



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

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



1-0030153

(51)⁸ C12N 15/63; C12N 15/77; C12P 13/04; (13) B
C12N 15/70

(21) 1-2017-03237

(22) 15/01/2016

(86) PCT/KR2016/000444 15/01/2016

(87) WO 2016/122146 04/08/2016

(30) 10-2015-0014587 29/01/2015 KR

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/12/2017 357A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) LEE, Seung Bin (KR); BAE, Hyun Ae (KR); LEE, Ji Hye (KR); YANG, Young Lyeol (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VÙNG KHỞI ĐỘNG, TRÌNH TỰ ĐIỀU HÒA BIỂU HIỆN CHỨA VÙNG KHỞI ĐỘNG NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM ĐÍCH

(57) Sáng chế đề cập đến vùng khởi động và phương pháp sản xuất sản phẩm đích bằng cách sử dụng vùng khởi động này. Sáng chế cũng đề cập đến trình tự điều hòa biểu hiện chứa vùng khởi động này, vector chứa trình tự điều hòa biểu hiện này và tế bào chủ chứa vector này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vùng khởi động và phương pháp sản xuất sản phẩm đích sử dụng vùng khởi động này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để sản xuất sản phẩm đích, ví dụ như, nguyên liệu L-axit amin, axit hữu cơ, hoặc axit nucleic, với hiệu suất cao bằng cách sử dụng vi sinh vật, cần phải kiểm soát một cách chọn lọc sự biểu hiện của gen liên quan đến một số quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật. Cụ thể, cần phải tăng cường sự biểu hiện của gen đích tham gia vào con đường sinh tổng hợp của sản phẩm đích, và ví dụ, có thể thực hiện cải biến trình tự điều hòa biểu hiện. Sự cải biến trình tự điều hòa biểu hiện này có thể bao gồm, ví dụ, thay thế vùng khởi động tự nhiên cho vùng khởi động mạnh, sự cải biến của vùng khởi động tự nhiên, hoặc sự cải biến của trình tự Shine-Dalgarno (SD). Sự thay thế vùng khởi động tự nhiên cho vùng khởi động mạnh đã được sử dụng nhiều nhất, và về mặt này, việc phát triển vùng khởi động hữu dụng được coi là điều cần thiết.

Tuy nhiên, vùng khởi động mạnh đã biết trong lĩnh vực này bị hạn chế, và có thể chỉ được biểu hiện ở vi sinh vật bị hạn chế. Trong một số trường hợp, vùng khởi động mạnh có thể không thể hiện được các hiệu quả biểu hiện mạnh ở các mức cường độ khác nhau như mong muốn.

Vùng khởi động tac có nguồn gốc từ *Escherichia coli* đã được biết đến một cách rộng rãi là vùng khởi động mạnh trong lĩnh vực này. Trong trường hợp chi *Corynebacterium*, vùng khởi động mới đã được phát triển bằng cách cải biến vùng khởi động tự nhiên (xem tài liệu Gene, 102, 93-98, 1991; Microbiology, 142, 1297-1309, 1996). Ví dụ, đã có báo cáo rằng vùng khởi động có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenesis* có hoạt tính cao hơn khoảng 10% so với hoạt tính của vùng khởi động tac có nguồn gốc từ *E. coli* (xem tài liệu Biotechnol. Lett. 25, 1311-1316, 2003). Ngoài ra, với tư cách là vùng khởi động mạnh có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenesis*, vùng khởi động của Pcj1 đến Pcj7 với các mức cường độ khác nhau đã được phát triển và có hoạt tính vùng khởi động mạnh lớn hơn ít nhất là 10 lần hoạt

tính của vùng khởi động tac (xem tài liệu KR 10-0620092). Ngoài ra, vùng khởi động có nguồn gốc từ *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) được báo cáo là có hoạt tính mạnh hơn so với hoạt tính của vùng khởi động tac, nhưng có khó khăn trong việc biểu hiện ở vi sinh vật không phải là vi sinh vật thuộc chi *Brevibacterium* (xem tài liệu US 5,593,781).

Về mặt này, khi các tác giả sáng chế nghiên cứu vùng bao gồm trình tự vùng khởi động mà có thể có mức cường độ khác nhau ở nhiều vi sinh vật khác nhau, phát hiện thấy vùng khởi động mới được tổng hợp theo sáng chế này được biểu hiện ở nhiều vi sinh vật khác nhau và thể hiện hiệu quả biểu hiện mạnh hơn nhiều so với hiệu quả biểu hiện của các vùng khởi động hiện có đã biết trong lĩnh vực này, từ đó tạo ra sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vùng khởi động mới, trình tự điều hòa biểu hiện có chứa vùng khởi động mới, vectơ chứa vùng khởi động mới, tế bào chủ chứa vectơ và phương pháp sản xuất sản phẩm đích bằng cách sử dụng tế bào chủ này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một hoặc nhiều phương án ví dụ, sáng chế đề xuất vùng khởi động có chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1. Trong sáng chế này, vùng khởi động được gọi là "vùng khởi động o2 (sau đây, được đề cập đến là "Po2")".

Thuật ngữ "vùng khởi động" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ vùng ADN mà ARN polymeraza được kết hợp vào để cho phép bắt đầu quá trình phiên mã của gen mà được liên kết có điều khiển với vùng khởi động, và có thể được nằm ở đầu 5' của vị trí bắt đầu quá trình phiên mã của mARN.

Polynucleotit có hoạt tính vùng khởi động như được dùng trong bản mô tả này có thể được cải biến đến một số mức độ theo các nghiên cứu gần đây về một vài kỹ thuật, chẳng hạn như kỹ thuật tiến hóa có định hướng hoặc kỹ thuật gây đột biến định hướng vị trí. Ví dụ, vùng khởi động có độ tương đồng lớn hơn hoặc bằng 70%, lớn hơn hoặc bằng 80%, lớn hơn hoặc bằng 90%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 95% so với trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này.

Thuật ngữ "độ tương đồng" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ mức độ (được thể hiện theo tỉ lệ phần trăm) đồng nhất trình tự giữa các trình tự polynucleotit. Trong bản mô tả này, độ tương đồng của trình tự đồng nhất với trình tự polynucleotit nhất định hoặc trình tự có hoạt tính tương tự với hoạt tính của trình tự polynucleotit nhất định được biểu diễn dưới dạng "% độ tương đồng". Ví dụ, độ tương đồng của các trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng phần mềm tiêu chuẩn, ví dụ như, BLAST 2.0, để tính các tham số chẳng hạn như điểm, độ đồng nhất, và độ tương tự. Theo cách khác, độ tương đồng của các trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự theo phương pháp lai hóa được thực hiện trong điều kiện nghiêm ngặt đã xác định. Các điều kiện đã xác định và thích hợp với phương pháp lai hóa có thể được xác định khi xét đến các phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem tài liệu *Infra in Sambrook et al.*, 1989).

