



(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)



1-0031491

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 1/15; C12N 9/10; (13) B
C12N 1/21; C12N 15/09; C12N 5/10;
C07K 14/415; C12N 1/19

(21) 1-2016-02756

(22) 06/01/2015

(86) PCT/JP2015/050077 06/01/2015

(87) WO 2015/107920 23/07/2015

(30) 2014-007779 20/01/2014 JP

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/11/2016 344A

(73) SUMITOMO RUBBER INDUSTRIES, LTD. (JP)

6-9, Wakinohama-cho 3-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 6510072, Japan

(72) YAMAGUCHI Haruhiko (JP).

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

(54) THỂ BIẾN NẠP ĐỀ BIỂU HIỆN CIS-PRENYLTRANFERAZA VÀ THỤ THỂ
NOGO B VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYISOPRENOIT BẰNG CÁCH
SỬ DỤNG THỂ BIẾN NẠP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B, được xem là có liên quan đến sự sinh tổng hợp polyisoprenoit, vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B, và phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thể biến nạp này. Sáng chế đề cập đến thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B, và phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thể biến nạp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay cao su tự nhiên (một ví dụ là polyisoprenoit) dùng trong các sản phẩm cao su công nghiệp được thu hoạch từ các cây sản sinh isoprenoit, như cây cao su para (*Hevea brasiliensis*) thuộc họ *Euphorbiaceae*, hoặc cây cao su Ấn Độ (*Ficus elastica*) thuộc họ *Moraceae*.

Hiện nay, *Hevea brasiliensis* gần như là nguồn cao su tự nhiên duy nhất được sử dụng trong các sản phẩm cao su công nghiệp. *Hevea brasiliensis* là một loại cây chỉ có thể sinh trưởng tại một số vùng nhất định, bao gồm Đông Nam Á và Nam Mỹ. Hơn nữa, các cây *Hevea brasiliensis* mất khoảng bảy năm kể từ khi trồng đến khi đủ trưởng thành để tạo ra cao su, và chỉ tạo ra cao su tự nhiên trong khoảng thời gian từ 20 đến 30 năm. Nhu cầu đối với cao su tự nhiên được mong đợi là gia tăng trong tương lai, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, nhưng vì các lý do nêu trên mà rất khó để làm tăng mạnh sản lượng cao su tự nhiên từ *Hevea brasiliensis*. Do đó, lo ngại rằng nguồn cao su tự nhiên sẽ dần khô cạn đi, và rất cần phải phát triển các nguồn cao su tự nhiên ổn định khác ngoài nguồn cao su từ cây *Hevea brasiliensis* trưởng thành và cải thiện sản lượng cao su tự nhiên từ *Hevea brasiliensis*.

Cao su tự nhiên có cấu trúc cis-1,4-polyisopren, với đơn vị isopentenyl diphosphat (IPP), và bản chất của cấu trúc này gợi ý rằng cis-prenyltransferaza (CPT) có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp cao su tự nhiên. Ví dụ, một số CPT được tìm thấy trong *Hevea brasiliensis*, bao gồm transferaza 1 của cao su *Hevea* (HRT1) và transferaza 2 của cao su *Hevea* (HRT2) (xem, ví dụ, Tài liệu 1 và 2). Cũng đã biết rằng quá trình tổng hợp cao su có thể giảm đi ở các loài bồ công anh Trung Quốc *Taraxacum brevicorniculatum* thông qua việc ức chế sự biểu hiện CPT (xem, ví dụ, Tài liệu 3).

Các nghiên cứu trước đây về protein gắn với quá trình sinh tổng hợp cao su tự nhiên đều tập trung vào yếu tố kéo dài mũ cao su (REF) và protein cao su ở dạng phân tử nhỏ (SRPP) (xem, ví dụ, Tài liệu 4 và 5). Tuy nhiên, sự kết hợp giữa các protein này và CPT hiện chưa được hiểu một cách thấu đáo.

Các nghiên cứu cũng gợi ý rằng thụ thể Nogo-B (NgBr) có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp dolichol bởi CPT ở người (xem, ví dụ, Tài liệu 6).

