



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0028905

(51)¹⁹ C12N 15/77; C12P 19/24; C12P 19/02; (13) B
C12N 1/20; C12N 9/90

(21) 1-2019-01458

(22) 20/03/2017

(86) PCT/KR2017/002964 20/03/2017

(87) WO 2018/043856 08/03/2018

(30) 10-2016-0111810 31/08/2016 KR

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/07/2019 376A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

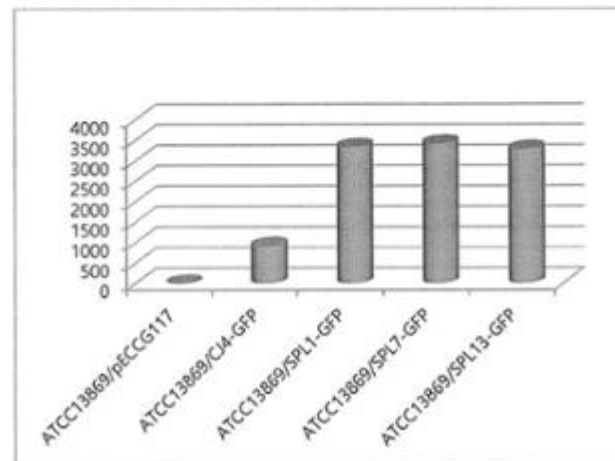
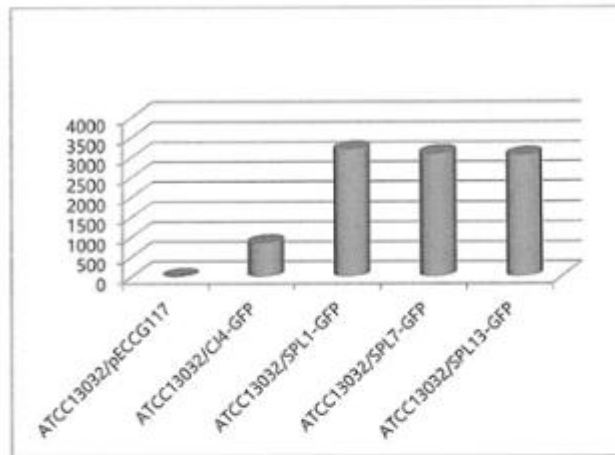
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) LEE, Young Mi (KR); LEE, Seung Bin (KR); KIM, Seong Bo (KR); LEE, Ji Hyun (KR); CHO, Seung Hyun (KR); PARK, Seung Won (KR); CHANG, Jin Sook (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, CATXET BIỂU HIỆN GEN, VECTƠ TÁI TỔ HỢP, VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM ĐÍCH

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic, catxet biểu hiện gen, vectơ biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic, vi sinh vật chứa phân tử axit nucleic hoặc vectơ biểu hiện gen và phương pháp sản xuất sản phẩm đích sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vùng trình tự khởi đầu, cụ thể hơn là đề cập đến phân tử axit nucleic, vectơ biểu hiện chứa phân tử axit nucleic, vi sinh vật chứa phân tử axit nucleic hoặc vectơ, và phương pháp sản xuất sản phẩm đích sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nỗ lực liên tiếp đã được thực hiện đối với việc sản xuất các sản phẩm đích, chẳng hạn như các axit amin hoặc các vật chất hữu dụng có thể được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau bao gồm dùng trong thực phẩm, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi, v.v., ở các vi sinh vật có hiệu giá cao (patent Hàn Quốc số 10-0924065). Một trong các phương pháp như vậy là phương pháp kích thích sự biểu hiện quá mức của gen đích trong vi sinh vật, và hệ thống biểu hiện gen hiệu quả cao là cần thiết cho mục đích này. Vì các vùng trình tự khởi đầu là một trong các nhân tố có liên quan mật thiết trong các hệ biểu hiện gen, nên việc phát triển vùng trình tự khởi đầu hữu dụng là rất cần thiết.

Vùng trình tự khởi đầu *tac* có nguồn gốc từ *E. coil* đã được biết đến rộng rãi là vùng trình tự khởi đầu mạnh. Trong trường hợp vi sinh vật dạng *Coryne*, các vùng trình tự khởi đầu mạnh đã được phát triển bằng cách sửa đổi các vùng trình tự khởi đầu các gen tự thân (*Gene*, 102, 93 - 98, 1991; *Microbiology*, 142, 1297 - 1309, 1996). Ví dụ, trong các trường hợp các vùng trình tự khởi đầu xuất phát từ *Corynebacterium ammoniagenesis*, đã bộc lộ là có sự cải thiện khoảng 10% so với vùng trình tự khởi đầu *tac* được báo cáo trong *E. coil* (*Biotechnol. Lett.* 25, 1311 - 1316, 2003). Bên cạnh đó, đối với các vùng trình tự khởi đầu mạnh xuất phát từ *Corynebacterium ammoniagenesis*, các vùng trình tự khởi đầu từ *Pcj1* đến *Pcj7* với các cường độ khác nhau đã được phát triển và chúng có các hoạt tính khởi đầu mạnh ít nhất là cao hơn gấp 10 lần so với vùng trình tự khởi đầu *tac* (patent Hàn Quốc số 10-0620092). Ngoài ra, vùng trình tự khởi đầu *Po2*, được tổng hợp từ *Corynebacterium glutamicum* để có hoạt tính khởi đầu mạnh, đã được phát triển (patent Hàn Quốc số 10-1632642). Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu phát triển vùng trình tự khởi đầu, vì hệ thống có hiệu quả thể hiện cao trong *Corynebacterium* so với hệ biểu hiện gen của *E. coli* là cần thiết.

Trong tình hình đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nỗ lực để khám phá các vùng trình tự khởi đầu có thể kích thích sự biểu hiện gen một cách mạnh mẽ trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Kết quả là, họ đã phát triển được vùng trình tự khởi đầu tổng hợp mới theo sáng chế và đã xác nhận được rằng vùng trình tự khởi đầu có hoạt tính biểu hiện cao hơn so với các vùng trình tự khởi đầu đã biết, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu; catxet biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic và gen đích; vectơ tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic hoặc catxet biểu hiện gen; vi sinh vật tái tổ hợp chứa vùng trình tự khởi đầu hoặc vectơ; và phương pháp sản xuất sản phẩm đích sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp.

Để đạt được các mục đích của sáng chế, một khía cạnh của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu bao gồm có ít nhất một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 đến 3.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 đồ thị thể hiện các kết quả của thử nghiệm protein phát huỳnh quang xanh (Green Fluorescent Protein – GFP) minh họa cường độ đo được của các vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế, trong đó Fig.1(A) thể hiện các kết quả của thử nghiệm GFP đối với các vùng trình tự khởi đầu dựa trên *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, và Fig.1(B) thể hiện các kết quả của thử nghiệm GFP đối với các vùng trình tự khởi đầu dựa trên *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869;

Fig.2 đồ thị thể hiện các kết quả sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography: HPLC) xác nhận sự sản sinh psicoza, trong đó Fig.2(A) thể hiện kết quả của phản ứng với cơ chất fructoza sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/CJ4-ATPE-2, Fig.2(B) thể hiện kết quả của phản ứng với cơ chất fructoza sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL1-ATPE-2, và Fig.2(C) thể hiện kết quả của phản ứng với cơ chất fructoza sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL7-ATPE-2; và

Fig.3 đồ thị thể hiện các kết quả HPLC xác nhận sự sản sinh tagatoza, trong đó Fig.3(A) thể hiện kết quả của phản ứng với cơ chất fructoza sử dụng *Corynebacterium*

glutamicum ATCC13032/CJ4-TN(m), và Fig.3(B) thể hiện kết quả của phản ứng với cơ chất fructoza sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL13-TN(m).

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vùng trình tự khởi đầu” đề cập đến trình tự axit nucleic không dịch mã nằm ở phần đầu của vùng mã hóa, bao gồm vị trí gắn dính polymeraza và có hoạt tính khởi đầu sự phiên mã của gen nằm ở phần sau của vùng trình tự khởi đầu thành mARN, tức là, miền ADN có gắn polymeraza và bắt đầu phiên mã gen. Vùng trình tự khởi đầu có thể ở vị trí 5’ của miền bắt đầu phiên mã mARN.

Theo sáng chế, các phân tử axit nucleic, có hoạt tính khởi đầu gồm có một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 đến 3 (tức là, trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3), được đặt tên lần lượt là SPL1, SPL7, và SPL13. Các phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu cũng có thể được đặt tên là các vùng trình tự khởi đầu, và tất cả các thuật ngữ được mô tả ở trên có thể được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả sáng chế.

Vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế kích hoạt sự biểu hiện của gen đích, thường được liên kết hoạt động với phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu trong vi sinh vật đích, và có thể được sử dụng như là vùng trình tự khởi đầu dùng chung.

Ngoài ra, trình tự vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể được sửa đổi bằng các phương pháp đột biến gen thông thường đã biết, ví dụ tiến hóa trực tiếp, đột biến gen hướng vị trí đích, v.v.. Theo đó, vùng trình tự khởi đầu có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, trình tự nucleotit bất kỳ có độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, tốt hơn là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, thậm chí còn tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và tốt nhất là 99% hoặc cao hơn, với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3, và có hoạt tính khởi đầu tương tự. Đồng thời, trình tự nucleotit bất kỳ có độ tương đồng nêu trên, trong đó một phần trình tự bị cắt bỏ, sửa đổi, thay thế hoặc chèn thêm, cũng nên được diễn giải là bao gồm trong phạm vi của phân tử axit nucleic theo sáng chế miễn là trình tự đó có hoạt tính khởi đầu.

Cụ thể, việc thể hiện “gồm có SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3” không loại trừ các trường hợp thêm đoạn, và/hoặc mất đoạn và/hoặc thay đổi, v.v., của nucleotit có thể xảy ra trong khi liên kết với gen đích cùng với việc sử dụng enzym

giới hạn, khi vùng trình tự khởi đầu tương ứng được sử dụng bằng cách liên kết với gen đích.

