



(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)



1-0029508

(51)⁷ C12N 15/09; C12Q 1/34; C12N 9/42

(13) B

(21) 1-2017-00987

(22) 20/03/2017

(30) 2016-064519 28/03/2016 JP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/10/2017 355A

(73) HONDA MOTOR CO., LTD. (JP)

1-1, Minami-Aoyama 2-chome, Minato-ku, Tokyo 107-8556 Japan

(72) Jiro OKUMA (JP); Yoshitsugu HIROSE (JP); Migiwa SUDA (JP); Asuka YAMAGUCHI (JP); Yasuhiro KONDO (JP); Masaru SATO (JP); Daisuke SHIBATA (JP).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) XENLOBIOHYĐROLAZA CHỊU NHIỆT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA ENZYM NÀY, VECTƠ BIỂU HIỆN ENZYM NÀY, THỂ BIẾN NẠP CHỨA VECTƠ NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ENZYM NÀY, HỖN HỢP GLYCOSIT HYĐROLAZA CHỨA ENZYM NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM PHÂN GIẢI XENLULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến xenlobiohyđrolaza chịu nhiệt, polynucleotit mã hóa enzym này, vectơ biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vectơ này, phương pháp sản xuất enzym này, hỗn hợp glycosit hyđrolaza chứa enzym này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng enzym này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, polynucleotit mã hóa enzym này, vectơ biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vectơ này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng enzym này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, việc phát triển các nguồn năng lượng thay thế dầu mỏ ngày càng trở nên quan trọng, do các vấn đề về môi trường, như trái đất nóng lên và ô nhiễm bầu khí quyển, cũng như quan ngại liên quan đến việc cung cấp năng lượng cho các phương tiện vận tải, bao gồm gia tăng đáng kể giá dầu thô và cạn kiệt nguồn dầu thô trong tương lai gần (sản xuất dầu mức cao nhất). Sinh khối thực vật hoặc lignoxenluloza là nguồn năng lượng tái tạo phong phú nhất trên trái đất, được mong đợi là nguồn năng lượng thay thế cho dầu mỏ. Lignoxenluloza là thành phần chính của sinh khối thực vật khô và bao gồm các polysacarit, như xenluloza, hemixenluloza, và lignin. Các polysacarit này có thể được thủy phân thành các monosacarit, như glucoza và xyloza bởi glycosit hydrolaza, như xenlulaza hoặc hemixenlulaza và sử dụng làm nhiên liệu sinh học hoặc nguyên liệu hóa học.

Lignoxenluloza là hợp chất có cấu trúc rất phức tạp, nên rất khó có thể phân giải hoặc thủy phân được bằng một enzym duy nhất. Do đó, để phân giải hoàn toàn lignoxenluloza thường cần ba loại enzym, bao gồm endoglucanaza (xenlulaza hoặc endo-1,4- β -D-glucanaza, EC 3.2.1.4), exo-xenlobiohydrolaza (1,4- β -xenlobiosidaza hoặc xenlobiohydrolaza, EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.176), và β -glucosidaza (EC 3.2.1.21), và cũng cần bổ sung nhiều enzym khác bao gồm hemixenlulaza xylanaza (endo-1,4- β -xylanaza, EC 3.2.1.8) và các enzym khác phân giải thành tế bào thực vật, như β -xylosidaza (EC 3.2.1.37).

Trong quy trình thông thường để sản xuất etanol sinh học bằng nguồn nguyên liệu ban đầu là lignoxenluloza, cơ chất ban đầu có nồng độ chất rắn cao nằm trong khoảng từ 30% đến 60% đã được sử dụng để đạt được hiệu suất năng lượng biến đổi thành etanol cao hơn. Tuy nhiên, khi nồng độ chất rắn trong cơ chất cao, thì phản ứng enzym thủy phân lignoxenluloza hầu như không thể xảy ra do độ nhớt cao của dung dịch sinh khối đã thủy phân. Do đó, bằng cách sử dụng enzym chịu nhiệt và thực hiện phản ứng thủy phân bằng enzym ở nhiệt độ cao, ví dụ 65°C hoặc cao hơn, thì ngoài việc tăng tốc độ phản ứng thủy phân, độ nhớt của dung dịch sinh khối đã thủy phân cũng được giảm xuống, nhờ vậy có thể rút ngắn được thời gian thủy phân và giảm lượng enzym cần sử dụng. Mặt khác, khi thực hiện phản ứng ở nhiệt độ cao, thì có thể ngăn ngừa được sự tăng sinh của các vi khuẩn không mong muốn trong phản ứng enzym. Do đó, có nhu cầu phát triển các enzym glycosit hydrolaza có độ ổn định nhiệt cao

Xenulaza có hoạt tính trong môi trường nhiệt độ cao đã được phân lập từ vi nấm sợi ưa nhiệt và vi khuẩn ưa nhiệt và các vi sinh vật tương tự, nhưng phần lớn các xenulaza này có hoạt tính endoglucanaza, hoạt tính xylanaza, hoạt tính xylosidaza hoặc hoạt tính glucosidaza, và rất ít có hoạt tính xenlobiohydrolaza, đóng vai trò quan trọng trong thủy phân lignoxenluloza, đã được phân lập. Tuy nhiên, trong số các xenlobiohydrolaza hoạt hóa thủy phân từ các đầu không khử của xenluloza, xenlobiohydrolaza GH6 có nhiệt độ tối ưu vượt quá 75°C đã được ghi nhận (ví dụ, xem Tài liệu Patent 1).

Một số xenlobiohydrolaza không chỉ chứa vùng xúc tác thủy phân xenluloza, mà còn chứa vùng cấu trúc có chức năng gắn kết xenluloza cũng được gọi là “vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat” (carbohydrate binding module - CBM). Mặc dù không có hoạt tính phân giải, nhưng bản thân vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat có khả năng gắn kết với xenluloza. Các chức năng đã biết của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat bao gồm làm tăng nồng độ của vùng xúc tác trong vùng lân cận của cơ chất bằng cách hấp thụ vào cơ chất không hòa tan, nhờ đó làm tăng tốc độ phân giải xenluloza, và phân cắt liên kết hydro giữa các chuỗi xenluloza nhờ gắn kết vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat, và phá hủy cấu trúc tinh thể. (Tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Hơn nữa, khi vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat được loại bỏ khỏi xenlobiohydrolaza phân giải xenluloza tinh thể, thì mặc dù khả năng phản ứng với cơ chất hòa tan không thay đổi, nhưng hoạt tính phân giải và ái

lực với xenluloza tinh thể giảm đáng kể, do đó vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat là cần cho hoạt tính phân giải xenluloza tinh thể của enzym xenlobiohydrolaza (Tài liệu phi sáng chế 3).

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu Patent 1: Công bố đơn Patent quốc tế số 2014/157492.

Tài liệu phi sáng chế 1: Bolam et al., *Biochemical Journal*, 1998, vol. 331, pp. 775-781.

Tài liệu phi sáng chế 2: DIN et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994, vol. 91, pp. 11383-11387.

Tài liệu phi sáng chế 3: Riedel et al., *FEMS Microbiology Letters*, 1998, vol. 164, pp. 261-267.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat thể hệ mới và có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và 105°C trong sự có mặt của ion canxi, polynucleotit mã hóa enzym này, vector biểu hiện enzym này, thể biến nạp chứa vector này, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza bằng enzym này.

Để đạt được mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã thu nhận thành công xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có trình tự axit amin thể hệ mới bằng cách chiết tách ADN trực tiếp từ đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng và giải trình tự bộ gen của hệ vi sinh vật khó nuôi cấy lấy từ môi trường này và hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, polynucleotit, vector biểu hiện, thể biến nạp, phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, hỗn hợp glycosit hydrolaza, và phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế được mô tả trong các phương án từ 1 đến 12 dưới đây.

1. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, chứa vùng cấu trúc gắn kết xenluloza bao gồm:

(A1) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1;

(B1) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza; hoặc

(C1) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza, và cũng có vùng xúc tác xenlobiohydrolaza, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

2. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo phương án 1, trong đó vùng xúc tác xenlobiohydrolaza bao gồm:

(A2) polypeptit có trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B2) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(C2) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

3. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo phương án 1, bao gồm:

(A3) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B3) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ

bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(C3) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

4. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,5 trong sự có mặt của ion canxi.

5. Polynucleotit, có

(a1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1,

(b1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza,

(c1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza, hoặc

(d1) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2, và mã hóa polypeptit có chức năng gắn kết xenluloza.

6. Polynucleotit theo phương án 5, bao gồm:

(a2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(b2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5,

(c2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(d2) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

7. Polynucleotit theo phương án 5 hoặc 6, trong đó polypeptit này cũng có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,5 trong sự có mặt của ion canxi.

8. Vector biểu hiện, chứa polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 5 đến 7, và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở tế bào vật chủ.

9. Thẻ biến nạp *E. coli*, chứa vector biểu hiện theo phương án 8.

10. Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này được sản xuất bằng cách biểu hiện xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này từ vector biểu hiện trong thẻ biến nạp *E. coli* theo phương án 9

11. Hỗn hợp glycosit hydrolaza, chứa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, hoặc xenlobiohydrolaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 5 đến 7, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác.

12. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza, bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải xenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 5 đến 7, thẻ biến nạp *E. coli* theo phương án 9, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo phương án 11.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5 và ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,5 trong sự có mặt của ion canxi. Do đó, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này thích hợp để thủy phân nguyên liệu chứa xenluloza ở nhiệt độ cao.

Ngoài ra, polynucleotit, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit này và thể biến nạp chứa vectơ này theo sáng chế cũng thích hợp để sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện trình tự axit amin sắp thẳng hàng (SEQ ID NO.3) của polypeptit mã hóa bởi khung đọc mã mở AR19G-166c4A và trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 (CBM2) của α -L-arabinofuranosidaza có nguồn gốc từ các phân loài *Actinomyces Microbispora*.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích điện di trên gel SDS-PAGE của protein AR19G-166c4A-19-2 được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166c4A-19-2 ở *E. coli* trong ví dụ 1, trong đó Fig.2A là hình vẽ thể hiện kết quả nhuộm màu bằng CBB, và Fig.2B là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích thấm tách Western.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA (ở độ pH = 5,5) ở các nhiệt độ khác nhau, trong sự có mặt của ion canxi hoặc trong sự vắng mặt của ion canxi của protein AR19G-166c4A-19-2 được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166c4A-19-2 ở *E. coli* và protein AR19G-166-QA được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166-QA ở *E. coli* trong ví dụ 1.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân Avicel (ở độ pH = 5,5) ở các nhiệt độ khác nhau, trong sự có mặt của ion canxi hoặc trong sự vắng mặt của ion canxi của protein AR19G-166c4A-19-2 được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166c4A-19-2 ở *E. coli* và protein AR19G-166-QA được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166-QA ở *E. coli* trong ví dụ 1.

Fig.5A là đồ thị thể hiện dữ liệu đo sự thay đổi mật độ huỳnh quang của thuốc nhuộm màu cam SYPRO do sự biến tính nhiệt trong sự có mặt của ion canxi hoặc trong

sự vắng mặt của ion canxi của protein AR19G-166c4A-19-2 được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166c4A-19-2 ở *E. coli* và protein AR19G-166-QA được tạo ra bằng cách biểu hiện gen AR19G-166-QA ở *E. coli* trong ví dụ 1. Fig.5B là đồ thị thể hiện đạo hàm bậc nhất “ $-d(\text{Mật độ huỳnh quang})/dt$ ” của đồ thị hàm số mật độ huỳnh quang - nhiệt độ được thể hiện trên Fig.5A

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính thủy phân Ávicel (ở độ pH = 5,5) ở các nhiệt độ khác nhau, trong sự có mặt của ion canxi hoặc trong sự vắng mặt của ion canxi của protein AR19G-166-RA và protein AR19G-166c4A-19-2-1 được tạo ra bằng cách bổ sung vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của protein AR19G-166c4A-19-2 protein vào protein AR19G-166-RA protein.

Mô tả chi tiết sáng chế

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế

Rất khó nuôi cấy nhiều vi sinh vật, bao gồm vi nấm sợi, vi khuẩn, và vi khuẩn cổ và khoảng 99% vi sinh vật sống trong môi trường, như đất là chưa được biết đến. Đặc biệt, rất khó nuôi cấy được vi sinh vật sống trong môi trường có nhiệt độ cao, và chỉ 0,1% hoặc thấp hơn vi sinh vật sống trong môi trường tự nhiên đã được phân lập và nuôi cấy bằng các kỹ thuật nuôi cấy đã biết. Việc khó nuôi cấy vi sinh vật sống trong môi trường có nhiệt độ cao là một yếu tố cản trở sự phát triển xenlobiohydrolaza chịu nhiệt. Do đó, sự phát triển xenlobiohydrolaza chịu nhiệt cần có phương pháp không dựa vào các kỹ thuật phân lập và nuôi cấy thông thường.

Gần đây, do sự phát triển của các máy giải trình tự thế hệ tiếp theo cho phép giải trình tự được hàng tỷ cặp bazơ, nên có thể giải trình tự bộ gen của vi sinh vật chứa trong đất và các môi trường tương tự. Bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích này, phương pháp phân tích hệ gen môi trường đã được đề cập đến, trong đó ADN bộ gen của quần thể vi sinh vật được tổng hợp từ mẫu môi trường, như đất, bộ gen của quần thể vi sinh vật có thành phần không đồng nhất được giải trình tự trực tiếp toàn bộ, và dữ liệu trình tự được lắp ráp bằng máy tính song song, để thiết kế lại trình tự bộ gen của quần thể vi sinh vật. Điều này góp phần rút ngắn thời gian giải trình tự bộ gen của vi sinh vật khó nuôi cấy.

Như được thể hiện ví dụ 1, các tác giả sáng chế đã chiết tách được ADN bộ gen

của quần thể vi sinh vật sống trong đất có nhiệt độ cao thu được ở khu vực suối nước nóng ở các vùng của Nhật Bản (ví dụ mẫu nước thu được ở khu vực suối nước nóng có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 58°C đến 78°C chứa đất, bùn, thảm vi sinh vật, màng sinh học và các loại tương tự), và thực hiện giải trình tự ADN bộ gen này, do đó thu được các khung đọc mã mở (Open Reading Frame - ORF) mã hóa các trình tự axit amin tương đồng với các xenlobiohydrolaza đã biết, sau đó các đoạn môi được thiết kế dựa trên thông tin trình tự nucleotit của các khung đọc mã mở thu được, và các gen tiềm năng được tách dòng từ ADN bộ gen của đất có nhiệt độ cao ở khu vực suối nước nóng bằng phương pháp PCR. Các ADN được tách dòng PCR được biến nạp vào *E. coli*, và các protein mã hóa bởi các trình tự nucleotit này được biểu hiện và sàng lọc chức năng bằng cách đo hoạt tính phân giải Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric (phosphoric acid swollen Avicel - PSA). Cuối cùng, thu được xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính phân giải PSA (sau đây gọi tắt là “AR19G-166c4A-19-2”) từ các khung đọc mã mở này. Trình tự axit amin của AR19G-166c4A-19-2 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của AR19G-166c4A-19-2 lần lượt như nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4.

