydroxyethyliminodioxetic, axit trietylen-tetraminhexaaxetic và axit đjenkolic, hoặc các muối của các axit này; các axit hữu cơ như axit diglycol, axit oxydisuccinic, axit carboxymetyloxysuxinic, axit xitric, axit lactic, axit tartaric, axit oxalic, axit malic, axit oxydisuxinic, axit gluconic, axit carboxymetylsuxinic và axit carboxy-metyltartaric hoặc các muối của các axit này; và aminotri(axit metylenphosphonic), axit 1-hydroxyetylidene-1,1-diphosphonic, etylen-diamintetra (axit metylenphosphonic), dietylen-triamin-penta(axit metylenphosphonic), các muối của các amin kim loại kiềm thấp hơn của chúng được đề cập. Trong chế phẩm chất tẩy rửa lỏng của sáng chế, hàm lượng của tác nhân chelat hóa thích hợp là từ 0,1 đến 5% khối lượng và tốt hơn là từ 0,1 đến 4 % khối lượng.

Đối với axit hữu cơ hoặc muối của chúng, ví dụ, các axit polyvalent carboxylic như các axit béo bão hòa, axit succinic, axit maleic, axit fumaric hoặc các muối của các axit này; các axit hydroxycarboxylic như axit xitric, axit malic, axit glycol, axit p-hydroxybenzoic, axit benzoic hoặc các muối của chúng được đề cập. Trong số đó, axit xitric hoặc muối của chúng là thích hợp hơn. Trong chế phẩm chất tẩy rửa lỏng của sáng chế, hàm lượng của axit hữu cơ hoặc muối của chúng là từ 0 đến 5% khối lượng, và thích hợp là, từ 0 đến 3 % khối lượng.

Các ví dụ về tác nhân khử mùi và tác nhân phân tán bao gồm axit polyacrylic, axit polymaleic, carboxymetylxeluloza, polyetylen glycol có trọng lượng phân tử trung bình trọng lượng là 5000 hoặc nhiều hơn, copolyme maleic

anhydrit-diisobutylen, a copolyme ete maleic anhydrit-metylvinyl, copolyme maleic anhydrit-vinyl axetat, sản phẩm ngưng tụ naphthalen sulfonat formalin và các polyme được mô tả trong các điểm 1 đến 21 yêu cầu bảo hộ (trang 1, cột 3, dòng 5 đến trang 3, cột 4, dòng 14) của JP-A-59-62614. Nếu chúng không phù hợp để pha trộn, chúng không thể được thêm vào.

Đối với tác nhân kháng nhuộm màu, ví dụ, polyvinylpyrrolidon được đề cập. Hàm lượng của chúng thích hợp là từ 0,01 đến 10% khối lượng.

Các ví dụ về tác nhân tẩy trắng bao gồm hydro peroxit, percacbonat và Pperborat. Hàm lượng của chúng thích hợp là từ 1 đến 10% khối lượng. Khi tác nhân tẩy trắng được sử dụng, tetraaxetyletyldiamin (TAED) và chất hoạt hóa tẩy trắng như được mô tả trong JP-A-6-316700 có thể được thêm vào ở lượng từ 0,01 đến 10% khối lượng.

Các ví dụ về tác nhân huỳnh quang bao gồm tác nhân huỳnh quang biphenyl (ví dụ, Tinopal CBS-X) và tác nhân huỳnh quang stilben (ví dụ, thuốc nhuộm huỳnh quang DM). Hàm lượng của tác nhân huỳnh quang thích hợp là từ 0,001 đến 2 % khối lượng.

Các ví dụ về các enzyme khác ngoại trừ proteaza kiềm đột biến của sáng chế bao gồm các loại khác của các proteaza và các hydrolaza như xellulaza, β -glucanaseza, hemicelulaseza, lipaza, peroxidaza, laccaseza, α -amylaza, glucoamylaza, cutinaza, pectinaza, reductaza, oxidaza, phenol oxidaza, ligninaza, pullulanaza, pectat lyaza, xyloglucanaza, xylanaza, pectin axetyleraza, polygalacturonaza, rhamnogalacturonaza, pectin lyaza, các loại mannanaza khác, pectinmetyl esteraza, cellobiohydrolaseza, và transglutaminaza và hỗn hợp của hai hoặc nhiều enzym này.

Như các thành phần khác, ví dụ, chất ổn định enzym như hợp chất Bo, nguồn ion canxi (hợp chất cung cấp ion canxi), hợp chất bihydroxy và axit formic; chất chống oxy hóa như butylhydroxytoluen, cresol distyren hóa, natri sulfit và natri hydrogen sulfit; chất hòa tan như axit paratoluenesulfonic, axit cumen sulfonic, axit metaxylenesulfonic, benzoat (có hiệu quả như chất bảo

quản), dung môi hữu cơ không hòa tan nước bao gồm paraffin như octan, decan, dodecan và tridecan; olefin như decen và dodecen; alkyl halogen hóa như metylen clorua và 1,1,1-tricloetan; terpen như D-limonen, chất màu, chất tạo mùi, chất bảo quản kháng sinh và tác nhân khử bọt như silicon có thể được thêm vào.

Như chế phẩm tẩy rửa lỏng thích hợp của sáng chế, chế phẩm được mô tả trong các ví dụ của JP-A-2010-189551, JP-A-2010-265333, JP-A-2010-275468, WO2010/058832, WO2010/119935 hoặc WO2010/137635 được đề cập. Cụ thể hơn, chế phẩm tẩy rửa lỏng bất kỳ có thể được sử dụng như được mô tả trong các ví dụ của JP-A-2010-275468. Như một ví dụ cụ thể, chế phẩm chất tẩy rửa lỏng được mô tả trong Ví dụ 3 có thể được đề cập trong đó có thể được điều chế bằng cách bổ sung enzym cho chế phẩm bao gồm ví dụ, 66% của chất hoạt động bề mặt (chất hoạt động bề mặt không ion: 46%; chất hoạt động bề mặt anion: 20%), 3% polyme hòa tan nước (polyetylen glycol (số phân tử gam bổ sung trung bình etylen oxit: 25), allyl ete/acrylic axit = 75/25 (tỷ khối) copolyme), 14% dung môi hữu cơ có thể trộn với nước (dietylen glycol monobutyl ete, propylen glycol), 5% tác nhân kiềm (monoetanol amin), 11% nước trao đổi ion và chất màu, hương vị (chế phẩm C).

Ví dụ, chế phẩm tẩy rửa lỏng có bán trên thị trường dưới đây là chất tẩy rửa lỏng đậm đặc bao gồm 40% chất hoạt động bề mặt hoặc nhiều hơn. Các thành phần được mô tả trong sản phẩm gắn nhãn sẽ được thể hiện dưới đây.

Chế phẩm A (Attack Neo; được sản xuất bởi Kao Corp.): chất hoạt động bề mặt (chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt anion: bazơ alkyl benzen mạch thẳng, bazơ axit béo) 74%, tác nhân ổn định (butyl carbitol), tác nhân kiềm, tác nhân phân tán và enzym.

Chế phẩm B (NANOX; được sản xuất bởi Lion Corporation): chất hoạt động bề mặt (polyoxyetylenalkyl sulfat) 55%, tác nhân ổn định và enzym.

Thích hợp là, chế phẩm chất tẩy rửa lỏng của sáng chế được sử dụng cho các vật liệu làm quần áo hoặc vải (khăn trải giường, màn cửa, thảm, vải treo

tường), nhưng không chỉ giới hạn ở ở các sản phẩm này. Do chế phẩm chất tẩy rửa theo sáng chế có thể chứa proteaza kiềm đột biến của sáng chế ở lượng lớn so với chế phẩm chất tẩy rửa thông thường, khả năng tẩy rửa enzyme cao có thể được cung cấp.

Sáng chế còn bao gồm các chế phẩm, phương pháp sản xuất, việc sử dụng hoặc các phương pháp như các phương án được đưa ra làm ví dụ dưới đây.

(1) Phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng, trong đó phương pháp bao gồm các bước, thu nhận proteaza kiềm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, thay thế ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của các Bảng 1-1 và 1-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó, bằng gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 1-1 và 1-2.

(2) Proteaza kiềm đột biến bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin mức độ tương đồng có 80% hoặc nhiều hơn, trong đó ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của các Bảng 2-1 và 2-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 2-1 và 2-2 .

(3) Trong các mục (1) và (2) nêu trên, proteaza kiềm này có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 là proteaza kiềm có mức độ tương đồng tốt hơn là 85% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, thích hợp hơn nữa là 97% hoặc nhiều hơn, còn thích hợp là 97,5% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn và còn tốt hơn là, 99% hoặc nhiều hơn, với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2.

(4) Trong các mục (1) đến (2) nêu trên, proteaza kiềm này có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 thích hợp là proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2

có sự loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung thích hợp là 1 đến 40, tốt hơn là 1 đến 20, và tốt hơn là, 1 đến 10 axit amin.

(5) Trong các mục (1) đến (2) nêu trên, proteaza kiềm này có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 là proteaza thích hợp được chọn từ nhóm bao gồm:

Proteaza KP9860 (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. KSM-KP9860 (FERM BP-6534), WO99/18218, số truy cập GenBank AB046403);

Proteaza E-1 (có nguồn gốc từ *Bacillus* No. D-6 (FERM P-1592), JP-A-49-71191, số truy cập GenBank AB046402);

Proteaza Ya (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. Y (FERM BP-1029), JP-A-61-280268, Số truy cập GenBank AB046404);

Proteaza SD521 (có nguồn gốc từ *Bacillus* SD521 (FERM P-11162), JP-A-3-191781, số truy cập GenBank AB046405);

Proteaza A-1 (có nguồn gốc từ NCIB12289, WO88/01293, số truy cập GenBank AB046406);

Proteaza A-2 (có nguồn gốc từ NCIB12513, WO98/56927); hoặc

Proteaza 9865 (có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566), số truy cập GenBank AB084155).

(6) Trong các mục (1) đến (2) nêu trên, proteaza kiềm này có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 là proteaza kiềm thu được bằng cách thay thế, tốt hơn là, tyrosin tại vị trí 195 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2, bằng glutamin, axit aspartic tại vị trí 369 bằng asparagin, threonin tại vị trí 65 bằng prolin, valin tại vị trí 273 bằng isoleuxin, threonin tại vị trí 359 bằng serin, serin tại vị trí 387 bằng alanin, asparagin tại vị trí 166 bằng glyxin, glyxin tại vị trí 167 bằng valin, alanin tại vị trí 133 bằng serin và valin tại vị trí 134 bằng threonin, và bằng cách chèn serin giữa vị trí 133 và vị trí 134; tốt hơn là, proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 250.

(7) Trong các mục từ (1) đến (6) nêu trên, tốt hơn là proteaza kiềm này có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 có các gốc axit amin dưới đây tại các vị trí tương ứng với các vị trí 30, 68 và 255 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2:

Vị trí tương ứng với vị trí 30: axit aspartic

Vị trí tương ứng với vị trí 68: histidin

Vị trí tương ứng với vị trí 255: serin.

(8) Trong mục (7) nêu trên, tốt hơn là, proteaza kiềm có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 có các gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của Bảng 3 tại các vị trí tương ứng với các vị trí được mô tả ở cột (i) của Bảng 3 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2.

(9) Trong các mục (1) đến (8) nêu trên, thích hợp là, ít nhất một gốc axit amin bao gồm ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó.

(10) Trong các mục từ (1) đến (9) nêu trên, thích hợp là, ít nhất một gốc axit amin bao gồm ít nhất hai gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó.

(11) Theo phương pháp để cải thiện tính tan của proteaza kiềm được mô tả trong các mục (1), từ (3) đến (10) nêu trên, thích hợp là, ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó được thế bằng gốc axit amin được mô tả dưới đây:

Vị trí 405 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin hoặc tryptophan;

Vị trí 81 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin, prolin, tyrosin hoặc tryptophan;

Vị trí 40 hoặc vị trí tương ứng với nó: isoleuxin, phenylalanin hoặc leuxin;

Vị trí 191 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin hoặc valin; và

Vị trí 59 hoặc vị trí tương ứng với nó: valin, isoleuxin hoặc leuxin.

(12) Proteaza kiểm đột biến được mô tả trong các mục từ (2) đến (10) nêu trên, thích hợp là, ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại vị trí 405, vị trí 81, vị trí 40, vị trí 191 và vị trí 59 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là gốc axit amin được mô tả dưới đây:

Vị trí 405 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin hoặc tryptophan;

Vị trí 81 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin, prolin, tyrosin hoặc tryptophan;

Vị trí 40 hoặc vị trí tương ứng với nó: isoleuxin, phenylalanin hoặc leuxin;

Vị trí 191 hoặc vị trí tương ứng với nó: leuxin hoặc valin; và

Vị trí 59 hoặc vị trí tương ứng với nó: valin, isoleuxin hoặc leuxin.

(13) Trong các mục (1), từ (3) đến (11) nêu trên, thích hợp là chất tẩy rửa lỏng chứa chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 40% khối lượng hoặc nhiều hơn và nước ở nồng độ ít hơn 60% khối lượng, tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 40 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 60% khối lượng, tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 45 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 55% khối lượng, thích hợp hơn nữa là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 50% khối lượng, và còn thích hợp là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 30% khối lượng.

(14) Proteaza kiểm đột biến mã hóa gen được mô tả trong bất kỳ trong số các mục từ (2) đến (10) và (12) nêu trên, hoặc proteaza kiểm biểu hiện tính tan

cải thiện được mô tả trong bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (11) và (13) nêu trên.

(15) Vector tái tổ hợp, trong đó vector này chứa gen được mô tả trong mục (14) nêu trên.

(16) Tế bào chuyển gen chứa vector tái tổ hợp được mô tả trong mục (17) nêu trên.

(17) Phương pháp sản xuất proteaza kiềm đột biến sử dụng tế bào chuyển gen được mô tả trong mục (16) nêu trên.

(18) Chế phẩm tẩy rửa lỏng bao gồm proteaza kiềm đột biến được mô tả trong bất kỳ trong số các mục từ (2) đến (10) và (12) nêu trên hoặc proteaza kiềm biểu hiện tính tan cải thiện được mô tả trong mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (11) và (13) nêu trên.

(19) Theo mục (18) nêu trên, chế phẩm tẩy rửa lỏng trên bao gồm, thích hợp là chất hoạt động bề mặt ở nồng độ 40% khối lượng hoặc nhiều hơn và nước ở nồng độ ít hơn 60% khối lượng, tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 40 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 60% khối lượng, tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 45 đến 90% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 55% khối lượng, thích hợp hơn nữa là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 50% khối lượng, và còn tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt ở nồng độ từ 50 đến 75% khối lượng và nước ở nồng độ 5% khối lượng hoặc nhiều hơn và ít hơn 30% khối lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, phạm vi kỹ thuật của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế proteaza kiềm đột biến

Phương pháp điều chế proteaza kiềm đột biến theo sáng chế sẽ được mô tả dưới đây bằng phương pháp điều chế, ví dụ, đột biến "D11G", bằng cách làm biến đổi axit aspartic gốc (D11) tại vị trí 11 của trình tự axit amin (SEQ ID No: 2) của vùng enzym trưởng thành proteaza KP43 dạng tự nhiên với glyxin, như một ví dụ.

Sử dụng plasmit pHA64TSB được mô tả ở Ví dụ tham khảo 1 (2) (được mô tả bên dưới) được pha loãng thích hợp làm khuôn; đoạn môi KG24S2 (SEQ ID No: 3: ATAAGGATCCGTGAGGAGGGAACCGA, có vị trí BamHI), được ủ bổ sung cho vùng ngược chiều của codon ban đầu, và đoạn môi D11_R (SEQ ID No: 4: CGCTTTGACAATTCCACGCGCAAC), được ủ bổ sung cho vùng ngược chiều liền kề với codon D11, PCR được thực hiện để khuếch đại vùng đầu N trình tự mã hóa ADN của proteaza KP43. Sau đó, sử dụng plasmit pHA64TSB làm khuôn, đoạn môi D11G_F (SEQ ID No: 5: GGAATTGTCAAAGCGGGAGTGGCTCAGAGCAGCTAC, một phần của mặt 5' của chúng gắn kết bổ sung cho đoạn môi D11_R) để thay thế codon D11 bằng codon glyxin, và đoạn môi KG11S (SEQ ID No: 6: CCCCTCTAGACGATTACCATATTAATTCCTCTACCC, có vị trí XbaI), được ủ bổ sung cho vùng xuôi dòng của codon đầu mút, PCR được thực hiện để khuếch đại vùng đầu C trình tự mã hóa ADN proteaza KP43. Sử dụng hỗn hợp của sản phẩm PCR thu được mã hóa vùng đầu N và sản phẩm PCR thu được mã hóa vùng đầu C làm khuôn, và sử dụng đoạn môi KG24S2 và đoạn môi KG11S trước, PCR được thực hiện để thu được sản phẩm PCR có toàn bộ chiều dài gen của proteaza KP43 đột biến trong đó codon D11 được thay bằng codon glyxin. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh chế bằng sự kết tủa etanol, được cắt đồng thời bằng enzym giới hạn BamHI và XbaI và được trộn với vector biểu hiện/chèn gen được mô tả trong Ví dụ tham khảo 1 (1) (được mô tả sau) để thực hiện phản ứng thất bằng cách sử dụng Ligation High (được sản xuất bởi Toyobo Co., Ltd.). Sản phẩm thất được tinh chế bởi sự kết tủa etanol. Sau đó, vi khuẩn chủ, *Bacillus* dòng sp. KSM-9865 (FERM P-18566) được chuyển gen bằng phương pháp điện di và được cấy lên môi trường thạch LB kiềm có chứa sữa tách béo. Vài ngày

sau, các khuẩn lạc được hình thành trên môi trường thạch. Từ các khuẩn lạc, tế bào chuyển gen có khả năng tạo thành khuẩn lạc trên sữa tách béo được tách để thu được tế bào chuyển gen tạo ra proteaza KP43 đột biến "D11G" trong đó D11 được biến đổi bằng glyxin.