Theo một hoặc nhiều phương án ví dụ, sáng chế đề xuất trình tự điều hòa biểu hiện, mà kiểm soát sự biểu hiện của gen đích, có chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.

Thuật ngữ "trình tự điều hòa biểu hiện" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ trình tự ADN dùng cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa mà được liên kết có điều khiển với trình tự ADN ở sinh vật chủ. Trình tự điều hòa biểu hiện này có thể bao gồm, vùng khởi động cần để bắt đầu quá trình phiên mã, trình tự vùng điều khiển để điều hòa quá trình phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự để điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Ví dụ, trình tự điều hòa biểu hiện thích hợp đối với sinh vật nhân sơ có thể bao gồm vùng khởi động, trình tự vùng điều khiển, và vị trí liên kết ribosom, nhưng không giới hạn ở đó. Trình tự điều hòa biểu hiện bao gồm Po2 theo sáng chế này có thể được tạo ra, nếu cần, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra trình tự điều hòa biểu hiện như mô tả ở trên.

Theo một hoặc nhiều phương án ví dụ, sáng chế đề xuất vector bao gồm trình tự điều hòa biểu hiện và gen đích liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện.

Thuật ngữ "liên kết có điều khiển" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ liên kết giữa trình tự điều hòa biểu hiện mà kiểm soát gen đích (ví dụ như, vùng khởi động) và các trình tự nucleotit khác. Về mặt này, trình tự điều hòa biểu hiện có thể có

khả năng kiểm soát quá trình phiên mã và/hoặc quá trình dịch mã của các trình tự nucleotit khác.

Thuật ngữ "vector" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ sản phẩm ADN bao gồm các trình tự bazơ của polynucleotit để mã hóa protein đích mà được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện thích hợp để biểu hiện protein đích. Ngoài ra, nhiều trình tự nucleotit có thể được liên kết với hoặc được tái tổ hợp với vector sao cho trình tự ADN của gen được chọn có trình tự không được dịch mã ở đầu 3' thích hợp, và vùng khởi động có thể được đưa vào tế bào. Vector có thể được dùng để biến nạp trong tế bào chủ thích hợp, và sau đó, có thể được sao chép bất chấp hệ gen của tế bào chủ. Theo cách khác, vector có thể được hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ. Ngoài ra, vector có thể bao gồm vùng khởi động hoặc biến thể của nó và gen đích, và hơn thế nữa, có thể bao gồm điểm mở đầu sao chép, vị trí điều hòa vùng khởi động, vị trí liên kết ribosom, vị trí kết thúc phiên mã, gen đánh dấu chọn lọc, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Vector dùng trong sáng chế này không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể được sao chép trong tế bào chủ, và vector bất kỳ có sẵn trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ về vector thường dùng trong lĩnh vực này bao gồm vector plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, vector cosmit, vector virus, và vector thể thực khuẩn. Ví dụ về vector thể thực khuẩn và cosmit bao gồm pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, và Charon21A, và ví dụ về vector plasmid bao gồm vector gốc pBR, vector gốc pUC, vector gốc pBluescriptII, vector gốc pGEM, vector gốc pTZ, vector gốc pCL, và vector gốc pET, nhưng các vector này không bị giới hạn ở đó.

Gen đích dùng để chỉ gen mã hóa sản phẩm được biểu hiện ở lượng dư. Ví dụ, gen đích có thể là gen tham gia vào việc sản xuất sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axit amin (ví dụ như, L-axit amin), axit hữu cơ, và tổ hợp của chúng. Chi tiết là, gen đích có thể là gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp axit amin, gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp axit hữu cơ, hoặc gen mã hóa protein tham gia vào việc xuất ra sản phẩm đích, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một hoặc nhiều phương án ví dụ, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm vector, trong đó vector này bao gồm trình tự điều hòa biểu hiện mà kiểm soát gen đích và bao

gồm vùng khởi động có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và gen đích mà được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện.

Tế bào chủ không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật dùng làm tế bào chủ có khả năng đưa vector vào bao gồm trình tự điều hòa biểu hiện mà kiểm soát gen đích và bao gồm vùng khởi động có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và gen đích mà được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện. Tế bào chủ có thể là cả tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn, nhưng trong phương án ví dụ, có thể là tế bào nhân sơ. Ví dụ, tế bào chủ có thể bao gồm chủng vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Brevibacterium*. Ví dụ, tế bào chủ có thể là chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc gen *Escherichia*. Ví dụ, tế bào chủ có thể là chủng vi sinh vật thuộc *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum* hoặc *Brevibacterium lactofermentum*.

Việc đưa vector vào có thể được thực hiện bằng cách, như được mô tả trong lĩnh vực này, chọn lựa kỹ thuật thích hợp theo tế bào chủ. Việc đưa vector vào có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, điện di, sốc nhiệt, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, phương pháp lithi axetat-DMSO, hoặc tổ hợp của chúng, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một hoặc nhiều phương án ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường, trong đó tế bào chủ có chứa vector mà bao gồm trình tự điều hòa biểu hiện có chứa vùng khởi động có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và gen đích mà được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện; và thu hồi sản phẩm đích từ tế bào chủ hoặc môi trường chứa tế bào chủ được nuôi cấy.

Sản phẩm đích có thể được chọn từ nhóm bao gồm axit amin (ví dụ như, L-axit amin), axit hữu cơ, và tổ hợp hợp của chúng. Thuật ngữ "axit amin" hoặc "L-axit amin" như được dùng trong bản mô tả này thường dùng để chỉ đơn vị cơ bản của protein cấu thành cơ thể sống, trong đó nhóm axit amin và nhóm carboxyl được liên kết với cùng nguyên tử cacbon. Axit amin có thể được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, threonin, serin, xystein, xystin, methionin, axit aspartic, asparagin, axit

glutamic, diiodotyrosin, lysin, arginin, histidin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, prolin, oxyprolin, và tổ hợp của chúng, nhưng không giới hạn ở đó. Thuật ngữ "axit hữu cơ" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ hợp chất hữu cơ có tính axit, và ví dụ, có thể bao gồm hợp chất hữu cơ có nhóm carboxyl và nhóm sulfonic. Axit hữu cơ này có thể bao gồm, ví dụ, axit lactic, axit axetic, axit suxinic, axit butyric, axit palmitic, axit oxalic, axit tartaric, axit propionic, axit hexenoic, axit capric, axit caprylic, axit valeric, hoặc axit xitric, nhưng không giới hạn ở đó.