AR19G-166c4A-19-2 có vùng xúc tác xenlobiohydrolaza và vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat (sau đây gọi tắt là CBM). Trong trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, 102 gốc axit amin từ gốc xystein ở vị trí số 2 đến gốc xystein ở vị trí số 103 là vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat, và 427 gốc axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 là vùng xúc tác xenlobiohydrolaza. Trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của AR19G-166c4A-19-2 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của AR19G-166c4A-19-2 lần lượt như nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2. Nói cách khác, AR19G-166c4A-19-2 là glycosit hydrolaza có hoạt tính xenlobiohydrolaza.

Thuật ngữ “hoạt tính xenlobiohydrolaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính tạo ra xenlobioza bằng cách thủy phân đầu không khử của cơ chất chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 và xenluloza tinh thể, hoặc PSA. Ví dụ về “hợp chất chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4” bao gồm glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 và oligosacarit chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4.

Thuật ngữ “có hoạt tính” hoặc “biểu hiện hoạt tính” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính phân giải ít nhất một cơ chất và tạo ra sự khác biệt đáng kể về hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất được thủy phân khi so với mẫu đối chứng âm.

Do đó, thuật ngữ “có hoạt tính xenlobiohydrolaza” được dùng trong bản mô tả để chỉ enzym có hoạt tính phân giải cơ chất PSA hoặc ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4 và xenluloza tinh thể và tạo ra sự khác biệt đáng kể về hàm lượng đầu khử hoặc cường độ phản ứng tạo màu của cơ chất được thủy phân khi so với mẫu đối chứng âm.

Mặc dù không có hoạt tính phân giải, nhưng bản thân vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat có khả năng gắn kết với xenluloza. Các chức năng đã biết của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat bao gồm làm tăng nồng độ của vùng xúc tác trong vùng lân cận của cơ chất bằng cách hấp thụ vào cơ chất không hòa tan, nhờ đó làm tăng tốc độ phân giải xenluloza, và phân cắt liên kết hydro giữa các chuỗi xenluloza nhờ gắn kết vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat, và phá hủy cấu trúc tinh thể.

Kết quả tra cứu trình tự axit amin của AR19G-166c4A-19-2 bằng cơ sở dữ liệu trình tự axit amin đã biết cho thấy vùng xúc tác xenlobiohydrolaza của enzym này là giống hệt với trình tự axit amin (SEQ ID NO.10) của AR19G-166-QA, là đột biến một axit amin (R299Q) của AR19G-166RA bộc lộ Tài liệu Patent 1. Hơn nữa, trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của enzym này có độ tương đồng cao nhất với trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 của α -L-arabinofuranosidaza có nguồn gốc từ các phân loài *Actinomyces Microbispora* (Mã truy cập Ngân hàng gen: ETK36906.1) (SEQ ID NO.9), và bằng 64%.

Do AR19G-166c4A-19-2 có vùng xúc tác xenlobiohydrolaza giống hệt như đột biến một axit amin (R299Q) của AR19G-166RA, nên AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính tương tự như AR19G-166RA và AR19G-166QV, với hoạt tính thủy phân mạnh PSA, và hoạt tính thủy phân yếu lichenan chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4, và xenluloza tinh thể Avicel. Mặt khác, AR19G-166c4A-19-2 hầu như không có hoạt tính thủy phân carboxymetyl xenluloza (sau đây gọi tắt là CMC) hoặc laminarin chứa glucan có liên kết β -1,3 và liên kết β -1,6.

AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5. Cụ thể, như thể hiện trong ví dụ 1, ở độ pH bằng 5,5, AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính thủy phân PSA ở khoảng nhiệt độ rộng nằm trong khoảng từ 50°C đến 105°C, và cũng có hoạt tính thủy phân Avicel ở khoảng nhiệt độ rộng nằm trong khoảng từ 50°C đến 99°C.

Hơn nữa, trong sự có mặt của ion kim loại hóa trị hai, AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính xenlobiohydrolaza cao hơn hoạt tính xenlobiohydrolaza thu được trong sự vắng mặt của ion kim loại hóa trị hai ở nhiệt độ cao. Cụ thể, như thể hiện trong ví dụ 1, trong sự có mặt của ion canxi, AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính xenlobiohydrolaza cao hơn hoạt tính xenlobiohydrolaza thu được trong sự vắng mặt của ion canxi ở nhiệt độ 75°C hoặc cao hơn. Cụ thể, trong sự có mặt của ion canxi, AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính thủy phân PSA ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH = 5,5.

Nhìn chung, ở protein có hoạt tính sinh học, một hoặc nhiều axit amin có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung, mà không làm giảm hoạt tính sinh học của protein này. Nói cách khác, trong AR19G-166c4A-19-2, một hoặc nhiều axit amin cũng có thể được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung mà không làm giảm hoạt tính xenlobiohydrolaza của enzym này.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat bao gồm polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A1) đến (C1) sau và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương tự liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5. Do có vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat, nên xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza cao hơn xenlobiohydrolaza chịu nhiệt chỉ chứa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza.

(A1) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1;

(B1) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza; hoặc

(C1) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so

với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza.

Không có giới hạn cụ thể về vùng xúc tác xenlobiohydrolaza của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, miễn là vùng này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5 khi liên kết với vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat theo sáng chế (tức là, vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat bao gồm polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A1) đến (C1)), và vùng xúc tác có thể được chọn từ xenlobiohydrolaza chịu nhiệt đã biết.

Tốt hơn nếu vùng xúc tác xenlobiohydrolaza của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế là polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A2) đến (C2).

(A2) polypeptit có trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B2) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(C2) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

Vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được gắn kết trực tiếp hoặc gắn kết nhờ gốc liên kết bao gồm ít nhất một gốc axit amin. Hơn nữa, vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza có thể liên kết với vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat nằm ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C.

Ví dụ về xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế bao gồm polypeptit chứa polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A3) đến (C3), hoặc polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A3) đến (C3).

(A3) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B3) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, or

(C3) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nỡ liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

Trong các polypeptit (B1), (B2) và (B3) tốt hơn nếu số lượng axit amin được loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3 nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 10, và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng của các polypeptit (C1), (C2) và (C3) với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3 miễn là nằm trong khoảng từ 70% đến 100%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 85% đến 100%, còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 90% đến 100% và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 95% đến 100%.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự axit amin được xác định bằng phương pháp sau: ở trạng thái, trong đó khoảng trống được tạo ra ở các vị trí xuất hiện đột biến chèn thêm hoặc loại bỏ, hai trình tự axit amin được đặt cạnh nhau sao cho các axit amin tương ứng là giống nhau; và tỷ lệ axit amin giống nhau so với tổng số trình tự axit amin trừ đi khoảng trống trên trình tự sắp thẳng hàng được xác định là độ tương đồng trình tự. Độ tương đồng giữa các trình tự axit amin có thể được xác định bằng nhiều phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Theo sáng chế, độ tương đồng của các trình tự axit amin được xác định dựa trên trình tự sắp thẳng hàng thu được bằng phần mềm tra cứu độ tương đồng BLASTP.

Các polypeptit (B1) đến (B3) và (C1) đến (C3) có thể được thiết kế nhân tạo hoặc cũng có thể là thể tương đồng của AR19G-166c4A-19-2 và các biến thể tương tự, hoặc các đoạn protein của chúng.

Mỗi polypeptit (A1) đến (A3), (B1) đến (B3) và (C1) đến (C3) có thể được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự axit amin, hoặc cũng có thể được sản xuất bởi hệ biểu hiện protein sử dụng polynucleotit theo sáng chế. Ngoài ra, mỗi polypeptit (B1) đến (B3) và (C1) đến (C3) cũng có thể được tổng hợp nhân tạo dựa trên polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3 bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen để chèn thêm một hoặc nhiều đột biến axit amin.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính thủy phân cơ chất PSA. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có hoạt tính thủy phân các cơ chất β -glucan hoặc oligosacarit khác ngoài PSA. Ví dụ về các glucan hoặc oligosacarit khác bao gồm xenluloza tinh thể, như Avicel, xenluloza vi tinh thể của vi khuẩn (sau đây gọi tắt là BMCC); giấy lọc; CMC; oligosacarit chứa liên kết β -1,4, như xenlobioza; xylan; p-nitrophenyl- β -D-galactopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPGAL); p-nitrophenyl- β -D-xylopyranosit (sau đây gọi tắt là PNPX); glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,4, như lichenan; glucan chứa liên kết β -1,3 và liên kết β -1,6, như laminarin; glucan chứa β -1,3 linkages; glucan chứa liên kết β -1,6; và oligosacarit chứa liên kết β -1,6, như gentiobioza. Tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel và lichenan ngoài PSA.

Tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở độ pH bằng 5,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 100°C, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 105°C, và còn tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 105°C. Tốt hơn nếu nhiệt độ tối ưu của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế nằm trong khoảng từ 85°C đến 100°C, và tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 90°C đến 100°C.

Tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0, và tốt hơn nữa nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

Hơn nữa, trong sự có mặt của ion kim loại hóa trị hai, tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza cao hơn hoạt

tính xenlobiohydrolaza thu được trong sự vắng mặt của ion kim loại hóa trị hai ngay cả ở nhiệt độ cao. Trong sự có mặt của ion kim loại hóa trị hai, tốt hơn nếu xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0, tốt hơn nữa nếu có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 105°C, và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, và còn tốt hơn nữa nếu có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 105°C, và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5.

Thuật ngữ “chịu nhiệt” được dùng trong bản mô tả để chỉ xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 105°C.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có thể có hoạt tính thủy phân xenluloza khác ngoài hoạt tính xenlobiohydrolaza. Ví dụ về các hoạt tính thủy phân xenluloza khác bao gồm hoạt tính xylanaza, hoạt tính β -galactosidaza, hoạt tính enddoglucanaza, hoạt tính xylosidaza hoặc hoạt tính β -glucosidaza.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể chỉ chứa vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat theo sáng chế và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, hoặc xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có thể bao gồm các vùng khác. Ví dụ về các vùng khác bao gồm vùng khác của xenlobiohydrolaza đã biết ngoài vùng xúc tác xenlobiohydrolaza. Ví dụ, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng bao gồm các enzym thu được bằng cách thay thế vùng xúc tác xenlobiohydrolaza trên xenlobiohydrolaza đã biết bằng polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A3) đến (C3), và enzym thu được bằng cách bổ sung polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A1) đến (C1) vào xenlobiohydrolaza đã biết.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể cũng chứa peptit tín hiệu cho phép dịch chuyển và định vị enzym này vào vùng đặc hiệu ở tế bào, hoặc peptit tín hiệu tạo ra tác dụng bài tiết enzym này ra khỏi tế bào ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Ví dụ về peptit tín hiệu bao gồm peptit tín hiệu vận chuyển không bào, peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất, peptit tín hiệu vận chuyển nhân tế bào, và peptit tín hiệu bài tiết. Ví dụ về peptit tín hiệu duy trì mạng lưới nội chất bao gồm peptit tín hiệu chứa trình tự axit amin HDEL.

Ngoài ra, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế cũng có thể chứa các trình tự đánh dấu khác nhau ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C để cho phép tinh chế dễ dàng khi sản xuất enzym này bằng hệ biểu hiện. Ví dụ về các trình tự đánh dấu có thể được sử dụng bao gồm các trình tự đánh dấu thường được sử dụng trong biểu hiện hoặc tinh chế protein tái tổ hợp, như trình tự đánh dấu His, trình tự đánh dấu hemagglutinin (HA), trình tự đánh dấu Myc, và trình tự đánh dấu Flag.

Nói cách khác, theo một khía cạnh, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế chứa polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (A3) đến (C3); và khi cần cũng chứa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm peptit tín hiệu và trình tự đánh dấu.

Polynucleotit mã hóa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế

Polynucleotit nêu trên mã hóa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sản xuất bằng hệ biểu hiện của vật chủ thu được bằng cách chèn vector biểu hiện chứa polynucleotit này vào vật chủ.

Cụ thể, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a1) đến (d1), và trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có vùng xúc xenlobiohydrolaza.

(a1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1,

(b1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza,

(c1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza, hoặc

(d1) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2, và mã hóa polypeptit có chức năng gắn kết xenluloza.

Ví dụ về polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a2) đến (d2), và polypeptit chứa trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a2) đến (d2).

(a2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(b2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5,

(c2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(d2) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

Thuật ngữ “polynucleotit trong đó nucleotit được loại bỏ” được dùng trong bản mô tả để chỉ đoạn nucleotit mà tạo ra polynucleotit bị khuyết đoạn (loại bỏ).

Thuật ngữ “polynucleotit trong đó nucleotit được thay thế” được dùng trong bản mô tả để chỉ nucleotit mà tạo ra polynucleotit được thay bằng nucleotit khác.

Thuật ngữ “polynucleotit trong đó nucleotit được bổ sung” được dùng trong bản mô tả để chỉ nucleotit mới được chèn vào polynucleotit.

Ví dụ về “các điều kiện nghiêm ngặt” theo sáng chế bao gồm phương pháp được mô tả trong tài liệu: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual Third Edition (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press)*. Ví dụ, các điều kiện trong dung dịch đệm lai hóa SSC 6× (thành phần của dung dịch SSC 20×: natri clorua 3M, dung dịch axit xitric 0,3M, độ pH bằng 7,0), dung dịch Denhardt 5x (thành phần dung dịch Denhardt

100x: 2% khối lượng albumin huyết thanh bò, 2% khối lượng ficoll, 2% khối lượng polyvinylpyrrolidon), 0,5% khối lượng SDS, 0,1mg/mL ADN tinh trùng cá hồi, và 50% formamit, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 70°C trong vài giờ đến qua đêm. Sau khi ủ, tốt hơn nếu dung dịch SSC 1× chứa 0,1% khối lượng SDS được sử dụng làm dung dịch đệm rửa, và tốt hơn nữa nếu dung dịch SSC 0,1× chứa 0,1% khối lượng SDS được sử dụng làm dung dịch đệm rửa.

Từ các trình tự nucleotit từ (a1) đến (e1) và (a2) đến (e2), có thể chọn lọc được bộ ba mã hóa thoái biến có tần xuất sử dụng cao ở vật chủ. Ví dụ, trình tự nucleotit (a1) có thể là trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2, hoặc trình tự nucleotit thu được bằng cách cải biến trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2 để có bộ ba mã hóa có tần xuất sử dụng cao ở vật chủ mà không làm biến đổi trình tự axit amin cần mã hóa bởi trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2. Các bộ ba mã hóa này có thể được cải biến bằng kỹ thuật cải biến trình tự gen hoặc tổng hợp gen nhân tạo đã biết.

Polynucleotit có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.4 có thể được tổng hợp hóa học dựa trên thông tin về trình tự nucleotit hoặc polynucleotit này có thể được tổng hợp dưới dạng gen có chiều dài đầy đủ mã hóa protein AR19G-166c4A-19-2 (sau đây gọi tắt là “gen AR19G-166c4A-19-2” hoặc “gen tách dòng AR19G-166c4A-19-2”) hoặc đoạn chức năng của nó chứa vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat và vùng xúc tác xenlobiohydrolaza từ tự nhiên bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Gen AR19G-166c4A-19-2 có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn chức năng của nó có thể được tổng hợp bằng cách thu nhận mẫu chứa các vi sinh vật từ tự nhiên; và thực hiện phương pháp PCR với khuôn là ADN bộ gen thu được từ mẫu, và đoạn mỗi xuôi và đoạn mỗi ngược được thiết kế dựa trên trình tự nucleoit như nêu trong SEQ ID NO.2 bằng phương pháp thông thường. ADN bổ sung được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược từ khuôn là ARN thông tin thu được từ mẫu.