Đồng thời, các bước tương tự được lặp lại bằng cách sử dụng hai đoạn môi được mô tả trong cột "đoạn môi đột biến R" và cột "đoạn môi đột biến F" của các Bảng 6-1 đến 6-13 tương ứng dưới đây thay cho đoạn môi D11_R và đoạn môi D11G_F để thu được các tế bào chuyển gen tạo ra các proteaza KP43 đột biến. Các proteaza đột biến được mô tả trong cột "Proteasea KP43 đột biến" của các Bảng 6-1 đến 6-13 bên dưới. Từng tế bào chuyển gen thu được được cấy theo cùng phương pháp được mô tả trong Ví dụ tham khảo 1 (2) để thu được dịch nuôi cấy chứa đột proteaza đột biến.

Bảng 6-1

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
D11G	D11_R	CGCTTTGACAAATCCACGCGCAAC (SEQ ID No: 4)	D11G_F	GGAATTGTCAAAGCGGGAGTGGCTCAGAGCAGCTAC (SEQ ID No: 5)
D11N	D11_R	CGCTTTGACAAATCCACGCGCAAC (SEQ ID No: 4)	D11N_F	GGAATTGTCAAAGCGGAATGTGGCTCAGAGCAGCTAC (SEQ ID No: 7)
D11S	D11_R	CGCTTTGACAAATCCACGCGCAAC (SEQ ID No: 4)	D11S_F	GGAATTGTCAAAGCGTCCGTGGCTCAGAGCAGCTAC (SEQ ID No: 8)
S16I	S16_R	GCTCTGAGCCACATCCGCTTTGAC (SEQ ID No: 9)	S16I_F	GATGTGGCTCAGAGCATTTACGGGTTGTATGGACAA (SEQ ID No: 10)
S16L	S16_R	GCTCTGAGCCACATCCGCTTTGAC (SEQ ID No: 9)	S16L_F	GATGTGGCTCAGAGCCTTTACGGGTTGTATGGACAA (SEQ ID No: 11)
S16V	S16_R	GCTCTGAGCCACATCCGCTTTGAC (SEQ ID No: 9)	S16V_F	GATGTGGCTCAGAGCGGTGTACGGGTTGTATGGACAA (SEQ ID No: 12)
S16W	S16_R	GCTCTGAGCCACATCCGCTTTGAC (SEQ ID No: 9)	S16W_F	GATGTGGCTCAGAGCTGGTACGGGTTGTATGGACAA (SEQ ID No: 13)
Y20A	Y20_R	CAACCCGTAGCTGCTCTGAGCCAC (SEQ ID No: 14)	Y20A_F	AGCAGCTACGGGTTGGCAGGACAAAGACAGATCGTA (SEQ ID No: 15)
Q22W	Q22_R	TCCATACAAACCCGTAGCTGCTCTG (SEQ ID No: 16)	Q22W_F	TACGGGTTGTATGGATGGGGACAGATCGTAGCGGTT (SEQ ID No: 17)
G23N	G23_R	TTGTCCATACAAACCCGTAGCTGCT (SEQ ID No: 18)	G23N_F	GGTTGTATGGACAAAATCAGATCGTAGCGGTTGCC (SEQ ID No: 19)
R37T	R37_R	ACCTGTATCAAGCCCTGTATCGGC (SEQ ID No: 20)	R37T_F	GGGCTTGATACAGGTACAAAATGACAGTTCGATGCAT (SEQ ID No: 21)
S40F	S40_R	GTCATTGCGACCTGTATCAAGCCC (SEQ ID No: 22)	S40F_F	ACAGTTCGCAATGACTTCTCGATGCATGAAGCCTTC (SEQ ID No: 23)
S40I	S40_R	GTCATTGCGACCTGTATCAAGCCC (SEQ ID No: 22)	S40I_F	ACAGTTCGCAATGACATTTTCGATGCATGAAGCCTTC (SEQ ID No: 24)
S40L	S40_R	GTCATTGCGACCTGTATCAAGCCC (SEQ ID No: 22)	S40L_F	ACAGTTCGCAATGACCTTTTCGATGCATGAAGCCTTC (SEQ ID No: 25)

Bảng 6-2

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
S40V	S40_R	GTCATTGCGACCTGTATCAAGCCC (SEQ ID No: 22)	S40V_F	ACAGGTCGCAATGACGTGTCGATGCAAGCCTTC (SEQ ID No: 26)
S40W	S40_R	GTCATTGCGACCTGTATCAAGCCC (SEQ ID No: 22)	S40W_F	ACAGGTCGCAATGACTGTCGATGCAAGCCTTC (SEQ ID No: 27)
S41I	S41I_R	ACTGTCATTGCGACCTGTATCAAG (SEQ ID No: 28)	S41I_F	GGTCGCAATGACAGTATTATGCAATGAAAGCCTTCCGC (SEQ ID No: 29)
A52G	A52_R	AGTAATTTCCCGCGGAAGGCTTC (SEQ ID No: 30)	A52G_F	CGCGGGAATAATTACTGGATTATATGCATTGGGACGG (SEQ ID No: 31)
A52S	A52_R	AGTAATTTCCCGCGGAAGGCTTC (SEQ ID No: 30)	A52S_F	CGCGGGAATAATTACTTCCTTATATGCATTGGGACGG (SEQ ID No: 32)
L53A	L53_R	TGCAGTAATTTTCCCGCGGAAGGC (SEQ ID No: 33)	L53A_F	GGGAAATAATTACTGCAGCATATGCATTGGGACGGACG (SEQ ID No: 34)
L53I	L53_R	TGCAGTAATTTTCCCGCGGAAGGC (SEQ ID No: 33)	L53I_F	GGGAAATAATTACTGCAATTTATGCATTGGGACGGACG (SEQ ID No: 35)
L53V	L53_R	TGCAGTAATTTTCCCGCGGAAGGC (SEQ ID No: 33)	L53V_F	GGGAAATAATTACTGCAGTGTATGCATTGGGACGGACG (SEQ ID No: 36)
L56V	L56_R	TGCATATAATGCAGTAATTTTCCC (SEQ ID No: 37)	L56V_F	ACTGCATTATATGCAGTGGGACGGACGAATAATGCC (SEQ ID No: 38)
T59F	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59F_F	TATGCATTGGGACGGTTCAATAATGCCAATGATACG (SEQ ID No: 40)
T59I	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59I_F	TATGCATTGGGACGGATTAAATAATGCCAATGATACG (SEQ ID No: 41)
T59L	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59L_F	TATGCATTGGGACGGCTTAATAATGCCAATGATCCG (SEQ ID No: 42)
T59M	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59M_F	TATGCATTGGGACGGATGAATAATGCCAATGATACG (SEQ ID No: 43)

Bảng 6-3

Đột biến proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
T59V	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59V_F	TATGCATTGGGACGGGTGAATAATGCCAATGATACG (SEQ ID No: 44)
T59W	T59_R	CCGTCCCAATGCATATAATGCAGT (SEQ ID No: 39)	T59W_F	TATGCATTGGGACGGGTGAATAATGCCAATGATACG (SEQ ID No: 45)
N60F	N60_R	CGTCCGTCCCAATGCATATAATGC (SEQ ID No: 46)	N60F_F	GCATTGGGACGGGACGTTCAATGCCAATGATACGAAT (SEQ ID No: 47)
N60I	N60_R	CGTCCGTCCCAATGCATATAATGC (SEQ ID No: 46)	N60I_F	GCATTGGGACGGGACGATTAAATGCCAATGATACGAAT (SEQ ID No: 48)
N60L	N60_R	CGTCCGTCCCAATGCATATAATGC (SEQ ID No: 46)	N60L_F	GCATTGGGACGGGACGCTTAATGCCAATGATACGAAT (SEQ ID No: 49)
N60V	N60_R	CGTCCGTCCCAATGCATATAATGC (SEQ ID No: 46)	N60V_F	GCATTGGGACGGGACGGTGAATGCCAATGATACGAAT (SEQ ID No: 50)
N60W	N60_R	CGTCCGTCCCAATGCATATAATGC (SEQ ID No: 46)	N60W_F	GCATTGGGACGGGACGTGGAATGCCAATGATACGAAT (SEQ ID No: 51)
N63D	N63_R	GGCATTATTCGTCCGTCCCAATGC (SEQ ID No: 52)	N63D_F	CGGACGAATAATGCCGATGATACGAATGGTCATGGT (SEQ ID No: 53)
N63L	N63_R	GGCATTATTCGTCCGTCCCAATGC (SEQ ID No: 52)	N63L_F	CGGACGAATAATGCCCTTGATACGAATGGTCATGGT (SEQ ID No: 54)
G80A	G80_R	GTTTCCTAATACGGAGCCAGCCAC (SEQ ID No: 55)	G80A_F	TCCGTATTAGGAAACGCATCCACTAATAAAGGAATG (SEQ ID No: 56)
G80H	G80_R	GTTTCCTAATACGGAGCCAGCCAC (SEQ ID No: 55)	G80H_F	TCCGTATTAGGAAACCAATTCCTACTAATAAAGGAATG (SEQ ID No: 57)
S81F	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81F_F	GTATTAGGAAACGGCTTCACTAATAAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 59)
S81I	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81I_F	GTATTAGGAAACGGCATTACTAATAAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 60)
S81L	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81L_F	GTATTAGGAAACGGCCTTACTAATAAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 61)

Bảng 6-4

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
S81Q	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81Q_F	GTATTAGGAACGGCCAGACTAATAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 62)
S81W	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81W_F	GTATTAGGAACGGCTGGACTAATAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 63)
S81Y	S81_R	GCCGTTTCCTAATACGGAGCCAGC (SEQ ID No: 58)	S81Y_F	GTATTAGGAACGGCTATACTAATAAGGAATGGCG (SEQ ID No: 64)
T82Q	T82_R	GGAGCCGTTTCCTAATACGGAGCC (SEQ ID No: 65)	T82Q_F	TTAGGAACGGCTCCCGAATAAAGGAATGGCGCT (SEQ ID No: 66)
N91C	N91_R	CGCCTGAGCGGCCATTCTTTATT (SEQ ID No: 67)	N91C_F	ATGGCGCCTCAGGCGTGCCTAGTCTTCCAACTATC (SEQ ID No: 68)
S100F	S100_R	ATCCATGATAGATTGGAAGACTAG (SEQ ID No: 69)	S100F_F	CAATCTATCATGTGATTTCGGTGGGGGACTTGGAGGA (SEQ ID No: 70)
S100I	S100_R	ATCCATGATAGATTGGAAGACTAG (SEQ ID No: 69)	S100I_F	CAATCTATCATGTGATATTGGTGGGGGACTTGGAGGA (SEQ ID No: 71)
S100L	S100_R	ATCCATGATAGATTGGAAGACTAG (SEQ ID No: 69)	S100L_F	CAATCTATCATGTGATCTTGGTGGGGGACTTGGAGGA (SEQ ID No: 72)
S100W	S100_R	ATCCATGATAGATTGGAAGACTAG (SEQ ID No: 69)	S100W_F	CAATCTATCATGTGATTGGGTGGGGGACTTGGAGGA (SEQ ID No: 73)
G101F	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101F_F	TCTATCATGGATAGCTTCGGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 75)
G101I	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101I_F	TCTATCATGGATAGCATTTGGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 76)
G101L	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101L_F	TCTATCATGGATAGCCTTGGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 77)
G101V	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101V_F	TCTATCATGGATAGCGTGGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 78)
G101W	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101W_F	TCTATCATGGATAGCTGGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 79)

Bảng 6-5

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
G101Y	G101_R	GCTATCCATGATAGATTGGAAGAC (SEQ ID No: 74)	G101Y_F	TCTATCATGGATAGCTATGGGGACTTGGAGGACTA (SEQ ID No: 80)
S109F	S109_R	AGGTAGTCCTCCAAAGTCCCCCACC (SEQ ID No: 81)	S109F_F	CTTGGAGGACTACCTTTTCAATCTGCAAAACCTTATTC (SEQ ID No: 82)
S109I	S109_R	AGGTAGTCCTCCAAAGTCCCCCACC (SEQ ID No: 81)	S109I_F	CTTGGAGGACTACCTATTAAATCTGCAAAACCTTATTC (SEQ ID No: 83)
S109L	S109_R	AGGTAGTCCTCCAAAGTCCCCCACC (SEQ ID No: 81)	S109L_F	CTTGGAGGACTACCTCTTAATCTGCAAAACCTTATTC (SEQ ID No: 84)
T113L	T113_R	TTGCAGATTGGAAGGTAGTCCTCC (SEQ ID No: 85)	T113L_F	CCTTCGAATCTGCAACTTTTATTTCAGCCCAAGCATAC (SEQ ID No: 86)
T113W	T113_R	TTGCAGATTGGAAGGTAGTCCTCC (SEQ ID No: 85)	T113W_F	CCTTCGAATCTGCAATGGTTATTTCAGCCCAAGCATAC (SEQ ID No: 87)
S120F	S120_R	GTATGCTTGGCTGAATAAGGTTTG (SEQ ID No: 88)	S120F_F	TTCAGCCCAAGCATACTTCGCTGGTGCCAGAAATTCAT (SEQ ID No: 89)
S120I	S120_R	GTATGCTTGGCTGAATAAGGTTTG (SEQ ID No: 88)	S120I_F	TTCAGCCCAAGCATACATTGCTGGTGCCAGAAATTCAT (SEQ ID No: 90)
S120W	S120_R	GTATGCTTGGCTGAATAAGGTTTG (SEQ ID No: 88)	S120W_F	TTCAGCCCAAGCATACTGGGCTGGTGCCAGAAATTCAT (SEQ ID No: 91)
S120Y	S120_R	GTATGCTTGGCTGAATAAGGTTTG (SEQ ID No: 88)	S120Y_F	TTCAGCCCAAGCATACTATGCTGGTGCCAGAAATTCAT (SEQ ID No: 92)
N135L	N135_R	CACTGCTGCTCCCCAGGAGTTTGT (SEQ ID No: 93)	N135L_F	TGGGGAGCAGCAGTGCTTGGGGCTTACACAACAGAT (SEQ ID No: 94)
T140F	T140_R	TGTGTAAGCCCCCATTCACCTGCTGC (SEQ ID No: 95)	T140F_F	AATGGGGCTTACACATTTCGATTCCAGAAAATGTGGAT (SEQ ID No: 96)
T140L	T140_R	TGTGTAAGCCCCCATTCACCTGCTGC (SEQ ID No: 95)	T140L_F	AATGGGGCTTACACACTTGATTCCAGAAAATGTGGAT (SEQ ID No: 97)
T140W	T140_R	TGTGTAAGCCCCCATTCACCTGCTGC (SEQ ID No: 95)	T140W_F	AATGGGGCTTACACATGGGATTCCAGAAAATGTGGAT (SEQ ID No: 98)

Bảng 6-6

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
K151F	K151_R	GCGACATAGTCATCCACATTTCT (SEQ ID No: 99)	K151F_F	GATGACTATGTGCGCTTCAATGATATGACGATCCTT (SEQ ID No: 100)
N166F	N166_R	CGGTCCTTCATTTCCCGGCAGCGAA (SEQ ID No: 101)	N166F_F	GGGAATGAAGGACCGTTTCGGCGGAACCATCAGTGCA (SEQ ID No: 102)
N166I	N166_R	CGGTCCTTCATTTCCCGGCAGCGAA (SEQ ID No: 101)	N166I_F	GGGAATGAAGGACCGATTGGCGGAACCATCAGTGCA (SEQ ID No: 103)
N166L	N166_R	CGGTCCTTCATTTCCCGGCAGCGAA (SEQ ID No: 101)	N166L_F	GGGAATGAAGGACCGCTTGGCGGAACCATCAGTGCA (SEQ ID No: 104)
N166V	N166_R	CGGTCCTTCATTTCCCGGCAGCGAA (SEQ ID No: 101)	N166V_F	GGGAATGAAGGACCGGTGGCGGAACCATCAGTGCA (SEQ ID No: 105)
N166W	N166_R	CGGTCCTTCATTTCCCGGCAGCGAA (SEQ ID No: 101)	N166W_F	GGGAATGAAGGACCGTGGCGGAACCATCAGTGCA (SEQ ID No: 106)
S191F	S191_R	TGGCGGAGGTTTTCCTAGCTCC (SEQ ID No: 107)	S191F_F	GAAACCTCCGCCCATCTTTGGGTCTTATGCGGAC (SEQ ID No: 108)
S191I	S191_R	TGGCGGAGGTTTTCCTAGCTCC (SEQ ID No: 107)	S191I_F	GAAACCTCCGCCCAATTTTGGGTCTTATGCGGAC (SEQ ID No: 109)
S191L	S191_R	TGGCGGAGGTTTTCCTAGCTCC (SEQ ID No: 107)	S191L_F	GAAACCTCCGCCCACTTTTGGGTCTTATGCGGAC (SEQ ID No: 110)
S191V	S191_R	TGGCGGAGGTTTTCCTAGCTCC (SEQ ID No: 107)	S191V_F	GAAACCTCCGCCCACTGTTTGGGTCTTATGCGGAC (SEQ ID No: 111)
S191W	S191_R	TGGCGGAGGTTTTCCTAGCTCC (SEQ ID No: 107)	S191W_F	GAAACCTCCGCCCACTGTTTGGGTCTTATGCGGAC (SEQ ID No: 112)
S194Y	S194_R	CCCAAAGCTTGGCGGAGGTTTTC (SEQ ID No: 113)	S194Y_F	CGCCCAAAGCTTTGGGTATTATGCGGACAATATCAAC (SEQ ID No: 114)
N200W	N200_R	GATATTGTCGCATAAGACCCAAA (SEQ ID No: 115)	N200W_F	TATGCGGACAATACTGGCATGTGGCACAGTTCTCT (SEQ ID No: 116)
Q204I	Q204_R	TGCCACATGTTGATATTGTCCGC (SEQ ID No: 117)	Q204I_F	ATCAACCATGTGGCAATTTTCTCTTACGTGGACCG (SEQ ID No: 118)