Danh sách tài liệu trích dẫn:

Tài liệu 1: Rahaman et al., BMC Genomics, 2013, vol. 14.

Tài liệu 2: Asawatreratanakul et al, European Journal of Biochemistry, 2003, vol. 270, pp. 4671-4680

Tài liệu 3: Post et al., Plant Physiology, 2012, vol. 158, pp. 1406-1417

Tài liệu 4: Hillebrand et al., PLoS ONE, 2012, vol. 7

Tài liệu 5: Priya et al., Plant Cell Reports, 2007, vol. 26, pp. 1833-1838

Tài liệu 6: K.D.Harrison et al., The EMBO Journal, 2011, vol. 30, pp. 2490-2500

Vấn đề kỹ thuật

Như đã đề cập ở trên, vẫn cần phải phát triển các nguồn cao su tự nhiên ổn định khác ngoài nguồn cao su tự nhiên từ các cây *Hevea brasiliensis* trưởng thành và tăng

sản lượng của cao su tự nhiên từ *Hevea brasiliensis*. Tuy nhiên, hiện tại, cơ chế sinh tổng hợp cao su tự nhiên, và cụ thể là cơ chế điều tiết phần lớn vẫn chưa được hiểu rõ, và do đó, vẫn cần có những yếu tố có thể cải thiện để làm tăng mạnh sản lượng cao su tự nhiên. Trong bối cảnh này, một phương pháp có thể giải quyết các vấn đề nêu trên là làm ổn định và tăng cường hoạt tính của CPT trong quá trình sinh tổng hợp cao su tự nhiên để làm tăng sản lượng cao su tự nhiên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B, được xem là có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp polyisoprenoit, vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B, và phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thể biến nạp này.

Giải pháp cho các vấn đề nêu trên

Sáng chế đề xuất thể biến nạp được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B.

Tốt hơn là, ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ cây.

Tốt hơn là, ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ cây sản sinh isoprenoit.

Tốt hơn là, ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ *Hevea brasiliensis*.

Tốt hơn là, gen mã hóa thụ thể Nogo-B là một trong số các ADN sau đây:

(3) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5; và

(4) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 trong các điều kiện nghiêm ngặt.

Tốt hơn là, gen mã hóa cis-prenyltransferaza là một trong số các ADN sau đây:

(1) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3; và

(2) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có hoạt tính enzym xúc tác phản ứng kéo dài mạch cis của hợp chất isoprenoit.

Tốt hơn là, gen mã hóa cis-prenyltransferaza là một trong số các ADN sau đây:

(1-1) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1; và

(2-1) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 trong các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có hoạt tính enzym xúc tác phản ứng kéo dài mạch cis của hợp chất isoprenoit.

Tốt hơn nếu vật chủ là cây sản sinh isoprenoit.

Sáng chế cũng xuất phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thể biến nạp được mô tả ở trên.

Hiệu quả của sáng chế

Thể biến nạp theo sáng chế được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza (CPT) và gen mã hóa thụ thể Nogo-B (NgBr) vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện CPT và NgBr. Do CPT và NgBR được biểu hiện đồng thời trong vật chủ, nên hoạt tính của CPT được mong đợi là được làm ổn định và tăng cường. Do đó, mong đợi rằng trong thể biến nạp, lượng sản phẩm được sinh tổng hợp thông qua các phản ứng được xúc tác bởi CPT và do đó sản lượng polyisoprenoit được tăng cường, và do đó việc sử dụng thể biến nạp này trong quá trình sản xuất polyisoprenoit có thể