Việc nuôi cấy tế bào chủ có thể được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Môi trường dùng để nuôi cấy tế bào chủ có thể bao gồm, dưới dạng nguồn của đường, đường và hydrat cacbon, chẳng hạn như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo, chẳng hạn như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; axit béo, chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu, chẳng hạn như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ, chẳng hạn như axit axetic, riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Môi trường dùng để nuôi cấy tế bào chủ có thể bao gồm, dưới dạng nguồn của nitơ, pepton, chất chiết nấm men, chất chiết thịt, chất chiết mạch nha, nước ngâm ngô, bột đậu tương, và ure, hoặc hợp chất vô cơ, chẳng hạn như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, hoặc amoni nitrat, riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Môi trường dùng để nuôi cấy tế bào chủ có thể bao gồm, dưới dạng nguồn của phospho, kali dihydro phosphat hoặc dikali hydro phosphat, hoặc muối chứa natri tương ứng của nó, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Môi trường dùng để nuôi cấy tế bào chủ có thể bao gồm, muối của kim loại, chẳng hạn như magie sulfat hoặc sắt sulfat, mà cần cho sự phát triển, nhưng muối của kim loại không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy tế bào chủ, các chất sinh trưởng thiết yếu, chẳng hạn như axit amin và vitamin, hoặc các tiền chất thích hợp có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Các nguyên liệu này có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy tế bào chủ theo phương thức thích hợp, và ví dụ, có thể được bổ sung theo mẻ hoặc liên tục.

Hơn nữa, trong quá trình nuôi cấy tế bào chủ, các hợp chất, chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric, có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo phương thức thích hợp để điều hòa độ pH của môi trường

nuôi cấy. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy tế bào chủ, chất chống tạo bọt, chẳng hạn như polyglycol este của axit béo, có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự tạo thành bọt. Để duy trì điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ như, không khí) có thể được đưa vào trong môi trường nuôi cấy. Ở đây, nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ khoảng 20°C đến khoảng 45°C, ví dụ, từ khoảng 25°C đến khoảng 40°C. Ngoài ra, việc nuôi cấy tế bào chủ có thể được duy trì đến khi đạt được lượng mong muốn của sản phẩm đích, và về mặt này, việc nuôi cấy tế bào chủ có thể tiếp tục trong thời gian từ khoảng 10 giờ đến khoảng 160 giờ.

Việc thu hồi sản phẩm đích từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy có chứa tế bào chủ được nuôi cấy có thể được thực hiện (tức là, được tách hoặc được thu hồi) thông qua phản ứng thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, phản ứng thích hợp có thể được thực hiện theo cách xử lý sử dụng chất làm kết tủa protein (tức là, phương pháp gây kết tủa bằng muối), ly tâm, chiết, nghiền bằng siêu âm, siêu lọc, thẩm tách, các kỹ thuật sắc ký khác, chẳng hạn như sắc ký lọc phân tử (tức là, lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, và tổ hợp của chúng, nhưng không giới hạn ở đó. Về mặt này, sản phẩm đích được sản xuất có thể được thu gom, được thu hồi, hoặc được tách từ tế bào chủ hoặc môi trường bao gồm tế bào chủ được nuôi cấy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1: Chuẩn bị vector tái tổ hợp có chứa vùng khởi động mới và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

(1) Chuẩn bị vector tái tổ hợp có chứa Po2 và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

Đối với việc tổng hợp vùng khởi động mà gây ra sự biểu hiện của gen đích, các trình tự của các vùng khởi động khác nhau có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* và vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* đã được phân tích, từ đó tổng hợp vùng khởi động có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1. Vùng khởi động đã được tổng hợp này được đề cập đến là vùng khởi động o2 (sau đây, gọi là "Po2"). Để đo hoạt tính Po2

để gây ra sự biểu hiện gen đích, Po2 được liên kết có điều khiển với khung đọc mở (open reading frame - ORF) của gen GFP sao cho vector tái tổ hợp được chuẩn bị. Sau đó, mỗi chủng *Corynebacteria* và *E. coli* được biến nạp bằng vector tái tổ hợp này, từ đó mỗi chủng biến nạp của *Corynebacteria* và *E. Coli* được chuẩn bị.

Ngoài ra, để chuẩn bị chủng có khả năng sản xuất L-axit amin được tăng cường, ví dụ như, L-arginin, hoặc axit amin phân nhánh, chẳng hạn như L-valin, là một ví dụ của sản phẩm đích, Po2 được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của gen sinh tổng hợp đối với arginin hoặc valin.

(1.1) Chuẩn bị vector pECCG117-Po2-gfp và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

(1.1.1) Chuẩn bị vector

Tiến hành PCR bằng cách sử dụng Po2 đã được tổng hợp làm mẫu và bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3 bao gồm các vị trí giới hạn Kpn I/EcoR V. Tiến hành PCR theo các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 5 phút, biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 30 giây, gắn ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 30 giây, trong đó các chu kỳ được thực hiện 30 lần. Sau đó, quá trình polyme hóa được thực hiện lại trên các chủng ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút, từ đó thu được Po2 có chiều dài khoảng 100 bp.

Tiến hành PCR bằng cách sử dụng vector pGFPuv (sản xuất bởi Clontech, Mỹ) làm mẫu và bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 bao gồm các vị trí giới hạn PstI/EcoR V. Tiến hành PCR theo các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 5 phút, biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 30 giây, gắn ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút, trong đó các chu kỳ được thực hiện 30 lần. Sau đó, quá trình polyme hóa được thực hiện lại ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút, từ đó thu được SEQ ID NO: 6 bao gồm ORF của gen GFP.

Po2 được xử lý bằng các enzym giới hạn PstI và EcoR V và ORF của gen GFP được xử lý bằng các enzym giới hạn Kpn I và EcoR V, ở các vị trí PstI và Kpn I của vector con thoi pECCG117 (xem tài liệu Biotechnology letters vol 13, No. 10, p. 721-726 (1991)) mà có thể được biểu hiện ở *E. coli* và *Corynebacteria*. Sau đó, Po2 và ORF đã xử lý của gen GFP được liên kết có điều khiển với nhau bằng cách sử dụng enzym

liên hợp ADN, từ đó sản xuất vector tái tổ hợp trong đó Po2 và gen GFP được liên kết với nhau. Ở đây, vector tái tổ hợp được gọi là pECCG117-Po2-gfp.