Bảng 6-7

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
Q204L	Q204_R	TGCCACATGGTTGATATTGTCCGC (SEQ ID No: 117)	Q204L_F	ATCAACCATGTGGCACTTTTCTCTTACGTGGACCG (SEQ ID No: 119)
Q204M	Q204_R	TGCCACATGGTTGATATTGTCCGC (SEQ ID No: 117)	Q204M_F	ATCAACCATGTGGCAATGTTCTCTTACGTGGACCG (SEQ ID No: 120)
Q204V	Q204_R	TGCCACATGGTTGATATTGTCCGC (SEQ ID No: 117)	Q204V_F	ATCAACCATGTGGCAAGTGTCTCTTACGTGGACCG (SEQ ID No: 121)
K212L	K212_R	TGTCGGTCCACGTGAAGAGAACTG (SEQ ID No: 122)	K212L_F	TCACGTGGACCGACACTTGATGGACGGATCAAACCG (SEQ ID No: 123)
K212V	K212_R	TGTCGGTCCACGTGAAGAGAACTG (SEQ ID No: 122)	K212V_F	TCACGTGGACCGACAGTGGATGGACGGATCAAACCG (SEQ ID No: 124)
K212W	K212_R	TGTCGGTCCACGTGAAGAGAACTG (SEQ ID No: 122)	K212W_F	TCACGTGGACCGACATGGGATGGACGGATCAAACCG (SEQ ID No: 125)
S233I	S233_R	AGATCTTGCTGATAGTATGAACGT (SEQ ID No: 126)	S233I_F	CTATCAGCAAGATCTATTTCTTGACCCGGATTCTCTCC (SEQ ID No: 127)
S233L	S233_R	AGATCTTGCTGATAGTATGAACGT (SEQ ID No: 126)	S233L_F	CTATCAGCAAGATCTCTTCTTGACCCGGATTCTCTCC (SEQ ID No: 128)
S233W	S233_R	AGATCTTGCTGATAGTATGAACGT (SEQ ID No: 126)	S233W_F	CTATCAGCAAGATCTTGGCTTGACCCGGATTCTCTCC (SEQ ID No: 129)
S238L	S238_R	ATCCGGTGCAAGAGAAAGATCTTGC (SEQ ID No: 130)	S238L_F	TCTCTTGACCCGGATCTTTCTCTTGGGCGAACCAT (SEQ ID No: 131)
N243I	N243_R	CGCCCAGAAGGAGGAATCCGGTGC (SEQ ID No: 132)	N243I_F	TCCTCCTTCTGGGCGGATTTCATGACAGTAAATATGCA (SEQ ID No: 133)
N243L	N243_R	CGCCCAGAAGGAGGAATCCGGTGC (SEQ ID No: 132)	N243L_F	TCCTCCTTCTGGGCGGCTTCATGACAGTAAATATGCA (SEQ ID No: 134)
N243Y	N243_R	CGCCCAGAAGGAGGAATCCGGTGC (SEQ ID No: 132)	N243Y_F	TCCTCCTTCTGGGCGGTATCATGACAGTAAATATGCA (SEQ ID No: 135)
S246F	S246_R	GTCATGGTTCGCCCCAGAAGGAGGA (SEQ ID No: 136)	S246F_F	TGGGCGAACCATGACTTCAAATATGCATACATGGGT (SEQ ID No: 137)

Bảng 6-8

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
S246L	S246_R	GTCATGGTTTCGCCCCAGAGGAGGA (SEQ ID No: 136)	S246L_F	TGGCGAACCATGACCTTAAATATGCATACATGGGT (SEQ ID No: 138)
S246V	S246_R	GTCATGGTTTCGCCCCAGAGGAGGA (SEQ ID No: 136)	S246V_F	TGGCGAACCATGACGTGAAATATGCATACATGGGT (SEQ ID No: 139)
S246W	S246_R	GTCATGGTTTCGCCCCAGAGGAGGA (SEQ ID No: 136)	S246W_F	TGGCGAACCATGACTGGAAATATGCATACATGGGT (SEQ ID No: 140)
S246Y	S246_R	GTCATGGTTTCGCCCCAGAGGAGGA (SEQ ID No: 136)	S246Y_F	TGGCGAACCATGACTATAAATATGCATACATGGGT (SEQ ID No: 141)
N275F	N275_R	TTTCACAAAATGCTCACGAAAGCTG (SEQ ID No: 142)	N275F_F	GAGCATTTTGTGAAATTCAGAGGCATCACACCAAAG (SEQ ID No: 143)
N275L	N275_R	TTTCACAAAATGCTCACGAAAGCTG (SEQ ID No: 142)	N275L_F	GAGCATTTTGTGAAACTTAGAGGCATCACACCAAAG (SEQ ID No: 144)
N275W	N275_R	TTTCACAAAATGCTCACGAAAGCTG (SEQ ID No: 142)	N275W_F	GAGCATTTTGTGAAATGGAGAGGCATCACACCAAAG (SEQ ID No: 145)
G277F	G277_R	TCTGTTTTTCACAAAATGCTCACG (SEQ ID No: 146)	G277F_F	TTTGTGAAAAACAGATTTCATCACACCAAAGCCTTCT (SEQ ID No: 147)
G277I	G277_R	TCTGTTTTTCACAAAATGCTCACG (SEQ ID No: 146)	G277I_F	TTTGTGAAAAACAGAAATTATCACACCAAAGCCTTCT (SEQ ID No: 148)
G277L	G277_R	TCTGTTTTTCACAAAATGCTCACG (SEQ ID No: 146)	G277L_F	TTTGTGAAAAACAGACTTATCACACCAAAGCCTTCT (SEQ ID No: 149)
G277V	G277_R	TCTGTTTTTCACAAAATGCTCACG (SEQ ID No: 146)	G277V_F	TTTGTGAAAAACAGAGTGATCACACCAAAGCCTTCT (SEQ ID No: 150)
G297F	G297_R	GATGTCAGCTGCACCGGCAATCAG (SEQ ID No: 151)	G297F_F	GGTGCAGCTGACATCTTCCTTGGCTACCCGAAACGGT (SEQ ID No: 152)
G297L	G297_R	GATGTCAGCTGCACCGGCAATCAG (SEQ ID No: 151)	G297L_F	GGTGCAGCTGACATCCTTCTTGGCTACCCGAAACGGT (SEQ ID No: 153)
G297W	G297_R	GATGTCAGCTGCACCGGCAATCAG (SEQ ID No: 151)	G297W_F	GGTGCAGCTGACATCTGGCTTGGCTACCCGAAACGGT (SEQ ID No: 154)

Bảng 6-9

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
S326W	S326_R	ACTGGACTCGTTTCACATAGGCAAC (SEQ ID No: 155)	S326W_F	GTGAACGAGTCCAGTTGGCTATCCACGCGCAAAAA (SEQ ID No: 156)
S330F	S330_R	GGTGGATAGAGAACTGGACTCGTT (SEQ ID No: 157)	S330F_F	AGTTCTCTATCCACCTTCCAAAAAGCGACGTACTCG (SEQ ID No: 158)
S330M	S330_R	GGTGGATAGAGAACTGGACTCGTT (SEQ ID No: 157)	S330M_F	AGTTCTCTATCCACCATGCAAAAAAGCGACGTACTCG (SEQ ID No: 159)
S330W	S330_R	GGTGGATAGAGAACTGGACTCGTT (SEQ ID No: 157)	S330W_F	AGTTCTCTATCCACCTGGCAAAAAAGCGACGTACTCG (SEQ ID No: 160)
K332G	K332_R	TTGGCTGGTGGATAGAGAACTGGA (SEQ ID No: 161)	K332G_F	CTATCCACCGCAAGGAGCGACGTACTCGTTTACT (SEQ ID No: 162)
K332T	K332_R	TTGGCTGGTGGATAGAGAACTGGA (SEQ ID No: 161)	K332T_F	CTATCCACCGCAAAACAGCGACGTACTCGTTTACT (SEQ ID No: 163)
K332V	K332_R	TTGGCTGGTGGATAGAGAACTGGA (SEQ ID No: 161)	K332V_F	CTATCCACCGCAAGTGGCGACGTACTCGTTTACT (SEQ ID No: 164)
T334L	T334_R	CGCTTTTGGCTGGTGGATAGAGA (SEQ ID No: 165)	T334L_F	ACCAGCCAAAAAGCGCTTTACTCGTTTACTGCTACT (SEQ ID No: 166)
G342E	G342_R	GGCAGTAGCAGTAAACGAGTACGT (SEQ ID No: 167)	G342E_F	TTTACTGCTACTGCCGAAAAGCCCTTTGAAAAATCTCC (SEQ ID No: 168)
G342L	G342_R	GGCAGTAGCAGTAAACGAGTACGT (SEQ ID No: 167)	G342L_F	TTTACTGCTACTGCCCTTAAAGCCCTTTGAAAAATCTCC (SEQ ID No: 169)
G342T	G342_R	GGCAGTAGCAGTAAACGAGTACGT (SEQ ID No: 167)	G342T_F	TTTACTGCTACTGCCACAAAAGCCCTTTGAAAAATCTCC (SEQ ID No: 170)
G342W	G342_R	GGCAGTAGCAGTAAACGAGTACGT (SEQ ID No: 167)	G342W_F	TTTACTGCTACTGCCTGGAAGCCCTTTGAAAAATCTCC (SEQ ID No: 171)
K343T	K343_R	GCCGGCAGTAGCAGTAAACGAGTA (SEQ ID No: 172)	K343T_F	ACTGCTACTGCCGGCACACACCTTTGAAAAATCTCCCTG (SEQ ID No: 173)
S357L	S357_R	CGCAGGGGCATCAGACCATACCAG (SEQ ID No: 174)	S357L_F	TCTGATGCCCTGGGCTTACAACGTCTCCGTAACG (SEQ ID No: 175)

Bảng 6-10

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
T359F	T359_R	TGTGCTCGCAGGGGCATCAGACCA (SEQ ID No: 176)	T359F_F	GCCCCTGCGAGCACATTCCGCTTCCGTAACGCTTGTC (SEQ ID No: 177)
T359G	T359_R	TGTGCTCGCAGGGGCATCAGACCA (SEQ ID No: 176)	T359G_F	GCCCCTGCGAGCACAGGAGCTTCCGTAACGCTTGTC (SEQ ID No: 178)
T359I	T359_R	TGTGCTCGCAGGGGCATCAGACCA (SEQ ID No: 176)	T359I_F	GCCCCTGCGAGCACAAATTGCTTCCGTAACGCTTGTC (SEQ ID No: 179)
T359L	T359_R	TGTGCTCGCAGGGGCATCAGACCA (SEQ ID No: 176)	T359L_F	GCCCCTGCGAGCACACTTGCTTCCGTAACGCTTGTC (SEQ ID No: 180)
S361I	S361_R	AGCAGTTGTGCTCGCAGGGGCATC (SEQ ID No: 181)	S361I_F	GCGAGCACAACTGCTATTGTAACGCTTGTC AATGAT (SEQ ID No: 182)
S361V	S361_R	AGCAGTTGTGCTCGCAGGGGCATC (SEQ ID No: 181)	S361V_F	GCGAGCACAACTGCTGTGGTAACGCTTGTC AATGAT (SEQ ID No: 183)
S361W	S361_R	AGCAGTTGTGCTCGCAGGGGCATC (SEQ ID No: 181)	S361W_F	GCGAGCACAACTGCTTGGGTAACGCTTGTC AATGAT (SEQ ID No: 184)
N376W	N376_R	TGGAGCGGTAATGACAAAGGTCCAG (SEQ ID No: 185)	N376W_F	GTCATTACCGCTCCATG GGGCACACAGTATGTAGGA (SEQ ID No: 186)
T378L	T378_R	GCCATTTGGAGCGGTAATGACAAAG (SEQ ID No: 187)	T378L_F	ACCGCTCCAAATGGCCTTCAGTATGTAGGAAATGAC (SEQ ID No: 188)
T378W	T378_R	GCCATTTGGAGCGGTAATGACAAAG (SEQ ID No: 187)	T378W_F	ACCGCTCCAAATGGCTGGCAGTATGTAGGAAATGAC (SEQ ID No: 189)
F385M	F385_R	GTCAATTCCTACATACTGTGTGCC (SEQ ID No: 190)	F385M_F	TATGTAGGAAATGACATGACTTCGCCATACAATGAT (SEQ ID No: 191)
F385P	F385_R	GTCAATTCCTACATACTGTGTGCC (SEQ ID No: 190)	F385P_F	TATGTAGGAAATGACCCAACTTCGCCATACAATGAT (SEQ ID No: 192)
F385Y	F385_R	GTCAATTCCTACATACTGTGTGCC (SEQ ID No: 190)	F385Y_F	TATGTAGGAAATGACTATATACTTCGCCATACAATGAT (SEQ ID No: 193)
T386A	T386_R	AAAGTCATTTCCTACATACTGTGT (SEQ ID No: 194)	T386A_F	GTAGGAAATGACTTTGCATCGCCATACAATGATAAC (SEQ ID No: 195)

Bảng 6-11

Đột biến Proteaza KP43	Tên đoạn mồi	Đoạn mồi đột biến R		Tên đoạn mồi	Đoạn mồi đột biến F	
		Trình tự			Trình tự	
T386I	T386_R	AAAGTCATTTCCTACATACTGTGT (SEQ ID No: 194)	T386I_F	T386I_F	GTAGGAAATGACTTTATTTCGCCCATACAATGATAAC (SEQ ID No: 196)	
T386L	T386_R	AAAGTCATTTCCTACATACTGTGT (SEQ ID No: 194)	T386L_F	T386L_F	GTAGGAAATGACTTTCTTTCGCCCATACAATGATAAC (SEQ ID No: 197)	
T386M	T386_R	AAAGTCATTTCCTACATACTGTGT (SEQ ID No: 194)	T386M_F	T386M_F	GTAGGAAATGACTTTATGTGCCCATACAATGATAAC (SEQ ID No: 198)	
S387F	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387F_F	S387F_F	GGAAATGACTTTACTTTCCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 200)	
S387G	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387G_F	S387G_F	GGAAATGACTTTACTGGACCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 201)	
S387I	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387I_F	S387I_F	GGAAATGACTTTACTATTCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 202)	
S387L	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387L_F	S387L_F	GGAAATGACTTTACTCTTCCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 203)	
S387M	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387M_F	S387M_F	GGAAATGACTTTACTATGCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 204)	
S387V	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387V_F	S387V_F	GGAAATGACTTTACTGTGCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 205)	
S387W	S387_R	AGTAAAGTCATTTCCTACATACTG (SEQ ID No: 199)	S387W_F	S387W_F	GGAAATGACTTTACTTTGCCATACAATGATAACTGG (SEQ ID No: 206)	
N390F	N390_R	GTATGGCGAAGTAAAGTCATTTC (SEQ ID No: 207)	N390F_F	N390F_F	TTTACTTCGCCCATACTTCGATAAAGTGGATGGCCGC (SEQ ID No: 208)	
N390G	N390_R	GTATGGCGAAGTAAAGTCATTTC (SEQ ID No: 207)	N390G_F	N390G_F	TTTACTTCGCCCATACGGAGATAAAGTGGATGGCCGC (SEQ ID No: 209)	
N390S	N390_R	GTATGGCGAAGTAAAGTCATTTC (SEQ ID No: 207)	N390S_F	N390S_F	TTTACTTCGCCCATCTCCGATAAAGTGGATGGCCGC (SEQ ID No: 210)	
N390T	N390_R	GTATGGCGAAGTAAAGTCATTTC (SEQ ID No: 207)	N390T_F	N390T_F	TTTACTTCGCCCATACACAGATAAAGTGGATGGCCGC (SEQ ID No: 211)	