làm cho sản lượng polyisoprenoit tăng lên.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là ảnh minh họa các kết quả của phương pháp phân tích lai đôi ở nấm men.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu khác nhau nhằm cải thiện năng suất của polyisoprenoit. Trong các nghiên cứu này, các tác giả đã tập trung vào cis-prenyltransferaza (CPT) do nó được xem là một trong các enzym đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp polyisoprenoit. Theo một báo cáo (Tài liệu 6), thụ thể Nogo-B (NgBr) tương tác với CPT ở người để cải thiện độ ổn định của protein CPT, nhờ đó làm ổn định và tăng cường hoạt tính sinh tổng hợp của dolichol. Điều này gợi ý đến việc NgBr có thể có liên hệ với hoạt tính của CPT ở các sinh vật nói chung. Bởi vì những vấn đề trên, tác giả đã tạo ra thể biến nạp được thiết kế để biểu hiện CPT và NgBr. Trong thể biến nạp này, do sự tồn tại đồng thời của CPT và NgBr, nên hoạt tính của CPT được mong đợi là ổn định và tăng cường. Do đó, mong đợi rằng lượng sản phẩm được sinh tổng hợp thông qua các phản ứng được xúc tác bằng CPT và do đó, việc sản xuất polyisoprenoit được tăng cường, làm gia tăng sản lượng polyisoprenoit.

Thể biến nạp theo sáng chế được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza (CPT) và gen mã hóa thụ thể Nogo-B (NgBr) vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện CPT và NgBr.

Gen mã hóa CPT và/hoặc gen mã hóa NgBr có thể có nguồn gốc bất kỳ, và tốt hơn nếu có nguồn gốc từ cây, tốt hơn nữa nếu là cây sản sinh isoprenoit. Tốt hơn nữa nếu các gen này đều có nguồn gốc từ ít nhất một cây sản sinh isoprenoit được chọn từ nhóm bao gồm *Hevea brasiliensis*, *Sonchus oleraceus*, *Parthenium argentatum*, và *Taraxacum kok-saghyz*, đặc biệt tốt hơn nếu là *Hevea brasiliensis*, trong số các cây nêu trên.

Trình tự axit amin của cis-prenyltransferaza (CPT)

Protein (1) sau đây là một ví dụ cụ thể về CPT:

(1) protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4.

Đã biết rằng các protein có một hoặc nhiều đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen, hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin gốc có thể có chức năng vốn có. Dựa trên thực tế này, một ví dụ cụ thể khác về CPT là protein (2) sau đây:

(2) protein có trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4, và có chức năng vốn có của chúng.

Chức năng vốn có của protein có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 trong bản mô tả dùng để chỉ chức năng vốn có của CPT, tức là, hoạt tính enzym mà xúc tác phản ứng kéo dài mạch cis của hợp chất isoprenoit.

Để giữ hoạt tính enzym này, trình tự axit amin tốt hơn nếu chứa một hoặc nhiều, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 58, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 44, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 29, đặc biệt tốt hơn nếu là từ 1 đến 15, tốt nhất nếu là từ 1 đến 6, tốt nhất nếu là từ 1 đến 3 đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin SEQ ID NO:2.

Ngoài ra, để duy trì hoạt tính enzym này, trình tự axit amin tốt hơn nếu chứa một hoặc nhiều, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 57, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 43, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 29, đặc biệt tốt hơn nếu là từ 1 đến 15, tốt nhất nếu là từ 1 đến 6, tốt nhất nếu là từ 1 đến 3 đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin SEQ ID NO:4.

Trong số các đột biến thay thế axit amin khác, đột biến thay thế bảo toàn được ưu tiên. Các ví dụ cụ thể bao gồm các đột biến thay thế trong mỗi nhóm sau đây trong dấu ngoặc đơn: (glyxin, alanin), (valin, isoleuxin, leuxin), (axit aspartic, axit glutamic), (asparagin, glutamin), (serin, threonin), (lysin, arginin), (phenylalanin, tyrosin), và các

đột biến khác.

Cũng đã biết rằng các protein với trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự cao so với trình tự axit amin gốc cũng có thể có chức năng tương tự. Xem xét thực tế này, một ví dụ cụ thể khác về CPT là protein (3) sau đây:

(3) protein có trình tự axit amin mà có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4, và có chức năng vốn có của chúng.