(1.1.2) Chuẩn bị chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 được biến nạp bằng mỗi vector trong số vector pECCG117 và vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-gfp bằng phương pháp xung điện, và sau đó, thu được chủng biến nạp từ môi trường chọn lọc chứa 25 mg/l kanamycin. Mỗi chủng thu được mà đã được biến nạp bằng vector pECCG117 và vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-gfp được gọi là ATCC13032/pECCG117 và ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp.

Ngoài ra, *E. coli* DH5 α được biến nạp bằng vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-gfp bằng phương pháp sốc nhiệt, và sau đó, thu được chủng biến nạp từ môi trường thạch Luria-Bertani (LB) chứa 25 mg/l kanamycin. Các chủng thu được được gọi là DH5 α /pECCG117-Po2-gfp và được gán ký hiệu nộp lưu "CA01-2290". CA01-2290 được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM) vào ngày 23 tháng 10 năm 2014, với số đăng ký KCCM11591P, theo điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc nộp lưu chủng vi sinh nhằm tiến hành các thủ tục về sáng chế.

(1.2) Chuẩn bị vector pECCG117-Po2-argJ và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

(1.2.1) Chuẩn bị vector

Đối với việc tổng hợp vector trong đó gen sinh tổng hợp chính, ví dụ như, gen argJ (Ncgl1341, SEQ ID NO: 7) mã hóa ornithin axetyltransferaza/N-axetylglutamat syntaza chức năng kép, để tăng cường sản xuất arginin được biểu hiện bởi Po2, vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-gfp được sử dụng để điều chế vector pECCG117-Po2-argJ.

Chi tiết hơn, tiến hành PCR trên chủng bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 làm mẫu và bộ đoạn môi SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, từ đó đảm bảo các mảnh ADN bao gồm gen argJ. Tiến hành PCR theo các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 58°C trong thời gian 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 2 phút bằng cách sử dụng Pfu polymeraza, trong đó các chu kỳ này được thực hiện 30 lần. Tiếp theo,

mảnh có chiều dài khoảng 1.201 bp và bao gồm các vị trí enzym giới hạn EcoRV và PstI 3' ở đầu 5' được khuếch đại. Các mảnh đã được khuếch đại này được tạo ra bằng PCR được tinh chế, được trộn với vector pECCG117-Po2-gfp mà các enzym giới hạn EcoRV và PstI được xử lý, và sau đó, được kết hợp với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng nội dung hợp, từ đó chuẩn bị vector tái tổ hợp, mà được gọi là pECCG117-Po2-argJ.

(1.2.2) Chuẩn bị chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector

Corynebacterium glutamicum KCCM10741P, là chủng sản xuất arginin, được biến nạp bằng vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-argJ bằng phương pháp xung điện (xem tài liệu KR 10-0791659), và sau đó, thu được chủng biến nạp từ môi trường chọn lọc chứa 25 mg/l kanamycin. Chủng thu được được gọi là KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ.

(1.3) Chuẩn bị vector pECCG117-Po2-ilvE và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

(1.3.1) Điều chế vector

Đối với việc tổng hợp vector trong đó gen sinh tổng hợp chính, ví dụ như, gen ilvE (Ncgl2123, SEQ ID NO: 10) mã hóa cho axit amin aminotransferaza có mạch phân nhánh, để tăng cường sản xuất valin được biểu hiện bởi Po2, vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-gfp được sử dụng để chuẩn bị vector pECCG117-Po2-ilvE.

Chi tiết hơn, tiến hành PCR trên chủng bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 làm mẫu và bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, từ đó đảm bảo các mảnh ADN bao gồm gen ilvE. Tiến hành PCR theo các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 58°C trong thời gian 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 2 phút bằng cách sử dụng Pfu polymeraza, trong đó các chu kỳ này được thực hiện 30 lần. Tiếp theo, mảnh có chiều dài khoảng 1.201 bp và bao gồm các vị trí enzym giới hạn EcoRV và PstI 3' ở đầu 5' được khuếch đại. Các mảnh đã được khuếch đại được tạo ra bằng PCR được tinh chế, được trộn với vector pECCG117-Po2-gfp mà các enzym giới hạn EcoRV và PstI được xử lý, và sau đó, được kết hợp với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng nội dung hợp, từ đó chuẩn bị vector tái tổ hợp, mà được gọi là pECCG117-Po2-ilvE.

(1.3.2) Chuẩn bị chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector

Corynebacterium glutamicum KCCM111201P, là chủng sản xuất valin, được biến nạp bằng vector tái tổ hợp pECCG117-Po2-ilvE bằng phương pháp xung điện (xem tài liệu KR 10-1117022), và sau đó, thu được chủng biến nạp từ môi trường chọn lọc chứa 25 mg/l kanamycin. Các chủng thu được được gọi là KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE.

Ví dụ so sánh 1: Điều chế vector tái tổ hợp bao gồm vùng khởi động đối chứng và chủng biến nạp bằng cách sử dụng vector này

Để đo hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích, gen GFP được sử dụng để liên kết có điều khiển vùng khởi động mạnh đã biết (ví dụ như, Ptrc, Pcj1, Pcj4, hoặc Pcj7 (xem tài liệu KR 10-0620092)) hoặc vùng khởi động kiểu dại (ví dụ như, aceEP (WT)) với ORF của gen GFP để chuẩn bị vector tái tổ hợp. Sau đó, mỗi chủng *Corynebacteria* và *E. coli* được biến nạp bằng vector tái tổ hợp, từ đó chuẩn bị mỗi chủng biến nạp của *Corynebacteria* và *E. coli*.

Ngoài ra, để đánh giá chủng biến nạp bao gồm gen sinh tổng hợp chính bằng cách sử dụng Po2 để tăng cường sản xuất gen đích, mỗi chủng biến nạp bao gồm gen sinh tổng hợp chính để tăng cường sản xuất arginin hoặc chủng biến nạp bao gồm gen sinh tổng hợp chính để tăng cường sản xuất valin được chuẩn bị.

(1) Chuẩn bị vector biểu hiện gfp có vùng khởi động khác với Po2 về mặt hoạt tính so với Po2 và chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum*

Các trình tự bazơ của aceEP(WT) được đảm bảo dựa trên Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (NIH Genbank), và tiến hành PCR trên đó bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại làm mẫu và bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14 bao gồm các vị trí giới hạn Kpn I/EcoR V. Tiến hành PCR theo cách tương tự như trong (1.1) của ví dụ 1, từ đó chuẩn bị vector tái tổ hợp gọi là pECCG117-aceEP(WT)-gfp.