Bảng 6-12

Đột biến Proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
N390Y	N390_R	GTATGGCGAAGTAAAGTCATTTC (SEQ ID No: 207)	N390Y_F	TTTACTTCGCCATACTATGATAAACTGGGATGGCCGC (SEQ ID No: 212)
W393Q	W393_R	GTTATCATTTGTATGGCGAAGTAAA (SEQ ID No: 213)	W393Q_F	CCATACAAATGATAACCAGGATGGCCGCAATAACGTA (SEQ ID No: 214)
R396G	R396_R	GCCATCCCAGTTATCATTTGTATGG (SEQ ID No: 215)	R396G_F	GATACTGGGATGGCGGAAATAACGTAGAAAAATGTA (SEQ ID No: 216)
F403K	F403_R	TACATTTTCTACGTTATTGCGGCC (SEQ ID No: 217)	F403K_F	AACGTAGAAAAATGTAAAAAATTAATGCACCACAAAAGC (SEQ ID No: 218)
F403T	F403_R	TACATTTTCTACGTTATTGCGGCC (SEQ ID No: 217)	F403T_F	AACGTAGAAAAATGTAAACAATTAATGCACCACAAAAGC (SEQ ID No: 219)
N405F	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405F_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 220)
N405I	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405I_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 221)
N405L	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405L_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 222)
N405P	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405P_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 223)
N405V	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405V_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 224)
N405W	N405_R	AATAAATACATTTTCTACGTTATT (SEQ ID No: 217)	N405W_F	GAAAAATGTATTTATTTCGCACCACAAAAGCGGGACG (SEQ ID No: 225)
A406F	A406_R	ATTAATAAATACATTTTCTACGTT (SEQ ID No: 226)	A406F_F	AATGTATTTATTAATTTCCACAAAAGCGGGACGTAT (SEQ ID No: 227)
A406V	A406_R	ATTAATAAATACATTTTCTACGTT (SEQ ID No: 226)	A406V_F	AATGTATTTATTAATGTGCCACAAAAGCGGGACGTAT (SEQ ID No: 228)
A406W	A406_R	ATTAATAAATACATTTTCTACGTT (SEQ ID No: 226)	A406W_F	AATGTATTTATTAATTTGCCACAAAAGCGGGACGTAT (SEQ ID No: 229)

Bảng 6-13

Đột biến proteaza KP43	Đoạn môi đột biến R		Đoạn môi đột biến F	
	Tên đoạn môi	Trình tự	Tên đoạn môi	Trình tự
P407C	P407_R	TGCATTAATAAATACATTTTCTAC (SEQ ID No: 230)	P407C_F	GTATTATTAAATGCATGCCAAAAGCGGGACGTATACA (SEQ ID No: 231)
P407G	P407_R	TGCATTAATAAATACATTTTCTAC (SEQ ID No: 230)	P407G_F	GTATTATTAAATGCAGGACAAAGCGGGACGTATACA (SEQ ID No: 232)
Q408I	Q408_R	TGGTGCATTAAATAAATACATTTTC (SEQ ID No: 233)	Q408I_F	TTTATTAAATGCACCAATTAGCGGGACGTATACAATT (SEQ ID No: 234)
Q408N	Q408_R	TGGTGCATTAAATAAATACATTTTC (SEQ ID No: 233)	Q408N_F	TTTATTAAATGCACCAATAGCGGGACGTATACAATT (SEQ ID No: 235)
Q408W	Q408_R	TGGTGCATTAAATAAATACATTTTC (SEQ ID No: 233)	Q408W_F	TTTATTAAATGCACCATGGAGCGGGACGTATACAATT (SEQ ID No: 236)
Q408Y	Q408_R	TGGTGCATTAAATAAATACATTTTC (SEQ ID No: 233)	Q408Y_F	TTTATTAAATGCACCATATAGCGGGACGTATACAATT (SEQ ID No: 237)
S409W	S409_R	TTGTGGTGCATTAAATAAATACATT (SEQ ID No: 233)	S409W_F	ATTAATGCACCACAAATGGGGACGTATACAATTGAG (SEQ ID No: 238)
S409Y	S409_R	TTGTGGTGCATTAAATAAATACATT (SEQ ID No: 239)	S409Y_F	ATTAATGCACCACAAATATGGGACGTATACAATTGAG (SEQ ID No: 240)
T411A	T411_R	CCCGCTTTGTGGTGCATTAAATAAA (SEQ ID No: 241)	T411A_F	GCACCACAAAGCGGGGCATATACAATTGAGGTACAG (SEQ ID No: 242)
T411L	T411_R	CCCGCTTTGTGGTGCATTAAATAAA (SEQ ID No: 241)	T411L_F	GCACCACAAAGCGGGCTTTATACAATTGAGGTACAG (SEQ ID No: 243)
T411P	T411_R	CCCGCTTTGTGGTGCATTAAATAAA (SEQ ID No: 241)	T411P_F	GCACCACAAAGCGGGGCATATACAATTGAGGTACAG (SEQ ID No: 244)
T411V	T411_R	CCCGCTTTGTGGTGCATTAAATAAA (SEQ ID No: 241)	T411V_F	GCACCACAAAGCGGGGTGTATACAATTGAGGTACAG (SEQ ID No: 245)
T427V	T427_R	CTGTGGTCCCAACCGGTACGTTATA (SEQ ID No: 246)	T427V_F	CCGGTTGACCACAGGTGTTCTCGTTGGCAATTGTG (SEQ ID No: 247)
V433L	V433_R	AATTGCCAACGAGAGGTCTGTGG (SEQ ID No: 248)	V433L_F	TTCTCGTTGGCAATTCTTAATTAATAGAATAACAGA (SEQ ID No: 249)

Ví dụ 2: Đánh giá về tính tan của proteaza kiềm đột biến

Nồng độ của protein của proteaza kiềm đột biến trong dịch nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1 theo phương pháp được mô tả ở Ví dụ tham khảo 2 (1) (được mô tả bên dưới). Hơn thế nữa, theo phương pháp được mô tả ở Ví dụ tham khảo 2 (2) (được mô tả bên dưới), độ đục của chế phẩm C trong đó dịch nuôi cấy được thêm vào ở lượng được xác định trước được đo. Từ độ đục, thu được độ đục tương đối (%). Đối với từng proteaza kiềm đột biến, thu được các giá trị độ đục tương đối ($N = 3$ hoặc nhiều hơn), được tính trung bình và được sử dụng như độ đục tương đối của từng proteaza kiềm đột biến.

Các kết quả được thể hiện ở Bảng 7. Từng proteaza kiềm đột biến thể hiện rằng độ đục tương đối cho proteaza kiềm gốc (WT) là 95% hoặc nhỏ hơn, cho thấy có sự cải thiện về tính tan.

Bảng 7

Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)
D11G	79,8	T59V	89,3	G101W	56,8	N200W	84,3	G297F	75,3	F385M	94,0	N405V	86,9						
D11N	83,6	T59W	58,2	G101Y	86,0	Q204I	80,1	G297L	78,3	F385P	75,8	N405W	76,0						
D11S	93,6	N60F	73,0	S109F	65,7	Q204L	94,9	G297W	69,3	F385Y	78,8	A406F	94,7						
S16I	81,2	N60I	70,0	S109I	71,6	Q204M	82,3	S326W	95,0	T386A	80,4	A406V	86,2						
S16L	88,6	N60L	63,1	S109L	82,6	Q204V	89,5	S330F	92,5	T386I	78,2	A406W	86,8						
S16V	93,6	N60V	74,0	T113L	85,1	K212L	94,2	S330M	85,4	T386L	93,8	P407C	82,2						
S16W	79,4	N60W	77,0	T113W	71,3	K212V	94,0	S330W	88,1	T386M	78,2	P407G	88,2						
Y20A	71,8	N63D	89,7	S120F	84,0	K212W	86,8	K332G	90,9	S387F	83,7	Q408I	83,8						
Q22W	86,5	N63L	75,0	S120I	93,7	S233I	94,3	K332T	90,6	S387G	85,9	Q408N	94,3						
G23N	89,8	G80A	79,2	S120W	76,5	S233L	81,9	K332V	92,9	S387I	91,5	Q408W	90,1						
R37T	84,5	G80H	91,4	S120Y	91,9	S233W	71,4	T334L	85,7	S387L	79,7	Q408Y	94,0						
S40F	86,9	S81F	82,3	N135L	94,7	S238L	85,9	G342E	85,4	S387M	84,9	S409W	69,5						
S40I	81,5	S81I	83,8	T140F	93,5	N243I	88,5	G342L	81,2	S387V	76,1	S409Y	87,8						
S40L	80,9	S81L	83,5	T140L	89,2	N243L	80,8	G342T	90,2	S387W	85,0	T411A	82,6						

Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)	Đột biến	độ đục tương đối (%)
S40V	81,6	S81Q	86,1	T140W	82,9	N243Y	80,0	G342W	77,7	N390F	75,3	T411L	93,5
S40W	49,8	S81W	76,4	K151F	93,0	S246F	88,5	K343T	75,4	N390G	87,9	T411P	85,1
S41I	79,3	S81Y	93,7	N166F	80,4	S246L	85,2	S357L	84,4	N390S	75,1	T411V	81,0
A52G	76,4	T82Q	85,0	N166I	93,1	S246V	89,6	T359F	76,0	N390T	90,4	T427V	92,4
A52S	88,5	N91C	89,3	N166L	82,3	S246W	74,5	T359G	74,7	N390Y	72,7	V433L	72,1
L53A	75,5	S100F	68,5	N166V	94,7	S246Y	92,5	T359I	85,2	W393Q	84,3		
L53I	94,9	S100I	62,3	N166W	78,2	N275F	87,3	T359L	84,0	R396G	70,2		
L53V	69,1	S100L	68,5	S191F	90,6	N275L	92,5	S361I	77,2	F403K	93,2		
L56V	76,7	S100W	75,8	S191I	82,4	N275W	82,1	S361V	84,2	F403T	80,0		
T59F	70,9	G101F	69,0	S191L	88,2	G277F	83,2	S361W	60,3	N405F	84,8		
T59I	69,4	G101I	72,7	S191V	81,6	G277I	91,9	N376W	52,9	N405I	80,1		
T59L	68,3	G101L	68,4	S191W	91,7	G277L	84,3	T378L	79,6	N405L	82,8		
T59M	69,8	G101V	74,3	S194Y	87,4	G277V	92,9	T378W	68,4	N405P	78,2		

Ví dụ 3: Đánh giá về tính tan của đa đột biến

Các đột biến nhằm cải thiện tính tan được tìm thấy ở Ví dụ 2 là đa phức hợp và do đó đánh giá hiệu quả của đa đột biến thu được này. Cụ thể, tiến hành chiết plasmit từ vi khuẩn chủ tạo ra proteaza đột biến biểu hiện tính tan cải thiện ở Ví dụ 2. Sử dụng plasmit này làm khuôn, đột biến khác để cải thiện tính tan được tìm thấy ở Ví dụ 2 được đưa vào theo cùng cách như ở Ví dụ 1 để tạo thành đột biến kép. Tiếp đó, plasmit được chiết từ vi khuẩn chủ tạo ra đột biến kép. Sử dụng plasmit này làm khuôn, quy trình tương tự được lặp lại để điều chế đột biến bội ba. Về đột biến kép và đột biến bội ba, độ đục tương đối (%) (giá trị trung bình của $N = 3$ hoặc nhiều hơn) cho proteaza kiểm gốc (WT) thu được theo cùng quy trình như ở Ví dụ 2. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 8.

Bảng 8

Đột biến	Độ đục tương đối (%)
T59L	68
T59L/S40L	28
T59L/S40L/N405W	19
T59L/S40L/S191V	17
T59L/S40L/S81W	14
T59L/S40L/S81L	12
T59L/N405L	47
T59L/N405L/S81L	30
T59L/N405L/S191L	28
T59L/N405L/S40L	25
T59L/S191L	28
T59L/S191L/S40L	21
T59L/S191L/S81W	21
T59L/S191L/S81L	16
WT	100

Ví dụ 4: Đánh giá về tính tan của các đa đột biến đến chất tẩy rửa lỏng đậm đặc có bán trên thị trường

Như tính tan của đa đột biến được xây dựng ở Ví dụ 3 cho từng chất tẩy rửa lỏng đậm đặc có bán trên thị trường (chế phẩm A; Attack Neo (Kao Corp.) và chế phẩm B; NANOX (lion), từng chế phẩm được thể hiện ở Bảng 9), độ đục tương đối (%) (giá trị trung bình của N = 3 hoặc nhiều hơn) cho proteaza kiềm gốc (WT) thu được theo cùng cách như ở Ví dụ 2. Các chất tẩy rửa có sẵn trên thị trường được sử dụng để đánh giá sau khi khử hoạt tính của các enzyme tẩy rửa ở 70°C trong 8 giờ. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 10.

Bảng 9

Chất tẩy rửa lỏng đậm đặc	Đặc tính chất lỏng	Chế phẩm
Chế phẩm A	Tính kiềm yếu	Chất hoạt động bề mặt (74%, bazơ cồn cao hơn (không ion), bazơ alkyl benzen mạch thẳng, bazơ axit béo (anion)), chất ổn định (butyl carbitol), tác nhân kiềm, tác nhân phân tán, enzym
Chế phẩm B	Trung tính	Chất hoạt động bề mặt (55% polyoxyetylen axit béo methyl este), chất ổn định, tác nhân kiềm, enzym

Bảng 10

Đột biến	Độ đục tương đối (%)	
	Chế phẩm A	Chế phẩm B
T59L/S81W/191V	23,5	38,9
T59L/S81W/191L	24,7	35,8
T59L/S81L/405L	19,5	28,9
T59L/S81L/191V	36,6	32,1
T59L/S81L/191L	20,5	29,2
T59L/S40L/81W	22,5	29,1
T59L/S40L/405W	24,9	34,6
T59L/S40L/405L	28,4	34,4
T59L/S40L/191V	22,9	32,5
T59L/S40L/191L	22,8	29,7
T59L/S191L/405W	29,3	44,6
T59L/S191L/405L	22,5	33,4
WT	100	100

Ví dụ 5: Đánh giá về tính tan của proteaza kiểm đột biến có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến như proteaza gốc

Để cập đến phần mô tả của JP-A-2002-218989, JP-A-2002-303176, JP-A-2004-000122, JP-A-2004-35176 và JP-A-2006-129865, các đột biến sau được đưa vào thành công trong proteaza KP43 (SEQ ID No: 2) để tạo ra proteaza KP43 đột biến (SEQ ID No: 250):

Tyrosin tại vị trí 195 được thế bằng glutamin (JP-A-2002-218989) ;

Axit aspartic tại vị trí 369 được thế bằng asparagin (JP-A-2002-303176);

Threonin tại vị trí 65 được thế bằng prolin, valin tại vị trí 273 bằng isoleuxin, threonin tại vị trí 359 bằng serin và serin tại vị trí 387 bằng alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin tại vị trí 166 được thế bằng glyxin, và glyxin tại vị trí 167 bằng valin (JP-A-2004-35176);

Alanin tại vị trí 133 được thế bằng serin, valin tại vị trí 134 bằng threonin và serin được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 (JP-A-2006-129865).

Trình tự axit amin của proteaza KP43 đột biến (SEQ ID No: 250) có các đột biến này được đưa vào trong đó có mức độ tương đồng 97,5% với dạng tự nhiên KP43; WT.

Sử dụng proteaza KP43 đột biến (mKP43) nêu trên như một gốc, đột biến có tính tan cải thiện được điều chế theo cùng cách như ở Ví dụ 1. Cụ thể hơn, đoạn môi đột biến đối với proteaza gốc được chỉ định và được điều chế. Sử dụng các đoạn môi này, sự đột biến được đưa vào theo cùng cách như ở Ví dụ 1 để điều chế proteaza kiểm đột biến. Về proteaza kiểm đột biến thu được, độ đục tương đối (%) (giá trị trung bình của N = 3 hoặc nhiều hơn) cho proteaza kiểm gốc (mKP43) thu được theo cùng quy trình như ở Ví dụ 2 và tính tan trong chế phẩm lỏng được đánh giá.

Các kết quả được thể hiện ở Bảng 11. Trong trường hợp của proteaza KP43 đột biến (mKP43) được sử dụng như một gốc, hiệu quả tăng tính tan của proteaza kiềm đột biến trong chế phẩm lỏng tương tự như trong trường hợp của dạng tự nhiên KP43 Proteaza được sử dụng như một gốc, được xác nhận.

Bảng 11

Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)
D11G	84,2	N60L	88,0	T334L	73,7	N390S	88,3
D11N	93,5	N60W	83,7	T334R	76,1	N390T	72,3
D11S	72,5	N63D	85,2	G342E	94,3	N390Y	73,8
S16V	79,9	N63L	94,6	G342L	98,1	W393Q	60,4
S16W	84,1	G80A	97,1	G342T	95,4	R396G	91,2
Y20A	87,9	G80H	68,5	G342W	83,8	F403K	79,9
Q22W	84,4	S81F	63,0	K343T	82,0	F403R	82,9
G23N	60,6	S81Q	66,5	S357L	94,8	F403T	88,4
R37T	75,1	S81W	52,4	T359G	93,6	N405F	69,5
S40F	71,1	S81Y	90,8	S361W	77,5	N405V	68,8
S40I	78,0	T82Q	84,5	N376W	53,3	N405W	43,1
S40L	73,2	N91C	88,4	F385M	75,2	A406W	52,1
S40W	87,5	S191F	80,7	F385P	74,7	P407C	92,6
S41I	92,1	S194Y	67,9	F385R	70,0	Q408I	74,7
A52G	74,0	N200W	80,1	F385Y	89,6	Q408N	60,6
A52S	85,5	Q204I	75,3	T386A	59,8	Q408W	76,1
L53A	90,4	Q204L	74,9	T386I	73,2	Q408Y	90,3
L53I	86,8	Q204M	78,9	T386L	77,2	S409Y	73,5
L53V	93,0	Q204V	93,5	T386M	85,9	T411A	74,2
L56V	76,3	S326W	70,3	S387F	73,8	T411L	87,7
T59F	80,3	S330F	84,0	S387G	91,0	T411P	83,1

Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)	Đột biến	Độ đục tương đối (%)
T59I	89,3	S330M	90,4	S387I	77,4	T411V	84,2
T59L	89,9	S330W	68,2	S387L	72,9	T427V	77,0
T59M	78,6	K332G	86,9	S387M	86,5	V433L	73,4
T59V	69,9	K332R	74,0	S387W	58,3		
N60F	88,4	K332T	73,3	N390F	74,1		
N60I	93,1	K332V	64,4	N390G	93,1		

Ví dụ 6: Đánh giá về tính tan của proteaza kiểm đa đột biến có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến (mKP43) như proteaza gốc

Các đột biến để cải thiện tính tan được tìm thấy ở Ví dụ 2 và Ví dụ 5 được sử dụng kết hợp và hiệu quả cải thiện tính tan được đánh giá. Cụ thể, đột biến đơn, đột biến kép, đột biến bội ba, đột biến bội bốn và đột biến bội năm như được thể hiện ở Bảng 12 được điều chế bằng cách sử dụng proteaza KP43 đột biến (mKP43, SEQ ID No: 250) được điều chế trong Ví dụ 5 như proteaza kiểm gốc theo cùng quy trình như ở Ví dụ 3. Độ đục tương đối (%) (giá trị trung bình của N = 2 hoặc nhiều hơn) của từng đột biến cho proteaza kiểm gốc thu được theo cùng quy trình như ở Ví dụ 2. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 12.