Tốt hơn là, bên cạnh vùng trình tự khởi đầu để thực hiện phiên mã gen, trình tự chỉ huy bất kỳ để điều khiển sự phiên mã, trình tự mã hóa vị trí bám dính ribosom mRNA thích hợp, và trình tự để điều khiển sự phiên mã và dịch mã có thể được bao gồm. Ví dụ, trình tự điều khiển thích hợp cho sinh vật nhân sơ có thể bao gồm trình tự chỉ huy hoặc miền bám dính ribosom bất kỳ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế có thể gồm có trình tự dùng để điều khiển sự biểu hiện gen như được mô tả ở trên, theo nhu cầu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Phân tử axit nucleic, gồm có một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 đến 3, có hoạt tính khởi đầu có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, mỗi dò như có thể được chuẩn bị từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự nucleotit bất kỳ có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế nhờ sự lai tạo với trình tự tương hợp với toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 đến 3 theo sáng chế dưới điều kiện nghiêm ngặt.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “độ tương đồng” chính là phần trăm đồng nhất giữa hai nửa polynucleotit hoặc hai nửa polypeptit. Độ tương đồng trình tự giữa nửa này và nửa khác có thể được xác định bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, độ tương đồng có thể được xác nhận sử dụng phần mềm chuẩn hóa để tính toán các tham số chẳng hạn như điểm số, tính đồng nhất và tính tương tự (tốt hơn là BLAST 2.0) hoặc bằng cách so sánh các trình tự thông qua các thí nghiệm lai tạo miền nam trong điều kiện nghiêm ngặt định trước, và điều kiện lai tạo thích hợp định trước có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng trong phạm vi công nghệ tương ứng (ví dụ J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

“Điều kiện nghiêm ngặt” là điều kiện cho phép sự lai tạo đặc biệt giữa các polynucleotit. Điều kiện này được mô tả chi tiết trong các tài liệu tham khảo (ví dụ J. Sambrook *et al.*, *supra*). Ví dụ, điều kiện lai tạo, khi các gen với độ tương đồng cao, (ví

dự các gen với độ tương đồng lên đến 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, và thậm chí còn tốt hơn nữa là 99% hoặc cao hơn) được lai tạo, và các gen với độ tương đồng thấp hơn các mức nêu trên không được lai tạo; hoặc điều kiện rửa, khi thực hiện rửa một lần, tốt hơn là từ 2 đến 3 lần, trong các điều kiện nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với điều kiện rửa thông thường cho lai tạo (tức là, ở nhiệt độ 60°C và có thể bao gồm 1 thể tích dung dịch đệm chứa đệm nước muối và natri citrat (saline-sodium citrate: SSC), và 0,1% natri dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate: SDS)), tốt hơn là nhiệt độ 60°C, bao gồm 0,1×SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 68°C, bao gồm 0,1×SSC, và 0,1% SDS. Mặc dù sự không tương thích giữa các nucleotit có thể xảy ra do tính nghiêm ngặt của phép lai tạo, hai axit nucleic cần phải có trình tự tương hợp. Thuật ngữ “tương hợp” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các gốc nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với các gốc nucleotit, adenosin tương hợp với thymine và cytosine tương hợp với guanine. Theo đó, sáng chế có thể bao gồm không chỉ các trình tự axit nucleic tương tự đáng kể mà còn chứa các đoạn axit nucleic phân lập tương hợp với trình tự hoàn chỉnh. Tốt hơn là, polynucleotit có độ tương đồng có thể được phát hiện sử dụng điều kiện lai tạo bao gồm điều kiện lai tạo tại giá trị nhiệt độ nóng chảy (melting Temperature: T_m) là 55°C và các điều kiện được mô tả ở trên. Đồng thời, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C, hoặc 65°C, nhưng không giới hạn ở đó và có thể được điều khiển thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng tùy theo mục đích cụ thể. Đã biết rằng tính nghiêm ngặt đối với lai tạo polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit và các biến thể đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50 - 9.51, 11.7 - 11.8).

Phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế có thể được phân lập hoặc điều chế sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, phân tử axit nucleic có thể được điều chế sử dụng kỹ thuật tổng hợp tiêu chuẩn sử dụng bộ công cụ tổng hợp ADN tự động, nhưng phương pháp điều chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất catxet biểu hiện gen bao gồm phân tử axit nucleic và gen đích theo sáng chế.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế tương tự như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “catxet biểu hiện gen” là catxet đơn vị bao

gồm vùng trình tự khởi đầu và gen đích và do đó có thể biểu hiện gen đích được liên kết với phần sau của vùng trình tự khởi đầu. Catxet biểu hiện gen như thế có thể bao gồm các yếu tố khác nhau có thể hỗ trợ sự biểu hiện hiệu quả gen đích, bên trong hoặc bên ngoài catxet. Catxet biểu hiện gen có thể thường bao gồm tín hiệu kết thúc phiên mã, miền bám dính ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã, bên cạnh vùng trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với gen đích.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen đích” đề cập đến gen mã hóa protein sẽ được biểu hiện trong vi sinh vật.

Ví dụ, gen đích có thể là gen liên quan trong quá trình tạo ra sản phẩm được chọn từ nhóm gồm có sacarit (ví dụ psicoza hoặc tagatoza), các axit amin dạng L (L-lysin, L-valin, v.v.), các axit hữu cơ, các enzym, và sự kết hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Tốt hơn là, gen đích có thể là gen mã hóa enzym chuyển hóa đường hoặc enzym gắn liền với quá trình sinh tổng hợp axit amin, gen mã hóa enzym gắn liền với khả năng khử, gen mã hóa enzym gắn liền với quá trình sinh tổng hợp axit hữu cơ, hoặc gen mã hóa enzym gắn liền với sự giải phóng sản phẩm đích, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Tốt hơn nữa là, gen đích có thể là gen mã hóa enzym xúc tác sự epime hóa psicoza (psicoza epimeraza), gen mã hóa enzym epime hóa tagatoza (tagatoza epimeraza), hoặc gen mã hóa enzym epime hóa tagaturonat (tagaturonat epimeraza), gen mã hóa enzym dehydro hóa (dehydrogenaza) glyceraldehyd-3-phosphat phụ thuộc nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) (NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), hoặc gen mã hóa enzym chuyển gốc amin (aminotransferaza) trong axit amin mạch nhánh, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Enzym psicoza epimeraza có thể được gọi tắt là ATPE và là enzym psicoza-3-epimeraza có hoạt tính chuyển hóa fructoza thành psicosza. Bên cạnh đó, enzym tagaturonat epimeraza hoặc enzym tagatoza epimeraza (axit hexuronic C4-epimeraza; patent Hàn Quốc số 10-1550796) có thể được gọi tắt là UxaE, và là enzym có hoạt tính chuyển hóa fructuronat thành tagaturonat hoặc chuyển hóa fructoza thành tagatoza. Enzym dehydro hóa glyceraldehyd-3-phosphat phụ thuộc NADP có thể được gọi tắt là GapN, và là enzym có hoạt tính chuyển hóa glyceraldehyd 3 phosphat dưới dạng cơ chất thành 3-phosphoglyxerat. Enzym chuyển gốc amin trong axit amin mạch nhánh có thể được gọi tắt là IlvE, và là enzym xúc tác bước cuối cùng trong con đường sinh tổng hợp các axit amin mạch nhánh. Các trình tự của các gen mã hóa ATPE, UxaE, GapN, và

IlvE có thể dễ dàng thu được thông qua cơ sở dữ liệu đã biết chẳng hạn như GenBank của Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (NIH - USA) bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Các gen mã hóa ATPE, UxaE, GapN, và IlvE là các gen đích minh họa có thể liên kết hoạt động với phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế, và vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể sử dụng không giới hạn gen bất kỳ có thể được biểu hiện trong vi sinh vật bởi vùng trình tự khởi đầu đa năng, như là gen đích. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết hoạt động” có nghĩa là trình tự của các gen nêu trên và trình tự vùng trình tự khởi đầu được liên kết về mặt chức năng sao cho trình tự axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế có thể khởi động và dàn xếp sự phiên mã của gen đích. Liên kết hoạt động có thể được tạo ra sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, và sự phân cắt và liên kết ADN vị trí đặc hiệu có thể được tạo ra sử dụng các enzym phân cắt và liên kết, v.v., đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là đề xuất vector tái tổ hợp có chứa (i) phân tử axit nucleic theo sáng chế hoặc (ii) catxet biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế và gen đích.