Các chủng *Corynebacterium glutamicum* được biến nạp bằng mỗi vector trong số các vector pECCG117-aceEP(WT)-gfp đã được chuẩn bị và vector pECCG117-Pcj1-gfp, pECCG117-Pcj4-gfp, và pECCG117-Pcj7-gfp (xem tài liệu KR 10-0620092), theo cách tương tự như trong (1.1) của ví dụ 1, từ đó chuẩn bị chủng biến nạp mà lần lượt được

gọi là ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp và ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp.

(2) Chuẩn bị vector biểu hiện gfp có vùng khởi động khác với Po2 về mặt hoạt tính so với Po2 và chủng biến nạp của *E. coli*

Các trình tự bazơ của Ptrc được đảm bảo dựa trên Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (NIH Genbank), và tiến hành PCR trên đó bằng cách sử dụng pTrc99A (NCBI GenBank, M22744) làm mẫu và bộ đoạn môi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 bao gồm các vị trí giới hạn Kpn/EcoR. Tiến hành PCR theo cách tương tự như trong (1.1) của ví dụ 1, từ đó chuẩn bị vector tái tổ hợp gọi là pECCG117-Ptrc-gfp.

Các chủng *E. coli* là mỗi vector trong số vector pECCG117-Ptrc-gfp đã được điều chế và vector pECCG117-Pcj1-gfp và pECCG117-Pcj4-gfp, theo cách tương tự như trong (1.1) của ví dụ 1, từ đó chuẩn bị các chủng biến nạp mà lần lượt được gọi là DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp, DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp và DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp.

(3) Chuẩn bị chủng biến nạp có vùng khởi động khác với Po2 về khả năng sản xuất sản phẩm đích so với Po2

(3.1) Chuẩn bị chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum*, chủng biến nạp này có khả năng sản xuất arginin

Vector pECCG117-Pcj7-gfp được sử dụng để chuẩn bị vector gọi là pECCG117-Pcj7-argJ theo cách tương tự như trong (1.2.1) của ví dụ 1, ngoại trừ việc tiến hành PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 17.

Sau đó, chủng biến nạp được chuẩn bị bằng cách sử dụng vector pECCG117-Pcj7-argJ theo cách tương tự như trong (1.2.2) của ví dụ 1, và được gọi là KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ.

(3.2) Chuẩn bị chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum*, chủng biến nạp này có khả năng sản xuất valin

Vector pECCG117-Pcj7-gfp được sử dụng để chuẩn bị vector gọi là pECCG117-Pcj7-ilvE theo cách tương tự như trong mục (1.3.1) của ví dụ 1, ngoại trừ việc tiến hành PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 18.

Sau đó, chủng biến nạp được chuẩn bị bằng cách sử dụng vector pECCG117-Pcj7-ilvE theo cách tương tự như trong mục (1.3.2) của ví dụ 1, và được gọi là KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE.

Ví dụ 2: Xác nhận hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích

(1) Xác nhận hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích ở *Corynebacterium glutamicum*

Để đo hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích ở chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum*, phép đo hoạt tính protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP) của chủng biến nạp gọi là ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp theo mục (1.1.2) của ví dụ 1 được so sánh với phép đo hoạt tính GFP của mỗi chủng biến nạp gọi là ATCC13032/pECCG117 theo (1.1.2) của ví dụ 1 và ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp, và ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp theo (1) của ví dụ so sánh 1.

Mỗi chủng trong số các chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum* ở trên được ủ trong chai có góc loại 250 ml chứa 25 ml của môi trường mầm theo tỉ lệ thể tích bằng 1:20, và sau đó, được nuôi cấy lắc (ở tốc độ khoảng 200 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C cho đến khi các chủng được sinh trưởng trong pha giữa nuôi cấy ($OD_{600}=10,0$). Sau khi hoàn thành nuôi cấy, thu gom các tế bào bằng cách ly tâm (ở tốc độ khoảng 5.000 vòng/phút trong thời gian khoảng 15 phút). Rửa các tế bào đã thu gom được hai lần bằng dung dịch đệm Tris.HCl 0,1% (độ pH 8,0), và sau đó, tạo huyền phù trong cùng dung dịch đệm để có độ đục ở 610 nm khoảng 160. Phá hủy các tế bào trong thời gian 6 phút bằng cách sử dụng máy đập hạt sau khi hạt thủy tinh được bổ sung ở 1,25 g/1,5 ml huyền phù. Thu gom dịch nổi bề mặt chứa chất chiết tế bào bằng cách ly tâm (ở tốc độ khoảng 15.000 vòng/phút trong thời gian khoảng 20 phút), và sau đó, đo định lượng nồng độ protein ở trong đó theo phương pháp Bradford (xem tài liệu Bradford, M.M 1976. Anal. Biochem. 72:248-254). Sau đó, cùng lượng đó của chất chiết tế bào được chiếu xạ bằng ánh sáng ở chiều dài bước sóng kích thích bằng 488 nm bằng cách sử dụng phương pháp của Laure Gory hoặc phương pháp tương tự, và ánh sáng ở chiều dài bước sóng phát xạ bằng 511 nm được đo bằng cách sử dụng quang phổ kế LS-50B (Perkin-Elmer), bằng cách đó xác định sự biểu hiện của gen GFP. Kết quả của phép đo hoạt tính GFP ở mỗi chủng được thể hiện trong bảng 1.

Môi trường mầm

20 g glucoza, 5 g amoni sulfat, 5 g chất chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 150 μg biotin, 1,5 mg thiamin hydroclorua, 3 mg axit canxi panthothenic, 3 mg nicotinamit (trên 1 l nước chung cất), và độ pH 7,2

Bảng 1

Cường độ huỳnh quang ở *Corynebacterium glutamicum*

Chủng	Cường độ huỳnh quang
ATCC13032/pECCG117	0,0
ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp	2339,5
ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp	170,7
ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp	589,6
ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp	920,5
ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp	270,4

Như được thể hiện trong kết quả của bảng 1, xác nhận được rằng Po2 có hoạt tính vùng khởi động ở *Corynebacterium glutamicum*, và chủng được gọi là ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp thể hiện cường độ huỳnh quang lớn bằng ít nhất là 13 lần cường độ huỳnh quang của chủng ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp kiểu dại. Ngoài ra, xác nhận được rằng chủng gọi là ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp thể hiện cường độ huỳnh quang ở mức độ cao hơn nhiều so với cường độ huỳnh quang của mỗi chủng gọi là ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp, ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp, và ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp bằng cách sử dụng vùng khởi động mạnh đã biết (ví dụ như, Pcj1, Pcj4, và Pcj7). Do đó, xác nhận được rằng Po2 thích hợp làm vùng khởi động mạnh để biểu hiện gen đích.