Bảng 12

Đột biến	Độ đục tương đối (%)
N405L	74,6
N405L/T59V	61,8
N405L/T59I/S40F	26,6
N405L/T59I/S40I	29,3
N405L/T59I/S81W	14,9
N405L/T59V/S40F	24,8
N405L/T59V/S40I	31,3
N405L/T59V/S81W	21,1

Đột biến	Độ đục tương đối (%)
N405W/S40F/T59I	21,9
N405W/S40F/T59V	30,1
N405W/S40I/T59I	21,8
N405W/S40I/T59V	22,0
N405L/T59I/S40F/S191L	10,5
N405L/T59V/S40I/S81L	8,6
N405L/T59V/S40I/S81Y	11,0
N405L/T59V/S40I/S191L	10,1
N405W/T59I/S40F/S191L	10,9
N405W/T59I/S40I/S191L	7,9
N405L/T59V/S40I/S191L/S81L	6,7
N405L/T59V/S40I/S191L/S81P	10,2
N405L/T59V/S40I/S191L/S81Y	7,8

Ví dụ 7: Đánh giá về tính tan của proteaza kiềm đa đột biến có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến (mKP43) như proteaza gốc bởi thử nghiệm gia tốc

Các đa đột biến có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến (SEQ ID No: 250) được điều chế ở Ví dụ 6 được cho qua thử nghiệm hình thành kết tủa nhanh bằng cách sử dụng chất tẩy rửa lỏng ở lượng sát với các điều kiện sử dụng thực tế. Để giải thích cụ thể hơn, 9 mL của chất tẩy rửa lỏng (ví dụ, chế phẩm C nêu trên; được mô tả trong Ví dụ 3 của JP-A-2010-275468) được cho vào ống thủy tinh (ống vít Maruemu số 5), tiếp theo, proteaza kiềm đa đột biến được pha loãng thích hợp được thêm vào để thu được nồng độ cuối cùng 0,2 đến 0,4 g/L, được khuấy thích hợp, được đóng kín và được lưu giữ ở 40°C hoặc 50°C. Hằng tuần, kiểm tra sự xuất hiện kết tủa ở đáy chai. Kết quả được thể hiện ở Bảng 13.

Bảng 13

Đột biến	Điều kiện bảo quản	Nồng độ cuối cùng (lượng protein theo g/L của chất tẩy rửa lỏng)				
		0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
N405L/T59V/ S40I/S191L	40°C 2 tuần	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	50°C 2 tuần	n/o	n/o	n/o	o	o

N405L/T59V/ S40I/S191L/S81L	40°C 4 tuần	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	50°C 4 tuần	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o

o: Thấy xuất hiện kết tủa

n/o: Không thấy xuất hiện kết tủa

Ví dụ 8: Đánh giá khả năng tẩy rửa của proteaza kiềm đa đột biến có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến (mKP43) như proteaza gốc

Các đa đột biến được điều chế ở Ví dụ 6 có nguồn gốc từ proteaza KP43 đột biến (mKP43, SEQ ID No: 250) như proteaza kiềm gốc được đánh giá về khả năng tẩy rửa. Khả năng tẩy rửa đánh giá được thực hiện bằng dụng cụ đo Tergot-O- (được sản xuất bởi Ueshima Seisakusho Co., Ltd.). Chất tẩy rửa lỏng (ví dụ, chế phẩm C nêu trên được mô tả trong Ví dụ 3 của JP-A-2010-275468)(350 μ L) được thêm vào nước (1 L) để thu được chất lỏng tẩy rửa. Tại đó enzyme được thêm vào sao cho thu được nồng độ cuối đạt 0,0716 mg/L. Sau đó, vải đã nhuộm EMPA117 (được sản xuất bởi EMPA, blood/milk/carbon), được cắt trước thành từng mảnh nhỏ 6 x 6 cm², được thêm vào và được rửa (80 vòng/phút) ở 20°C. Sau khi các mảnh vải đã nhuộm được rửa sạch bằng nước bảo dưỡng và cường độ sáng của chúng được đo bằng dụng cụ đo sự biến đổi màu (MINOLTA, CM3500d). Dựa vào sự thay đổi cường độ sáng trước và sau khi rửa, tỷ lệ rửa được tính (theo công thức dưới đây).

$$\text{Tỷ lệ rửa (\%)} = (L2-L1)/(L0-L1) \times 100$$

L0: cường độ sáng của vải đã nhuộm gốc

L1: cường độ sáng của vải đã nhuộm trước khi rửa

L2: cường độ sáng của vải đã nhuộm sau khi rửa

Tỷ lệ rửa tương đối là tỷ lệ rửa với đột biến dựa vào tỷ lệ rửa của proteaza kiềm gốc được coi như 100. Kết quả được thể hiện ở Bảng 14. Từng đột biến được điều chế trong Ví dụ 6 biểu hiện tỷ lệ rửa tương ứng với tỷ lệ rửa của proteaza kiềm gốc.

Bảng 14

Đột biến	Tỷ lệ rửa tương đối (%)
Proteaza kiềm gốc đột biến (mKP43)	100,0
N405L/T59V/S40I/S191L	97,7
N405L/T59V/S40I/S191L/S81L	101,7
N405L/T59V/S40I/S191L/S81P	95,7
N405L/T59V/S40I/S191L/S81Y	94,9

Ví dụ tham khảo 1: Phương pháp điều chế enzym

Phương pháp điều chế enzym, được đánh giá về tính tan của chúng trong chế phẩm lỏng, từ ví dụ, proteaza KP43 dạng tự nhiên sẽ được mô tả dưới đây.

(1) Tạo vector biểu hiện/chèn gen

Sử dụng vector con thoi có sẵn trên thị trường, pHY300PLK (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.) làm khuôn, đoạn môi pHY+1 (HindIII) F (ggggAAGCTTCTAGAGATCTGCAGGTCGACGG: SEQ ID No: 251) và đoạn môi pHY+3040 (HindIII) R (ggggaagcttAAGGTAAAGGATAAAACAGCACAATTCCAAG: SEQ ID No: 252), sự khuếch đại PCR được thực hiện bằng kit PrimeSTAR Mutagenesis (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.). Sản phẩm khuếch đại được cắt bằng enzym giới hạn, HindIII (Roche), sự tạo màng nội phân tử được thực hiện bằng cách sử dụng Ligation High (được sản xuất bởi Toyobo Co., Ltd.) và quá trình tinh chế được tiến hành nhờ sự kết tủa ethanol. Vi khuẩn chủ, *Bacillus* dòng sp. KSM-9865 (FERM P-18566) được biến đổi gen bằng phương pháp điện chuyển và được cấy lên môi trường thạch LB kiềm có chứa sữa tách béo (có chứa 1% Bacto trypton, 0,5% phân chiết nấm men, 1% natri clorua, 1% sữa tách béo, 1,5% aga, 0,05% natri cacbonat và 15 ppm tetracyclin). Vài ngày sau, các cụm khuẩn lạc hình thành trên môi trường thạch phân lập như tế bào chuyển gen và

tách plasmit. Trình tự của toàn bộ chiều dài plasmit được phân tích bằng cách sử dụng bộ chương trình so sánh trình tự ADN Prism 3100 (được sản xuất bởi ABI) để xác nhận rằng đột biến không mong muốn không được đưa vào bởi lỗi PCR. Plasmit này được chọn như pHA3040.

Sau đó, sử dụng ADN của bộ gen của *Bacillus* sp. KSM-64 (FERM P-10482) làm khuôn, đoạn môi SP64-F (EcoRI) (gggggaattcGAACAAGTACTTACCATTTTAGAGTC: SEQ ID No: 253) và đoạn môi SP64-R (BamHI) (gggggatccTTATTAAAGTAATTGAATCAAATAGC: SEQ ID No: 254), sự khuếch đại PCR được thực hiện để thu được phần ADN bao gồm vùng chất hoạt hóa ngược chiều Endo-1,4-beta-glucanaza (số truy cập GenBank M84963) có nguồn gốc từ *Bacillus* sp. KSM-64. Sản phẩm khuếch đại và PHA3040 đã được đặt trước được trộn ở các lượng thích hợp, được cắt hai lần bằng các enzym giới hạn EcoRI (Roche) và BamHI (Roche), liên kết với Ligation High, và được tinh chế nhờ sự kết tủa etanol. Vi khuẩn chủ dòng *Bacillus* spKSM-9865 (FERM P-18566) được biến đổi với vi khuẩn này bằng phương pháp điện di và được làm cấy lên môi trường thạch LB kiềm có chứa sữa tách béo. Sau vài ngày, khuẩn lạc hình thành trên môi trường thạch được phân lập như tế bào tái tổ hợp và chiết plasmit. Trình tự chất hoạt hóa được chèn trong vị trí đa nhân được phân tích để xác nhận tiếp đột biến không mong muốn không được đưa vào bởi lỗi PCR. Plasmit này được chọn như pHA3040SP64 (SEQ ID No: 255). Plasmit này đồng thời được cắt bằng các enzym giới hạn BamHI và XbaI (Roche) để thu được vector biểu hiện/chèn gen.

(2) Điều chế proteaza KP43

ADN bao gồm trình tự gen proteaza KP43 dạng tự nhiên (SEQ ID No: 1) (có vị trí BamHI ngược chiều, đầu 5', và vị trí XbaI xuôi chiều, đầu 3') được cắt đồng thời bằng BamHI và XbaI, được trộn bằng vector biểu hiện/chèn gen thu được ở trên và được cho qua phản ứng ghép nối bằng cách sử dụng Ligation High (được sản xuất bởi Toyobo Co., Ltd.). Sản phẩm ghép nối được tinh chế

bằng cách kết tủa etanol, vi khuẩn chủ, dòng *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566) được chuyển gen bằng phương pháp điện chuyển và được cấy lên môi trường thạch LB kiểm có chứa sữa tách béo. Vài ngày sau, từ các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch, tế bào chuyển gen biểu hiện gen proteaza cây và phân lập dựa vào khả năng phân hủy sữa tách béo. ADN plasmit được chiết từ tế bào chuyển gen và tiếp theo gen proteaza nêu trong SEQ ID No: 1 được chèn chính xác được kiểm chứng. Plasmit tạo thành được chọn như pHA64TSB.

Tế bào chuyển gen của dòng KSM-9865 chứa pHA64TSB được cấy trong 5 mL môi trường bảo quản giống (6,0% (w/v) polypepton S, 0,1% dịch chiết nấm men, 1,0% maltoza, 0,02% magiê sulfat-7 hydrat, 0,1% kali dihydrogen phosphat, 0,3% natri cacbonat khan, 30 ppm tetracyclin) và được cấy trong khi lắc ở 30°C trong 16 giờ. Sau đó, cho 30 mL môi trường gốc (8% polypepton S, 0,3% dịch chiết nấm men, 10% maltoza, 0,04% magiê sulfat-7 hydrat, 0,2% kali dihydrogenphosphat, 1,5% natri cacbonat khan, 30 ppm tetracyclin), dung dịch giống bảo quản (1% (v/v)) được ủ và nuôi cấy trong điều kiện lắc ở 30°C trong 3 ngày. Dung dịch nuôi cấy chứa proteaza KP43 thu được bằng cách nuôi cấy được ly tâm để thu được dịch nổi. Nhờ điện di chuyển SDS-polyacrylamit gel, đã xác nhận rằng protein được chứa trong dịch nổi nuôi cấy là proteaza KP43 độc lập. Nếu cần, tinh chế để khử muối được thực hiện bằng cột lọc gel, Econopack 10-DG (Biorad).

Ví dụ tham khảo 2: Phương pháp đánh giá tính tan enzym

(1) Phương pháp đo lượng proteaza protein

Lượng proteaza protein có trong dịch cấy trong suốt hoặc trong mẫu tinh chế khử muối được đo bằng cách sử dụng kit đứng thử nghiệm protein (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries Ltd.) như sau. Cụ thể, cho từng lỗ của tấm 96 giếng, dung dịch phát sinh màu (250 μ L) của kit được thêm vào, và tiếp theo mẫu enzym (10 μ L) đã pha loãng thích hợp được trộn và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, sự hấp thụ ở 660 nm được đo bằng đầu đọc vi tấm VersaMax (phương pháp phân tử). Từ đường cong chuẩn, được tạo

ra đồng thời bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn anbumin tuyến ức bò (BSA) gắn kèm với kit, nồng độ protein proteaza (mg/mL dưới dạng BSA) được xác định.

(2) Đánh giá về tính tan của proteaza trong chất tẩy rửa lỏng

Sử dụng dịch cấy trong suốt có chứa gốc proteaza kiềm (dạng tự nhiên KP43; WT) hoặc proteaza kiềm đột biến, tính tan trong chế phẩm lỏng được đánh giá. Cụ thể hơn, cho từng lỗ của tấm 96 lỗ, 150 μ L của chất tẩy rửa lỏng (ví dụ, chế phẩm C nêu trên; được mô tả trong Ví dụ 3 của JP-A-2010-275468) được thêm vào. Cho vào lỗ, dịch cấy trong suốt có chứa proteaza kiềm khác về nồng độ protein hoặc mẫu tinh chế khử muối (6,5 μ L) được thêm vào và được khuấy thích hợp. Sau khi hỗn hợp được giữ nguyên ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sự thâm hút ở 650 nm được đo bằng đầu đọc vi tấm VersaMax (Phương pháp phân tử). Như một chỗ trống, sự thâm hút của dung dịch để trong đó nước trao đổi ion được thêm vào để thay thế cho dịch cấy trong suốt được đo. Sự thâm hút của chỗ trống bị giảm xuống từ sự thâm hút của hỗn hợp để thu được giá trị, được xác định như độ đục (Δ OD650 nm) và được sử dụng như chỉ số về tính tan Proteaza. Dựa vào giá trị thu được ở Δ OD650 nm, độ đục tương đối của từng đột biến với proteaza kiềm gốc (WT) được tính theo phương trình dưới đây.

Độ đục tương đối (%) = (độ đục của đột biến/nồng độ của đột biến)/(độ đục của proteaza kiềm gốc/nồng độ của proteaza kiềm gốc) $\times$ 100

Độ đục (Δ OD650 nm) của chế phẩm C để trong đó proteaza được bổ sung mang mối liên hệ cân xứng với nồng độ proteaza của chế phẩm. Hơn thế nữa, ngay cả khi dịch cấy trong suốt được sử dụng như proteaza và ngay cả khi mẫu lọc gel được sử dụng, thu được mối liên hệ cân xứng tương tự.

Ví dụ tham khảo 3:

Phương pháp đo hoạt tính proteaza

Trong các ví dụ, hoạt tính của proteaza kiềm thu được được đo bằng quy trình sau. Cụ thể hơn, 0,9 mL của 1/15 M đệm phosphat (pH 7,4) và 40 mM

dung dịch Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilit/dimetyl sulfoxit (0,05 mL) được thêm vào trong ống thử nghiệm và được duy trì ở 30°C trong 5 phút. Đến mức độ này dung dịch enzym (0,05 mL) được thêm vào và phản ứng được thực hiện ở 30°C trong 10 phút và sau đó, 5% (w/v) dung dịch axit xitric chứa nước (2,0 mL) được thêm vào để kết thúc phản ứng. Sự thấm hút ở 420 nm được đo bằng máy đo ảnh phổ. Lưu ý rằng, 1 unit (U) của enzym được xác định như lượng enzym để tạo ra 1 μmol của p-nitroanilin mỗi phút trong phản ứng trên.

Các phương án của sáng chế được mô tả ở trên. Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả ở trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiển nhiên có thể thực hiện các cải biến hoặc thay đổi các phương án này trong phạm vi của sáng chế.