Phân tử axit nucleic và catxet biểu hiện gen giống như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” là phân tử ADN nhân tạo sở hữu vật liệu gen cho phép biểu hiện gen đích trong tế bào chủ thích hợp, và tốt hơn là, cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit của gen được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm, bên cạnh vùng trình tự khởi đầu có khả năng khởi động phiên mã, trình tự chỉ huy bất kỳ để điều hòa sự phiên mã đó, trình tự mã hóa miền bám dính ribosom mRNA thích hợp, và trình tự để điều hòa sự phiên mã và dịch mã, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Vector được sử dụng theo sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể miễn là vector đó có thể biểu hiện trong tế bào chủ, và tế bào chủ có thể được biến nạp sử dụng vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Các ví dụ về vector thông thường được sử dụng có thể bao gồm các plasmid, các cosmit, các virus và các thể thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, *pWE15*, *M13*, *λBL3*, *λBL4*, *λIXII*, *λASHII*, *λAPII*, *λt10*, *λt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, v.v., có thể được sử dụng làm với vector thể thực khuẩn hoặc

vector cosmit; và các plasmid dựa trên *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, v.v., có thể được sử dụng làm vector plasmid. Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể mà vector biểu hiện đã biết bất kỳ cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, vùng trình tự khởi đầu nội sinh trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế nhờ vector đưa nhiễm sắc thể vào trong tế bào chủ. Việc đưa phân tử axit nucleic vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, ví dụ tái tổ hợp tương đồng. Ví dụ, có thể sử dụng các vector *pECCG117*, *pDZ*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC*, *pCES208*, *pXMJ19*, v.v., nhưng vector không bị giới hạn ở đó. Vì vector theo sáng chế có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể thông qua tái tổ hợp tương đồng, có thể bao gồm thêm dấu hiệu lựa chọn để xác nhận việc đưa vào nhiễm sắc thể như thế. Dấu hiệu lựa chọn được sử dụng phục vụ cho việc lựa chọn tế bào biến nạp, tức là, để xác nhận việc chèn phân tử axit nucleic đích, và các dấu hiệu có khả năng cung cấp các kiểu hình có thể lựa chọn chẳng hạn như kháng thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, kháng các tác nhân độc hại, và biểu hiện các protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong các trường hợp khi được xử lý với các tác nhân chọn lọc, chỉ có các tế bào có khả năng biểu hiện các dấu hiệu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các tính trạng kiểu hình khác, và do đó có thể lựa chọn được các tế bào biến nạp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” được sử dụng để chỉ quy trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ, nhờ đó cho phép biểu hiện polynucleotit được mã hóa bởi protein trong tế bào chủ. Với polynucleotit được biến nạp, không quan trọng việc nó có được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm trong hay ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Đồng thời, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ miễn là nó có thể được đưa vào trong tế bào chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng catxet biểu hiện là cấu trúc di truyền bao gồm tất cả các thành phần cần thiết đòi hỏi phải có để tự biểu hiện, hoặc ở dạng vector có chứa catxet biểu hiện. Catxet biểu hiện hoặc vector có chứa polynucleotit có thể là đối tượng chứa, ví dụ, phân tử axit nucleic gồm có trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3 theo sáng chế, có hoạt tính khởi đầu, và có thể là vector, mà gen đích không liên kết hoạt động. Thậm chí trong trường hợp này, phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu có thể được

thay thế bằng vùng trình tự khởi đầu nội sinh trong tế bào chủ (ví dụ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*) và nhờ sự tái tổ hợp tương đồng. Như vậy, gen nội sinh trong tế bào chủ có thể được biểu hiện.

Phương pháp biến nạp có thể bao gồm phương pháp bất kỳ có thể đưa các axit nucleic vào tế bào, và sự biến nạp có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng tùy theo tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm mở lỗ bằng điện, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, và phương pháp liti axetat-DMSO, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có chứa phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế, catxet biểu hiện gen, hoặc vector tái tổ hợp có chứa catxet biểu hiện gen.

Phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu, catxet biểu hiện gen, và vector tái tổ hợp giống như được mô tả ở trên.

Catxet biểu hiện gen và vector tái tổ hợp có thể được đưa vào vi sinh vật bằng cách biến nạp.

Đồng thời, sự biến nạp giống như đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật” là khái niệm bao gồm cả hai loại vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể là vi sinh vật có cơ chế yếu đi hoặc tăng cường cụ thể do sự chèn gen ngoại lai hoặc tăng cường hoặc làm yếu hoạt tính của gen nội sinh. Như được sử dụng ở đây, vi sinh vật có thể bao gồm, mà không giới hạn, vi sinh vật bất kỳ, trong đó phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu theo sáng chế được đưa vào có thể có chức năng là vùng trình tự khởi đầu.

Tốt hơn là, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và tốt hơn nữa là, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, v.v.. Thậm chí tốt hơn nữa là, vi sinh vật có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm đích,

bao gồm (a) nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế trong môi trường dinh dưỡng thích hợp; và (b) thu hồi sản phẩm đích từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sản phẩm đích” có thể được chọn từ nhóm gồm có các sacarit (ví dụ psicoza hoặc tagatoza), các axit amin dạng L (ví dụ L-lysin, L-valin), các axit hữu cơ, các enzym, và kết hợp của chúng. “Sacarit” là carbohydrat có vị ngọt, và có thể được chọn từ nhóm gồm có, ví dụ, glucoza, fructoza, galactoza, alluloza, tagatoza, xyloza, lactoza, sucroza, và kết hợp của chúng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

“Axit amin” hoặc “axit amin dạng L” nói chung để chỉ đơn vị cấu thành cơ bản của protein trong đó nhóm amin và nhóm carboxyl được liên kết với cùng một nguyên tử cacbon. Axit amin có thể được chọn từ nhóm gồm có, ví dụ, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, threonine, serine, cysteine, glutamine, methionine, axit aspartic, asparagine, axit glutamic, lysine, arginine, histidine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, proline, và kết hợp của chúng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các axit hữu cơ có thể là các hợp chất hữu cơ có tính axit, ví dụ, các hợp chất này có chứa nhóm carboxy và nhóm sulfonic. Các ví dụ cụ thể về các axit hữu cơ có thể bao gồm axit lactic, axit axetic, axit succinic, axit butyric, axit palmitic, axit oxalic, axit tartaric, axit citric, axit propionic, axit hexenoic, axit capric, axit caprylic, axit valeric, hoặc axit citric, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. “Enzym” có nghĩa là các chất xúc tác protein điều hòa các phản ứng hóa học trong sinh vật sống, và cụ thể là, các enzym đóng vai trò làm chất xúc tác làm giảm năng lượng hoạt hóa cần có cho phản ứng bằng cách tạo ra phức enzym-chất phản ứng bằng cách bám dính và các chất phản ứng. Ví dụ, một số enzym có thể liên quan đến sự sản sinh các sacarit (ví dụ psicoza hoặc tagatoza), và tốt hơn nữa là, các enzym này có thể là psicoza epimeraza, tagatoza epimeraza, hoặc tagaturonat epimeraza, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các sản phẩm đích có thể bao gồm sản phẩm đích bất kỳ có thể được sản sinh nhờ sự biểu hiện của gen đích, được liên kết hoạt động với vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế, nhưng sản phẩm đích không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” đề cập đến việc nuôi dưỡng vi sinh vật dưới các điều kiện môi trường nhân tạo thích hợp. Theo sáng chế, quy trình nuôi cấy có thể được thực hiện dựa trên môi trường nuôi cấy phù hợp và các điều kiện nuôi cấy đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Tốt hơn là, quy trình nuôi

cấy có thể được thực hiện liên tục trong một mẻ, phân mẻ hoặc quy trình nuôi cấy phân mẻ lặp lại, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Môi trường dinh dưỡng được sử dụng trong quá trình nuôi cấy phải thỏa mãn phù hợp các nhu cầu của các chủng vi sinh vật cụ thể. Môi trường nuôi cấy đối với các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* và chi *Escherichia* đã được bộc lộ (ví dụ, trong tài liệu Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Nguồn cacbon được sử dụng trong môi trường dinh dưỡng có thể bao gồm đường và các carbohydrat chẳng hạn như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; các loại dầu và chất béo chẳng hạn như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu và dầu dừa; các axit béo chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; các alcohol chẳng hạn như glycerol và etanol; và các axit hữu cơ chẳng hạn như axit gluconic, axit axetic, và axit pyruvic, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các vật liệu này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Đối với nguồn nitơ được sử dụng, pepton, cao nấm men, chất chiết xuất từ thịt bò, cao mạch nha, dịch chiết ngô cô đặc, bột bã đậu nành, và urê hoặc các hợp chất vô cơ chẳng hạn như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni carbonat, và amoni nitrat có thể được sử dụng, nhưng nguồn ni-tơ không bị giới hạn ở đó. Nguồn ni-tơ cũng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Đối với nguồn phospho, kali dihydro phosphat hoặc dikali hydro phosphat hoặc các muối chứa natri tương ứng có thể được sử dụng, nhưng nguồn phospho không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm muối kim loại chẳng hạn như magiê sulfat hoặc sắt sulfat cần thiết cho sự sinh trưởng. Hơn nữa, các chất thiết yếu cho sự sinh trưởng chẳng hạn như các axit amin và các vitamin có thể được sử dụng bên cạnh các vật liệu được đề cập ở trên. Đồng thời, các tiền chất thích hợp cũng có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tốt hơn là, khi sản phẩm đích cần tạo ra là enzym, môi trường dinh dưỡng có thể chứa cơ chất của enzym đó. Ví dụ, fructoza có thể sử dụng làm cơ chất cho psicoza epimeraza, tagatoza epimeraza, hoặc tagaturonat epimeraza, có thể được bao gồm trong môi trường dinh dưỡng. Các vật liệu nguồn nêu trên có thể được cấp thích đáng vào môi trường nuôi cấy theo cách phân mẻ hoặc liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy. Các quy trình nuôi cấy khác nhau này đã được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu tham khảo ("*Biochemical Engineering*" by James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138 - 176).