(2) Xác nhận hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích ở *E. coli*

Để đo hoạt tính Po2 để gây ra sự biểu hiện gen đích ở chủng biến nạp của *E. coli*, phép đo hoạt tính GFP của chủng biến nạp gọi là DH5 α /pECCG117-Po2-gfp theo (1.1.2) của ví dụ 1 được so sánh với phép đo hoạt tính GFP của mỗi chủng biến nạp gọi là DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp, DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp, và DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp theo (2) của ví dụ so sánh 2.

Mỗi chủng biến nạp của *E. coli* ở trên được ủ trong chai có góc loại 250 ml chứa 25 ml môi trường LB chứa kanamycin tỉ lệ thể tích bằng 1:20, và sau đó, nuôi cấy lắc (ở tốc độ khoảng 200 vòng/phút) ở nhiệt độ cho đến khi các chủng được sinh trưởng

trong pha giữa nuôi cấy ($OD_{600}=3,0$). Sau khi hoàn thành nuôi cấy, thu gom các tế bào bằng cách ly tâm (ở tốc độ khoảng 5.000 vòng/phút trong thời gian khoảng 15 phút), rửa hai lần bằng dung dịch đệm Tris.HCl 0,1% (độ pH 8,0), tạo huyền phù trong cùng dung dịch đệm, phá hủy bằng cách nghiền bằng siêu âm, và sau đó, đưa đi ly tâm (ở tốc độ khoảng 15.000 vòng/phút trong thời gian khoảng 20 phút) để thu được dịch nổi bề mặt chứa chất chiết tế bào. Đo định lượng dịch nổi bề mặt về nồng độ protein ở trong đó theo phương pháp Bradford. Sau đó, cùng lượng đó của chất chiết tế bào được chiếu xạ bằng ánh sáng ở chiều dài bước sóng kích thích bằng 488 nm bằng cách sử dụng phương pháp của Laure Gory hoặc phương pháp tương tự, và ánh sáng ở chiều dài bước sóng phát xạ bằng 511 nm được đo bằng cách sử dụng quang phổ kế LS-50B (Perkin-Elmer), từ đó xác định sự biểu hiện của gen GFP. Kết quả của phép đo hoạt tính GFP trong mỗi chủng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Cường độ huỳnh quang ở *E. coli*

Chủng	Cường độ huỳnh quang
DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp	287,0
DH5 α /pECCG117-Po2-gfp	248,9
DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp	3041,9
DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp	135,1

Như được thể hiện trong kết quả của bảng 2, xác nhận được rằng Po2 có hoạt tính vùng khởi động ở *E. coli*, và rằng chủng gọi là DH5 α /pECCG117-Po2-gfp thể hiện cường độ huỳnh quang ở mức độ tương tự với cường độ huỳnh quang của chủng DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp, mà đã biết là vùng khởi động mạnh và cao hơn so với cường độ huỳnh quang của chủng DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp. Do đó, xác nhận được rằng Po2 thích hợp làm vùng khởi động mạnh để biểu hiện gen đích ở *E. coli*.

Ví dụ 3: Đánh giá các chủng để tăng cường khả năng sản xuất sản phẩm đích

(1) Đánh giá các chủng về tăng cường sản xuất arginin

Đối với việc đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất arginin, khi gen sinh tổng hợp chính đối với arginin, tức là, gen argJ, được biểu hiện bằng cách sử dụng Po2, chủng KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ theo (1.2.2) của ví dụ 1, mà được dùng làm chủng để tăng cường sản xuất gen argJ, được so sánh với chủng không biến nạp KCCM10741P (không có khả năng sản xuất arginin được biến nạp) và chủng

KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ theo (3.1) của ví dụ so sánh 1 về khả năng sản xuất arginin.

Ủ 1 vòng của mỗi chủng biến nạp ở trên trong chai có góc loại 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất, và sau đó, nuôi cấy lắc ở tốc độ khoảng 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, đo sự sản xuất L-arginin bằng HPLC. Kết quả của phép đo sự sản xuất L-arginin được thể hiện trong bảng 3.

Môi trường sản xuất

Glucosa 6%, amoni sulfat 3%, monokali phosphat 0,1%, magie sulfat heptahydrat 0,2%, nước ngâm ngô (corn steep liquor - CSL) 1,5 %, NaCl 1%, chất chiết nấm men 0,5 %, biotin 100 µg/l, và độ pH 7,2

Bảng 3

Sản xuất arginin ở KCCM10741P

Chủng	OD	Nồng độ arginin (g/l)
KCCM10741P	89	3,1
KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ	85	4,6
KCCM10741P/pECCG117- Po2-argJ	82	5,7

Như được thể hiện trong kết quả của bảng 3, xác nhận được rằng Po2 dẫn đến sự sản xuất arginin được cải thiện ở *Corynebacterium glutamicum* trong đó sự biểu hiện của gen argJ được tăng cường. Cụ thể, sự sản xuất arginin ở *Corynebacterium glutamicum* được tăng lên khoảng 84% so với sự sản xuất arginin ở chủng đối chứng, và được tăng lên khoảng 23% so với sự sản xuất arginin ở chủng KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ. Do đó, xác nhận được rằng Po2 ảnh hưởng đến sự biểu hiện được tăng cường của gen argJ.

(2) Đánh giá các chủng về tăng cường sản xuất L-valin

Đối với việc đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất valin, khi gen sinh tổng hợp chính đối với valin, tức là, gen ilvE, được biểu hiện bằng cách sử dụng Po2, chủng KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE theo (1.3.2) của ví dụ 1, mà được dùng làm chủng để tăng cường sản xuất gen ilvE, được so sánh với chủng không biến nạp gọi là KCCM11201P (không có khả năng sản xuất L-valin được biến nạp) và chủng gọi là KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE theo (3.2) của ví dụ so sánh 1 về khả năng sản xuất L-valin.

Ủ 1 vòng của mỗi chủng biến nạp ở trên trong chai có góc loại 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất, và sau đó, nuôi cấy lắc ở tốc độ khoảng 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, việc sản xuất L-valin được đo bằng HPLC. Kết quả của phép đo sự sản xuất L-valin được thể hiện trong bảng 4.