Toàn bộ nội dung của các tài liệu và các đơn sáng chế được trích dẫn theo sáng chế được kết hợp bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm trong chế phẩm lỏng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước, thu nhận proteaza kiềm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, thay thế ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của các Bảng 1-1 và 1-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó, bằng gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 1-1 và 1-2:

Bảng 1-1

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(A)	405	leuxin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin, prolin hoặc valin
(B)	81	leuxin, prolin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin hoặc glutamin
(C)	40	isoleuxin, phenylalanin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(D)	191	leuxin, valin, phenylalanin, isoleuxin hoặc tryptophan
(E)	59	valin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(F)	11	glyxin, asparagin hoặc serin
(G)	16	isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(H)	20	alanin
(I)	22	tryptophan
(J)	23	asparagin
(K)	37	threonin
(L)	41	isoleuxin
(M)	52	glyxin hoặc serin
(N)	53	alanin, isoleuxin hoặc valin
(O)	56	valin
(P)	60	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(Q)	63	axit aspartic hoặc leuxin
(R)	80	alanin hoặc histidin

(S)	82	glutamin
(T)	91	xystein
(U)	100	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(V)	101	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(W)	109	phenylalanin, isoleuxin hoặc leuxin
(X)	113	leuxin hoặc tryptophan
(Y)	120	phenylalanin, isoleuxin, tryptophan hoặc tyrosin
(Z)	135	leuxin
(AA)	140	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AB)	151	phenylalanin
(AC)	166	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(AD)	194	tyrosin
(AE)	200	tryptophan
(AF)	204	isoleuxin, leuxin, valin hoặc metionin
(AG)	212	leuxin, valin hoặc tryptophan

Bảng 1-2

	(i) Vị trí	(ii) Góc axit amin
(AH)	233	isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(AI)	238	leuxin
(AJ)	243	isoleuxin, leuxin hoặc tyrosin
(AK)	246	phenylalanin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(AL)	275	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AM)	277	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin
(AN)	297	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AO)	326	tryptophan
(AP)	330	phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(AQ)	332	glyxin, threonin, hoặc valin
(AR)	334	leuxin
(AS)	342	axit glutamic, leuxin, threonin hoặc tryptophan

(AT)	343	threonin
(AU)	357	leuxin
(AV)	359	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc glyxin
(AW)	361	isoleuxin, valin hoặc tryptophan
(AX)	376	tryptophan
(AY)	378	leuxin hoặc tryptophan
(AZ)	385	metionin, prolin hoặc tyrosin
(BA)	386	alanin, isoleuxin, leuxin hoặc metionin
(BB)	387	phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, metionin, valin hoặc tryptophan
(BC)	390	phenylalanin, glyxin, serin, threonin hoặc tyrosin
(BD)	393	glutamin
(BE)	396	glyxin
(BF)	403	lysin hoặc threonin
(BG)	406	phenylalanin, valin hoặc tryptophan
(BH)	407	xystein hoặc glyxin
(BI)	408	isoleuxin, asparagin, tryptophan hoặc tyrosin
(BJ)	409	tryptophan hoặc tyrosin
(BK)	411	alanin, leuxin, prolin hoặc valin
(BL)	427	valin
(BM)	433	leuxin.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các gốc axit amin tại vị trí 30, vị trí 68 và vị trí 255 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là các gốc axit amin sau:

vị trí 30 hoặc vị trí tương ứng với nó: axit aspartic;

vị trí 68 hoặc vị trí tương ứng với nó: histidin; và

vị trí 255 hoặc vị trí tương ứng với nó: serin.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ít nhất một gốc axit amin này bao gồm ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại

(A) vị trí 405, (B) vị trí 81, (C) vị trí 40, (D) vị trí 191 và (E) vị trí 59, hoặc các vị trí tương ứng với nó.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chất tẩy rửa lỏng là chất tẩy rửa lỏng đậm đặc chứa từ 40 đến 90% khối lượng chất hoạt động bề mặt.

5. Proteaza kiểm đột biến, trong đó proteaza kiểm này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc trình tự axit amin có mức độ tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, trong đó ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại các vị trí được mô tả ở cột (i) của các Bảng 2-1 và 2-2 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là các gốc axit amin được mô tả ở cột (ii) của các Bảng 2-1 và 2-2:

Bảng 2-1

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(A')	405	leuxin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin, prolin hoặc valin
(B')	81	leuxin, prolin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, isoleuxin hoặc glutamin
(C')	40	isoleuxin, phenylalanin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(D')	191	leuxin, valin, phenylalanin, isoleuxin hoặc tryptophan
(E')	59	valin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, metionin hoặc tryptophan
(F')	11	glyxin, asparagin hoặc serin
(G')	16	leuxin hoặc tryptophan
(H')	20	alanin
(I')	22	tryptophan
(J')	23	asparagin
(K')	37	threonin
(L')	41	isoleuxin
(M')	52	glyxin hoặc serin

(N')	53	alanin, isoleuxin hoặc valin
(O')	56	valin
(P')	60	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(Q')	63	axit aspartic hoặc leuxin
(R')	80	alanin hoặc histidin
(S')	91	xystein
(T')	100	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(U')	109	phenylalanin, isoleuxin hoặc leuxin
(V')	113	leuxin hoặc tryptophan
(W')	120	phenylalanin, isoleuxin, tryptophan hoặc tyrosin
(X')	135	leuxin
(Y')	140	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(Z')	151	phenylalanin
(AA')	166	phenylalanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc tryptophan
(AB')	200	tryptophan
(AC')	204	leuxin hoặc metionin
(AD')	212	leuxin, valin hoặc tryptophan
(AE')	233	isoleuxin, leuxin hoặc tryptophan
(AF')	238	leuxin
(AG')	243	isoleuxin, leuxin hoặc tyrosin

Bảng 2-2

	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
(AH')	246	phenylalanin, leuxin, valin, tryptophan hoặc tyrosin
(AI')	275	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AJ')	277	phenylalanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin
(AK')	297	phenylalanin, leuxin hoặc tryptophan
(AL')	326	tryptophan
(AM')	330	phenylalanin, metionin hoặc tryptophan

(AN')	332	glyxin, threonin, hoặc valin
(AO')	334	leuxin
(AP')	343	threonin
(AQ')	357	leuxin
(AR')	359	phenylalanin hoặc glyxin
(AS')	361	isoleuxin, valin hoặc tryptophan
(AT')	376	tryptophan
(AU')	378	leuxin hoặc tryptophan
(AV')	385	metionin, prolin hoặc tyrosin
(AW')	386	alanin, isoleuxin, leuxin hoặc metionin
(AX')	387	phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, metionin, valin hoặc tryptophan
(AY')	390	phenylalanin, glyxin, serin, threonin hoặc tyrosin
(AZ')	393	glutamin
(BA')	396	glyxin
(BB')	403	lysin hoặc threonin
(BC')	406	phenylalanin, valin hoặc tryptophan
(BD')	407	xystein hoặc glyxin
(BE')	408	isoleuxin, asparagin, tryptophan hoặc tyrosin
(BF')	409	tryptophan hoặc tyrosin
(BG')	411	alanin, leuxin, prolin hoặc valin
(BH')	427	valin
(BI')	433	Leuxin.

6. Proteaza kiểm đột biến theo điểm 5, trong đó các gốc axit amin tại vị trí 30, vị trí 68 và vị trí 255 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 2 hoặc các vị trí tương ứng với nó là các gốc axit amin sau:

vị trí 30 hoặc vị trí tương ứng với nó: axit aspartic;

vị trí 68 hoặc vị trí tương ứng với nó: histidin; và

vị trí 255 hoặc vị trí tương ứng với nó: serin.

7. Proteaza kiểm đột biến theo điểm 5 hoặc 6, trong đó ít nhất một gốc axit amin này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin tại (A') vị trí 405, (B') vị trí 81, (C') vị trí 40, (D') vị trí 191 và (E') vị trí 59, hoặc các vị trí tương ứng với nó.
8. Gen mã hóa proteaza kiểm đột biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7.
9. Vector tái tổ hợp, trong đó vector này chứa gen theo điểm 8.
10. Tế bào chuyển gen chứa vector tái tổ hợp theo điểm 9.
11. Phương pháp sản xuất proteaza kiểm đột biến sử dụng tế bào chuyển gen theo điểm 10.
12. Chế phẩm tẩy rửa lỏng chứa proteaza kiểm đột biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5 đến 7.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> KAO CORPORATION

<120> Phương pháp cải thiện tính tan của proteaza kiềm, proteaza kiềm đột biến và phương pháp sản xuất proteaza kiềm đột biến này

<130> KS1252

<150> JP 2012-089482

<151> 2012-04-10

<150> JP 2013-031995

<151> 2013-02-21

<160> 255

<170> PatentIn phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 2040

<212> ADN

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<400> 1

```

ggatccgtga ggaggggaacc gaatgagaaa gaagaaaaag gtgtttttat ctgtttttatc    60
agctgcagcg attttgtcga ctgttgcgtt aagtaatcca tctgcagggtg gtgcaaggaa    120
ttttgatctg gatttcaaag gaattcagac aacaactgat gctaaagggtt tctccaagca    180
ggggcagact ggtgctgctg cttttctggt ggaatctgaa aatgtgaaac tcccaaaagg    240
tttgcagaag aagcttgaaa cagtcccggc aaataataaa ctccatatta tccaattcaa    300
tggaccaatt ttagaagaaa caaaacagca gctggaaaaa acagggggcaa agattctcga    360
ctacatacct gattatgctt acattgtcga gtatgagggc gatgttaagt cagcaacaag    420
caccattgag cacgtggaat ccgtggagcc ttatttgccg atatacagaa tagatcccca    480
gcttttcaca aaaggggcat cagagcttgt aaaagcagtg gcgcttgata caaagcagaa    540
aaataaagag gtgcaattaa gaggcacga acaaacgca caattcgcaa taagcaatga    600
tgtgctatat attacggcaa agcctgagta taagggtgatg aatgatgttg cgcgtggaat    660
tgtcaaagcg gatgtggctc agagcagcta cgggttgtat ggacaaggac agatcgtagc    720
ggttgccgat acagggccttg atacaggtcg caatgacagt tcgatgcatg aagccttccg    780
cgggaaaatt actgcattat atgcattggg acggacgaat aatgccaatg atacgaatgg    840
tcatggtacg catgtggctg gctccgtatt aggaaacggc tccactaata aaggaatggc    900

```

gcctcaggcg aatctagtct tccaatctat catggatagc ggtgggggac ttggaggact 960
 accttcgaat ctgcaaacct tattcagcca agcatacagt gctgggtgcca gaattcatac 1020
 aaactcctgg ggagcagcag tgaatggggc ttacacaaca gattccagaa atgtggatga 1080
 ctatgtgcgc aaaaatgata tgacgatcct tttcgtgcc gggaatgaag gaccgaacgg 1140
 cggaaccatc agtgcaccag gcacagctaa aaatgcaata acagtcggag ctacggaaaa 1200
 cctccgcca agctttgggt cttatgcgga caatatcaac catgtggcac agttctcttc 1260
 acgtggaccg acaaaggatg gacggatcaa accggatgtc atggcaccgg gaacgttcat 1320
 actatcagca agatcttctc ttgcaccgga ttctctcttc tgggcgaacc atgacagtaa 1380
 atatgcatac atgggtggaa cgtccatggc tacaccgatc gttgctggaa acgtggcaca 1440
 gcttcgtgag cattttgtga aaaacagagg catcacacca aagccttctc tattaagaagc 1500
 ggcactgatt gccggtgcag ctgacatcgg ccttggctac ccgaacggta accaaggatg 1560
 gggacgagtg acattggata aatccctgaa cgttgcttat gtgaacgagt ccagttctct 1620
 atccaccagc caaaaagcga cgtactcgtt tactgctact gccggcaagc ctttgaaaat 1680
 ctccctggta tgggtctgatg cccctgcgag cacaactgct tccgtaacgc ttgtcaatga 1740
 tctggacctt gtcattaccg ctccaaatgg cacacagtat gtaggaaatg actttacttc 1800
 gccatacaat gataactggg atggccgcaa taacgtagaa aatgtattta ttaatgcacc 1860
 acaaagcggg acgtatacaa ttgaggtaca ggcttataac gtaccggttg gaccacagac 1920
 cttctcgttg gcaattgtga attaatagaa taacagacaa aaaacgctgg cgtatgccag 1980
 ggtttttttg tttgaaatca agaaaaaagg gtagaggaat taatatggta atcgtctaga 2040

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<400> 2

Asn	Asp	Val	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Ala	Gln	Ser	Ser
1				5					10					15	
Tyr	Gly	Leu	Tyr	Gly	Gln	Gly	Gln	Ile	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Gly
				20				25					30		
Leu	Asp	Thr	Gly	Arg	Asn	Asp	Ser	Ser	Met	His	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly
				35				40					45		
Lys	Ile	Thr	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Arg	Thr	Asn	Asn	Ala	Asn	Asp
				50				55					60		
Thr	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Gly

65					70					75					80
Ser	Thr	Asn	Lys	Gly	Met	Ala	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Phe	Gln	Ser
				85					90					95	
Ile	Met	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Leu	Gln
			100					105					110		
Thr	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Tyr	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Ile	His	Thr	Asn
		115					120					125			
Ser	Trp	Gly	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Ala	Tyr	Thr	Thr	Asp	Ser	Arg	Asn
	130					135					140				
Val	Asp	Asp	Tyr	Val	Arg	Lys	Asn	Asp	Met	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Ala
145					150					155					160
Gly	Asn	Glu	Gly	Pro	Asn	Gly	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala
				165				170					175		
Lys	Asn	Ala	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Thr	Glu	Asn	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe
		180					185					190			
Gly	Ser	Tyr	Ala	Asp	Asn	Ile	Asn	His	Val	Ala	Gln	Phe	Ser	Ser	Arg
	195					200					205				
Gly	Pro	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Gly
	210				215					220					
Thr	Phe	Ile	Leu	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Phe
225					230					235					240
Trp	Ala	Asn	His	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Met	Gly	Gly	Thr	Ser	Met
			245						250				255		
Ala	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Ala	Gln	Leu	Arg	Glu	His	Phe
		260					265					270			
Val	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Thr	Pro	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Ala
	275						280				285				
Leu	Ile	Ala	Gly	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Leu	Gly	Tyr	Pro	Asn	Gly	Asn
	290					295					300				
Gln	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Asp	Lys	Ser	Leu	Asn	Val	Ala	Tyr
305					310					315					320
Val	Asn	Glu	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Ala	Thr	Tyr	Ser
			325						330				335		
Phe	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys	Pro	Leu	Lys	Ile	Ser	Leu	Val	Trp	Ser
		340						345				350			
Asp	Ala	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Val	Asn	Asp	Leu
	355						360				365				
Asp	Leu	Val	Ile	Thr	Ala	Pro	Asn	Gly	Thr	Gln	Tyr	Val	Gly	Asn	Asp
	370					375				380					
Phe	Thr	Ser	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asn	Trp	Asp	Gly	Arg	Asn	Asn	Val	Glu
385					390				395						400
Asn	Val	Phe	Ile	Asn	Ala	Pro	Gln	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Val
			405					410					415		
Gln	Ala	Tyr	Asn	Val	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Thr	Phe	Ser	Leu	Ala	Ile
		420					425					430			
Val	Asn														

<210> 3

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR KG24S2

 <400> 3
 ataaggatcc gtgaggagg aaccga 26

 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR D11_R

 <400> 4
 cgctttgaca attccacgcg caac 24

 <210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR D11G_F

 <400> 5
 ggaattgtca aagcgggagt ggctcagagc agctac 36

 <210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR KG11S

 <400> 6
 cccctctaga cgattaccat attaattcct ctaccc 36
 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR D11N_F

 <400> 7
 ggaattgtca aagcgaatgt ggctcagagc agctac 36

<210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR D11S_F

 <400> 8
 ggaattgtca aagcgtccgt ggctcagagc agctac 36

 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S16_R
 <400> 9
 gctctgagcc acatccgctt tgac 24

 <210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S16I_F

 <400> 10
 gatgtggctc agagcattta cgggttgat ggacaa 36

 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S16L_F

 <400> 11
 gatgtggctc agagccttta cgggttgat ggacaa 36

 <210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S16V_F

 <400> 12
 gatgtggctc agagcgtgta cgggttgat ggacaa 36

<210> 13
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S16W_F

 <400> 13
 gatgtggctc agagctggta cgggttgat ggacaa 36

 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Y20_R

 <400> 14
 caaccgtag ctgctctgag ccac 24
 <210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Y20A_F

 <400> 15
 agcagctacg ggttggcagg acaaggacag atcgta 36

 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q22_R

 <400> 16
 tccataacaac ccgtagctgc tctg 24

 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q22W_F

 <400> 17

tacgggttgt atggatgggg acagatcgta gcggtt

36

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G23_R

<400> 18

ttgtccatac aacccgtagc tgct

24

<210> 19

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G23N_F

<400> 19

gggttgtatg gacaaaatca gatcgtagcg gttgcc

36

<210> 20

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR R37_R

<400> 20

acctgtatca agccctgtat cggc

24

<210> 21

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR R37T_F

<400> 21

gggcttgata caggtacaaa tgacagttcg atgcat

36

<210> 22

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40_R

<400> 22

gtcattgcga cctgtatcaa gccc

24

<210> 23

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40F_F

<400> 23

acaggtcgca atgacttctc gatgcatgaa gccttc

36

<210> 24

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40I_F

<400> 24

acaggtcgca atgacatttc gatgcatgaa gccttc

36

<210> 25

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40L_F

<400> 25

acaggtcgca atgaccttc gatgcatgaa gccttc

36

<210> 26

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40V_F

<400> 26

acaggtcgca atgacgtgac gatgcatgaa gccttc

36

<210> 27

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S40W_F

 <400> 27
 acaggtcgca atgactgggc gatgcatgaa gccttc 36

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S41I_R

 <400> 28
 actgtcattg cgacctgtat caag 24

<210> 29
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S41I_F

 <400> 29
 ggtcgcaatg acagtattat gcatgaagcc ttccgc 36

<210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A52_R

 <400> 30
 agtaattttc ccgcggaagg cttc 24

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A52G_F

 <400> 31
 cgcgggaaaa ttactggatt atatgcattg ggacgg 36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A52S_F