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng hợp chất bazơ thích hợp chẳng hạn như natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac, hoặc hợp chất axit thích hợp chẳng hạn như axit phosphoric hoặc axit sulfuric. Ngoài ra, việc tạo bọt có thể được kiểm soát bằng tác nhân chống tạo bọt chẳng hạn như este polyglycol của axit béo. Để duy trì điều kiện hiếu khí khi nuôi cấy, oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy (ví dụ không khí) có thể được dẫn vào. Nhiệt độ nuôi cấy có thể thường ở phạm vi từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, nhưng nhiệt độ không bị giới hạn ở đó và có thể thay đổi theo các điều kiện nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất sản phẩm đích theo sáng chế có thể bao gồm bước thu hồi sản phẩm đích từ vi sinh vật theo sáng chế hoặc từ môi trường dinh dưỡng mà vi sinh vật được nuôi cấy. Phương pháp sản xuất sản phẩm đích từ vi sinh vật hoặc môi trường dinh dưỡng nơi vi sinh vật được nuôi cấy là phân lập hoặc thu hồi sản phẩm đích sử dụng phản ứng thích hợp đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, các phương pháp có thể bao gồm xử lý bằng chất làm kết tủa protein (phương pháp tách bằng muối), ly tâm, chiết tách, siêu âm, siêu lọc, thẩm tách, các phương pháp sắc ký khác nhau chẳng hạn như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, v.v., và kết hợp của chúng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Bước thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh sạch, và người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể lựa chọn quy trình thích hợp từ các quy trình tinh sạch khác nhau và sử dụng nếu cần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ thực hiện dưới đây, v.v., để giúp người đọc hiểu rõ về sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ này có thể được sửa đổi theo nhiều cách thức khác nhau và cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Các ví dụ theo sáng chế được đưa ra chỉ nhằm mục đích giải thích đủ chi tiết cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Ví dụ 1: Xác nhận sự biểu hiện gen đích được gây ra bởi vùng trình tự khởi đầu

1-1. Chuẩn bị các vector tái tổ hợp chứa các trình tự vùng trình tự khởi đầu

Để tổng hợp vùng trình tự khởi đầu có khả năng kích thích sự biểu hiện của gen đích, các trình tự vùng trình tự khởi đầu khác nhau có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* và vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* được phân tích. Các vùng trình

tự khởi đầu có các trình tự nucleotit được biểu diễn bằng các mã nhận biết SEQ ID NO: 1, 2, và 3 được tổng hợp và đặt tên lần lượt là SPL1, SPL7, và SPL13.

Dựa trên các vùng trình tự khởi đầu SPL1, SPL7, và SPL13 đã chuẩn bị bằng cách tổng hợp làm mạch khuôn, phản ứng chuỗi trùng hợp PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi là SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 bao gồm các vị trí giới hạn *KpnI/EcoRV* [Sambrook *et al*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratories]. Phản ứng PCR được thực hiện dưới các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 30 giây, và kéo dài chuỗi ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 30 giây; và kéo dài chuỗi ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút. Kết quả là, thu được SPL1, SPL7, và SPL13 ở kích thước khoảng 300 bp.

Khung đọc mở (Open Reading Frame: *ORF*) của gen *GFP* thu được bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng vectơ *pGFPuv* (Clontech, USA) làm mạch khuôn cùng với các đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 bao gồm các vị trí giới hạn *PstI/EcoRV*. Phản ứng PCR được thực hiện dưới các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây, và kéo dài chuỗi ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút; và kéo dài chuỗi ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen GFP (SEQ ID số 14) dài khoảng 716 bp.

Ở các vị trí giới hạn *PstI* và *KpnI* của vectơ con thoi *pECCG117* (*Biotechnology letters*, vol 13, No. 10, p.721 - 726 (1991), (patent Hàn Quốc số 10-1992-0007401)), mà có thể được hiểu hiện trong vi sinh vật dạng *E. coli* và *Coryne*, mỗi *SPL1*, *SPL7*, và *SPL13*, được xử lý với các enzym giới hạn *KpnI* và *EcoRV*, và *ORF* của gen *GFP* được xử lý với *PstI* và *EcoRV* được liên kết hoạt động với nhau sử dụng enzym ADN ligaza, và nhờ đó các vectơ tái tổ hợp, trong đó mỗi *SPL1*, *SPL7*, và *SPL13* được liên kết với GFP, được chuẩn bị và chúng được đặt tên lần lượt là *pSPL1-GFP*, *pSPL7-GFP*, và *pSPL13-GFP*.

1-2. Chuẩn bị chủng vi sinh biến nạp

Vectơ *pECCG117*, các vectơ tái tổ hợp (*pSPL1-GFP*, *pSPL7-GFP*, và *pSPL13-GFP*) được chuẩn bị ở trên, và *p117-CJ4-GFP*, bao gồm vùng trình tự khởi đầu *pcj4* đã được bộc lộ từ trước (patent Hàn Quốc số 10-0620092), được biến nạp lần lượt vào

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 bằng phương pháp xung điện (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) 52: 541 - 545), tương ứng, và các chủng biến nạp được thu trong đĩa thạch Luria-Bertani (LB) chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng biến nạp thu được dựa trên ATCC13032 lần lượt được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pECCG117, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL1-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL7-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL13-GFP, và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/CJ4-GFP. Bên cạnh đó, các chủng biến nạp thu được dựa trên ATCC13869 lần lượt được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/pECCG117, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL1-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL7-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL13-GFP, và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/CJ4-GFP.

6 loại chủng biến nạp thu được bằng cách biến nạp nêu trên, tức là, ATCC13032/SPL7-GFP, ATCC13032/SPL13-GFP, ATCC13032/SPL1-GFP, ATCC13869/SPL7-GFP, ATCC13869/SPL13-GFP, và ATCC13869/SPL1-GFP, lần lượt được đặt tên là CA01-2301, CA01-2302, CA01-2303, CA01-2304, CA01-2305, và CA01-2306, tương ứng, và sau đó được gửi lưu trữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest, ngày 17/02/2017, với mã số truy cập lần lượt là KCCM11971P, KCCM11972P, KCCM11973P, KCCM11974P, KCCM11975P và KCCM11976P.

1-3. Xác nhận hoạt tính của các vùng trình tự khởi đầu

Để xác nhận hoạt tính của các vùng trình tự khởi đầu SPL1, SPL7, và SPL13, các chủng biến nạp thu được trong ví dụ 1-2 (tức là, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/pECCG117, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/CJ4-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL1-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL7-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL13-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/pECCG117, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/CJ4-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL1-GFP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL7-GFP, và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869/SPL13-GFP) được nuôi cấy bằng phương pháp được mô tả dưới đây và hoạt tính GFP của chúng được đo lại.

Các chủng biến nạp được cấy vào mỗi bình thót cổ dung tích 25 mL chứa môi trường nuôi cấy (glucoza (20 g), amoni sulfat ((NH₄)₂SO₄) (5 g), cao nấm men (5 g), urê (1,5 g), KH₂PO₄ (4 g), K₂HPO₄ (8 g), MgSO₄·7H₂O (0,5 g), biotin (150 µg), muối thiamin - HCl (1,5 mg), muối canxi-axit pantothenic (3 mg), và nicotinamit (3 mg) (trên cơ sở 1 L nước lọc), độ pH 7,2) và được nuôi trong tủ ẩm lắc ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ. Các tế bào vi khuẩn được thu hồi bằng ly tâm (5.000 vòng/phút, 15 phút), sau đó rửa hai lần với đệm Tris-HCl 50 mM (độ pH 8,0), và huyền phù hóa trong dung dịch đệm đó. Bổ sung bi thủy tinh vào dung dịch huyền phù (1,25 g/1,5 mL), và sử dụng máy phá tế bào vi hạt để phá vỡ các tế bào vi khuẩn trong thời gian 6 phút. Sau đó, tiến hành ly tâm dịch thu được (15.000 vòng/phút, 20 phút), từ đó thu hồi phần nổi lên, và nồng độ của các protein được định lượng bằng phương pháp Bradford. Xác định mức độ biểu hiện gen theo phương pháp được do Laure Gory và đồng sự giới thiệu (*FEMS Microbiology Letters*, 194, 127 - 133, 2001) đối với các lượng dịch chiết tế bào vi khuẩn bằng nhau, trong đó các mẫu tế bào vi khuẩn được chiếu ánh sáng kích thích có bước sóng 488 nm, và sau đó đo ánh sáng phát xạ ở bước sóng 511 nm sử dụng quang phổ kế LS-50B (Perkin-Elmer), và nhờ đó xác định được mức độ biểu hiện của gen GFP (Bảng 1).

Bảng 1

Chủng vi sinh vật	Độ nhạy huỳnh quang
ATCC13032/pECCG117	0,0
ATCC13032/CJ4-GFP	850,2
ATCC13032/SPL1-GFP	3.197,4
ATCC13032/SPL7-GFP	3.097,7
ATCC13032/SPL13-GFP	3.051,1
ATCC13869/pECCG117	0,0
ATCC13869/CJ4-GFP	921,7
ATCC13869/SPL1-GFP	3.342,3
ATCC13869/SPL7-GFP	3.425,5
ATCC13869/SPL13-GFP	3.287,3

Như được thể hiện trong bảng 1 ở trên, tất cả SPL1, SPL7, và SPL13 đều thể hiện các hoạt tính khởi đầu của chúng ở hai loại *Corynebacterium glutamicum* khác nhau và cũng đã thể hiện độ nhạy huỳnh quang cao hơn vùng trình tự khởi đầu *pcj4*, mà đã được biết đến là một vùng trình tự khởi đầu mạnh. Từ các kết quả này, có thể thấy rằng SPL1,

SPL7, và SPL13 là các vùng trình tự khởi đầu rất mạnh có thể biểu hiện các gen đích trong *Corynebacterium glutamicum*.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng sản sinh các sản phẩm đích

2-1. Đánh giá khả năng sản sinh psicoza

(1) Chuẩn bị các vector và chủng biến nạp cho sự biểu hiện ATPE bao gồm các trình tự vùng trình tự khởi đầu SPL1 và SPL7

Các vector đối với các chủng vi sinh *Corynebacterium* với sự biểu hiện tăng của gen ATPE (psicoza epimeraza có nguồn gốc từ *Agrobacterium tumefaciens*) được chuẩn bị sử dụng SPL1 và SPL7. Khung đọc mở (ORF) của gen ATPE được khuếch đại bằng cách thực hiện phản ứng PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 1 phút ở nhiệt độ 72°C) sử dụng vector *pET24-ATPE-2* (SEQ ID số 8) làm mạch khuôn cùng với các đoạn môi tương ứng với các SEQ ID NO: 9 và 10. Gen ATPE đã khuếch đại và các vector *pSPL1-GFP* và *pSPL7-GFP* đối với các chủng *Corynebacterium* đã được chuẩn bị trong ví dụ 1 được xử lý với các enzym giới hạn *EcoRV* và *PstI*, và ATPE-2 thu được bằng phản ứng PCR được liên kết hoạt động trên đó sử dụng bộ kit dung hợp BD In-Fusion, và nhờ đó hoàn toàn chuẩn bị được các vector *pSPL1-ATPE-2* và *pSPL7-ATPE-2* đối với các chủng *Corynebacterium*.