Môi trường sản xuất

Glucosa 5%, amoni sulfat 2%, monokali phosphat 0,1%, magie sulfat heptahydrat 0,05%, CSL 2,0%, biotin 200 µg/l, và độ pH 7,2

Bảng 4

Sản xuất valin ở KCCM11201P

Chủng	Nồng độ valin (g/l)
KCCM11201P	2,8
KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE	3,3
KCCM11201P/pECCG117- Po2-ilvE	3,7

Như được thể hiện trong kết quả của bảng 4, xác nhận được rằng Po2 dẫn đến sự sản xuất valin được cải thiện ở *Corynebacterium glutamicum* trong đó sự biểu hiện của gen ilvE được tăng cường. Cụ thể, sự sản xuất valin ở chủng KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE được tăng lên đáng kể khoảng 32% so với sự sản xuất valin ở chủng đối chứng, và được tăng lên khoảng 17% so với sự sản xuất valin ở chủng KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-ilvE. Do đó, xác nhận được rằng Po2 ảnh hưởng đến sự biểu hiện được tăng cường của gen ilvE.

Mã số đăng ký

Cơ sở đăng ký: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (quốc tế)

Mã số đăng ký: KCCM11591P

Ngày đăng ký: Ngày 23 tháng 10 năm 2014

Theo một hoặc nhiều của phương án ví dụ ở trên, vùng khởi động mới có thể có các hoạt tính khác nhau tùy theo vi sinh vật được dùng để gây ra sự biểu hiện của gen đích. Về mặt này, vùng khởi động mới này có thể được sử dụng trong trường hợp mà hoạt tính của gen đích cần phải được kiểm soát trong quá trình sản xuất sản phẩm đích, dẫn đến sự sản xuất hiệu quả của sản phẩm đích.

Cần hiểu rằng các phương án ví dụ được mô tả trong bản mô tả này chỉ nên được xem xét theo nghĩa mô tả và không nhằm mục đích giới hạn sáng chế. Phần mô tả các dấu hiệu hoặc khía cạnh trong mỗi phương án ví dụ thường phải được coi như là có sẵn đối với các dấu hiệu hoặc khía cạnh tương tự khác trong các phương án ví dụ khác.

Khi một hoặc nhiều phương án ví dụ được mô tả, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết có thể được thực hiện ở đó mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định trong các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

HIỆP ƯỚC BUDAPEST VỀ SỰ CÔNG NHẬN QUỐC
TẾ ĐỐI VỚI VIỆC NỘP LƯU CHỦNG VI SINH
NHẪM TIẾN HÀNH CÁC THỦ TỤC VỀ SÁNG CHẾ

BIỂU MẪU QUỐC TẾ

Người nhận CJ CheilJedang Corporation

CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

ĐÃ NHẬN TRONG TRƯỜNG HỢP BẢN GỐC
được cấp theo Điều 7. 1 bởi
CƠ QUAN NỘP LƯU QUỐC TẾ
đã xác nhận ở phía dưới trang này

I. NHẬN DIỆN VI SINH VẬT	
Tham chiếu nhận diện đưa ra bởi NGƯỜI NỘP LƯU: <i>Escherichia coli</i> CA01-2290	Mã số đăng ký đưa ra bởi CƠ QUAN NỘP LƯU QUỐC TẾ: KCCCM11591P
II. MÔ TẢ KHOA HỌC VÀ/HOẶC KÝ HIỆU PHÂN LOẠI ĐƯỢC ĐỀ XUẤT	
Vi sinh vật được nhận diện theo mục I ở trên được kèm theo: ☐ bản mô tả khoa học : ☐ ký hiệu phân loại được đề xuất (Đánh dấu chữ thập vào ô phù hợp)	
III. TIẾP NHẬN VÀ CHẤP NHẬN	
Cơ quan Nộp lưu Quốc tế này chấp nhận vi sinh vật được nhận diện ở mục I ở trên, mà đã được tiếp nhận bởi cơ quan này vào ngày 23 tháng 10 năm 2014. (ngày nộp lưu ban đầu) ¹	
IV. CƠ QUAN NỘP LƯU QUỐC TẾ	
Tên : Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc Địa chỉ : Yurim B/D 45, Hongjinae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	(Các chữ ký của (những) người có thẩm quyền đại diện Cơ quan Nộp lưu Quốc tế hoặc của (các) nhân viên được ủy quyền: Ngày: 23 tháng 10 năm 2014.

¹ Khi áp dụng Điều 6. 4 (d), ngày này là ngày đạt được tình trạng của cơ quan nộp lưu quốc tế; khi việc nộp lưu được thực hiện ngoài Hiệp ước Budapest sau khi đạt được tình trạng của cơ quan nộp lưu quốc tế được đổi thành việc nộp lưu theo Hiệp ước Budapest, ngày này là ngày mà vi sinh vật được tiếp nhận bởi cơ quan nộp lưu quốc tế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vùng khởi động chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.
2. Trình tự điều hòa biểu hiện chứa vùng khởi động theo điểm 1.
3. Vector chứa trình tự điều hòa biểu hiện theo điểm 2 và gen đích mà được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa biểu hiện này.
4. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 3.
5. Tế bào chủ theo điểm 4, trong đó tế bào chủ này là tế bào vi khuẩn thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*.
6. Phương pháp sản xuất sản phẩm đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
nuôi cấy tế bào chủ chứa vùng khởi động theo điểm 1, trình tự điều hòa biểu hiện theo điểm 2, hoặc vector theo điểm 3; và
thu hồi sản phẩm đích từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy chứa tế bào chủ được nuôi cấy.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sản phẩm đích là axit amin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ corporation

<120> Vùng khởi động mới và sử dụng chúng

<130> PX051110

<150> KR 2015-0014587

<151> 2015-01-29

<160> 18

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 86

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN của vùng khởi động O2

<400> 1

caataatcgt gaattttggc agcaacagaa ttatgltgga taatggaaac glgcaaaaagc
60

atagattatt ggaggagatc aaaaca
86

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi xuôi để PCR của vùng khởi động O2

<400> 2

ggtacccaat aatcgtgaat tttggc
26

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi ngược để PCR của vùng khởi động O2

<400> 3

gatatctgtt ttgatctcct ccaata
26

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi xuôi để PCR của pGFPuv

<400> 4
gatatcatga gtaaaggaga aga
23

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi ngược để PCR của pGFPuv

<400> 5
ctgcagttat ttgttagagct cat
23

<210> 6
<211> 729
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> trình tự ADN của GFP