Không có giới hạn cụ thể về độ tương đồng của trình tự nucleotit (d1) và (d2) so với trình tự nucleoit như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.4 miễn là nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 85% đến 100%, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 90% đến 100%, còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 95% đến 100, và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 98% đến 100%.

Độ tương đồng trình tự (độ tương đồng) giữa các trình tự nucleotit được xác định bằng phương pháp sau: ở trạng thái trong đó khoảng trống được tạo ra ở các vị trí xuất hiện đột biến chèn thêm hoặc loại bỏ, hai trình tự nucleotit được đặt cạnh nhau sao cho các trình tự nucleotit tương ứng là giống nhau; và tỷ lệ các trình tự nucleotit giống nhau so với tổng số trình tự nucleotit trừ đi khoảng trống trên trình tự sắp thẳng hàng được xác định là độ tương đồng trình tự. Độ tương đồng trình tự giữa các trình tự nucleotit có thể được xác định bằng nhiều phần mềm tra cứu độ tương đồng đã biết trong lĩnh vực này. Theo sáng chế, độ tương đồng của các trình tự nucleotit được xác định dựa trên trình tự sắp thẳng hàng thu được bằng phần mềm tra cứu độ tương đồng BLASTN.

Ví dụ, mỗi polynucleotit có trình tự nucleotit (b1), (b2), (c1), (c2), (d1) hoặc (d2) có thể được tổng hợp nhân tạo bằng cách loại bỏ, thay thế, hoặc bổ sung một hoặc nhiều nucleotit trong polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.4. Ngoài ra, trình tự nucleotit (b1), (b2), (c1), (c2), (d1) hoặc (d2) cũng có thể là trình tự có chiều dài đầy đủ của gen tương đồng với gen AR19G-166c4A-19-2 hoặc đoạn chức năng của nó. Gen tương đồng với gen AR19G-166c4A-19-2 có thể thu được bằng kỹ thuật gen tái tổ hợp dùng để thu nhận gen tương đồng của gen có trình tự nucleotit đã biết.

Polynucleotit theo sáng chế có thể chỉ chứa miền mã hóa vùng xúc tác xenlobiohydrolaza và vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat, hoặc ngoài các miền này, thì polynucleotit theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều miền mã hóa trình tự liên kết, petit tín hiệu, trình tự đánh dấu khác nhau, hoặc các trình tự tương tự.

Nói cách khác, theo một khía cạnh, polynucleotit theo sáng chế chứa trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit từ (a2) đến (e2); và khi cần cũng chứa miền mã hóa ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm peptit tín hiệu và trình tự đánh dấu.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế

Vectơ nêu trên chứa polynucleotit theo sáng chế và biểu hiện polypeptit có hoạt tính xenlobiohydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5 ở tế bào vật chủ. Nói cách khác, vectơ biểu hiện này chứa polynucleotit theo sáng chế ở trạng thái có thể biểu hiện xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế. Cụ thể hơn, vectơ biểu hiện theo

sáng chế cần được tích hợp với cat-xet biểu hiện chứa, từ đoạn nằm trước, ADN có trình tự vùng khởi đầu, polynucleotit theo sáng chế, và ADN có trình tự vùng kết thúc. Polynucleotit theo sáng chế có thể được biến nạp vào vector biểu hiện này bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết hoặc kit tổng hợp vector biểu hiện có bán trên thị trường.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể là vector biểu hiện để chèn vào tế bào nhân sơ, như *E. coli* hoặc tế bào nhân thật, như nấm men, vi nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, hoặc tế bào thực vật. Vector biểu hiện bất kỳ có thể được chọn lọc và sử dụng theo vật chủ tương ứng.

Tốt hơn nữa, vector biểu hiện theo sáng chế không chỉ chứa polynucleotit theo sáng chế, mà còn chứa gen kháng thuốc hoặc các gen tương tự. Điều này cho phép dễ dàng sàng lọc được tế bào đã chuyển gen và tế bào chưa chuyển gen bằng vector này.

Ví dụ về gen kháng thuốc bao gồm gen kháng kanamycin, gen kháng hygromycin và gen kháng bialaphos.

Thể biến nạp theo sáng chế

Thể biến nạp nêu trên chứa vector biểu hiện theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được biểu hiện ở thể biến nạp này. Các xenlobiohydrolaza đã biết có phổ vật chủ biểu hiện hẹp, tức là khó biểu hiện không tương đồng. Tuy nhiên, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được biểu hiện trong nhiều vật chủ, bao gồm *E. coli*, nấm men, vi nấm sợi và lục lạp thực vật bậc cao. Theo đó, vật chủ để chèn vector biểu hiện theo sáng chế có thể là tế bào nhân sơ, như *E. coli*, hoặc tế bào nhân thật, như nấm men, vi nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật. Tức là, thể biến nạp theo sáng chế là *E. coli*, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, hoặc tế bào thực vật. Nói cách khác, ví dụ về thể biến nạp theo sáng chế bao gồm *E. coli*, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, hoặc tế bào thực vật chứa in vector biểu hiện theo sáng chế. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sản xuất dễ dàng với lượng lớn bằng cách nuôi cấy thể biến nạp *E. coli* này. Mặt khác, do protein bị glycosyl hóa ở tế bào nhân thật, nên xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có độ ổn định nhiệt cao hơn có thể được sản xuất bằng cách sử dụng thể biến nạp là tế bào nhân thật chứ không sử dụng thể biến nạp là tế bào nhân sơ.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp sản xuất thể biến nạp theo sáng chế bằng cách sử dụng vector biểu hiện và thể biến nạp theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp thông thường. Ví dụ về các phương pháp sản xuất thể biến nạp bao gồm phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, phương pháp súng hạt, phương pháp xung điện, và phương pháp chuyển gen nhờ polyetylen glycol. Khi vật chủ là tế bào thực vật, tốt hơn nếu phương pháp súng hạt hoặc phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium* được sử dụng.

Khi tế bào nhân sơ, nấm men, vi nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú hoặc các tế bào tương tự được sử dụng làm vật chủ, thì thể biến nạp thu được có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường giống như phương pháp nuôi cấy vật chủ chưa chuyển gen.

Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế

Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế chế là phương pháp để sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt trong thể biến nạp theo sáng chế. Khi nuôi cấy thể biến nạp được sản xuất bằng cách sử dụng vector biểu hiện chứa polynucleotit theo sáng chế nằm sau vùng khởi đầu mà không có khả năng điều hòa thời gian biểu hiện hoặc các yếu tố tương tự, thì xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện liên tục trong thể biến nạp. Mặt khác, trong thể biến nạp được sản xuất bằng cách sử dụng vùng khởi đầu cảm ứng biểu hiện để cảm ứng biểu hiện bằng hợp chất đặc hiệu, điều kiện nhiệt độ đặc hiệu, hoặc các yếu tố tương tự, thì xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được biểu hiện trong thể biến nạp này bằng cách cảm ứng phù hợp với điều kiện cảm ứng biểu hiện tương ứng.

Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được sản xuất bằng thể biến nạp có thể được sử dụng ở trạng thái vẫn nằm trong thể biến nạp, hoặc có thể được chiết xuất và tinh chế từ thể biến nạp.

Không có giới hạn cụ thể về phương pháp chiết xuất và tinh chế xenlobiohydrolaza chịu nhiệt từ thể biến nạp miễn là phương pháp này không làm giảm hoạt tính của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này, và phương pháp thông thường để chiết xuất polypeptit từ tế bào hoặc mô sinh học có thể được sử dụng. Ví dụ về các phương

pháp này bao gồm phương pháp, trong đó thể biến nạp được ngâm trong dung dịch đệm thích hợp để chiết xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, sau đó dịch chiết và bã rắn được phân tách. Tốt hơn nếu dung dịch đệm chứa chất tăng độ hòa tan, như chất hoạt động bề mặt. Khi thể biến nạp là thực vật, thì thể biến nạp có thể được băm hoặc nghiền trước khi ngâm trong dung dịch đệm. Hơn nữa, phương pháp phân tách rắn-lỏng đã biết, như phương pháp lọc, phương pháp lọc nén, hoặc phương pháp ly tâm có thể được sử dụng để phân tách dịch chiết và bã rắn, hoặc thể biến nạp được ngâm trong dung dịch đệm có thể được ép. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt trong dịch chiết có thể được tinh chế bằng phương pháp đã biết, như phương pháp kết tinh muối, phương pháp siêu lọc, hoặc phương pháp sắc ký.

Khi xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế được biểu hiện trong thể biến nạp ở trạng thái có peptit tín hiệu bài tiết, thì dung dịch chứa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt có thể được thu nhận dễ dàng bằng cách nuôi cấy thể biến nạp, sau đó thu gom dịch nổi nuôi cấy bằng cách loại bỏ thể biến nạp ra khỏi môi trường nuôi cấy thu được. Hơn nữa, khi xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có trình tự đánh dấu, như trình tự đánh dấu His, thì xenlobiohydrolaza chịu nhiệt trong dịch chiết hoặc dịch nổi nuôi cấy có thể được tinh chế dễ dàng bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng trình tự đánh dấu này.

Nói cách khác, phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế bao gồm bước sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt trong thể biến nạp, và khi cần cũng bao gồm bước chiết xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt từ thể biến nạp và tinh chế xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này.

Hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế

Hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên chứa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, hoặc xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế có thể được sử dụng ở trạng thái nằm trong thể biến nạp theo sáng chế hoặc có thể được chiết xuất từ thể biến nạp này và tinh chế. Khi xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế được sử dụng dưới dạng hỗn hợp với một hoặc nhiều glycosit hydrolaza khác để thủy phân xenluloza, thì có thể phân giải hiệu quả

nguyên liệu lignoxenluloza chứa xenluloza khó phân giải.

Không có giới hạn cụ thể về glycosit hydrolaza khác ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế trong hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên, miễn là có hoạt tính thủy phân xenluloza. Ví dụ về glycosit hydrolaza khác ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế trong hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên bao gồm hemixenlulaza, như xylanaza và β -xylosidaza, xenlobiohydrolaza không phải là xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, β -glucosidaza, và endoglucanaza. Tốt hơn nếu ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, thì hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế còn chứa ít nhất một glycosit hydrolaza được chọn từ hemixenlulaza và endoglucanaza, và tốt hơn nữa nếu ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, thì hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa cả hemixenlulaza lẫn endoglucanaza. Đặc biệt, ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, tốt hơn nếu hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa ít nhất một glycosit hydrolaza được chọn từ nhóm bao gồm xylanaza, β -xylosidaza, xenlobiohydrolaza không phải là xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế và endoglucanaza; và tốt hơn nữa nếu ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa toàn bộ xylanaza, β -xylosidaza, xenlobiohydrolaza không phải là xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế và endoglucanaza.

Tốt hơn nếu glycosit hydrolaza khác chứa trong hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính glycosit hydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 70°C, và tốt hơn nữa nếu enzyme này là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính glycosit hydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 95°C, và còn tốt hơn nữa nếu enzyme này là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính glycosit hydrolaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 105°C. Khi hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chứa toàn bộ các enzyme chịu nhiệt (ví dụ nhiệt độ tối ưu của hoạt tính enzyme hoặc nhiệt độ biến tính của protein enzyme này bằng 70°C hoặc cao hơn), thì có thể thủy phân hiệu quả xenluloza bằng hỗn hợp glycosit hydrolaza này ở điều kiện nhiệt độ cao. Nói cách khác, khi hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế chỉ chứa glycosit hydrolaza chịu nhiệt, thì có thể thực hiện phản ứng thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza chứa xenluloza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 95°C (tức là quá trình thủy phân ở nhiệt độ cao) bằng cách sử dụng hỗn hợp glycosit hydrolaza này. Đối với quá trình thủy phân ở nhiệt

độ cao này, thì lượng enzym sử dụng, thời gian thủy phân và chi phí cho phản ứng thủy phân có thể giảm đáng kể.

Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế

Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế là phương pháp để thu được sản phẩm phân giải xenluloza bằng cách thủy phân nguyên liệu chứa xenluloza bằng xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế. Cụ thể, sản phẩm phân giải xenluloza (ví dụ, sản phẩm phân giải chứa xenlobioza và glucoza và các đường tương tự) được sản xuất bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, thể biến nạp theo sáng chế, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế.

Không có giới hạn cụ thể về nguyên liệu chứa xenluloza, miễn là chứa xenluloza. Ví dụ cụ thể về nguyên liệu chứa xenluloza bao gồm sinh khối xenluloza, như cỏ dại, chất thải nông nghiệp, giấy thải, hoặc các nguyên liệu tương tự. Trước khi tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, tốt hơn nếu nguyên liệu chứa xenluloza được xử lý vật lý, như nghiền hoặc băm nhỏ, xử lý hóa học bằng axit, kiềm, hoặc hợp chất tương tự, hoặc ngâm hoặc phân giải vào dung dịch đệm thích hợp.

Tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza bởi xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế được thực hiện ở điều kiện ở đó enzym này có hoạt tính xenlobiohydrolaza. Ví dụ, trong sự vắng mặt của ion kim loại hóa trị hai, tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, và tốt hơn nữa nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5. Hơn nữa, trong sự có mặt của ion kim loại hóa trị hai, tốt hơn nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 105°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, và tốt hơn nữa nếu phản ứng thủy phân xenluloza được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 105°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5. Thời gian phản ứng thủy phân xenluloza được điều chỉnh thích hợp theo loại nguyên liệu chứa xenluloza được sử dụng, phương pháp xử lý sơ bộ nguyên liệu, lượng và các yếu tố tương tự của nguyên liệu chứa xenluloza. Ví dụ, phản ứng thủy phân

xenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 10 phút đến 100 giờ, tuy nhiên khi phân giải sinh khối xenluloza, thì phản ứng thủy phân xenluloza có thể được thực hiện trong thời gian từ 1 giờ đến 100 giờ.

Để thủy phân nguyên liệu chứa xenluloza, cũng tốt hơn nếu sử dụng ít nhất một glycosit hydrolaza khác ngoài xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế. Glycosit hydrolaza khác có thể giống như glycosit hydrolaza chứa trong hỗn hợp glycosit hydrolaza nêu trên, và tốt hơn nếu nếu enzyme này là glycosit hydrolaza chịu nhiệt có hoạt tính glycosit hydrolaza ít nhất ở nhiệt độ bằng 70°C, và tốt hơn nếu ít nhất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 100°C. Ngoài ra, theo một khía cạnh, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế sử dụng xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, thể biến nạp theo sáng chế, hoặc xenlobiohydrolaza chịu nhiệt được sản xuất bằng phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế, và theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza theo sáng chế sử dụng hỗn hợp glycosit hydrolaza theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông các ví dụ dưới đây, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Quy trình tách dòng xenlobiohydrolaza chịu nhiệt thể hệ mới từ đất ở khu vực suối nước nóng.

1. Chiết tách ADN từ đất ở khu vực suối nước nóng và giải trình tự bộ gen

Để giải trình tự gen của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế (có nhiệt độ tối ưu bằng 55°C hoặc cao hơn) và xenlobiohydrolaza siêu chịu nhiệt theo sáng chế (có nhiệt độ tối ưu bằng 80°C hoặc cao hơn), ADN từ đất ở khu vực suối nước nóng có tính chất từ trung tính đến kiềm yếu được thu nhận và ADN bộ gen của quần thể vi sinh vật trong đất này được giải trình tự.