Các vector *pSPL1-ATPE-2* và *pSPL7-ATPE-2* đã chuẩn bị được như trên được đưa vào chủng *ATCC13032* bằng phương pháp mở lỗ bằng điện, và nhờ đó chuẩn bị được các chủng *SPL1-ATPE-2* và *SPL7-ATPE-2*.

(2) Đánh giá khả năng sản sinh psicoza của các chủng được biến nạp

Các chủng đã được chuẩn bị theo quy trình nêu trên được nuôi cấy sử dụng môi trường dinh dưỡng có thành phần giống như ở ví dụ 1 và các hoạt tính ATPE của chúng được xác định. Các chủng *ATCC13032/pECCG117* và *ATCC13032/CJ4-ATPE-2* được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Các chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB rắn đặt trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C và sản phẩm nuôi cấy qua đêm của mỗi chủng được cấy vào 25 mL môi trường dinh dưỡng và nuôi trong tủ ấm lắc ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm và phần nổi lên được loại bỏ. Thể vi khuẩn thu hồi được rửa với dung dịch đệm 3-[4-(2-Hydroxyetyl)piperazin-1-yl]propan-1-sulfonic axit (EPPS) (độ

pH 8,0), và phần tủa thu được được hòa tan trong dung dịch EPPS (độ pH 8,0). Bổ sung polyoxyetylen stearylamin (POESA) (1 mg/mL), thực hiện phản ứng ở nhiệt độ bình thường trong phòng trong thời gian 1 giờ và ly tâm. Sau đó phần tủa thu được nhờ ly tâm được hòa tan trong dung dịch EPPS (pH 8,0), rồi bổ sung dung dịch fructoza (350 g/L) làm cơ chất và thực hiện phản ứng ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 3 giờ, và phản ứng được kết thúc nhờ xử lý nhiệt. Sau đó, phần dịch nổi được thu hồi nhờ ly tâm và lượng sản phẩm psicoza thu được được xác định bằng cách phân tích sắc ký HPLC (Fig.1(A), Fig.1(B), và Fig.1(C)). Lượng psicoza sản xuất sau khi phản ứng được liệt kê trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Chủng vi sinh vật	Fructoza (g/L)	Psicoza (g/L)
ATCC13032/pECCG117	348,7	0
ATCC13032/CJ4-ATPE-2	329,9	18,8
ATCC13032/SPL1-ATPE-2	263,2	79,2
ATCC13032/SPL7-ATPE-2	280,1	67,4

Như được thể hiện trong bảng 2, đã xác nhận được rằng khả năng sản sinh psicoza của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL1-ATPE-2 và ATCC13032/SPL7-ATPE-2 đã được cải thiện đến 321% và 258%, so với *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/CJ4-ATPE-2, tương ứng. Từ kết quả trên, có thể xác nhận rằng khi sử dụng các vùng trình tự khởi đầu SPL1 và SPL7 theo sáng chế, mức độ biểu hiện của gen mã hóa ATPE được tăng lên nhờ đó xác nhận rằng hoạt tính ATPE đã tăng đáng kể.

2-2. Đánh giá khả năng sản sinh tagatoza

(1) Chuẩn bị các vectơ và các chủng biến nạp cho sự biểu hiện UxaE bao gồm trình tự vùng trình tự khởi đầu SPL13

Các vectơ đối với các chủng *Corynebacterium* được chuẩn bị bằng cách tách dòng gen tagatoza epimeraza (UxaE) có nguồn gốc từ *Thermotoga neapolitana* sử dụng CJ4-GFP, trong đó GFP được chèn, và SPL13-GFP được chuẩn bị ở ví dụ 1. Khung đọc mở (ORF) của gen *TN(m)* được khuếch đại bằng cách thực hiện phản ứng PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 1 phút ở nhiệt độ 72°C) sử dụng vectơ *pET28a-TN(m)* (SEQ ID NO: 11) làm mạch khuôn cùng với các đoạn môi tương ứng với các SEQ ID NO: 12 và 13. Gen *TN(m)* đã khuếch đại

và các vector *CJ4-GFP* và *SPL13-GFP* đối với các chủng *Corynebacterium* được xử lý với các enzym hạn chế *EcoRV* và *PstI*, và sau đó được thất lại, và nhờ đó, các vector *pCJ4-TN(m)* và *pSPL13-TN(m)* đối với các chủng *Corynebacterium* được chuẩn bị một cách hoàn chỉnh.

Các vector *pCJ4-TN(m)* và *pSPL13-TN(m)* chuẩn bị được đưa vào chủng ATCC13032 bằng phương pháp mở lỗ bằng điện và nhờ đó các chuẩn bị được các chủng ATCC13032/CJ4-TN(m) và SPL13-TN(m).

(2) Đánh giá khả năng sản sinh tagatoza của các chủng biến nạp

Các chủng vi sinh vật được chuẩn bị bằng quy trình nêu trên được nuôi cấy và xử lý sơ bộ trong môi trường và các điều kiện nuôi cấy giống như được mô tả ở ví dụ 1 và đã thu được các chủng vi sinh để hoạt hóa UxaE. Việc đánh giá hoạt tính được thực hiện bằng cách chỉ thay đổi lượng cơ chất, nhiệt độ phản ứng và thời gian phản ứng theo cách giống như được mô tả trong ví dụ 2-1 (bằng cách phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 2 giờ sau khi bổ sung dung dịch fructoza (100 g/L)). Sau đó, phân nổi lên được thu hồi bằng ly tâm và lượng tagatoza sản sinh được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký HPLC (Fig.2(A) và Fig.2(B)). Lượng tagatoza sản sinh sau khi phản ứng được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Chủng vi sinh vật	Fructoza (g/L)	Tagatoza (g/L)
ATCC13032/pECCG117	100	0
ATCC13032/CJ4-TN(m)	92,2	6,9
ATCC13032/SPL13-TN(m)	82,7	16,8

Như được thể hiện trong bảng 3, khả năng sản sinh tagatoza của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/SPL13-TN(m) được cải thiện đến 143% so với *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032/CJ4-TN(m). Từ kết quả trên, có thể xác nhận rằng khi sử dụng vùng trình tự khởi đầu SPL13 theo sáng chế, mức độ biểu hiện của gen mã hóa UxaE đã tăng lên do đó xác nhận rằng hoạt tính UxaE tăng lên đáng kể.

2-3. Đánh giá khả năng sản sinh valin

(1) Chuẩn bị vector *pECCG117-SPL7-ilvE* và các chủng biến nạp bao gồm trình tự vùng trình tự khởi đầu SPL7

Để xác nhận khả năng sản sinh L-valin như là một ví dụ về axit amin dạng L, các vector *pECCG117-CJ7-ilvE* và *pECCG117-SPL7-ilvE* được chuẩn bị như sau, để tăng cường hoạt tính enzym của *ilvE* (NCgl2123), gen mã hóa enzym chuyển nhóm amin trong axit amin mạch phân nhánh, là gen đóng vai trò chính trong sinh tổng hợp valin. Tốt hơn là, như là kết quả của quá trình PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 1 phút ở nhiệt độ 72°C) sử dụng nhiễm sắc thể ATCC14067 làm mạch khuôn cùng với các đoạn môi tương ứng với các SEQ ID NO: 14 và 15, đoạn sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1104 bp, có vị trí giới hạn *EcoRV* tại đầu 5' và vị trí giới hạn *PstI* tại đầu 3' của gen *NCgl2123*, được khuếch đại. Đoạn sản phẩm PCR thu được được tinh sạch và phối trộn với *pECCG117-CJ7-GFP* (patent Hàn Quốc số 10-0620092) và *pECCG117-SPL7-GFP* đã được xử lý với các enzym giới hạn *EcoRV* và *PstI*, tương ứng, và các vector được chuẩn bị sử dụng bộ kit tách dòng In-fusion. Các vector chuẩn bị được nêu trên do đó lần lượt được đặt tên là *pECCG117-CJ7-ilvE* và *pECCG117-SPL7-ilvE*.

SEQ ID NO: 14: 5' GAGATCAAAACAGATATCATGACGTCATTAGAGTTTC 3'

SEQ ID NO: 15: 5' ATCCCCCGGGCTGCAGTTAGCCAACCAGTGGGTA 3'

Các vector tái tổ hợp chuẩn bị được bao gồm *pECCG117-CJ7-ilvE* và *pECCG117-SPL7-ilvE*, và vector *pECCG117* được biến nạp vào chủng vi sinh vật sản sinh valin, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P (patent Hàn Quốc số 10-1117022), bằng phương pháp xung điện, và các chủng biến nạp được thu trong đĩa thạch LB chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng thu được như thế do đó lần lượt được đặt tên là KCCM11201P/pECCG117, KCCM11201P/CJ7-ilvE, và KCCM11201P/SPL7-ilvE, tương ứng.

(2) Đánh giá khả năng sản sinh valin của các chủng biến nạp

Khả năng sản sinh L-valin của ba chủng biến nạp khác nhau được phân tích bằng cách nuôi cấy như được mô tả dưới đây.