 <400> 32
 cgcggggaaaa ttacttcctt atatgcattg ggacgg 36

 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR L53_R

 <400> 33
 tgcagtaatt ttcccgcgga aggc 24

 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR L53A_F

 <400> 34
 gggaaaatta ctgcagcata tgcattggga cggacg 36

 <210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR L53I_F

 <400> 35
 gggaaaatta ctgcaattta tgcattggga cggacg 36

 <210> 36
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR L53V_F

 <400> 36

gggaaaatta ctgcagtgtgta tgcattggga cggacg

36

<210> 37

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR L56_R

<400> 37

tgcatataat gcagtaattt tccc

24

<210> 38

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR L56V_F

<400> 38

actgcattat atgcagtggg acggacgaat aatgcc

36

<210> 39

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59_R

<400> 39

ccgtcccaat gcatataatg cagt

24

<210> 40

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59F_F

<400> 40

tatgcattgg gacggttcaa taatgccaat gatacg

36

<210> 41

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59I_F

<400> 41

tatgcattgg gacggattaa taatgccaat gatacg

36

<210> 42

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59L_F

<400> 42

tatgcattgg gacggcttaa taatgccaat gatccg

36

<210> 43

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59M_F

<400> 43

tatgcattgg gacggatgaa taatgccaat gatacg

36

<210> 44

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59V_F

<400> 44

tatgcattgg gacgggtgaa taatgccaat gatacg

36

<210> 45

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T59W_F

<400> 45

tatgcattgg gacggtggaa taatgccaat gatacg

36

<210> 46

<211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60_R

 <400> 46
 cgtccgtccc aatgcatata atgc 24

 <210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60F_F

 <400> 47
 gcattgggac ggacgttcaa tgccaatgat acgaat 36

 <210> 48
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60I_F

 <400> 48
 gcattgggac ggacgattaa tgccaatgat acgaat 36

 <210> 49
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60L_F

 <400> 49
 gcattgggac ggacgcttaa tgccaatgat acgaat 36

 <210> 50
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60V_F

 <400> 50
 gcattgggac ggacggtgaa tgccaatgat acgaat 36

<210> 51
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N60W_F

 <400> 51
 gcattgggac ggacgtggaa tgccaatgat acgaat 36

 <210> 52
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N63_R

 <400> 52
 ggcattattc gtccgtccca atgc 24

 <210> 53
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N63D_F

 <400> 53
 cggacgaata atgccgatga tacgaatggg catggg 36

 <210> 54
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N63L_F

 <400> 54
 cggacgaata atgcccttga tacgaatggg catggg 36

 <210> 55
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G80_R

 <400> 55

gtttcctaata acggagccag ccac

24

<210> 56

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G80A_F

<400> 56

tccgtattag gaaacgcattc cactaataaaa ggaatg

36

<210> 57

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G80H_F

<400> 57

tccgtattag gaaaccattc cactaataaaa ggaatg

36

<210> 58

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81_R

<400> 58

gccgtttcct aatacggagc cagc

24

<210> 59

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81F_F

<400> 59

gtattaggaa acggcttcac taataaagga atggcg

36

<210> 60

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81I_F

<400> 60
 gtattaggaa acggcattac taataaagga atggcg 36

<210> 61
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81L_F

<400> 61
 gtattaggaa acggccttac taataaagga atggcg 36

<210> 62
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81Q_F

<400> 62
 gtattaggaa acggccagac taataaagga atggcg 36

<210> 63
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81W_F

<400> 63
 gtattaggaa acggctggac taataaagga atggcg 36

<210> 64
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S81Y_F

<400> 64
 gtattaggaa acggctatac taataaagga atggcg 36

<210> 65
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T82_R

<400> 65

ggagccggttt cctaatacgg agcc

24

<210> 66

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T82Q_F

<400> 66

ttaggaaacg gctcccagaa taaaggaatg ggcgct

36

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N91_R

<400> 67

cgcctgaggc gccattcctt tatt

24

<210> 68

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N91C_F

<400> 68

atggcgcctc aggcgtgcct agtcttccaa tctatc

36

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S100_R

<400> 69

atccatgata gattggaaga ctag

24

<210> 70

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S100F_F

 <400> 70
 caatctatca tggatttcgg tgggggactt ggagga 36

 <210> 71
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S100I_F

 <400> 71
 caatctatca tggatattgg tgggggactt ggagga 36

 <210> 72
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S100L_F

 <400> 72
 caatctatca tggatcttgg tgggggactt ggagga 36

 <210> 73
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S100W_F

 <400> 73
 caatctatca tggattgggg tgggggactt ggagga 36

 <210> 74
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101_R

 <400> 74
 gctatccatg atagattgga agac 24

<210> 75
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101F_F

 <400> 75
 tctatcatgg atagcttcgg gggacttgga ggacta 36

 <210> 76
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101I_F

 <400> 76
 tctatcatgg atagcattgg gggacttgga ggacta 36

 <210> 77
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101L_F

 <400> 77
 tctatcatgg atagccttgg gggacttgga ggacta 36

 <210> 78
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101V_F

 <400> 78
 tctatcatgg atagcgtggg gggacttgga ggacta 36

 <210> 79
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101W_F

 <400> 79

tctatcatgg atagctgggg gggacttgga ggacta 36

<210> 80
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G101Y_F

<400> 80
 tctatcatgg atagctatgg gggacttgga ggacta 36

<210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S109_R

<400> 81
 aggtatgcct ccaagtcctcc cacc 24

<210> 82
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S109F_F

<400> 82
 cttggaggac tacctttcaa tctgcaaacc ttattc 36

<210> 83
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S109I_F

<400> 83
 cttggaggac tacctattaa tctgcaaacc ttattc 36

<210> 84
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S109L_F

<400> 84

cttgaggagac tacctcttaa tctgcaaacc ttattc

36

<210> 85

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T113_R

<400> 85

ttgcagattc gaaggtagtc ctcc

24

<210> 86

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T113L_F

<400> 86

ccttcgaatc tgcaactttt attcagccaa gcatac

36

<210> 87

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T113W_F

<400> 87

ccttcgaatc tgcaatggtt attcagccaa gcatac

36

<210> 88

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S120_R

<400> 88

gtatgcttgg ctgaataagg tttg

24

<210> 89

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S120F_F

<400> 89

ttcagccaag cataacttcgc tgggtgccaga attcat

36

<210> 90

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S120I_F

<400> 90

ttcagccaag catacattgc tgggtgccaga attcat

36

<210> 91

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S120W_F

<400> 91

ttcagccaag cataactgggc tgggtgccaga attcat

36

<210> 92

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S120Y_F

<400> 92

ttcagccaag catactatgc tgggtgccaga attcat

36

<210> 93

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N135_R

<400> 93

cactgctgct ccccaggagt ttgt

24

<210> 94

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N135L_F

 <400> 94
 tgggggagcag cagtgcttgg ggcttacaca acagat 36

 <210> 95
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T140_R

 <400> 95
 tgtgtaagcc ccattcactg ctgc 24

 <210> 96
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T140F_F

 <400> 96
 aatgggggctt acacattcga ttccagaaat gtggat 36

 <210> 97
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T140L_F

 <400> 97
 aatgggggctt acacacttga ttccagaaat gtggat 36

 <210> 98
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T140W_F

 <400> 98
 aatgggggctt acacatggga ttccagaaat gtggat 36

<210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K151_R

<400> 99
 gcgcacatag tcatccacat ttct 24

<210> 100
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K151F_F

<400> 100
 gatgactatg tgcgcttcaa tgatatgacg atcctt 36

<210> 101
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166_R

<400> 101
 cggtccttca ttcccggcag cgaa 24

<210> 102
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166F_F

<400> 102
 gggaatgaag gaccgttcgg cggaaccatc agtgca 36

<210> 103
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166I_F

<400> 103
gggaatgaag gaccgattgg cggaaccatc agtgca 36

<210> 104
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166L_F

<400> 104
gggaatgaag gaccgcttgg cggaaccatc agtgca 36

<210> 105
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166V_F

<400> 105
gggaatgaag gaccggtggg cggaaccatc agtgca 36

<210> 106
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N166W_F

<400> 106
gggaatgaag gaccgtgggg cggaaccatc agtgca 36

<210> 107
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191_R

<400> 107
tgggcggagg ttttccgtag ctcc 24

<210> 108
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191F_F

<400> 108

gaaaacctcc gccattctt tgggtcttat gcggac

36

<210> 109

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191I_F

<400> 109

gaaaacctcc gcccaatttt tgggtcttat gcggac

36

<210> 110

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191L_F

<400> 110

gaaaacctcc gccactttt tgggtcttat gcggac

36

<210> 111

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191V_F

<400> 111

gaaaacctcc gccagtgtt tgggtcttat gcggac

36

<210> 112

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S191W_F

<400> 112

gaaaacctcc gccatggtt tgggtcttat gcggac

36

<210> 113

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S194_R

 <400> 113
 cccaaagctt gggcggaggt tttc 24

 <210> 114
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S194Y_F

 <400> 114
 cgcccaagct ttgggtatta tgcggacaat atcaac 36

 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N200_R

 <400> 115
 gatattgtcc gcataagacc caaa 24

 <210> 116
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N200W_F

 <400> 116
 tatgcggaca atatctggca tgtggcacag ttctct 36

 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q204_R

 <400> 117
 tgccacatgg ttgatattgt ccgc 24

 <210> 118

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q204I_F

<400> 118
 atcaaccatg tggcaatttt ctcttcacgt ggaccg 36

<210> 119
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q204L_F

<400> 119
 atcaaccatg tggcactttt ctcttcacgt ggaccg 36

<210> 120
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q204M_F

<400> 120
 atcaaccatg tggcaatggt ctcttcacgt ggaccg 36

<210> 121
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q204V_F

<400> 121
 atcaaccatg tggcagtgtt ctcttcacgt ggaccg 36

<210> 122
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K212_R

<400> 122
 tgtcgggtcca cgtgaagaga actg 24

<210> 123
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K212L_F

<400> 123
 tcacgtggac cgacacttga tggacggatc aaaccg

36

<210> 124
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K212V_F

<400> 124
 tcacgtggac cgacagtgga tggacggatc aaaccg

36

<210> 125
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K212W_F

<400> 125
 tcacgtggac cgacatggga tggacggatc aaaccg

36

<210> 126
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S233_R

<400> 126
 agatcttgct gatagtatga acgt

24

<210> 127
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S233I_F

<400> 127
 ctatcagcaa gatctattct tgcaccggat tcctcc 36

<210> 128
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S233L_F

<400> 128
 ctatcagcaa gatctcttct tgcaccggat tcctcc 36

<210> 129
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S233W_F

<400> 129
 ctatcagcaa gatcttggct tgcaccggat tcctcc 36

<210> 130
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S238_R

<400> 130
 atccggtgca agagaagatc ttgc 24

<210> 131
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S238L_F

<400> 131
 tctcttgac cggatctttc cttctgggcg aaccat 36

<210> 132
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N243_R

<400> 132

cgcccagaag gaggaatccg gtgc

24

<210> 133

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N243I_F

<400> 133

tcctccttct gggcgattca tgacagtaaa tatgca

36

<210> 134

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N243L_F

<400> 134

tcctccttct gggcgcttca tgacagtaaa tatgca

36

<210> 135

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR N243Y_F

<400> 135

tcctccttct gggcgatatca tgacagtaaa tatgca

36

<210> 136

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246_R

<400> 136

gtcatgggttc gccccaagg agga

24

<210> 137

<211> 36

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246F_F

 <400> 137
 tgggcgaacc atgacttcaa atatgcatac atgggt 36

 <210> 138
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246L_F

 <400> 138
 tgggcgaacc atgaccttaa atatgcatac atgggt 36

 <210> 139
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246V_F

 <400> 139
 tgggcgaacc atgacgtgaa atatgcatac atgggt 36

 <210> 140
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246W_F

 <400> 140
 tgggcgaacc atgactggaa atatgcatac atgggt 36

 <210> 141
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S246Y_F

 <400> 141
 tgggcgaacc atgactataa atatgcatac atgggt 36

<210> 142
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N275_R
 -
 <400> 142
 tttcacaaaa tgctcacgaa gctg 24