Mẫu đất ở khu vực suối nước nóng có tính chất từ trung tính đến kiềm yếu (các mẫu ADN bộ gen N2, AR19, AR15, OJ1, và H1) được thu nhận bằng cách thu thập mẫu

nước chứa đất, bùn và sinh khối từ 5 điểm lấy mẫu ở 3 khu vực suối nước nóng của Nhật Bản. Các mẫu đất ở các khu vực suối nước nóng này có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 58°C đến 78°C và độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 8,0 ở thời điểm lấy mẫu.

ADN được chiết tách từ mỗi mẫu đất thu được ở các khu vực suối nước nóng (10g) bằng kit chiết tách ADN (ISOIL Large for Beads ver. 2, do Nippon Gene Co., Ltd. sản xuất). ADN chiết tách được (5µg) được giải trình tự bằng máy giải trình tự GS FLX Titan 454 do Roche Diagnostics Ltd. sản xuất.

Quá trình giải trình tự ADN bộ gen này được hiện bằng cách sử dụng mẫu đất suối nước nóng AR15 và thu được trình tự bộ gen có chiều dài đoạn đọc trung bình bằng 396bp, tổng số các đoạn trình tự đọc bằng 2.766.332, và tổng chiều dài bộ gen đã được giải trình tự bằng 1.106.243.280bp.

2. Lắp ráp và thống kê dữ liệu hệ gen môi trường của mẫu đất thu được ở khu vực suối nước nóng.

Dữ liệu đầu ra từ máy giải trình tự Roche 454 (tệp tin sff) được xử lý loại bỏ các đoạn trình tự đọc chất lượng thấp và lắp ráp lại bằng phần mềm Genomics Workbench Ver. 4 (do CLC bio, Inc. sản xuất).

Tổng chiều dài của các đoạn tiếp giáp đã được lắp ráp thành ít nhất 500bp bằng 159.587.150bp và bộ dữ liệu này được sử dụng để phân tích gen xenlulaza. Tổng số các đoạn trình tự đọc sau khi loại bỏ các đoạn trình tự đọc chất lượng thấp là 2.766.328 đoạn trình tự đọc, và các đoạn trình tự đọc này được lắp ráp thành các đoạn tiếp giáp có chiều dài trung bình bằng 1.230bp (tổng số là 129.742 đoạn tiếp giáp), và đoạn tiếp giáp lớn nhất có chiều dài bằng 105.977bp.

3. Phát hiện khung đọc mã mở (Open Reading Frame - ORF) của xenlobiohydrolaza.

Các trình tự có mã phân loại enzym 3.2.1.4 (xenlulaza), 3.2.1.21 (β-glucosidaza), 3.2.1.37 (β-xylosidaza), 3.2.1.91 (xenluloza 1,4-β-xenlobiosidaza), và 3.2.1.8 (endo-1,4-β-xylanaza) được tải về từ cơ sở dữ liệu UniProt (<http://www.uniprot.org/>, ngày truy cập: 09/12/2011), và cơ sở dữ liệu về các gen glycosit hydrolaza này được thiết kế. Khung đọc mã mở (các vùng gen) được phát hiện từ các

trình tự tiếp giáp thu được ở phần 2 bằng phần mềm MetaGeneAnnotator (Noguchi *et al.*, *MetaGeneAnnotator: Detecting Species-Specific Patterns of Ribosomal Binding Site for Precise Gene Prediction in Anonymous Prokaryotic and Phage Genomes*, *DNA Res.*, 2008, 15, pp. 387 - 396). Các gen mã hóa glycosit hydrolaza từ các khung đọc mã mở phát hiện được được xác định bằng phần mềm BLASTP (phiên bản 2.2.18) và tham khảo cơ sở dữ liệu nêu trên. Hơn nữa, điều kiện tùy chọn của phần mềm BLASTP được thiết lập như sau: “trình tự truy vấn = sai”, “trị số kỳ vọng (E) $< 1e^{-20}$ ”, (sau đó, các trị số mặc định được thiết lập như sau: “trị số để phát hiện khoảng trống = -1”, “trị số để mở rộng khoảng trống = -1”, “trị số sắp thẳng hàng được tạo khoảng trống X = 0”, “trị số lý thuyết cho các trình tự mục tiêu mở rộng = 0”, và “cỡ chữ = mặc định”), và các trình tự khung đọc mã mở mục tiêu được thu thập là gen mã hóa glycosit hydrolaza.

4. Phân loại gen thành các họ glycosit hydrolaza.

Các trình tự nucleotit thu được ở phần 3 bao gồm các trình tự gen mã hóa glycosit hydrolaza, như xenlulaza, endohemixenlulaza, và enzym cắt mạch nhánh được phân loại chức năng bằng cách đối chiếu với cơ sở dữ liệu về trình tự vùng chức năng của protein Pfam HMMs (Pfam phiên bản 23.0 và HMMER phiên bản 2.3; Finn *et al.*, *Nucleic Acids Research Database*, 2010, Issue 38, p.D211-222). Cụ thể, mỗi trình tự nucleotit này được phân loại thành họ glycosit hydrolaza (GH) dựa trên độ tương đồng của chúng với cơ sở dữ liệu vùng Pfam bằng thuật toán tra cứu độ tương đồng trình tự HMMER (Durbin *et al.*, “*The theory behind profile HMMs. Biological sequence analysis: probabilistic models of protein and nucleic acids*”, 1998, Cambridge University Press.; hmmpfam (phiên bản 2.3.2), trị số kỳ vọng E $< 1e^{-5}$; cơ sở dữ liệu = Pfam_fs (mô hình có thể được sử dụng để phát hiện các đoạn của các vùng đại diện ở trình tự)).

Dựa trên kết quả tra cứu độ tương đồng bằng phần mềm BLASTP và đối chiếu với cơ sở dữ liệu về trình tự vùng chức năng của protein Pfam HMMs bằng cách sử dụng dữ liệu trình tự thu được từ mẫu đất ở khu vực suối nước nóng AR19, 61 khung đọc mã mở được xác định là gen mã hóa xenlobiohydrolaza. Trong số các khung đọc mã mở này có một khung đọc mã mở, trong đó trình tự vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 thế hệ mới (CBM2) đã được bổ sung vào đầu tận cùng N của trình tự của thể đột biến một axit amin (R299Q) AR19G-166-QA của AR19G-166RA đã biết. Các đoạn môi được thiết

kể cho khung đọc mã mở này, và gen này được tách dòng bằng phương pháp PCR sử dụng khuôn là ADN thu được từ mẫu đất ở khu vực suối nước nóng đã được khuếch đại bằng kit GenomiPhi V2, do GE Healthcare, Inc. sản xuất) để phân lập được gen xenlobiohydrolaza AR19G-166c4A-19-2 từ khung đọc mã mở AR19G-166c4A có trình tự xenlobiohydrolaza thuộc họ GH6 với trình tự CBM2 ở đầu tận cùng 5'.

5. Khung đọc mã mở AR19G-166c4A

Khung đọc mã mở AR19G-166c4A mã hóa polypeptit chứa 590 gốc axit amin (SEQ ID NO.3), và có chiều dài không đầy đủ (SEQ ID NO.4), polypeptit này bắt đầu từ gốc axit amin alanin (A) ở vị trí số 1, và đầu 3' của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit này được kết thúc bằng bộ ba mã hóa kết thúc. Kết quả phân tích độ tương đồng trình tự cho thấy rằng trong trình tự axit amin mã hóa bởi khung đọc mã mở AR19G-166c4A, 102 gốc axit amin từ xystein (C) ở vị trí số 2 đến xystein (C) ở vị trí số 103 được xác định là vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 (CBM2), và 427 gốc axit amin từ leuxin (L) ở vị trí số 164 đến prolin (P) ở vị trí số 590 được xác định là vùng xúc tác glycosit hydrolaza GH6. Vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 này (CBM2) là trình tự thể hệ mới có độ tương đồng trình tự axit amin bằng 64% so với vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat2 (vùng chứa các axit amin từ vị trí số 29 đến 128 của SEQ ID NO.9) của α -L-arabinofuranosidaza có nguồn gốc từ các phân loài *Actinomyces Microbispora*. Độ tương đồng trình tự được xác định bằng thuật toán ClustalW.

Fig.1 là hình vẽ thể hiện trình tự axit amin sắp thẳng hàng (SEQ ID NO.3) của polypeptit mã hóa bởi khung đọc mã mở AR19G-166c4A và trình tự axit amin của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat 2 (CBM2) của α -L-arabinofuranosidaza có nguồn gốc từ các phân loài *Actinomyces Microbispora* (SEQ ID NO.9). Trên Fig.1, các axit amin nằm trong các ô màu trắng hoặc màu đen là các gốc axit amin giống hệt nhau trong cả hai trình tự axit amin này, và ký tự “-” thể hiện khoảng trống trên trình tự.

6. Gen xenlobiohydrolaza AR19G-166c4A-19-2

Gen xenlobiohydrolaza AR19G-166c4A-19-2 từ khung đọc mã mở AR19G-166c4A được phân lập bằng phương pháp PCR tách dòng. Gen AR19G-166c4A-19-2 chứa trình tự nucleotit có chiều dài bằng 1.773bp giống hệt với khung đọc mã mở

AR19G-166c4A.

7. Biểu hiện và tinh chế protein xenlobiohydrolaza.

Bằng cách sử dụng đoạn môi xuôi chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.7 (5'-GTGATGGCCTGCCAGGTGTCCTAC-3': trong đó sáu nucleotit (GTGATG) được bổ sung vào đầu 5' của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.5, và đầu 5' này được phosphoryl hóa), và đoạn môi ngược chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO. 8 (5'-ATGCAGAGCTCTTAGGGTTGGATCGGCGGATAG-3': trong đó trình tự nhận diện enzym giới hạn SacI được bổ sung vào đầu 5' của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.6, SacI là trình tự sử dụng để chèn vector), sản phẩm PCR đã được khuếch đại bằng KOD-Plus-Neo (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được chèn vào vec to pLEAD5 (do Nippon Gene Co., Ltd. sản xuất), và biến nạp vào chủng *E. coli* JM109. Trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.5 là tương đồng (giống hệt) với đoạn trình tự chứa các nucleotit từ vị trí số 1 đến 18 của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4. Hơn nữa, trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.6 là trình tự bổ sung với đoạn trình tự chứa các nucleotit từ vị trí số 1.752 đến 1.773 của trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4. Các dòng dương tính được chọn lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc và nuôi cấy trên môi trường lỏng LB chứa 100mg/L ampicilin ở nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 17 đến 20 giờ, sau đó các plasmit được tổng hợp bằng kit miniprep (hệ thống tinh chế ADN Wizard plus SV Minipreps, do Promega Corporation sản xuất). Các plasmid thu được được giải trình tự bằng máy giải trình tự 3730, do Life Technologies Corporation sản xuất. Gen tách dòng AR19G-166c4A-19-2 được thu nhận từ khung đọc mã mở AR19G-166c4A bằng phương pháp PCR tách dòng.

Dòng *E. coli* đã chuyển gen có plasmit AR19G-166c4A-19-2/pLEAD5 đã được giải trình tự được cấy vào môi trường canh thang Turbo (do Athena Environmental Sciences, Inc. sản xuất) chứa 50mg/L ampicilin, và nuôi cấy trong khoảng 20 giờ để biểu hiện protein đích. Sau khi nuôi cấy, *E. coli* được thu nhận bằng ly tâm, và thể tích dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) tương đương với 1/10 thể tích dịch nuôi cấy được bổ sung vào và tạo hỗn dịch, sau đó quy trình bao gồm 5 phút phá vỡ, sau đó 5 phút nghỉ được lặp lại 7 hoặc 8 lần bằng máy siêu âm Astrason 3000 (do MISONIX Inc. sản xuất), để thu được dịch chiết thô *E.coli* tái tổ hợp chứa protein đích. Dịch chiết thô *E.coli*

tái tổ hợp gen này được lọc qua giấy lọc (đường kính lỗ lọc $\phi = 0,45\mu\text{m}$, do EMD Millipore Corporation sản xuất), và dịch lọc thu được được sử dụng làm dịch nuôi cấy đồng nhất E.coli tái tổ hợp gen.

Dịch nuôi cấy đồng nhất E.coli tái tổ hợp gen được nạp vào cột trao đổi ion HiTrap Q HP (do GE Healthcare, Inc. sản xuất) được cân bằng với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), và hệ thống sắc ký lỏng AKTA (do GE Healthcare, Inc. sản xuất) được sử dụng để phân đoạn các protein với gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50% trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 1M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được thu gom, và màng siêu lọc ly tâm VIVASPIN 20 (do Sartorius stedim Biotech SA sản xuất) được sử dụng để trao đổi dung dịch đệm với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 750mM amoni sulfat. Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza sau khi trao đổi dung dịch đệm được nạp vào cột phân tách tương tác kỵ nước HiTrap Phenyl HP (do GE Healthcare, Inc. sản xuất) được cân bằng với cùng dung dịch đệm, và các protein được phân đoạn bằng gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 100% trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0). Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được thu gom, sau đó cô bằng VIVASPIN 20 cho đến khi thể tích dịch lỏng bằng khoảng 8 mL. Mẫu cô được nạp vào cột lọc gel Hiload 26/60 superdex 200 pg (do GE Healthcare, Inc. sản xuất) được cân bằng với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0) chứa 150mM NaCl, và phân đoạn bằng cách nạp thể tích dung dịch đệm tương tự tương đương với 1 đến 1,5 lần thể tích cột vào cột ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 2 đến 3mL/phút. Các phân đoạn có hoạt tính xenlobiohydrolaza được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), sau đó cô để thu được enzym tinh khiết có nồng độ cuối cùng bằng khoảng 1mg/mL.

Dịch nuôi cấy đồng nhất E.coli tái tổ hợp gen và enzym tinh khiết (protein xenlobiohydrolaza tinh khiết) được điện di trên gel SDS-PAGE (gel SDS-polyacrylamit). Dịch nuôi cấy đồng nhất E.coli tái tổ hợp gen và enzym tinh khiết được điện di SDS bằng cách sử dụng gel không chứa thuốc nhuộm Mini-PROTEAN TGX (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất). Dịch nuôi và enzym tinh khiết tương ứng được trộn với dung dịch xử lý Tris-SDS β ME (do Cosmo Bio Co. Ltd. sản xuất) ở tỷ lệ 1:1, và sau khi xử lý các mẫu điện di thu được ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút, mẫu dịch nuôi cấy đồng

nhất *E.coli* tái tổ hợp gen (10 μ L) và mẫu enzym tinh khiết (1 μ g) được điện di tương ứng. Sau khi điện di kết thúc, các băng protein được hiện màu và phát hiện bằng thuốc nhuộm CBB và phân tích thẩm tách Western.

Khi thực hiện phân tích thẩm tách Western, sau khi điện di SDS, các protein được chuyển lên màng polyvinyliden florua bằng cách sử dụng thiết bị Trans-Blot SD (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) và hộp Trans-Blot Turbo Transfer (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất). Các protein trên màng được cho phản ứng với các kháng thể sơ cấp của thỏ đã pha loãng 1000 lần. Các kháng thể sơ cấp của thỏ được sản xuất bằng cách tổng hợp polypeptit chứa 20 gốc axit amin từ vị trí số 384 đến 403 (CDPNGQSRYSAYPTGALPN) mã hóa bởi AR19G-166-RA, và tinh chế huyết thanh của thỏ đã gây miễn dịch bằng phương pháp ái lực (do Operon Biotechnologies, Inc. sản xuất). Kháng thể sơ cấp của thỏ đã gắn kết với protein được phát hiện bằng kit thẩm tách Western (do Pierce Biotechnology, Inc. sản xuất), và tín hiệu huỳnh quang hóa học được phát hiện bằng thiết bị chụp ảnh Ez-Capture MG (do ATTO Corporation sản xuất).