Mỗi chủng vi sinh vật được cấy với lượng tương ứng với que cấy vòng platin vào bình thót cổ có gờ ở góc đáy dung tích 250 mL chứa sẵn 25 mL môi trường dinh dưỡng sản sinh valin và được nuôi trong tủ ẩm lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ. Khi hoàn tất quá trình nuôi, nồng độ của L-valin trong mỗi dịch nuôi cấy được phân tích bằng sắc ký HPLC (SHIMADZU LC-20AD).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,2)

Glucoza (50 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 g), cao chiết ngô cô đặc (20 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), Biotin (200 μg) (trên cơ sở 1 L nước cất)

Việc nuôi cấy và phân tích nêu trên được thực hiện lặp lại, và các nồng độ *L*-valin phân tích được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

	Chủng vi sinh	<i>L</i> -valin (g/L)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Đối chứng	KCCM11201P/pECCG117	2,7	2,9	2,9	2,8
1	KCCM11201P/CJ7- <i>ilvE</i>	3,1	3,2	3,4	3,2
2	KCCM11201P/SPL7- <i>ilvE</i>	3,9	4,0	3,8	3,9

Như được thể hiện trong bảng 4, đã xác nhận được rằng khả năng sản sinh valin của chủng KCCM11201P/SPL7-*ilvE*, khi được biến nạp vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế, được cải thiện đến 21,8% so với *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P/CJ7-*ilvE* có vùng trình tự khởi đầu đã biết được đưa vào, và bên cạnh đó, đã có sự cải thiện đến 39,2% so với nhóm đối chứng KCCM11201P/pECCG117. Từ các kết quả nêu trên, có thể xác nhận rằng vùng trình tự khởi đầu *SPL7* đã làm tăng sự biểu hiện của gen *ilvE* nhờ đó làm tăng đáng kể hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen tương ứng.

2-4. Đánh giá khả năng sản sinh lysin

(1) chuẩn bị vector *pDZTn-SPL13-gapN1* và các chủng biến nạp bao gồm trình tự vùng trình tự khởi đầu SPL13

Để xác nhận khác năng sản sinh L-lysin như là một ví dụ điển hình về axit amin dạng L, các vector được chuẩn bị như sau để tăng cường hoạt tính enzym của glyceraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza phụ thuộc NADP (GapN), có nguồn gốc từ *Streptococcus mutants* đã biết.

Để chèn vào gen *NCgl2392* có khả năng di động trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, phản ứng PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 1 phút ở nhiệt độ 72°C) được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 hoang dại làm mạch khuôn, cùng với các đoạn mồi tương ứng với các mã nhận biết SEQ ID NO: 16, SEQ

ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, và SEQ ID NO: 19 dưới đây, dựa trên cơ sở dữ liệu NIH Genbank của NIH (Hoa Kỳ), và kết quả là, các đoạn có đầu 5' và đầu 3' của gen *NCgl2392* được khuếch đại. Kết quả của việc thực hiện phản ứng PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 2 phút ở nhiệt độ 72°C) sử dụng vector *pECCG122-Pcj7-gapN1* (patent Hàn Quốc số 10-1182033) cùng với các đoạn môi tương ứng với SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21 dưới đây, *Pcj7-gapN1* được khuếch đại. Kết quả của việc thực hiện phản ứng PCR (30 chu kỳ phản ứng trong thời gian 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, và 1 phút ở nhiệt độ 72°C) sử dụng vector *pECCG122-Pcj7-gapN1* và vector *SPL13-GFP* được chuẩn bị ở ví dụ 1, cùng với các đoạn môi tương ứng với SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 21 dưới đây, các gen *SPL13* và *gapN* được khuếch đại, tương ứng, và các gen này được tách dòng thành vector *pDZ* (patent Hàn Quốc số 0924065), không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, cùng với đoạn gen *NCgl2392* được chuẩn bị ở trên, và nhờ đó các vector *pDZTn-Pcj7-gapN1* và *pDZTn-SPL13-gapN1* được chuẩn bị.

SEQ ID NO: 16: 5' ATCCTCTAGAGTCGACCAAATGCTCCAACCGTCCGT 3'

SEQ ID NO: 17: 5' CTCGAGGAACTCATTCTTCTGCTCG 3'

SEQ ID NO: 18: 5' TCTAGAACTAGTGGGCCCCGACATCTAATAACCGGGCAG 3'

SEQ ID NO: 19: 5' ATGCCTGCAGGTCGACGCAGACGCACTCGACTACAC 3'

SEQ ID NO: 20: 5' GAATGAGTTCCTCGAGAGAAACATCCCAGCGCTACT 3'

SEQ ID NO: 21: 5' GCCCACTAGTTCTAGATTATTTGATATCAAATACGA 3'

SEQ ID NO: 22: 5' GAATGAGTTCCTCGAGGGCGCTTCATGTCAACAATC 3'

SEQ ID NO: 23: 5' ATTGTTTTGTCATATGTGTTTTGATCTCCTCCAATA 3'

SEQ ID NO: 24: 5' CATATGACAAAACAATATAAAAA 3'

Mỗi trong số các vector nêu trên (*pDZTn-Pcj7-gapN1* và *pDZTn-SPL13-gapN1*) được biến nạp sử dụng chủng KCCM11016P có khả năng sản sinh lysin tăng (vi sinh vật đã được bộc lộ dưới dạng KFCC10881, được nộp lưu lại vào cơ quan lưu chủng quốc tế theo hiệp ước Budapest, và được ấn định mã số truy cập là KCCM11016P; patent Hàn Quốc số 10-0159812) làm chủng bố mẹ, bằng phương pháp xung điện (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) 52: 541 - 545), và các chủng biến nạp được thu trong môi

trường dinh dưỡng chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L). Để lựa chọn các dòng trong đó gen *gapN1* được chèn vào hệ gen bằng quy trình tái tổ hợp thứ cấp (trao đổi chéo), các dòng có các gen *Pcj7-gapN1* và *SPL13-gapN1* được chèn vào, tương ứng, được thu nhận sử dụng các cặp mồi tương ứng với SEQ ID NO: 20 và NO: 21 và tương ứng với SEQ ID NO: 21 và NO: 22. Các dòng thu được như thế được đặt tên lần lượt là KCCM11016P/CJ7-gapN1 và KCCM11016P/SPL13-gapN1, tương ứng.

(2) Đánh giá khả năng sản sinh lysin của các chủng biến nạp

Khả năng sản sinh L-lysine của ba loại chủng biến nạp khác nhau được phân tích bằng cách nuôi cấy như được mô tả dưới đây.

Mỗi chủng biến nạp được cấy vào bình thót cổ có gờ ở góc đáy dung tích 250 mL chứa sẵn 25 mL môi trường nhân giống và được nuôi trong tủ ấm lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ. Sau đó, 1 mL môi trường nhân giống được cấy vào trong bình thót cổ có gờ ở góc đáy dung tích 250 mL chứa sẵn 25 mL môi trường sản xuất và được nuôi trong tủ ấm lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ. Nồng độ của L-valin trong mỗi dịch nuôi cấy được phân tích bằng sắc ký HPLC (SHIMADZU LC-20AD).

Môi trường nhân giống (độ pH 7,0)

Glucose (20 g), pepton (10 g), cao nấm men (5 g), urê (1,5 g), KH_2PO_4 (4 g), K_2HPO_4 (8 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotin (100 µg), thiamin HCl (1000 µg), canxi-axit pantothenic (2000 µg), nicotinamit (2000 µg) (trên cơ sở 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

Glucose (100 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 g), protein đậu nành (2,5 g), cao chiết ngô cô đặc (5 g), urê (3 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotin (100 µg), muối thiamin HCl (1000 µg), canxi-axit pantothenic (2000 µg), nicotinamit (3000 µg), và CaCO_3 (30 g) (trên cơ sở 1 L nước cất),

Việc nuôi cấy và phân tích nêu trên được thực hiện lặp lại, và các nồng độ L-lysine phân tích được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

	Chủng vi sinh	L-lysine (g/L)			
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Trung bình

Đối chứng	KCCM11016P	42,3	43,1	41,2	42,2
1	KCCM11016P/CJ7-gapN1	47,6	49,1	49,2	48,3
2	KCCM11016P/SPL13-gapN1	51,0	51,5	52,9	51,8

Như được thể hiện trong bảng 5, đã xác nhận được rằng khả năng sản sinh lysin của chủng KCCM11016P/SPL13-gapN1, khi được biến nạp vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế, được cải thiện 7,2% so với *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P/CJ7-gapN1 có vùng trình tự khởi đầu đã biết được đưa vào, và bên cạnh đó, đã có sự cải thiện đến 22,7% so với nhóm đối chứng, KCCM11016P. Từ các kết quả nêu trên, có thể xác nhận rằng vùng trình tự khởi đầu SPL13 đã làm tăng sự biểu hiện của gen *gapN1* nhờ đó làm tăng đáng kể hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen tương ứng.

Tóm lại, từ các kết quả nêu trên, các vùng trình tự khởi đầu SPL1, SPL7, và SPL13 theo sáng chế có thể làm tăng đáng kể sự biểu hiện của gen đích trong vi sinh vật tái tổ hợp, so với các vùng trình tự khởi đầu thông thường đã biết. Theo đó, các vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể không chỉ cung cấp hệ thống biểu hiện hiệu quả mà còn được sử dụng một cách hiệu quả trong các lĩnh vực công nghiệp khác nhau để sản xuất các sản phẩm đích với sản lượng cao, chẳng hạn như các sacarit, các vật chất chức năng, và các axit amin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể có các hoạt tính khác nhau tùy theo các vi sinh vật được kích thích biểu hiện gen đích. Theo đó, khi cần điều chỉnh hoạt tính của gen đích theo nhu cầu trong quá trình sản xuất sản phẩm đích, sản phẩm đích có thể được sản xuất một cách hiệu quả sử dụng vùng trình tự khởi đầu theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic có hoạt tính khởi đầu bao gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 đến 3.
2. Catxet biểu hiện gen bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 1 và một gen đích.
3. Vector tái tổ hợp chứa (i) phân tử axit nucleic theo điểm 1 hoặc (ii) catxet biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic theo điểm 1 và một gen đích.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 1 hoặc vector theo điểm 3.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Corynebacterium ammoniagenesis*.
6. Phương pháp sản xuất sản phẩm đích bao gồm:
 - (a) nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 4 trong môi trường; và
 - (b) thu hồi sản phẩm đích từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sản phẩm đích là psicoza, tagatoza hoặc axit amin.