Để duy trì chức năng vốn có, tức là hoạt tính của enzym được mô tả ở trên, thì mức độ tương đồng về trình tự so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 tốt hơn nếu bằng ít nhất là 85%, tốt hơn nữa nếu bằng ít nhất là 90%, tốt hơn nữa nếu bằng ít nhất là 95%, đặc biệt tốt hơn nếu bằng ít nhất là 98%, tốt nhất nếu bằng ít nhất là 99%.

Mức độ tương đồng nhất về trình tự giữa các trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán BLAST (Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) được phát triển bởi Karlin và Altschul hoặc FASTA (Methods Enzymol., 183, 63 (1990)).

Việc liệu đây có phải là protein có hoạt tính enzym nêu trên hay không có thể được xác định bằng các kỹ thuật thông thường, như bằng cách biểu hiện protein đích trong thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa protein đích vào *Escherichia coli* hoặc các sinh vật chủ khác, và xác định sự có mặt hoặc không có mặt chức năng của protein đích bằng phương pháp đo hoạt tính tương ứng.

CPT tốt hơn nếu là protein bất kỳ trong số các protein sau đây:

(1-1) protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2;

(2-1) protein có trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen, và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID NO:2, và có chức năng vốn có của chúng; và

(3-1) protein có trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và có chức năng vốn có của chúng. Tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi CPT là protein bất kỳ trong số các protein nêu trên, thì nó tương tác với NgBr. Trong trường hợp này, hoạt tính của CPT được mong đợi là được làm ổn định và tăng cường hơn nữa.

Trình tự axit amin của thụ thể Nogo-B (NgBr)

Protein (4) sau đây là một ví dụ cụ thể về NgBr:

(4) protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

Như được mô tả ở trên, đã biết rằng các protein có một hoặc nhiều đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen, hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin gốc có thể có chức năng vốn có. Do đó, một ví dụ cụ thể khác về NgBr là protein (5) sau đây:

(5) protein có trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin SEQ ID NO:6, và có chức năng vốn có của chúng.

Chức năng vốn có của protein có SEQ ID NO:6 trong bản mô tả này là chức năng vốn có của NgBr, tức là, chức năng liên kết với màng thông qua một hoặc nhiều miền xuyên màng trên phía đầu tận cùng N của protein, và tương tác với protein khác trên phía đầu tận cùng C của chúng. Một chức năng của thụ thể Nogo-B trong các tế bào thần kinh đã biết là NgBr tương tác với protein ức chế myelin (ví dụ, Nogo-A) hoặc protein tương tự, do đó có liên quan đến sự truyền tín hiệu gây ra sự xếp lỗi phát triển thần kinh và ức chế sự đâm chồi các dây thần kinh. Tuy nhiên, ở đây sự tương tác có liên quan đến sự truyền tín hiệu nêu trên không thuộc chức năng vốn có của protein có SEQ ID NO:6.

Để duy trì chức năng vốn có, tức là, chức năng của NgBr, trình tự axit amin tốt hơn nếu chứa một hoặc nhiều, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 52, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 39, tốt hơn nữa nếu là từ 1 đến 26, đặc biệt tốt hơn nếu là từ 1 đến 13, tốt nhất nếu là từ 1 đến 6, tốt nhất nếu là từ 1 đến 3 đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến xen, và/hoặc đột biến bổ sung axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

Tương tự với nội dung trên, trong số các đột biến thay thế axit amin, thì đột biến thay thế bảo toàn được ưu tiên. Các ví dụ cụ thể bao gồm các đột biến thay thế trong mỗi nhóm sau đây trong dấu ngoặc đơn: (glyxin, alanin), (valin, isoleuxin, leuxin), (axit aspartic, axit glutamic), (asparagin, glutamin), (serin, threonin), (lysin, arginin), (phenylalanin, tyrosin), và các đột biến tương tự.

Như được mô tả ở trên, cũng đã biết rằng các protein với trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự cao so với trình tự axit amin ban đầu cũng có thể có chức năng tương tự. Do đó, một ví dụ cụ thể khác về NgBr là protein (6) sau đây:

(6) protein có trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80% so với trình tự axit amin SEQ ID NO:6, và có chức năng vốn có của chúng.