Fig.2A là hình ảnh thể hiện kết quả nhuộm màu bằng CBB và Fig.2B là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích thẩm tách Western của dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E.coli* tái tổ hợp gen thu được từ *E. coli* đã chuyển gen AR19G-166c4A-19-2, và enzym tinh khiết thu được từ dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E.coli* tái tổ hợp gen đã điện di trên gel SDS-PAGE. Fig.2 là hình vẽ thể hiện các mẫu điện di, trong đó làn 1 thể hiện protein chỉ thị khối lượng, làn 2 thể hiện dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E.coli* tái tổ hợp gen, và làn P thể hiện enzym tinh khiết. Các kết quả này cho thấy rằng trong cả phân tích nhuộm màu bằng CBB và thẩm tách Western đều quan sát được băng đậm trong dịch nổi nuôi cấy đồng nhất *E.coli* tái tổ hợp gen (làn 2) có khối lượng phân tử gần bằng 63,4kDa được xác định từ trình tự axit amin (SEQ ID NO.3), và băng đơn tương ứng với băng này (thể hiện bằng mũi tên trên Fig.2) trong enzym tinh khiết (làn 3).

8. Hoạt tính xenlobiohydrolaza

Hoạt tính xenlobiohydrolaza thủy phân cơ chất PSA và Avicel của protein enzym (AR19G-166c4A-19-2) mã hóa bởi gen AR19G-166c4A-19-2 được đánh giá. Trong các phép đo, dung dịch được điều chế bằng cách pha loãng enzym tinh khiết thu được trong phần 7 với dung dịch đệm Tris-HCl 0,05M (độ pH = 8,0) đến nồng độ bằng 1mg/mL

được sử dụng.

Cơ chất PSA được điều chế bằng cách hòa tan bột Avicel (bột xenluloza vi tinh thể, do Merck & Co., Inc. sản xuất) trong dung dịch axit phosphoric, sau đó bổ sung nước tinh khiết để tạo kết tủa, sau đó rửa cho đến khi thu được độ pH = 5,0 hoặc cao hơn. PSA được sử dụng trong các thử nghiệm sau được điều chế bằng phương pháp nêu tên.

Máy trộn nhiệt (do Eppendorf AG sản xuất) được sử dụng để phản ứng, ống mẫu có dung tích bằng 1,5mL được sử dụng làm ống phản ứng, và dung dịch phản ứng chứa 10μL enzym tinh khiết đã pha loãng, 40μL nước tinh khiết, 50μL dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH = 5,5), và 100μL dung dịch cơ chất 1% khối lượng. Trong trường hợp của cơ chất PSA, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95 đến 110°C bằng cách sử dụng thiết bị Reacti-Therm (do GL Sciences Inc. sản xuất), ống thủy tinh có dung tích bằng 1,5mL được sử dụng làm ống phản ứng, và thể tích dung dịch phản ứng bằng 400μL. Dung dịch phản ứng chứa 20μL enzym tinh khiết đã pha loãng, 80μL nước tinh khiết, 100μL dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH = 5,5), và 200μL dung dịch PSA 1% khối lượng.

Trong toàn bộ các phép đo, dung dịch hỗn hợp được điều chế bằng cách thay dung dịch enzym tinh khiết bằng dung dịch đệm Tris-HCl 50mM (độ pH = 8,0), sau đó để phản ứng ở cùng điều kiện được sử dụng làm mẫu đối chứng. Hơn nữa, dung dịch cơ chất và dung dịch hỗn hợp chứa dung dịch enzym tinh khiết, nước tinh khiết và dung dịch đệm được giữ riêng ở nhiệt độ phản ứng trong 5 phút (ủ sơ bộ) trước khi trộn để hoạt hóa phản ứng. Sau khi kết thúc 20 phút phản ứng trong trường hợp của PSA hoặc 60 phút phản ứng trong trường hợp của Avicel, thuốc thử axit 3,5-đinitrosalixylic (dung dịch DNS) được bổ sung vào mỗi dung dịch phản ứng ở thể tích bằng thể tích dung dịch, và hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 5 phút, làm nguội trên nước đá trong 5 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 17.500 g trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu được dịch nổi. Hàm lượng đường khử trong dịch nổi được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ, tính toán hàm lượng đường khử bằng cách sử dụng đường chuẩn glucoza, sau đó tính toán hàm lượng đường khử được tạo ra bởi phản ứng thủy phân enzym dựa trên mức độ khác biệt so với mẫu đối chứng. Hoạt tính enzym để tạo ra 1μmol đường khử trong một phút được định nghĩa là 1U, và trị số thu được bằng cách lấy

hoạt tính này chia cho lượng protein được định nghĩa là hoạt tính riêng (U/mg). Mỗi phép đo được thực hiện lặp lại ba lần, và trị số trung bình và độ lệch chuẩn được xác định.

9. Mức độ phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính AR19G-166c4A-19-2

Mức độ phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính thủy phân PSA và hoạt tính thủy Avicel của AR19G-166c4A-19-2 được đánh giá.

Cụ thể, để đánh giá mức độ phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính thủy phân PSA, phản ứng được thực hiện theo cùng cách thức mô tả trong phần 8, chỉ khác là thiết lập nhiệt độ phản ứng đến 50°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C hoặc 110°C và ở mỗi nhiệt độ, hàm lượng đường khử được tạo ra bởi phản ứng thủy phân enzym được xác định và hoạt tính thủy phân PSA (U/mg) được tính toán.

Để đánh giá mức độ phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính thủy phân Avicel, phản ứng được thực hiện theo cùng cách thức mô tả trong phần 8, chỉ khác là thiết lập nhiệt độ phản ứng đến 50°C, 60°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C hoặc 99°C và ở mỗi nhiệt độ, hàm lượng đường khử được tạo ra bởi phản ứng thủy phân enzym được xác định và hoạt tính thủy phân Avicel (U/mg) được tính toán.

Hơn nữa, các phép đo cũng được thực hiện bằng cách sử dụng các dung dịch phản ứng trong đó dung dịch nước chứa 10mM CaCl₂ được bổ sung thay cho nước tinh khiết, và ở mỗi nhiệt độ, hàm lượng đường khử được tạo ra bởi phản ứng thủy phân enzym được xác định và hoạt tính thủy phân PSA (U/mg) và hoạt tính thủy phân Avicel (U/mg) được tính toán.

Hơn nữa, các phép đo tương tự được thực hiện đối với AR19G-166-QA không chứa vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat để so sánh.

Kết quả đo hoạt tính thủy phân PSA được thể hiện trên Fig.3. AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính thủy phân PSA ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 105°C (Fig.3). Cụ thể, trong sự có mặt của ion canxi, AR19G-166c4A-19-2 có hoạt tính thủy phân PSA mạnh ngay cả ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 105°C.

Nhiệt độ tối ưu ($T_{\text{tối ưu}}$) ở đó hoạt tính mạnh nhất bằng 95°C trong sự vắng mặt của ion canxi (được ký hiệu “AR19G-166c4A-19-2” trên Fig.3) và 105°C trong sự có mặt

của ion canxi (được ký hiệu “AR19G-166c4A-19-2 + Ca^{2+} ” trên Fig.3). Trái lại, nhiệt độ tối ưu của AR19G-166-QA bằng 70°C trong sự vắng mặt của ion canxi (được ký hiệu “AR19G-166-QA” trên Fig.3) và 80°C trong sự có mặt của ion canxi (được ký hiệu “AR19G-166-QA + Ca^{2+} ” trên Fig.3). Các kết quả này cho thấy rằng sự có mặt của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat làm tăng nhiệt độ tối ưu của hoạt tính thủy phân PSA lên 25°C.

Kết quả đo hoạt tính thủy phân Avicel được thể hiện trên Fig.4. Nhiệt độ tối ưu của cả AR19G-166c4A-19-2 và AR19G-166-QA bằng 85°C, không phụ thuộc vào sự có mặt hoặc vắng mặt của ion canxi. Tuy nhiên, trong trường hợp của AR19G-166c4A-19-2, hoạt tính thủy phân Avicel tăng đáng kể. Hoạt tính thủy phân Avicel trung bình của AR19G-166-QA ở nhiệt độ tối ưu bằng 85°C, trong sự vắng mặt hoặc có mặt ion canxi, tương ứng bằng $0,17 \pm 0,05\text{U/mg}$ và $0,12 \pm 0,04\text{U/mg}$, trong khi đó hoạt tính thủy phân Avicel trung bình của AR19G-166c4A-19-2 bằng tương ứng bằng $0,34 \pm 0,03\text{U/mg}$ và $0,43 \pm 0,02\text{U/mg}$. Các kết quả này cho thấy rằng sự có mặt của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat làm tăng hoạt tính thủy phân Avicel lên 2 lần trong sự vắng mặt của ion canxi, và lên 3,6 lần trong sự có mặt của ion canxi.

10. Đánh giá độ ổn định nhiệt của xenlobiohydrolaza bằng phương pháp phân tích nhiệt cắt lớp

Phương pháp phân tích nhiệt cắt lớp (DSF) là phương pháp đo nhiệt độ biến tính của protein bằng thuốc nhuộm huỳnh quang và máy PCR định lượng, và có thể áp dụng cho nhiều protein. Thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng để phân tích nhiệt cắt lớp, như thuốc nhuộm màu cam SYPRO, là chất phát huỳnh quang trong điều kiện không phân cực khi gắn kết vào vùng kỵ nước, và sự phát huỳnh quang bị ức chế trong điều kiện phân cực khi hòa tan trong nước. Nhìn chung, cấu trúc của protein bị tháo xoắn ở nhiệt độ biến tính, và các vùng kỵ nước bên trong của protein bị lộ ra khỏi bề mặt protein. Khi thuốc nhuộm màu cam SYPRO gắn kết với các vùng kỵ nước bị lộ ra bởi ánh sáng kích thích có bước sóng nằm trong khoảng từ 470nm đến 480nm, thì thuốc nhuộm này phát ra ánh sáng huỳnh quang có cực đại ở bước sóng khoảng 595nm. Bằng cách tăng nhiệt độ của dung dịch protein trong các khoảng thời gian cách đều nhau, và đo mật độ huỳnh quang tương ứng thì có thể xác định được nhiệt độ biến tính của protein (= nhiệt

độ thay đổi mật độ huỳnh quang).

Các phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch enzym tinh khiết được điều chế bằng cách hòa tan enzym tinh khiết AR19G-166c4A-19-2 thu được trong phần 7 trong nước ở nồng độ bằng 1mg/mL, hoặc dung dịch enzym tinh khiết được điều chế bằng cách hòa tan AR19G-166-QA trong nước ở nồng độ bằng 1mg/mL.

Cụ thể, thuốc nhuộm màu cam SYPRO đã pha loãng 100 lần (2 μ L, do Life Technologies sản xuất Inc.), 1 μ L dung dịch enzym tinh khiết có nồng độ bằng 1 mg/mL, 5 μ L dung dịch đệm axetat 200mM (độ pH = 5,6) và 12 μ L nước tinh khiết hoặc dung dịch được điều chế bằng cách trộn nước tinh khiết và dung dịch CaCl₂ 10mM ở tỷ lệ bằng 2:1 được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa PCR 96-giếng (đĩa PCR 96-giếng MLL-9651, do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) sao cho thể tích của mỗi giếng bằng 20 μ L. Đĩa PCR được đậy kín bằng các nắp đậy có 8 mũ chụp (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất), nhiệt độ của mỗi giếng được tăng từ 30°C đến 100°C mỗi lần 0,2°C bằng máy PCR định lượng (hệ thống PCR định lượng CFX96 Touch, do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất), và sau ngừng 10 giây kể từ khi nhiệt độ đạt đến nhiệt độ mục tiêu, mật độ huỳnh quang của mỗi giếng tương ứng được đo đồng thời. Thuốc nhuộm màu cam SYPRO được kích thích bằng đi-ốt phát quang (LED) có bước sóng ánh sáng phát ra nằm trong khoảng từ 450nm đến 490nm, và ánh sáng được phát xạ từ thuốc nhuộm màu cam SYPRO được lọc bằng bộ lọc thông dải ở bước sóng nằm trong khoảng từ 560nm đến 580nm, mật độ huỳnh quang được đo bằng máy ảnh CCD, và sự thay đổi về mật độ huỳnh quang được vẽ đồ thị dưới dạng hàm số của nhiệt độ. Nhiệt độ biến tính (nhiệt độ nóng chảy; T_m) được xác định là điểm cực tiểu cục bộ của đạo hàm bậc nhất của đồ thị hàm số mật độ huỳnh quang - nhiệt độ (" $-d(\text{Mật độ huỳnh quang})/dt$ ") được thể hiện trên trục T của Fig.5B). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm CFX Manager (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) được tích hợp trên máy PCR định lượng. Mỗi phép đo được thực hiện lặp lại ba lần, và trị số trung bình và độ lệch chuẩn được xác định.

Fig.5 là đồ thị thể hiện sự thay đổi về mật độ huỳnh quang của thuốc nhuộm màu cam SYPRO Orange được đo bằng phương pháp phân tích nhiệt cắt lớp và gây bởi biến nhiệt protein enzym AR19G-166c4A-19-2 và AR19G-166-QA. Fig.5A là đồ thị thể hiện dữ liệu đo thực tế, trong khi đó Fig.5B là đồ thị thể hiện đạo hàm bậc nhất " $-d(\text{Mật độ$

huỳnh quang/ dt ” của đồ thị hàm số mật độ huỳnh quang - nhiệt độ được thể hiện trên Fig.5A.

Đạo hàm bậc nhất của đồ thị hàm số mật độ huỳnh quang - nhiệt độ của AR19G-166c4A-19-2 (không bổ sung CaCl_2) có điểm cực tiểu cục bộ ở $93,0 \pm 0^\circ\text{C}$, tức là nhiệt độ biến tính của enzym này. Nhiệt độ này gần bằng nhiệt độ tối ưu 95°C của enzym được xác định từ hoạt tính thủy phân PSA. Hơn nữa, khi bổ sung CaCl_2 , thì thực tế là không xuất hiện điểm cực tiểu cục bộ ngay cả khi nhiệt độ đã đạt 100°C , điều này cho thấy rằng nhiệt độ biến tính vượt quá 100°C . Mặt khác, nhiệt độ biến tính trung bình của AR19G-166-QA tương ứng bằng $75,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (không bổ sung CaCl_2) và $80,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (bổ sung CaCl_2), gần bằng nhiệt độ tối ưu 70°C (không bổ sung CaCl_2) và 80°C (bổ sung CaCl_2) của enzym được xác định từ hoạt tính thủy phân PSA.