Fig.1

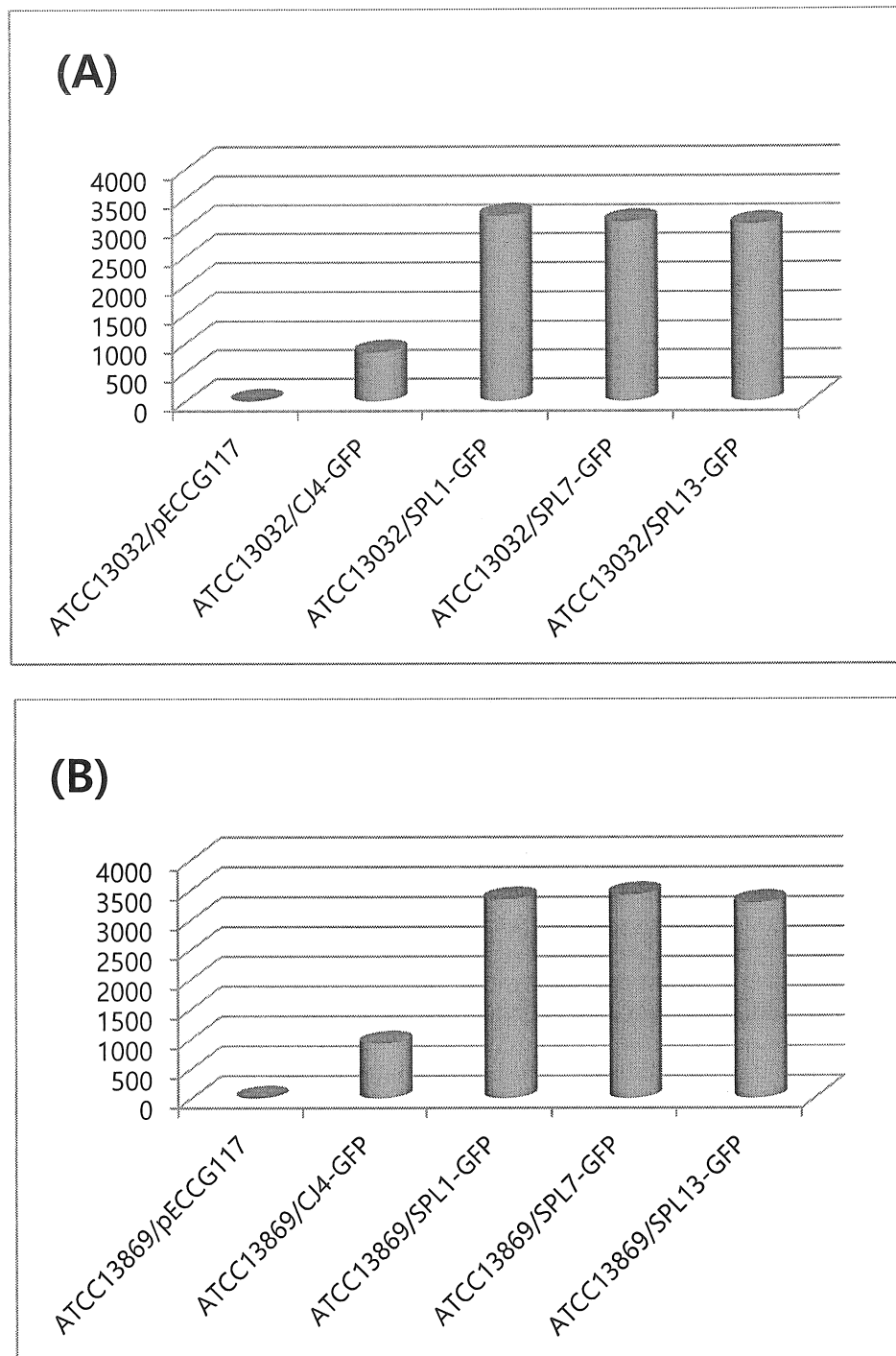


Fig.2

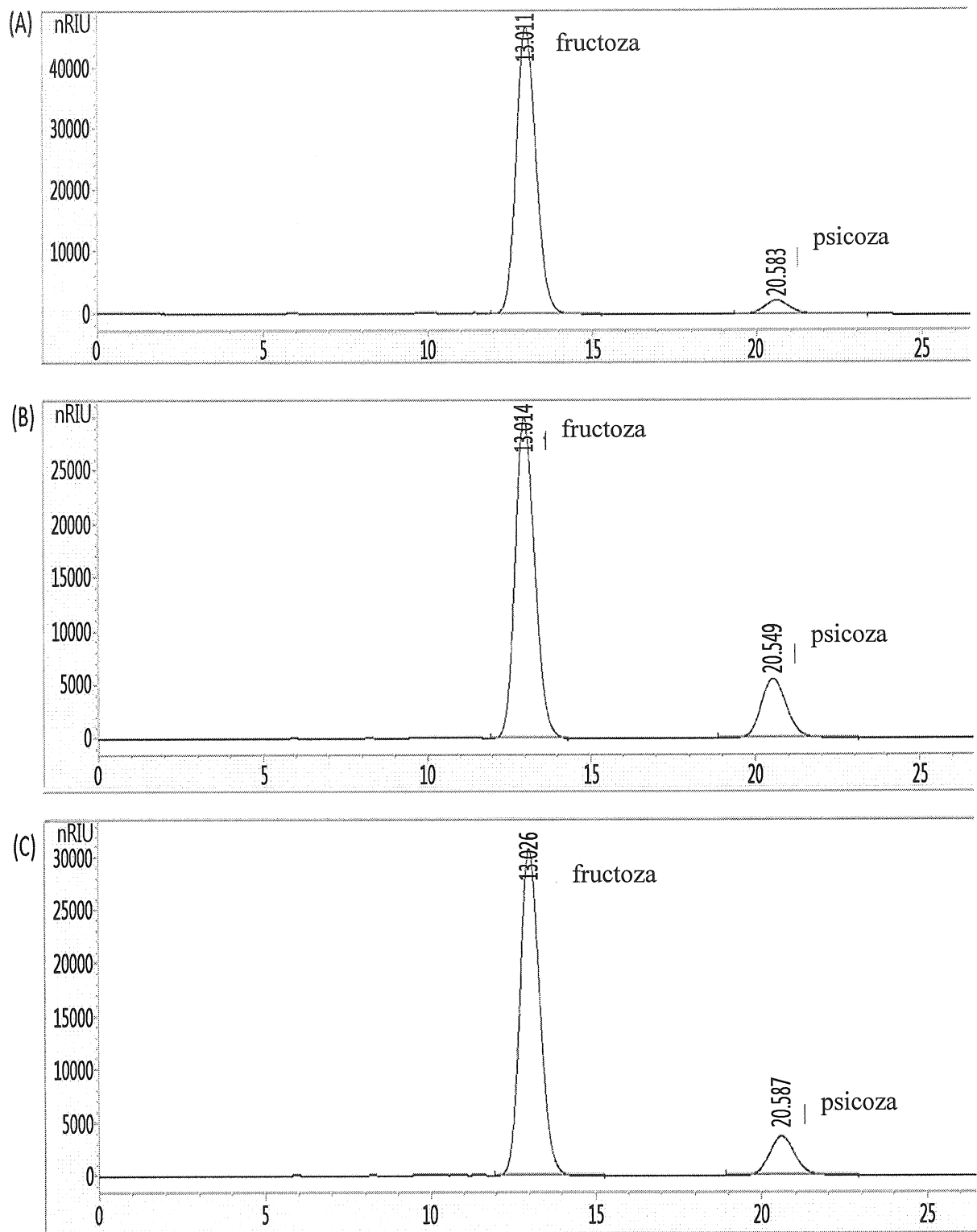
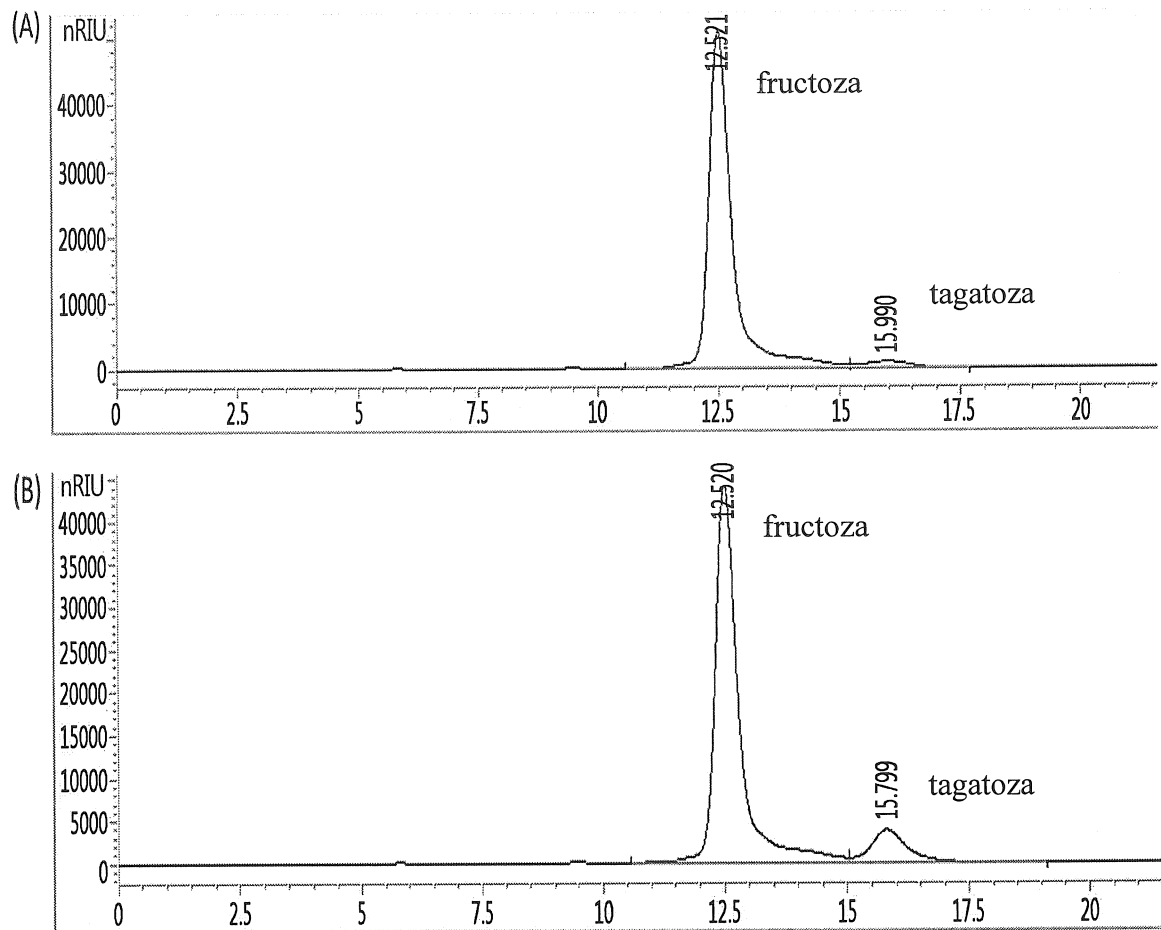