<400> 6
gatatcatga gtaaaggaga agaacttttc actggagttg tccaattct tgttgaatta
60

gatggatgatg ttaatgggca caaattttct gtcagtggag agggatgaagg tgatgcaaca
120

tacggaaaac ttacccttaa atttatttgc actactggaa aactacctgt tccatggcca
180

acacttgtca ctactttctc ttatgggtgt caatgctttt cccgttatcc ggatcatatg
240

aaacggcatg actttttcaa gagtgccatg cccgaagggt atgtacagga acgcactata
300

tctttcaaag atgacgggaa ctacaagacg cgtgctgaag tcaagtttga aggtgatacc
360

cttgттаатс gtatcgagtt aaaaggtatt gatttttaaag aagatggaaa cattctcgga
420

cacaaactcg agtacaacta taactcacac aatgtataca tcacggcaga caaacaaaag
480

aatggaatca aagctaactt caaaattcgc cacaacattg aagatggatc cgttcaacta
540

gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt ggcgatggcc ctgtcctttt accagacaac
600

cattacctgt cgacacaatc tgcccttttcg aaagatccca acgaaaagcg tgaccacatg
660

gtcctttcttg agtttgtaac tgctgctggg attacacatg gcatggatga gctctacaaa
720

taactgcag
729

<210> 7

<211> 1167

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7

atggcagaaa aaggcattac cgcgccgaaa ggcttcggtt cttctgcaac gaccgcgggt
60

attaaagctt ctggcaatcc tgacatggcg ttggtggtta accaggggcc agagttttcc
120

gcagcggcgc tgtttacacg taaccgagtt ttgcgcgcgc ctgtgaaggt gagccgagag
180

aacgttgctg atggccagat cagggtctgt ttgtacaacg ctggtaatgc taatgcgtgt
240

aatggctctgc agggtgagaa ggatgctcgt gagtctgttt ctcatctagc tcaaaatttg
300

ggcttgaggg attccgatat tgggtgtgtg tccactgggc ttattgggtga gttgcttcgc
360

atggataagc tcaatgcagg tattgatcag ctgaccgctg agggcgcttt gggtgacaat
420

ggtgcagctg ctgccaaggc gatcatgacc actgacacgg tggataagga aaccgtcgtg
480

tttgetgatg gttggactgt cggcggaatg ggcaagggcg tgggcatgat ggcgccgtct
540

cttgccacca tgctggtctg cttgaccact gatgcatccg ttactcagga aatggctcag
600

atcgcgctgg ctaatgctac ggccggttacg tttgacaccc tggatattga tggatcaacc
660

tccaccaatg acaccgtgtt cctgctggca tctggcgcta gcggaatcac cccaactcag
720

gatgaactca acgatgcggt gtacgcagct tgtttctgata tcgcagcgaa gcttcaggct
780

gatgcagagg gtgtgaccaa gcgcgttgct gtgacagtgg tgggaaccac caacaacgag
840

caggcgatta atgcggctcg cactgttgct cgtgacaatt tgttcaagtg cgcaatgttt
900

ggatctgata caaactgggg tcgcgtgttg gctgcagtcg gcatggctga tgctgatatg
960

gaaccagaga agatttctgt gttcttcaat ggtaagcag tatgcottga ttccactggc
1020

gctcctggtg ctcgtgaggt ggatctttcc ggcgctgaca ttgatgtccg aattgatttg
1080

ggcaccagtg gggaaggcca ggcaacagtt cgaaccactg acctgagctt ctctacgtg
1140

gagatcaact ccgcgtacag ctcttaa
1167

<210> 8

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi xuôi để PCR của argJ

<400> 8

gagatcaaaa cagatatcat ggcaaaaaa ggcattac
38

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi ngược để PCR của argJ

<400> 9

atcccccggg ctgcagttaa gagctgtacg cggagt
36

<210> 10

<211> 1104

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 10

atgacgtcat tagagttcac agtaaccggt accgaaaatc cgacgtcacc cgatcgtctg
60

aaggaaattc ttgccgcacc gaagttcgggt aagtacttca ccgaccacat ggtgaccatt
120

gactggaacg agtcggaagg ctggcacaac gcccaattag tgccatacgc gccgattcct
180

atggatcctg ccaccaccgt attccaactac ggacaggcaa tttttgaggg aattaaggcc
240

taccgccatt cggacgaaac catcaagact ttccgtcctg atgaaaacgc cgagcgtatg
300

cagcgttcag cagctcgaat ggcaatgcca cagttgcaa caggaggactt tattaaagca
360

cttgaactgc tggtagacgc ggatcaggat tgggttcctg agtacggcgg ggaagcttcc
420

ctctacctgc gccattcat gatctccacc gaaattggct tgggtgtcag ccagctgat
480

gcctacaagt tcttggtcat cgcattccca gtcggcgctt acttcaccgg tggaatcaag
540

cctgtttccg tctggctgag cgaagattac gtccgcgctg caccggcgg aactggtgac
600

gccaaatttg ctggcaacta cgcggcttct ttgcttgccc agtcccaggc tgcggaaaag
660

ggctgtgacc aggtcgtatg gttggatgcc atcgagcaca agtacatcga agaaatgggt
720

ggcatgaacc ttgggttcat ctaccgcaac ggcgaccacg tcaagctagt caccctgaa
780

ctttccggct cactacttcc aggcattcact cgcaagtcac ttctacaagt agcacgcgac
840

ttgggctacg aagtagaaga gcgaaagatc accaccaccg agtgggaaga agacgcaaag
900

tctggcgcca tgaccgaggc atttgcttgc ggtactgcag ctgttatcac ccctggtggc
960

accgtgaaat cagctcacgg caccttcgaa gtgaacaaca atgaagtcgg agaaatcacg
1020

atgaagcttc gtgaaaccct caccggaatt cagcaaggaa acgttgaaga ccaaaacgga
1080

tggctttacc cactggttgg ctaa
1104

<210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi xuôi để PCR của ilvE

<400> 11
gagatcaaaa cagatatcat gacgtcatta gaggtc
36

<210> 12
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> reverse primer để PCR của ilvE

<400> 12
atcccccggtg ctgcagttag ccaaccagtg ggta
34

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi xuôi để PCR của aceP(WT)

<400> 13
 ggtaccgtca ttacccccgc ctaacc
 26

<210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi ngược để PCR của aceP (WT)

<400> 14
 gatatccaaa gtcacttcct taagt
 26

<210> 15
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi xuôi để PCR của trcP

<400> 15
 ggtaccctgc acggtgcacc aatgct
 26

<210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi ngược để PCR của trcP

<400> 16
 gatatcctgt ttcctgtgtg aaattg
 26

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi xuôi để PCR của argJ

<400> 17

cgaaaggaaa cactcgatat catggccaaa aaaggcatta c
41

<210> 18
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi để PCR của ilvE

<400> 18
cgaaaggaaa cactcgatat catgacgtca ttagagttc
39