11. Tác dụng của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat đến hoạt tính xenlobiohydrolaza

Để kiểm chứng tác dụng thu được khi vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của AR19G-166c4A-19-2 được bổ sung vào các enzym khác, xenlobiohydrolaza AR19G-166c4A-19-2-1 (SEQ ID NO.11) có vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat mô tả nêu trên được bổ sung vào AR19G-166-RA được điều chế và đo hoạt tính thủy phân Avicel. Gen AR19G-166c4A-19-2-1 (SEQ ID NO.12) được điều chế bằng kit đột biến điểm có định hướng QuikChange (do Agilent Technologies, Inc. sản xuất) để thay thế glutamin ở vị trí số 462 của AR19G-166c4A-19-2 bằng arginin. Cụ thể, quá trình điều chế được thực hiện bằng cách sử dụng khuôn là AR19G-166c4A-19-2/pLEAD5, và sử dụng đoạn môi đột biến gen 1 chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.13 và đoạn môi đột biến gen 2 chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.14. Quá trình biểu hiện và tinh chế AR19G-166c4A-19-2-1 được thực hiện theo cùng cách thức mô tả trong phần 7, và mức độ phụ thuộc nhiệt độ của hoạt tính xenlobiohydrolaza được đánh giá theo cùng cách thức mô tả trong phần 9. Để so sánh, các phép đo tương tự được thực hiện đối với AR19G-166-RA không có CBM.

Kết quả đo hoạt tính thủy phân Avicel được thể hiện trên Fig.6. AR19G-166c4A-19-2-1 có hoạt tính thủy phân Avicel tăng đáng kể ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 85°C so với AR19G-166-RA không có CBM. Hoạt tính thủy phân Avicel trung bình của

AR19G-166c4A-19-2-1 ở nhiệt độ 80°C bằng $0,26 \pm 0,06\text{U/mg}$ trong sự vắng mặt của ion canxi và $0,31 \pm 0,01\text{U/mg}$ trong sự có mặt của ion canxi, trong khi đó hoạt tính thủy phân Avicel trung bình của AR19G-166-RA tương ứng bằng $0,06 \pm 0,06\text{U/mg}$ và $0,10 \pm 0,01\text{U/mg}$. Các kết quả này cho thấy rằng sự có mặt của vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat làm tăng hoạt tính thủy phân Avicel lên 4,3 lần (hoặc lên 3,1 lần trong sự có mặt của ion canxi).

Các kết quả này cho thấy khi bổ sung CBM của xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo sáng chế vào các enzym xenlobiohydrolaza khác, thì hoạt tính xenlobiohydrolaza của các enzym này có thể tăng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt chứa vùng cấu trúc gắn kết xenluloza bao gồm:

(A1) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1;

(B1) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza; hoặc

(C1) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và có chức năng gắn kết xenluloza, và cũng có vùng xúc tác xenlobiohydrolaza, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

2. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo điểm 1, trong đó vùng xúc tác xenlobiohydrolaza bao gồm:

(A2) polypeptit có trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B2) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến trên trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(C2) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin từ gốc leuxin ở vị trí số 164 đến đến gốc prolin ở vị trí số 590 của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

3. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo điểm 1, bao gồm:

(A3) polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(B3) polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(C3) polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

4. Xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel trương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,5 trong sự có mặt của ion canxi.

5. Polynucleotit, có

(a1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1,

(b1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza,

(c1) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, polypeptit này có chức năng gắn kết xenluloza, hoặc

(d1) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.2, và mã hóa polypeptit có chức năng gắn kết xenluloza.

6. Polynucleotit theo điểm 5, bao gồm:

(a2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3,

(b2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được tạo ra bằng

cách loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung từ 1 đến 20 axit amin trên trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5,

(c2) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 70% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, polypeptit này có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5, hoặc

(d2) trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 80% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.4, và mã hóa polypeptit có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 95°C và độ pH bằng 5,5.

7. Polynucleotit theo điểm 5 hoặc 6, trong đó polypeptit này cũng có hoạt tính thủy phân cơ chất Avicel tương nở liên hợp axit phosphoric ít nhất ở nhiệt độ bằng 105°C và độ pH bằng 5,5 trong sự có mặt của ion canxi.

8. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, và có khả năng biểu hiện polypeptit có hoạt tính xenlobiohydrolaza ở tế bào vật chủ.

9. Thể biến nạp *E. coli* chứa vector biểu hiện theo điểm 8.

10. Phương pháp sản xuất xenlobiohydrolaza chịu nhiệt, trong đó xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này được sản xuất bằng cách biểu hiện xenlobiohydrolaza chịu nhiệt này từ vector biểu hiện trong thể biến nạp *E. coli* theo điểm 9.

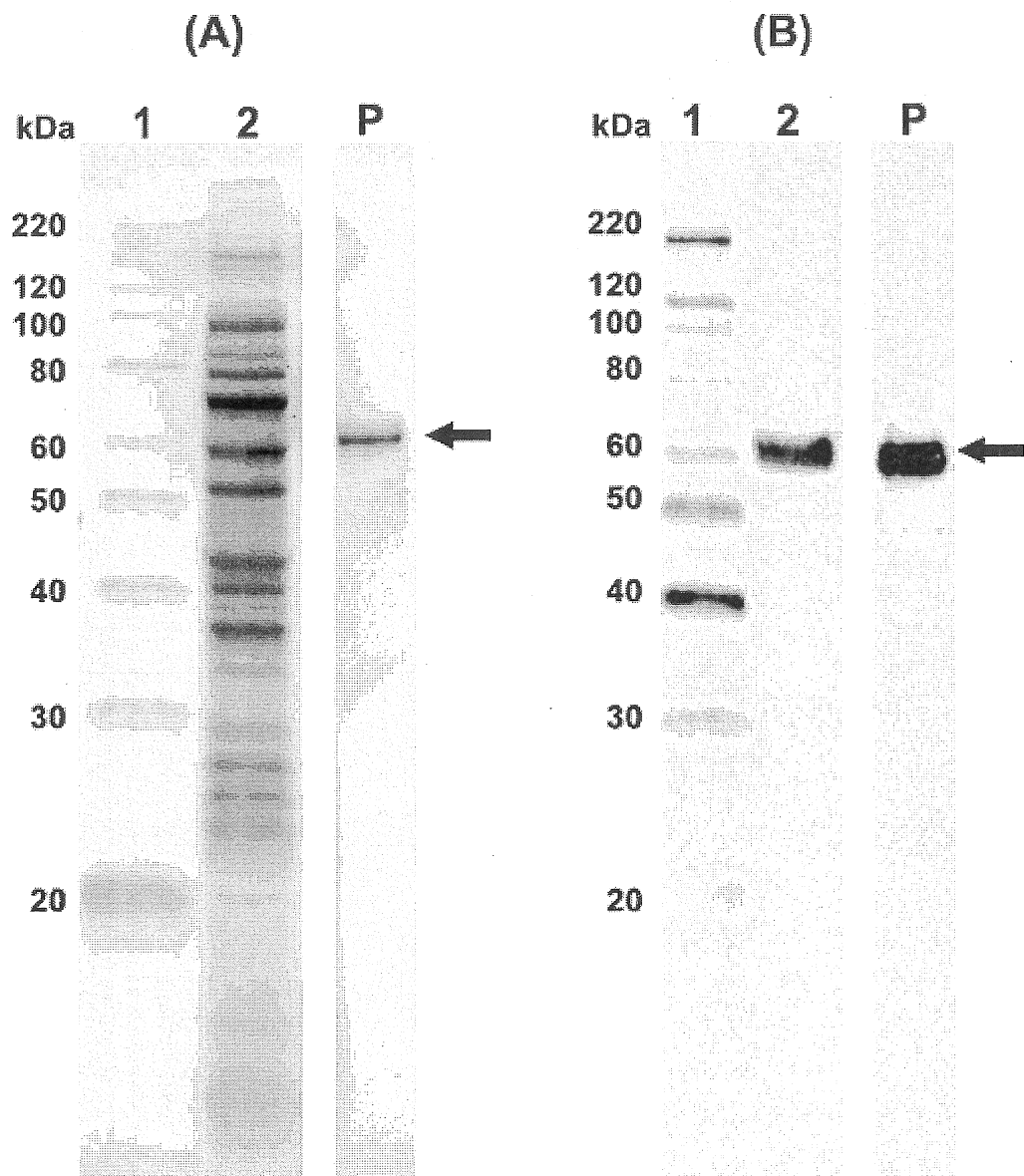
11. Hỗn hợp glycosit hydrolaza, chứa xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc xenlobiohydrolaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, và ít nhất một glycosit hydrolaza khác.

12. Phương pháp sản xuất sản phẩm phân giải xenluloza, bao gồm bước tạo ra sản phẩm phân giải xenluloza bằng cách cho nguyên liệu chứa xenluloza tiếp xúc với xenlobiohydrolaza chịu nhiệt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, xenlobiohydrolaza chịu nhiệt mã hóa bởi polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, thể biến nạp *E. coli* theo điểm 9, hoặc hỗn hợp glycosit hydrolaza theo

điểm 11.

Fig.1

AR19G-166c4A	1	ACQVSYTVANQNPGGATVNVTIINNTSSPTNGWILEDFNPQQITNLWNGSVQJGQHVTVTNAWNGCTIPAGSSVTIEGFMWSGNS	90
Microbispora CBM2	1	-CQVPIYTVINQNPGGFGTINVTISNL-GDPVNGWRLINSEF-ACQITVQLWNGIVITQSGSQVVTNASTVNTIPIGCTNIEGFMWSGNS	87
AR19G-166c4A	91	PAPSSFILNGQPCGGTAGGGPQPTPTPTPTPAAPTATPTPVAPTATPTRTPTPTLSTPGPTPTPPSGTHLDMPPFIGAIGVWPDWA	180
Microbispora CBM2	88	PAPSSFALNGVTC-----	100
AR19G-166c4A	181	TNVTISQANQTADPTLAAQNRKVATYSTAMVLDRIAATAGRGLRGHLDEALRQVQOAGQPWITLVTVDLPNRDCSAAASNGELLVAQNG	270
Microbispora CBM2	100	-----	100
AR19G-166c4A	271	LARYKAFFIDPIVAILSDPRVAGLRIVITIEPDSLPNLVNLSTPACAEQAQWAYIEGTRYAVNRLRTIPNVVITYLDIAHSGVLGMDNFN	360
Microbispora CBM2	100	-----	100
AR19G-166c4A	361	GAVNLYTQVWQGMQDQGFNSIDGFTINWANYTPLEEYLPDPNLTIAGQPVRSASFYEKNPYFDEL DYALALRNAF IGRGFPSTIGMLIDT	450
Microbispora CBM2	100	-----	100
AR19G-166c4A	451	SRINGGGSYGQCRPTGPSSDTSWVWAYVDGSRVDRRYHRGNWCNQAGGIGERPOAAPRSGIDAYVMKPPGESDGVSQPGIVDPDDPNK	540
Microbispora CBM2	100	-----	100
AR19G-166c4A	541	KFDPWCDPNGQSRYNISAYPTGALPNAPHAGRMIFPQQFEILVRNAVYPPIQP	590
Microbispora CBM2	100	-----	100