Fig.3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Phân tử axit nucleic, catxet biểu hiện gen, vectơ tái tổ hợp, vi sinh vật tái tổ hợp và phương pháp sản xuất sản phẩm đích

<130> OPA17051

<150> KR 10-2016-0111810

<151> 2016-08-31

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 294

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SPL1

<400> 1

ggcgcttcatgtcaacaatctttaacgttttcaagttcacaagtcgtgttcaaattggtga	60
caagattggacactgtgctgaattggcaccaagccctcataaatgatagatctaaatcga	120
atatcaatatatggtctgtttatttggaacgcgtcccagtggtgagacgcatccgctaaa	180
gccccaggaaccctgtgcagaaagaacaaataatcgtgaattttggcagcaacagtgagt	240
cctgatacaattgaaaacgtgcaaaagcataaattattggaggagatcaaaaca	294

<210> 2

<211> 294

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SPL7

<400> 2

ggcgcttcatgtcaacaatctttaacgttttcaagttcacaagtcgtgttcaaattggtga	60
caagattggacactgtgctgaattggcaccaagccctcataaatgatagatctaaatcga	120
atatcaatatatggtctgtttatttggaacgcgtcccagtggtgagacgcatccgctaaa	180
gccccaggaaccctgtgcagaaagaacaaataatcgtgaattttggcagcaacagcaatt	240
cctgctacaattgaaaacgtgcaaaagcatagattattggaggagatcaaaaca	294

<210> 3

<211> 294

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SPL13

<400> 3
 ggcgcttcatgtcaacaatctttaacgttttcaagttcacaagtcgtgttcaaattggtga 60
 caagattggacactgtgctgaattggcaccaagccctcataaatgatagatctaaatcga 120
 atatcaatatatggtctgtttatttgaacgcgtcccagtggtgagacgcatccgctaaa 180
 gccccaggaaccctgtgcagaaagaacaaataatcgtgaattttggcagcaacagcgggg 240
 cctggtataattgaaaacgtgcaaaagcatagattattggaggagatcaaaaca 294

<210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi SPL-1

<400> 4
 ggtaccggcgcttcatgtcaacaatc 26

<210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi SPL-2

<400> 5
 gatattctgttttgatctcctccaat 25

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi GFP-1

<400> 6
 gatattcatgagtaaaggagaaga 23

<210> 7

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

<220>
 <223> đoạn mồi GFP-2

<400> 7
 ctgcagttattttagagct cat

23

<210> 8
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pET24-ATPE-2

<400> 8
 atgaaacacggcatctattattcttactgggaacatgagtgagcgccaagttcgggtccc 60
 tatatcgagaaggtcgccaagctcggtttcgacatcctcgaagtcgcccaccatatac 120
 aacgaatacagcgacgcgaactcgcgaccatcaggaagagcggaaggataacggcatc 180
 atcctcaccgcccggcatcggtcgcgtcgaaaaccaagaacctgtcgtcggaagatgctgcg 240
 gtgcgtgcggccggcaaggcggttctttgaaagaacctttcgaaacgtcgccaagctcgat 300
 atccacaccatcgggcgcgcatcattgcattcctattggccaatcgattattcgagcccgtc 360
 gacaaggcaggcgattatgcgcgcggcgctcgaggggtatcaacggcattgccgatttcgcc 420
 aatgatctcggcataaacctgtgcatcgaagtcctcaaccgctttgaaaaccacgtcctc 480
 aacacggcgggcggaaggcgctcgcttttgtgaaggatgtcggcaagaacaatgtgaaagtc 540
 atgctggataccttccacatgaacatcgaggaagacagtttcgggtgacgccatccgcacg 600
 gccggcccgccttctggggcacttccataaccggtgaatgcaatcgccgcgtaccgggcaag 660
 ggcagaatgccgtggcacgaaatcggccttgcgctgcgtgatatacaactacaccggcgcg 720
 gtaatcatggagcctttcgtcaagacaggcgccaccatcggtcggtatcaaggtgtgg 780
 cgcgacctgagcgggtggcgccgacatcgcgaaaatggatgaagatgcccgcaatgcgctg 840
 gcattctcccgccttcgttcttggtggctga 870

<210> 9
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi ATPE-1

<400> 9
atctaggagattaagatatcatgaaacacggcatctattatt 42

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ATPE-2

<400> 10
gtggatccccgggctgcagtcagccaccaagaacg 36

<210> 11
<211> 1473
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> pET28a-TN (m)

<400> 11
Atgggtcttgaaagtgttcaaagatcacttttgaaggggatacgaagtttacgaaaagtct 60
tatagagaaaaggattctctctctttcttcttgacaaaaggagaggaaggaaaaattctg 120
gtagtggctggagaaaaggcacctgagggctgtgcgtttttcaaaaaacagcgggtggag 180
gggtgttctgttctttttctgtgagagaaatcatgagaacttgaagttctcagaaaatac 240
tttccagatctcaaaccagttcgagcaggattgagagcgtcttttgaacagggtgacaga 300
ctcgggtatcaccacaccggctcacgtgagggcgttgaaggattcagggtttttcccatc 360
tttgcgagcaggacgtgagggagaacgaaagaacgggaaggacctggagagatgtgctg 420
gacgatgccacatggggagttttccaggagggatacagtgagggattcggagcagacgcc 480
gatcacgcgaagcggccggaggatcttggttcggctgcaagggaaggtttcacatgttc 540
acaatcgatccttcgaatcatgtgaggaatctttcaaaactcagtgaagagaaaaaac 600
gagatgttcgaggaaatactgaaaaagagcgaatcgacaggatctatcttgggaaaaaa 660
tacaccgtcctcggtgaaagactggagttcgacgagaaaaatttgagggatgctgctctg 720
gtgtactatgatgcatcgccacgtggatatgatgtatcaaattttgaaagacgaaacc 780
ccggatatcgacttcgaagtgtcagttgacgaaacagaaactcccacgagtcctctcttc 840
cacattttcgttggtggaagaactcagacgaagaggtgtggagttcaccaatcttgccctg 900
agattcatcggcgaatgggaaaagggaataggttacaagggggatcttgacagttcgag 960
agagaaatcaaatgcacgcagaaatcgcaaggatgttcgaaggatacaaaatatcactc 1020

cactctggaagcgacaaatccccgtgtatcctgcttttgcttccgcgacaggaggcctt 1080
 ttccacgtgaagacagccggaacgagttatcttgaggcgggtgaagggtcatatccatggtc 1140
 aaccgggagctcttccgggagatctacaggtgtgctctcgatcactttgaggaagacaga 1200
 aagtcctatcacatatctgcggatctgtcgaaagttccggaagtagagaaagtgaagat 1260
 gaagatcttccagggtctttttgaagacatcaacgtgagacagttgatccatgtcacctat 1320
 ggctctgttctgaaagatgcatctttgaaagaacggctgtttaagacgcttgaacaaaat 1380
 gaggaactcttctacgagaccgtggcaaacatataaaaaggcacgtagacctgttgaag 1440
 gggtgactcgagcaccaccaccaccactga 1473

<210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi TN(m) -1

<400> 12
 gatatcatgggtcttgaaagtgttcaaag 28

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi TN(m) -2

<400> 13
 ctgcagtcaccccttcaacaggtctacgtg 30

<210> 14
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GFP

<400> 14
 atgagtaaaggagaagaacttttctactggagttgtcccaattcttgttgaattagatgggt 60
 gatgttaatgggcacaaatcttctgtcagtgaggaggggtgaagggtgatgcaacatacggg 120
 aaacttacccttaaattttatctgcactactggaaaactacctgttccatggccaacactt 180

gtcactactttctcttatggtgttcaatgcttttcccgttatccggatcatatgaaacgg	240
catgactttttcaagagtgccatgcccgaagggttatgtacaggaacgcactatatctttc	300
aaagatgacgggaactacaagacgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttggt	360
aatcgtatcgagttaaaaggtattgatttttaagaagatggaaacattctcggacacaaa	420
ctcgagtacaactataactcacacaatgtatacatcacggcagacaaaacaaagaatgga	480
atcaaagctaacttcaaaattcgccacaacattgaagatggatccggttcaactagcagac	540
cattatcaacaaaataactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattac	600
ctgtcgacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggtcctt	660
cttgagtttgtaactgctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaataa	717