 <210> 143
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N275F_F

 <400> 143
 gagcattttg tgaaattcag aggcatcaca ccaaag 36

 <210> 144
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N275L_F

 <400> 144
 gagcattttg tgaaacttag aggcatcaca ccaaag 36

 <210> 145
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N275W_F

 <400> 145
 gagcattttg tgaaatggag aggcatcaca ccaaag 36

 <210> 146
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G277_R

 <400> 146

tctgttttttc acaaaatgct cacg

24

<210> 147

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G277F_F

<400> 147

tttgtgaaaa acagattcat cacaccaaag ctttct

36

<210> 148

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G277I_F

<400> 148

tttgtgaaaa acagaattat cacaccaaag ctttct

36

<210> 149

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G277L_F

<400> 149

tttgtgaaaa acagacttat cacaccaaag ctttct

36

<210> 150

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G277V_F

<400> 150

tttgtgaaaa acagagtgat cacaccaaag ctttct

36

<210> 151

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G297_R

<400> 151

gatgtcagct gcaccggcaa tcag

24

<210> 152

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G297F_F

<400> 152

ggtgcagctg acatcttcct tggctaccg aacggt

36

<210> 153

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G297L_F

<400> 153

ggtgcagctg acatccttct tggctaccg aacggt

36

<210> 154

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G297W_F

<400> 154

ggtgcagctg acatctggct tggctaccg aacggt

36

<210> 155

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S326_R

<400> 155

actggactcg ttcacatagg caac

24

<210> 156

<211> 36

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S326W_F

 <400> 156
 gtgaacgagt ccagttggct atccaccagc caaaaa 36

 <210> 157
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S330_R

 <400> 157
 ggtggataga gaactggact cggt 24

 <210> 158
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S330F_F

 <400> 158
 agttctctat ccaccttcca aaaagcgacg tactcg 36

 <210> 159
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S330M_F

 <400> 159
 agttctctat ccacatgca aaaagcgacg tactcg 36

 <210> 160
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S330W_F

 <400> 160
 agttctctat ccacctggca aaaagcgacg tactcg 36

<210> 161
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K332_R

<400> 161
 ttggctggtg gatagagaac tgga 24

<210> 162
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K332G_F

<400> 162
 ctatccacca gccaaaggagc gacgtactcg tttact 36

<210> 163
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K332T_F

<400> 163
 ctatccacca gccaaacagc gacgtactcg tttact 36

<210> 164
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR K332V_F

<400> 164
 ctatccacca gccaaagtggc gacgtactcg tttact 36

<210> 165
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T334_R

<400> 165
 cgcttttttg ctggtggata gaga 24

<210> 166
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T334L_F

<400> 166
 accagccaaa aagcgcttta ctcgtttact gctact 36

<210> 167
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G342_R

<400> 167
 ggccagtagca gtaaaccgagt acgt 24

<210> 168
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G342E_F

<400> 168
 tttactgcta ctgccgaaaa gcctttgaaa atctcc 36

<210> 169
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR G342L_F

<400> 169
 tttactgcta ctgcccttaa gcctttgaaa atctcc 36

<210> 170
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G342T_F

<400> 170

tttactgcta ctgccacaaa gcctttgaaa atctcc

36

<210> 171

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR G342W_F

<400> 171

tttactgcta ctgcctggaa gcctttgaaa atctcc

36

<210> 172

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR K343_R

<400> 172

gccggcagta gcagtaaacg agta

24

<210> 173

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR K343T_F

<400> 173

actgctactg ccggcacacc tttagaaaatc tccctg

36

<210> 174

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S357_R

<400> 174

cgcaggggca tcagaccata ccag

24

<210> 175

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S357L_F

 <400> 175
 tctgatgccc ctgcgcttac aactgcttcc gtaacg 36

 <210> 176
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T359_R

 <400> 176
 tgtgctcgca ggggcatcag acca 24

 <210> 177
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T359F_F

 <400> 177
 gccctgcca gcacattcgc ttccgtaacg cttgtc 36

 <210> 178
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T359G_F

 <400> 178
 gccctgcca gcacaggagc ttccgtaacg cttgtc 36

 <210> 179
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T359I_F

 <400> 179
 gccctgcca gcacaattgc ttccgtaacg cttgtc 36

 <210> 180

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T359L_F

 <400> 180
 gccctgcga gcacacttgc ttccgtaacg cttgtc 36

 <210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S361_R

 <400> 181
 agcagttgtg ctgcagggg catc 24

 <210> 182
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S361I_F

 <400> 182
 gcgagcacia ctgctattgt aacgcttgtc aatgat 36

 <210> 183
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S361V_F

 <400> 183
 gcgagcacia ctgctgtggt aacgcttgtc aatgat 36

 <210> 184
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S361W_F

 <400> 184
 gcgagcacia ctgcttgggt aacgcttgtc aatgat 36

<210> 185
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N376_R

 <400> 185
 tggagcggta atgacaaggt ccag 24

 <210> 186
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N376W_F

 <400> 186
 gtcattaccg ctccatgggg cacacagtat gtagga 36

 <210> 187
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T378_R

 <400> 187
 gccatttgga gcggtaatga caag 24

 <210> 188
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T378L_F

 <400> 188
 accgctccaa atggccttca gtatgtagga aatgac 36

 <210> 189
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T378W_F

<400> 189
 accgctccaa atggctggca gtatgtagga aatgac 36

<210> 190
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F385_R

<400> 190
 gtcatttcct acatactgtg tgcc 24

<210> 191
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F385M_F

<400> 191
 tatgtaggaa atgacatgac ttcgccatac aatgat 36

<210> 192
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F385P_F

<400> 192
 tatgtaggaa atgacccaac ttcgccatac aatgat 36

<210> 193
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F385Y_F

<400> 193
 tatgtaggaa atgactatac ttcgccatac aatgat 36

<210> 194
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T386_R

 <400> 194
 aaagtcattt cctacatact gtgt 24

 <210> 195
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T386A_F

 <400> 195
 gtaggaaatg actttgcatc gccatacaat gataac 36

 <210> 196
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T386I_F

 <400> 196
 gtaggaaatg actttatttc gccatacaat gataac 36

 <210> 197
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T386L_F

 <400> 197
 gtaggaaatg actttctttc gccatacaat gataac 36

 <210> 198
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T386M_F

 <400> 198
 gtaggaaatg actttatgtc gccatacaat gataac 36

 <210> 199
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387_R

<400> 199

agtaaagtca tttcctacat actg

24

<210> 200

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387F_F

<400> 200

ggaaatgact ttactttccc atacaatgat aactgg

36

<210> 201

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387G_F

<400> 201

ggaaatgact ttactggacc atacaatgat aactgg

36

<210> 202

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387I_F

<400> 202

ggaaatgact ttactattcc atacaatgat aactgg

36

<210> 203

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387L_F

<400> 203

ggaaatgact ttactcttcc atacaatgat aactgg

36

<210> 204

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387M_F

<400> 204
 ggaaatgact ttactatgcc atacaatgat aactgg 36

<210> 205
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387V_F

<400> 205
 ggaaatgact ttactgtgcc atacaatgat aactgg 36

<210> 206
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR S387W_F

<400> 206
 ggaaatgact ttacttggcc atacaatgat aactgg 36

<210> 207
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390_R

<400> 207
 gtatggcgaa gtaaagtcac ttcc 24

<210> 208
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390F_F

<400> 208
 tttacttcgc cataacttcga taactgggat ggccgc 36

<210> 209
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390G_F

 <400> 209
 ttacttcgc catacggaga taactgggat ggccgc 36

 <210> 210
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390S_F

 <400> 210
 ttacttcgc catactccga taactgggat ggccgc 36

 <210> 211
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390T_F

 <400> 211
 ttacttcgc catacacaga taactgggat ggccgc 36

 <210> 212
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N390Y_F

 <400> 212
 ttacttcgc catactatga taactgggat ggccgc 36

 <210> 213
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR W393_R

<400> 213
gttatcattg tatggcgaag taaa 24

<210> 214
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR W393Q_F

<400> 214
ccatacaatg ataaccagga tggccgcaat aacgta 36

<210> 215
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR R396_R

<400> 215
gccatcccag ttatcattgt atgg 24

<210> 216
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR R396G_F

<400> 216
gataactggg atggcggaaa taacgtagaa aatgta 36

<210> 217
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit như mỗi PCR F403_R

<400> 217
tacattttct acgttattgc ggcc 24

<210> 218
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F403K_F

 <400> 218
 aacgtagaaa atgtaaaaat taatgcacca caaagc 36

 <210> 219
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR F403T_F

 <400> 219
 aacgtagaaa atgtaacaat taatgcacca caaagc 36

 <210> 220
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405F_F

 <400> 220
 gaaaatgtat ttatttttcgc accacaaagc gggacg 36

 <210> 221
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405I_F

 <400> 221
 gaaaatgtat ttattattgc accacaaagc gggacg 36

 <210> 222
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405L_F

 <400> 222
 gaaaatgtat ttattcttgc accacaaagc gggacg 36

 <210> 223
 <211> 36

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405P_F

 <400> 223
 gaaaatgtat ttattccagc accacaaagc gggacg 36

 <210> 224
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405V_F

 <400> 224
 gaaaatgtat ttattgtggc accacaaagc gggacg 36

 <210> 225
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR N405W_F

 <400> 225
 gaaaatgtat ttatttgggc accacaaagc gggacg 36

 <210> 226
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A406_R

 <400> 226
 attaataaat acattttcta cggt 24

 <210> 227
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A406F_F

 <400> 227
 aatgtattta ttaatttccc acaaagcggg acgtat 36

<210> 228
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A406V_F

<400> 228
 aatgtattta ttaatgtgcc acaaagcggg acgtat 36

<210> 229
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR A406W_F

<400> 229
 aatgtattta ttaattggcc acaaagcggg acgtat 36

<210> 230
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR P407_R

<400> 230
 tgcattaata aatacatTTTT ctac 24

<210> 231
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR P407C_F

<400> 231
 gtatttatta atgcatgcc aagcgggacg tataca 36

<210> 232
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR P407G_F

<400> 232
 gtatttatta atgcaggaca aagcgggacg tataca 36

<210> 233
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q408_R

<400> 233
 tgggtgcatta ataaatacat tttc 24

<210> 234
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q408I_F

<400> 234
 tttattaatg caccaattag cgggacgtat acaatt 36

<210> 235
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q408N_F

<400> 235
 tttattaatg caccaaatag cgggacgtat acaatt 36

<210> 236
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q408W_F

<400> 236
 tttattaatg caccatggag cgggacgtat acaatt 36

<210> 237
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR Q408Y_F

<400> 237

tttattaatg caccatatag cgggacgtat acaatt

36

<210> 238

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S409W_F

<400> 238

attaatgcac cacaatgggg gacgtataca attgag

36

<210> 239

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S409_R

<400> 239

ttgtggtgca ttaataaata catt

24

<210> 240

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR S409Y_F

<400> 240

attaatgcac cacaatatgg gacgtataca attgag

36

<210> 241

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T411_R

<400> 241

cccgctttgt ggtgcattaa taaa

24

<210> 242

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T411A_F

 <400> 242
 gcaccacaaa gcggggcata tacaattgag gtacag 36

 <210> 243
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T411L_F

 <400> 243
 gcaccacaaa gcgggcttta tacaattgag gtacag 36

 <210> 244
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T411P_F

 <400> 244
 gcaccacaaa gcggggcata tacaattgag gtacag 36

 <210> 245
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T411V_F

 <400> 245
 gcaccacaaa gcggggtgta tacaattgag gtacag 36

 <210> 246
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR T427_R

 <400> 246

ctgtggtcca accggtacgt tata

24

<210> 247

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR T427V_F

<400> 247

ccggttggac cacaggtggt ctcgttggca attgtg

36

<210> 248

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR V433_R

<400> 248

aattgccaac gagaaggctt gtgg

24

<210> 249

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit như mỗi PCR V433L_F

<400> 249

ttctcgttgg caattcttaa ttaatagaat aacaga

36

<210> 250

<211> 435

<212> PRT

<213> Bacillus sp. cải biến KSM-KP43

<400> 250

Asn	Asp	Val	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Ala	Gln	Ser	Ser
1				5				10					15		
Tyr	Gly	Leu	Tyr	Gly	Gln	Gly	Gln	Ile	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Gly
		20					25					30			
Leu	Asp	Thr	Gly	Arg	Asn	Asp	Ser	Ser	Met	His	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly
		35					40					45			
Lys	Ile	Thr	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Arg	Thr	Asn	Asn	Ala	Asn	Asp
	50					55					60				
Pro	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Gly

65					70					75				80	
Ser	Thr	Asn	Lys	Gly	Met	Ala	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Phe	Gln	Ser
				85					90					95	
Ile	Met	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Leu	Gln
			100					105					110		
Thr	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Tyr	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Ile	His	Thr	Asn
		115					120					125			
Ser	Trp	Gly	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Gly	Ala	Tyr	Thr	Thr	Asp	Ser	Arg
	130						135				140				
Asn	Val	Asp	Asp	Tyr	Val	Arg	Lys	Asn	Asp	Met	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala
145					150					155					160
Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Pro	Gly	Val	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr
			165					170					175		
Ala	Lys	Asn	Ala	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Thr	Glu	Asn	Leu	Arg	Pro	Ser
		180					185						190		
Phe	Gly	Ser	Gln	Ala	Asp	Asn	Ile	Asn	His	Val	Ala	Gln	Phe	Ser	Ser
		195					200					205			
Arg	Gly	Pro	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Met	Ala	Pro
	210					215					220				
Gly	Thr	Phe	Ile	Leu	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser
225					230					235					240
Phe	Trp	Ala	Asn	His	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Met	Gly	Gly	Thr	Ser
			245					250					255		
Met	Ile	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Ala	Gln	Leu	Arg	Glu	His
		260					265					270			
Phe	Ile	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Thr	Pro	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala
		275					280					285			
Ala	Leu	Ile	Ala	Gly	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Leu	Gly	Tyr	Pro	Asn	Gly
	290					295					300				
Asn	Gln	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Asp	Lys	Ser	Leu	Asn	Val	Ala
305					310					315					320
Tyr	Val	Asn	Glu	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Ala	Thr	Tyr
			325					330					335		
Ser	Phe	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys	Pro	Leu	Lys	Ile	Ser	Leu	Val	Trp
		340						345					350		
Ser	Asp	Ala	Pro	Ala	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Val	Asn	Asp
	355						360					365			
Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Thr	Ala	Pro	Asn	Gly	Thr	Gln	Tyr	Val	Gly	Asn
	370						375				380				
Asp	Phe	Thr	Ala	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asn	Trp	Asp	Gly	Arg	Asn	Asn	Val
385					390					395					400
Glu	Asn	Val	Phe	Ile	Asn	Ala	Pro	Gln	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu
			405					410					415		
Val	Gln	Ala	Tyr	Asn	Val	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Thr	Phe	Ser	Leu	Ala
			420					425					430		
Ile	Val	Asn													
	435														

<210> 251
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR pHY+1(HindIII)F
 <400> 251
 ggggaagctt ctagagatct gcaggtcgac gg 32

<210> 252
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR pHY+3040(HindIII)R
 <400> 252
 ggggaagctt aaggtaaagg ataaaacagc acaattccaa g 41

<210> 253
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR SP64-F(EcoRI)
 <400> 253
 gggggaattc gaacaagtac ttaccatttt agagtc 36

<210> 254
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit như mỗi PCR SP64-R(BamHI)
 <400> 254
 ggggggatcc ttatttaaagt aattgaatca aatagc 36

<210> 255
 <211> 3636
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit vectơ pHA3040SP64
 <400> 255
 aagcttctag agatctgcag gtcgacggat ccttattaaa gtaattgaat caaatagcta 60

aattcataag	cataaccgaa	agtgctttcg	ataatgtttt	aaaaaacttg	tgagtaaccc	120
agattctctc	ctgcttctca	acaacttata	agttatctaa	attatgacta	cttgactcaa	180
tctaccccct	tcctaaatcg	gcatatagca	caaggttaac	cgcttacaaa	tatcataaaa	240
aaaagatgta	tattgctgtc	tacaaattta	ttatagcatg	ttgaaattag	aatactagag	300
tgaattttca	ccccctgtt	aaaaaaagag	ccggaatata	aggttttata	gtaaaccgct	360
ttcgaaacag	tattttcgtt	ctaggtataa	ataattatag	aaaagcggtt	tctataatta	420
aaactaatac	aatttttctta	tgtccgttgt	cttctacttc	tatttcaatc	tttagttctc	480
aaaaaaattc	aaaaaaataa	aatcaggacc	tgtttacctg	attttattcc	gtattcaatt	540
taaaaagaaa	ttccctctaa	atataagccg	gttgcacg	caaatcctgc	ttggcttcta	600
tcttttgact	ctaaaatgg	aagtacttgt	tcgaattcct	gttataaaaa	aaggatcaat	660
tttgaactct	ctcccaaagt	tgatccctta	acgattttaga	aatccctttg	agaatgttta	720
tatacattca	aggtaaccag	ccaactaatg	acaatgattc	ctgaaaaaag	taataacaaa	780
ttactataca	gataagttga	ctgatcaact	tccataggta	acaacctttg	atcaagtaag	840
ggtatggata	ataaaccacc	tacaattgca	atacctgttc	cctctgataa	aaagctggta	900
aagttaagca	aactcattcc	agcaccagct	tcctgctggt	tcaagctact	tgaaacaatt	960
gttgatataa	ctgttttgg	gaacgaaagc	ccacctaaaa	caaatacgat	tataattgtc	1020
atgaaccatg	atgttggttc	taaaagaaag	gaagcagtta	aaaagctaac	agaaagaaat	1080
gtaactccga	tgtttaacac	gtataaagga	cctcttctat	caacaagtat	cccaccaatg	1140
tagccgaaaa	taatgacact	cattgttcca	gggaaaataa	ttacacttcc	gatttcggca	1200
gtacttagct	ggtgaacatc	tttcatcata	taaggaacca	tagagacaaa	ccctgctact	1260
gttccaaata	taattcccc	acaaagaact	ccaatcataa	aaggatatatt	ttccctaata	1320
ccgggatcaa	caaaaggatc	tgttactttc	ctgatatggt	ttacaaatat	caggaatgac	1380
agcacgctaa	cgataagaaa	agaaatgcta	tatgatgttg	taaacaacat	aaaaaataca	1440
atgcctacag	acattagtat	aattcctttg	atatcaaaat	gaccttttat	ccttacttct	1500
ttctttaata	atttcataag	aaacggaaca	gtgataattg	ttatcatagg	aatgagtaga	1560
agataggacc	aatgaatata	atgggctatc	attccaccaa	tcgctggacc	gactccttct	1620
cccatggcta	ctatcgatcc	aataagacca	aatgctttac	ccctattttc	ctttggaata	1680
tagcgcgcaa	ctacaaccat	tacgagtgtc	ggaaatgcag	ctgcaccagc	cccttgaata	1740
aaacgagcca	taataagtaa	ggaaaagaaa	gaatggccaa	caaaccat	taccgaccgc	1800
aaacaattta	ttataattcc	aataggagt	aaccttttga	tgctaattg	atcagatagc	1860
tttccatata	cagctgttcc	aatggaaaag	gttaacataa	aggctgtgtt	caccagttt	1920
gtactcgcag	gtggtttatt	aaaatcattt	gcaatatcag	gtaatgagac	gttcaaaacc	1980
atttcattta	atacgctaaa	aaaagataaa	atgcaaagcc	aaattaaaat	ttggttgtgt	2040
cgtaaattcg	attgtgaata	ggatgtattc	acatttcacc	ctccaataat	gagggcagac	2100
gtagtttata	gggttaatga	tacgcttccc	tcttttaatt	gaaccctgtt	acattcatta	2160
ttcattacac	ttcataatta	attcctccta	aacttgatta	aaacatttta	ccacatataa	2220

```

actaagtttt aaattcagta tttcatcact tatacaacaa tatggcccgt ttgttgaact 2280
actctttaat aaaataaattt ttccgttccc aattccacat tgcaataata gaaaatccat 2340
cttcatcggc tttttcgtca tcatctgtat gaatcaaatc gccttcttct gtgtcatcaa 2400
ggtttaattt tttatgtatt tcttttaaca aaccaccata ggagattaac cttttacggt 2460
gtaaaccctt ctccaaatca gacaaacgtt tcaaattctt ttcttcatca tcggtcataa 2520
aatccgtatc ctttacagga tattttgcag tttcgtcaat tgccgattgt atatccgatt 2580
tataatttatt tttcgggtcga atcatttgaa cttttacatt tggatcatag tctaatttca 2640
ttgccttttt ccaaaattga atccattgtt tttgattcac gtagttttct gtattcttaa 2700
aataagttgg ttccacacat accaatacat gcatgtgctg attataagaa ttatctttat 2760
tatttattgt cacttccgtt gcacgcataa aaccaacaag atttttatta atttttttat 2820
attgcatcat tcggcgaaat ccttgagcca tatctgacaa actcttattt aattcttcgc 2880
catcataaac atttttaact gttaatgtga gaaacaacca acgaactggt ggcttttggt 2940
taataacttc agcaacaacc ttttgtgact gaatgccatg tttcattgct ctctccagt 3000
tgcacattgg acaaagcctg gatttacaaa accacactcg atacaacttt ctttcgcctg 3060
tttcacgatt ttgtttatac tctaataattt cagcacaatc ttttactctt tcagcctttt 3120
taaattcaag aatatgcaga agttcaaagt aatcaacatt agcgattttc ttttctctcc 3180
atgggtctcac ttttccactt tttgtcttgt ccactaaaac ccttgatttt tcacttgaat 3240
aatgctact attaggacac ataattattaa aagaaacccc catctattta gttatttggt 3300
tggtcactta taactttaac agatgggggt tttctgtgca accaatttta agggttttcc 3360
aatactttta aacacataca taccaacact tcaacgcacc tttcagcaac taaaataaaa 3420
atgacgttat ttctatatgt atcaagataa gaaagaacaa gttcaaaacc atcaaaaaaa 3480
gacacctttt caggtgcttt ttttatttta taaactcatt ccctgatctc gacttcgttc 3540
tttttttacc tctcggttat gagttagttc aaattcgttc tttttagggt ctaaacgtg 3600
tttttcttgg aattgtgctg ttttatcctt tacctt 3636

```