**Fig.2**

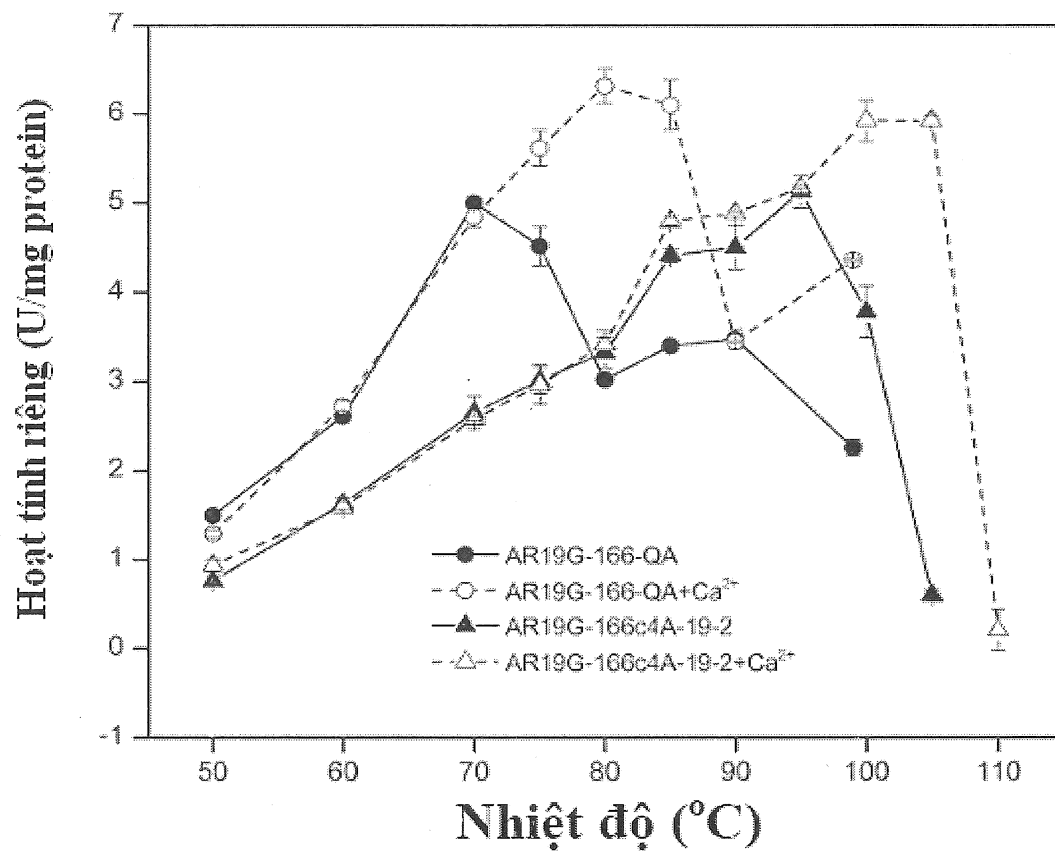


Fig.3

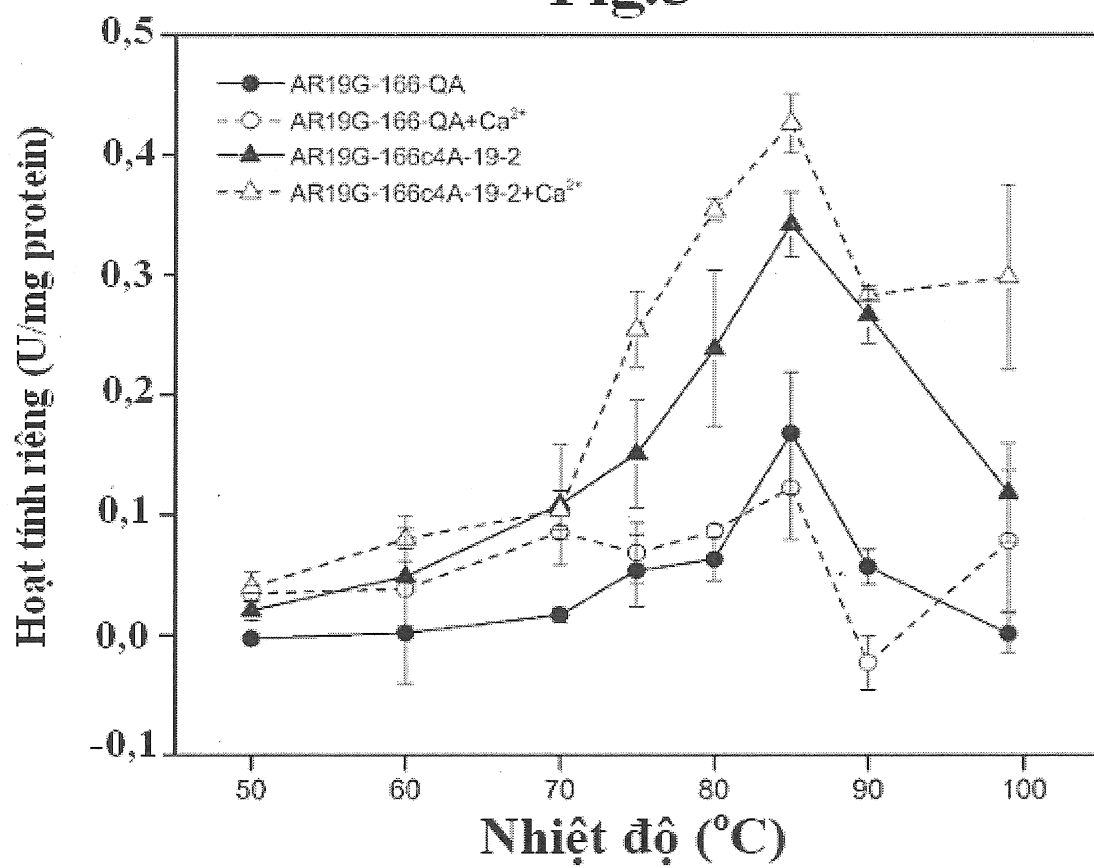


Fig.4

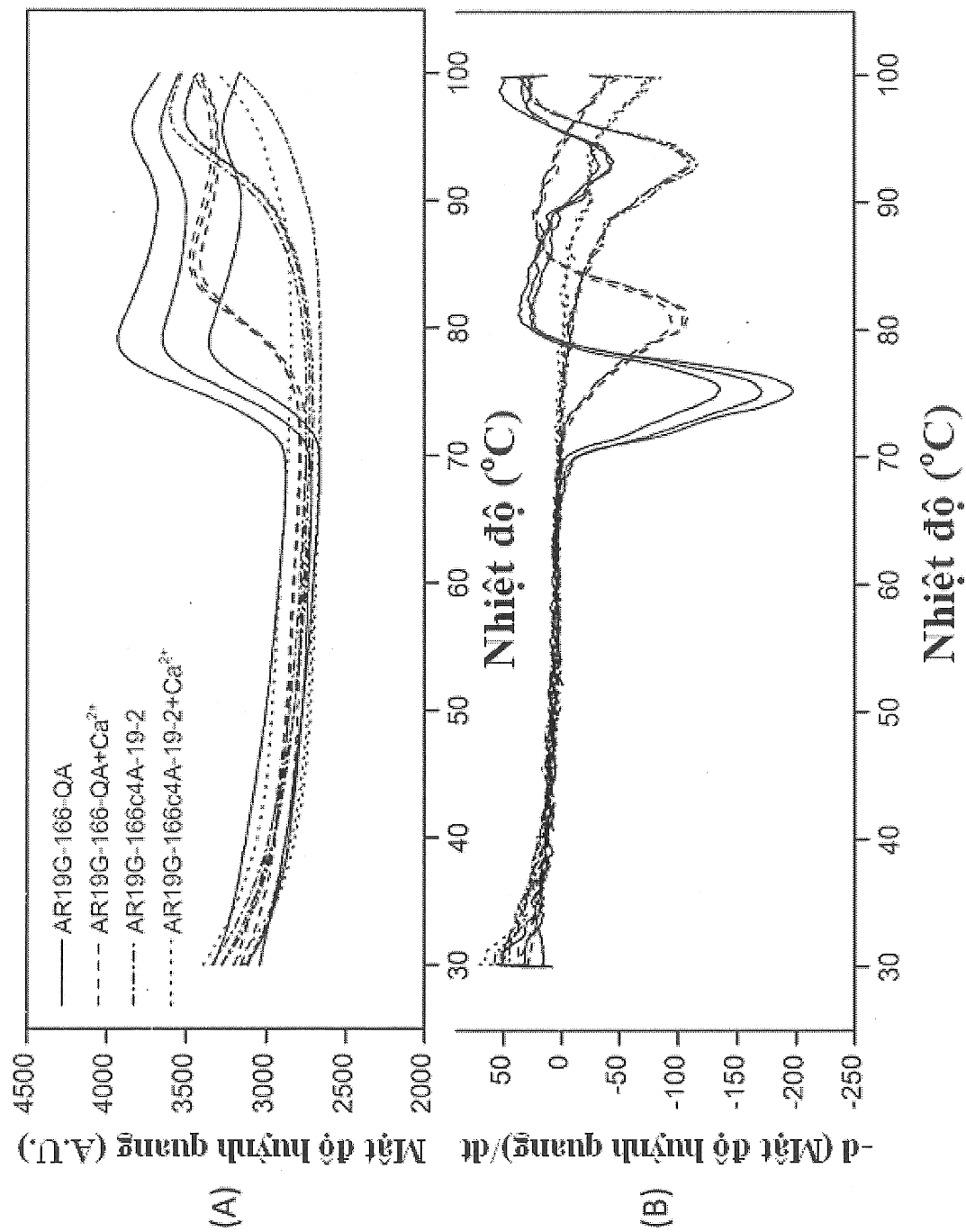
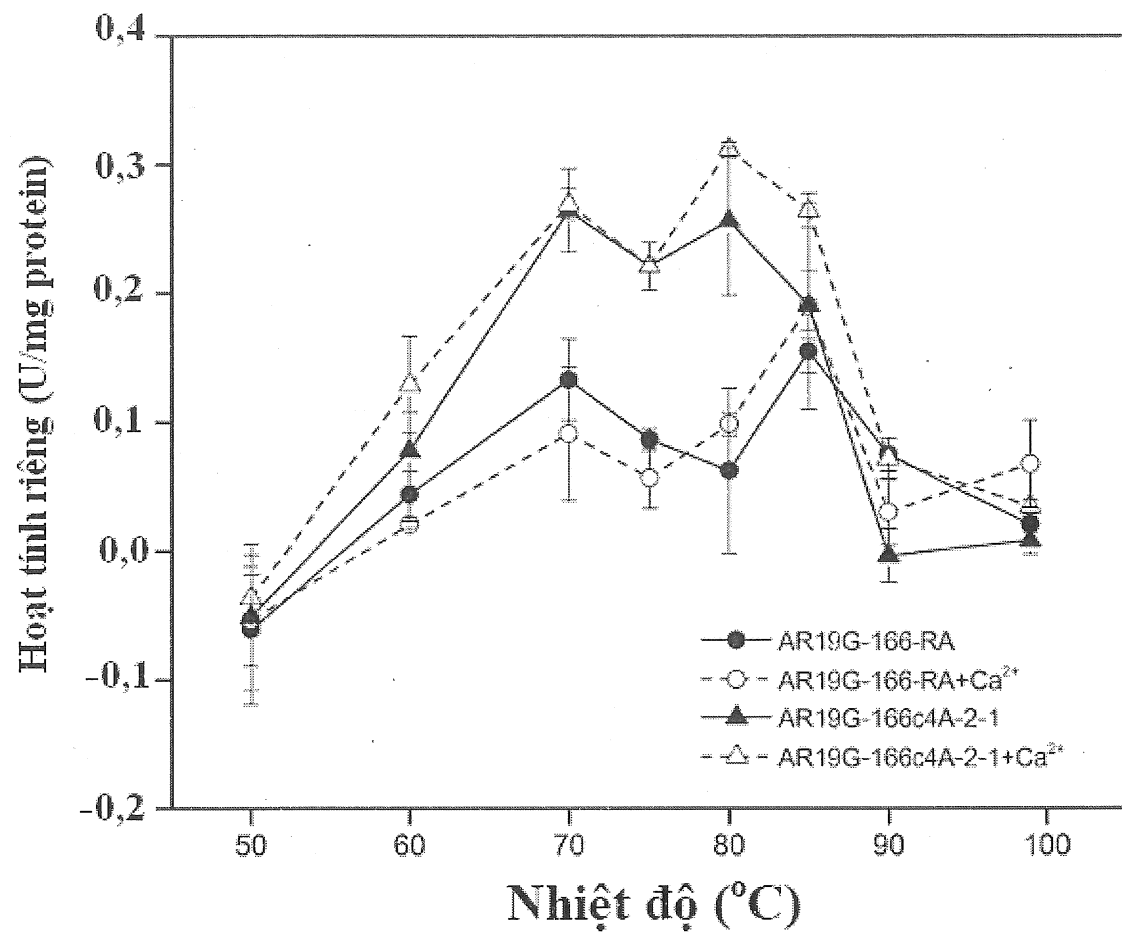


Fig.5

**Fig.6**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HONDA MOTOR CO., LTD.
 <120> XENLOBIOHYDROLAZA CHỊU NHIỆT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA ENZYM NÀY, VECTO BIỂU HIỆN ENZYM NÀY, THỂ BIỂN NẠP CHỨA VECTO NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ENZYM NÀY, HỖN HỢP GLYCOSIT HYDROLAZA CHỨA ENZYM NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM PHÂN GIẢI XENLULOZA
 <130> H115148201
 <160> 13
 <210> 1
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> Vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của AR19G-166c4A-19-2
 <400> 1
 Cys Gln Val Ser Tyr Thr Val Ala Asn Gln Trp Pro Gly Gly Ala Thr
 1 5 10 15
 Val Asn Val Thr Ile Thr Asn Thr Thr Ser Ser Pro Ile Asn Gly Trp
 20 25 30
 Thr Leu Glu Trp Asp Phe Pro Asn Pro Ser Gln Gln Ile Thr Asn Leu
 35 40 45
 Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Gln Thr Gly Gln His Val Thr Val Thr Asn
 50 55 60
 Ala Ala Trp Asn Gly Thr Ile Pro Ala Gly Ser Ser Val Thr Phe Gly
 65 70 75 80
 Phe Asn Met Ser Trp Ser Gly Ser Asn Pro Ala Pro Ser Ser Phe Thr
 85 90 95
 Leu Asn Gly Gln Pro Cys
 100
 <210> 2
 <211> 306
 <212> ADN
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> Vùng cấu trúc gắn kết cacbonhydrat của AR19G-166c4A-19-2
 <400> 2
 tgccaggtgt cctacacggt agccaaccag tggcccggcg gcgccaccgt gaacgtgaca 60
 attaccaaca ccaccagcag ccccatcaac ggctggacgc tggaatggga cttccccaac 120
 ccagccagc agatcaccaa cctctggaac ggctcctact cccaaaccgg acagcacgtg 180
 acagtgacca atgccgcctg gaacggaaca atccagccg gcagctccgt aaccttcgga 240
 ttcaacatga gctggagcgg atcgaaccg gcgccagca gcttcaccct gaacggacaa 300
 ccgtgc 306
 <210> 3
 <211> 590
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> AR19G-166c4A-19-2
 <400> 3
 Ala Cys Gln Val Ser Tyr Thr Val Ala Asn Gln Trp Pro Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Asn Val Thr Ile Thr Asn Thr Thr Ser Ser Pro Ile Asn Gly
 20 25 30
 Trp Thr Leu Glu Trp Asp Phe Pro Asn Pro Ser Gln Gln Ile Thr Asn
 35 40 45
 Leu Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Gln Thr Gly Gln His Val Thr Val Thr
 50 55 60
 Asn Ala Ala Trp Asn Gly Thr Ile Pro Ala Gly Ser Ser Val Thr Phe
 65 70 75 80
 Gly Phe Asn Met Ser Trp Ser Gly Ser Asn Pro Ala Pro Ser Ser Phe
 85 90 95
 Thr Leu Asn Gly Gln Pro Cys Gly Gly Thr Ala Gly Gly Gly Pro Gln
 100 105 110
 Pro Thr Pro Thr Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 115 120 125
 Thr Pro Thr Pro Val Ala Pro Thr Ala Thr Pro Thr Arg Thr Pro Thr
 130 135 140
 Pro Thr Leu Thr Ser Thr Pro Gly Pro Thr Pro Thr Pro Pro Ser
 145 150 155 160
 Gly Thr His Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn
 165 170 175
 Pro Asp Trp Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp
 180 185 190
 Pro Thr Leu Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala
 195 200 205
 Val Trp Leu Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg
 210 215 220
 Gly His Leu Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro

225 230 235 240
 Val Val Ile Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser
 245 250 255
 Ala Ala Ala Ser Asn Gly Glu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala
 260 265 270
 Arg Tyr Lys Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp
 275 280 285
 Pro Arg Tyr Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser
 290 295 300
 Leu Pro Asn Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala
 305 310 315 320
 Gln Asn Ala Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg
 325 330 335
 Thr Ile Pro Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp
 340 345 350
 Leu Gly Trp Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln
 355 360 365
 Val Val Gln Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile
 370 375 380
 Thr Asn Val Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp
 385 390 395 400
 Pro Asn Leu Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr
 405 410 415
 Glu Trp Asn Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg
 420 425 430
 Asn Ala Phe Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile
 435 440 445
 Asp Thr Ser Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Gln Cys Arg
 450 455 460
 Pro Thr Gly Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp
 465 470 475 480
 Gly Ser Arg Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln
 485 490 495
 Ala Gly Gly Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile
 500 505 510
 Asp Ala Tyr Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser
 515 520 525
 Gln Pro Gly Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro
 530 535 540
 Met Cys Asp Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr
 545 550 555 560
 Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln
 565 570 575
 Phe Glu Ile Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
 580 585 590

<210> 4

<211> 1773

<212> ADN

<213> Trình tự chưa biết

<220>

<223> AR19G-166c4A-19-2

<400> 4

gcctgcccag	tgctcctacac	ggtagccaac	cagtgggccc	gcggcgccac	cgtgaacgtg	60
acaattacca	acaccaccag	cagcccccac	aacggctgga	cgctgggaatg	ggacttcccc	120
aaccccagcc	agcagatcac	caacctcttg	aacggctcct	actcccaaac	cggacagcac	180
gtgacagtga	ccaatgccgc	ctggaacgga	acaatcccag	ccggcagctc	cgtaaccttc	240
ggattcaaca	tgagctggag	cggatcgaac	ccggcgccca	gcagcttcac	cctgaacgga	300
caaccgtgcg	gcggcaccgc	cggcggtggc	ccccagccca	ccccaccacc	cacgcgcacg	360
cccacaccgg	cggcacctac	cgccaccccc	acgcccgttg	cgcccaccgc	cacccccacc	420
cgcacgcccc	caccgacact	cacctctacg	ccggggccta	caccaacgcc	acccccctca	480
ggaaccattt	tggacaatcc	attcatcgga	gccatcggtt	acgtgaatcc	ggactgggca	540
accaatgtga	tcagccaagc	gaaccaaagc	gctgatccaa	ccttggcggc	tcaaatgcgt	600
aaggtggcca	cctactccac	agctgtcttg	ttggatcgta	tcgccgccat	caccgctggc	660
cgcggattgc	gcgggcattt	ggatgaagca	ctacgccaaa	tgacgaagc	tgccagccg	720
gttgtgatca	cccttgtgat	ctatgatctg	ccaaatcgag	attgctctgc	tgctgcctcc	780
aattggcaat	tactgtgcat	ccagaatgga	ctggcccgcg	acaaagcgga	gttcatcgat	840
cccatcgtag	ccattctctc	agatccccga	tatgccgggc	tacgcacgtg	caccatcatc	900
gaaccggact	ccttacccaa	cctggtcacg	aacctcagca	tcccggcatg	cgagaagct	960
cagaatgcat	atatcgaagg	gatccgctat	gcggtgaacc	ggctgcgga	aattcccaac	1020
gtctacatct	atctggatga	gcgccactca	ggctgggttg	gctgggataa	taactttaat	1080
ggggcagtaa	atctctacac	ccaagtgttg	caagggaatg	atcaagggtt	taacagtatc	1140
gatggattca	tcaccaacgt	tgccaactat	acccccctcg	aagaacccta	tttgcccgat	1200
cccaacctga	ccatcgctgg	gcaacccggt	cgctctgcca	gcttctacga	atggaacccc	1260
tactttgatg	agctggatta	cgctctggct	ctgcgcaacg	cttttatcgg	acgaggcttc	1320
cccagacca	ttgggatgct	catcgatacc	agccgaaaag	gggtggggcg	atgcagctat	1380
gggcaatgca	ggcccacggg	tcccagttca	gataccagca	gcgtgaatgc	ctacgtggac	1440
ggctcgcgag	tagaccgacg	ctatcatcgg	ggcaactggg	gtaaccaggc	gggtgggatc	1500
ggcgagcgcc	ctcagggcgc	accgcggtcc	ggatcgacg	cctacgtgtg	ggtgaaacca	1560
cctggggag	ccgatgggg	cagccaaccc	gggatcgctg	atcccagaca	tcccaacaag	1620

```

aagttcgatc ctatgtgtga tcccaacgga cagagccggt ataactccgc ataccctaact 1680
ggggctctgc ccaacgcgcc ccacgtggg cgggtggtcc cgcagcagtt cgaaatcctg 1740
gtgcggaacg cctatccgcc gatccaaccc taa 1773
<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
<400> 5
gcctgccagg tgcctac 18
<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
<400> 6
ttagggttgg atcggcggat ag 22
<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
<400> 7
gtgatggcct gccaggtgtc ctac 24
<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
<400> 8
atgcagagct cttagggttg gatcggcgga tag 33
<210> 9
<211> 480
<212> PRT
<213> Microbispora sp.
<220>
<223> alpha-L-arabinofuranosidaza
<400> 9
Met Ser Ala Ala Ala Val Ala Thr Leu Val Thr Ala Ala Ala Gly Val
1 5 10 15
Ala Gly Thr His Ala Ala Ser Ala Ala Ala Gly Cys Gln Val Thr
20 25 30
Tyr Thr Val Thr Asn Gln Trp Pro Gly Gly Phe Gly Thr Asn Val Thr
35 40 45
Ile Ser Asn Leu Gly Asp Pro Val Asn Gly Trp Arg Leu Thr Trp Ser
50 55 60
Phe Pro Ala Gly Gln Thr Val Thr Gln Leu Trp Asn Gly Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Gln Ser Gly Ser Gln Val Thr Val Thr Asn Ala Ser Tyr Asn Ala Thr
85 90 95
Ile Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Phe Gly Phe Asn Gly Ser Trp Asn
100 105 110
Gly Ser Asn Pro Ala Pro Ser Phe Ala Leu Asn Gly Val Thr Cys
115 120 125
Thr Gly Gly Val Thr Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr
130 135 140
Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Ser Pro Ser Pro Ser
145 150 155 160
Pro Ser Thr Arg Gln Pro Cys Asp Ile Tyr Ala Ser Gly Gly Thr Pro
165 170 175
Cys Val Ala Ala His Ser Thr Thr Arg Ala Leu Tyr Ala Ala Tyr Thr
180 185 190
Gly Pro Leu Tyr Gln Val Arg Arg Ser Ser Asp Asn Thr Thr Arg Asp
195 200 205
Ile Gly Val Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asp Ser Ala Ala Gln Asp
210 215 220
Ser Phe Cys Ala Asn Thr Asn Cys Val Ile Thr Val Ile Tyr Asp Gln
225 230 235 240
Ser Gly Arg Asn Asn Arg Leu Thr Gln Ala Pro Pro Gly Gly Phe Ala
245 250 255
Gly Pro Ala Ala Gly Gly Tyr Asp Asn Leu Ala Asp Ala Lys Ala Ala
260 265 270
Pro Thr Thr Val Gly Gly His Lys Ala Tyr Gly Val Tyr Val Ala Ala
275 280 285
Gly Thr Gly Tyr Arg Asn Asn Ala Thr Asn Gly Val Ala Lys Gly Asp

```

```

      290              295              300
Gln Pro Glu Gly Met Tyr Ala Ile Phe Asp Gly Thr His Tyr Asn Gly
305              310              315              320
Gly Cys Cys Phe Asp Tyr Gly Asn Ala Glu Thr Asn Ser Arg Asp Asn
      325              330              335
Gly Asn Gly Thr Met Glu Ala Ile Tyr Phe Gly Asn Ile Lys Val Trp
      340              345              350
Gly Tyr Gly Thr Gly Asn Gly Pro Trp Ile Met Ala Asp Leu Glu Asn
      355              360              365
Gly Leu Phe Ser Gly Val Asn Ala Gly Tyr Asn Ala Asn Asp Pro Thr
      370              375              380
Val Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Ala Ile Ile Lys Gly Glu Ser Asn His
385              390              395              400
Trp Ala Ile Arg Gly Gly Asn Ala Gln Ser Gly Gly Leu Ser Thr Phe
      405              410              415
Tyr Asp Gly Lys Arg Pro Asn Val Ser Gly Tyr Asn Pro Met Lys Lys
      420              425              430
Glu Gly Ala Ile Ile Leu Gly Ile Gly Gly Asp Asn Ser His Gly Ser
      435              440              445
Ala Gly Thr Phe Tyr Glu Gly Val Met Thr Ser Gly Tyr Pro Ser Asp
      450              455              460
Ala Thr Glu Ser Ala Val Gln Ala Asn Ile Val Ala Ala Gly Tyr Arg
465              470              475              480
<210> 10
<211> 427
<212> PRT
<213> Trình tự chưa biết
<220>
<223> AR19G-166-QA
<400> 10
Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn Pro Asp Trp
1      5      10      15
Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp Pro Thr Leu
      20      25      30
Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala Val Trp Leu
      35      40      45
Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg Gly His Leu
      50      55      60
Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro Val Val Ile
      65      70      75      80
Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser Ala Ala Ala
      85      90      95
Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala Arg Tyr Lys
      100      105      110
Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp Pro Arg Tyr
      115      120      125
Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser Leu Pro Asn
      130      135      140
Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala Gln Asn Ala
145      150      155      160
Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg Thr Ile Pro
      165      170      175
Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp Leu Gly Trp
      180      185      190
Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln Val Val Gln
      195      200      205
Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile Thr Asn Val
      210      215      220
Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp Pro Asn Leu
225      230      235      240
Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr Glu Trp Asn
      245      250      255
Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ala Phe
      260      265      270
Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile Asp Thr Ser
      275      280      285
Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Gln Cys Arg Pro Thr Gly
      290      295      300
Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp Gly Ser Arg
305      310      315      320
Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln Ala Gly Gly
      325      330      335
Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile Asp Ala Tyr
      340      345      350
Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser Gln Pro Gly
      355      360      365
Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro Met Cys Asp
      370      375      380
Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Leu

```

```

385          390          395          400
Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln Phe Glu Ile
          405          410          415
Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
          420          425
<210> 11
<211> 590
<212> PRT
<213> Trình tự chưa biết
<220>
<223> AR19G-166c4A-19-2-1
<400> 11
Ala Cys Gln Val Ser Tyr Thr Val Ala Asn Gln Trp Pro Gly Gly Ala
 1          5          10          15
Thr Val Asn Val Thr Ile Thr Asn Thr Thr Ser Ser Pro Ile Asn Gly
          20          25          30
Trp Thr Leu Glu Trp Asp Phe Pro Asn Pro Ser Gln Ile Thr Asn
          35          40          45
Leu Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Gln Thr Gly Gln His Val Thr Val Thr
          50          55          60
Asn Ala Ala Trp Asn Gly Thr Ile Pro Ala Gly Ser Ser Val Thr Phe
          65          70          75          80
Gly Phe Asn Met Ser Trp Ser Gly Ser Asn Pro Ala Pro Ser Ser Phe
          85          90          95
Thr Leu Asn Gly Gln Pro Cys Gly Gly Thr Ala Gly Gly Pro Gln
          100          105          110
Pro Thr Pro Thr Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Ala Ala Pro Thr Ala
          115          120          125
Thr Pro Thr Pro Val Ala Pro Thr Ala Thr Pro Thr Arg Thr Pro Thr
          130          135          140
Pro Thr Leu Thr Ser Thr Pro Gly Pro Thr Pro Thr Pro Pro Ser
          145          150          155          160
Gly Thr His Leu Asp Asn Pro Phe Ile Gly Ala Ile Gly Tyr Val Asn
          165          170          175
Pro Asp Trp Ala Thr Asn Val Ile Ser Gln Ala Asn Gln Thr Ala Asp
          180          185          190
Pro Thr Leu Ala Ala Gln Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Ser Thr Ala
          195          200          205
Val Trp Leu Asp Arg Ile Ala Ala Ile Thr Ala Gly Arg Gly Leu Arg
          210          215          220
Gly His Leu Asp Glu Ala Leu Arg Gln Met Gln Gln Ala Gly Gln Pro
          225          230          235          240
Val Val Ile Thr Leu Val Ile Tyr Asp Leu Pro Asn Arg Asp Cys Ser
          245          250          255
Ala Ala Ala Ser Asn Gly Glu Leu Leu Val Ala Gln Asn Gly Leu Ala
          260          265          270
Arg Tyr Lys Ala Glu Phe Ile Asp Pro Ile Val Ala Ile Leu Ser Asp
          275          280          285
Pro Arg Tyr Ala Gly Leu Arg Ile Val Thr Ile Ile Glu Pro Asp Ser
          290          295          300
Leu Pro Asn Leu Val Thr Asn Leu Ser Ile Pro Ala Cys Ala Glu Ala
          305          310          315          320
Gln Asn Ala Tyr Ile Glu Gly Ile Arg Tyr Ala Val Asn Arg Leu Arg
          325          330          335
Thr Ile Pro Asn Val Tyr Ile Tyr Leu Asp Ile Ala His Ser Gly Trp
          340          345          350
Leu Gly Trp Asp Asn Asn Phe Asn Gly Ala Val Asn Leu Tyr Thr Gln
          355          360          365
Val Val Gln Gly Met Asp Gln Gly Phe Asn Ser Ile Asp Gly Phe Ile
          370          375          380
Thr Asn Val Ala Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Pro Asp
          385          390          395          400
Pro Asn Leu Thr Ile Ala Gly Gln Pro Val Arg Ser Ala Ser Phe Tyr
          405          410          415
Glu Trp Asn Pro Tyr Phe Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Leu Arg
          420          425          430
Asn Ala Phe Ile Gly Arg Gly Phe Pro Ser Thr Ile Gly Met Leu Ile
          435          440          445
Asp Thr Ser Arg Asn Gly Trp Gly Gly Cys Ser Tyr Gly Arg Cys Arg
          450          455          460
Pro Thr Gly Pro Ser Ser Asp Thr Ser Ser Val Asn Ala Tyr Val Asp
          465          470          475          480
Gly Ser Arg Val Asp Arg Arg Tyr His Arg Gly Asn Trp Cys Asn Gln
          485          490          495
Ala Gly Gly Ile Gly Glu Arg Pro Gln Ala Ala Pro Arg Ser Gly Ile
          500          505          510
Asp Ala Tyr Val Trp Val Lys Pro Pro Gly Glu Ser Asp Gly Val Ser
          515          520          525
Gln Pro Gly Ile Val Asp Pro Asp Asp Pro Asn Lys Lys Phe Asp Pro

```

530 535 540
 Met Cys Asp Pro Asn Gly Gln Ser Arg Tyr Asn Ser Ala Tyr Pro Thr
 545 550 555 560
 Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro His Ala Gly Arg Trp Phe Pro Gln Gln
 565 570 575
 Phe Glu Ile Leu Val Arg Asn Ala Tyr Pro Pro Ile Gln Pro
 580 585 590
 <210> 12
 <211> 1773
 <212> ADN
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> AR19G-166c4A-19-2-1
 <400> 12
 gcctgccagg tgctcctacac ggtagccaac cagtggcccg gcggcgccac cgtgaacgtg 60
 acaattacca acaccaccag cagcccatc aacggctgga cgctggaatg ggacttcccc 120
 aaccccagcc agcagatcac caacctctgg aacggctcct actccaaaac cggacagcac 180
 gtgacagtga ccaatgccgc ctggaacgga acaatcccag ccggcagctc cgtaaccttc 240
 ggattcaaca tgagctggag cggatcgaac ccggcgccca gcagcttcac cctgaacgga 300
 caaccgtgcg gcggcaccgc cggcggtggc cccagccca cccccacc caccggcagc 360
 cccacacggg cggcacctac cgccaccccc acgcccgttg cgccacccgc cccccacc 420
 cgcacgcccc caccgacact cacctctacg ccggggccta caccaacgcc acccccttca 480
 ggaaccatt tggacaatcc attcatcgga gccatcggt acgtgaatcc ggactgggca 540
 accaatgtga tcagccaagc gaaccaaagc gctgatccaa ccttggcggc tcaaatgctg 600
 aagggtgcca cctactccac agctgtctgg ttggatcgta tcgcgccat caccgctggc 660
 cgcggtatgc gcgggcattt ggatgaagca ctacgcaaaa tgcagcaagc tggccagccg 720
 gttgtgatca cccttctgat ctatgatctg ccaaactcgag attgctctgc tgctgcctcc 780
 aatggcgaat tactggtcgc ccagaatgga ctggcccgt acaaagcgga gttcatcgat 840
 cccatcgtag ccattctctc agatccccga tatcgccggc tacgcatcgt caccatcatc 900
 gaaccggact ccttacccaa cctggtcagc aacctcagca tcccggcatg cgcagaagct 960
 cagaatgcat atatcgagg gatccgctat gcggtgaacc ggctgcggac aattcccaac 1020
 gtctacatct atctggatat cgccactca ggctggttgg gctgggataa taactttaat 1080
 ggggcagtaa atctctacac ccaagttgtg caaggaatgg atcaagggtt taacagtatc 1140
 gatggattca tcaccaacgt tgccaactat acccccctcg aagaacctta ttgcccgat 1200
 cccaacctga ccatcgctgg gcaaccggtt cgctctgcca gcttctacga atggaacccc 1260
 tactttgatg agctggatta cgctctggct ctgcgcaacg cttttatcgg acgaggcttc 1320
 cccagcacca ttgggatgct catcgatacc agccgaaacg ggtggggcgg atgcagctat 1380
 gggcgatgca ggcccacggg tcccagttca gataccagca gcgtgaatgc ctacgtggac 1440
 ggctcgcgag tagaccgacg ctatcatcgg ggcaactggt gtaaccaggc ggtggggatc 1500
 ggcgagcgcc ctcaggccgc accgcggtcc ggtatcgacg cctacgtgtg ggtgaaacca 1560
 cctggggagt ccgatgggt cagccaaccc gggatcgteg atcccagca tcccaacaag 1620
 aagttcgatc ctatgtgtga tcccaacgga cagagccggt ataactccgc atacccaact 1680
 ggggctctgc ccaacgcgcc ccacgctggg cgggtggttc cgcagcagtt cgaaatcctg 1740
 gtgcggaacg cctatcgcc gatccaaccc taa 1773
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
 <400> 13
 atgcagctat gggcgatgca ggcccacggg 30
 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi.
 <400> 14
 cccgtgggcc tgcacgccc atagctgcat 30