Để duy trì chức năng vốn có, tức là chức năng của NgBr, thì mức độ tương đồng về trình tự so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 tốt hơn nếu bằng ít nhất là 85%, tốt hơn nữa nếu bằng ít nhất là 90%, tốt hơn nữa nếu bằng ít nhất là 95%, đặc biệt tốt hơn nếu bằng ít nhất là 98%, tốt nhất nếu bằng ít nhất là 99%.

Việc liệu đó có phải là protein có cấu trúc NgBr hay không có thể được xác định bằng các kỹ thuật thông thường, như bằng cách biểu hiện protein đích trong thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa protein đích vào *Escherichia coli* hoặc các sinh vật chủ khác, phá vỡ thể biến nạp sau đó tách thành các phần cắt bằng phương pháp ly tâm, và tiếp đó quan sát sự biểu hiện mạnh mẽ trong phần cắt bằng cách ly tâm, và tiếp đó quan sát sự biểu hiện mạnh phần cắt màng bằng kỹ thuật phân tích thâm tách Western

bằng cách sử dụng kháng thể của thụ thể kháng Nogo thương mại (ví dụ Millipore, GeneTex).

ADN mã hóa cis-prenyltransferaza (CPT)

ADN mã hóa CPT có thể là một trong các ADN sau đây:

(1) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3; và

(2) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có chức năng vốn có của nó.

Chức năng vốn có của protein được mã hóa bằng ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 ở đây là giống như chức năng vốn có của protein có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “lai” có nghĩa là quy trình trong đó ADN lai với ADN có trình tự nucleotit đặc hiệu hoặc một phần của ADN đó. Do đó, ADN có trình tự nucleotit đặc hiệu hoặc một phần của ADN đó có thể có trình tự nucleotit đủ dài có thể phù hợp làm đầu dò trong phép phân tích thẩm tách Northern hoặc Southern hoặc làm đoạn mồi oligonucleotit trong phép phân tích phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR). ADN được sử dụng làm đầu dò có thể có chiều dài ít nhất là 100 bazơ, tốt hơn nếu ít nhất là 200 bazơ, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 500 bazơ mặc dù nó có thể là ADN có chiều dài ít nhất là 10 bazơ, tốt hơn nếu ít nhất là 15 bazơ.

Các kỹ thuật để tiến hành các thử nghiệm lai ADN đã được biết rõ. Các điều kiện lai trong đó các thử nghiệm này được tiến hành có thể được xác định theo tài liệu, ví dụ, Molecular Cloning, 2nd ed. và 3rd ed. (2001), Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press (1994), Immunology methods manual, Academic press (Molecular), và nhiều loại ấn phẩm chuyên ngành khác.

Các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm, ví dụ, ủ qua đêm bộ lọc được cố định ADN và đầu dò ADN ở nhiệt độ 42°C trong dung dịch chứa formamit 50%, 5× SSC (natri clorua 750mM, natri xitrat 75mM), natri phosphat 50mM (độ pH=7,6), 5× dung dịch Denhardt, dextran sulfat 10%, và 20 µg/l ADN trong tinh dịch cá hồi bị biến tính, sau đó rửa bộ lọc trong, ví dụ, 0,2×dung dịch SSC ở nhiệt độ khoảng 65°C. Các điều kiện ít nghiêm ngặt hơn cũng có thể được sử dụng. Các thay đổi về điều kiện nghiêm ngặt có thể được thực hiện thông qua việc điều chỉnh bằng tay nồng độ của formamit (tỷ lệ phần trăm formamit thấp hơn làm cho điều kiện ít nghiêm ngặt hơn), nồng độ muối hoặc nhiệt độ. Ví dụ, các điều kiện ít nghiêm ngặt gồm ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong dung dịch chứa 6× SSCE (20× SSCE:3 mol/l natri clorua, 0,2 mol/l natri dihydro phosphat, 0,02 mol/l EDTA, độ pH=7,4), SDS 0,5%, formamit 30%, và 100 µg/l ADN trong tinh dịch cá hồi bị biến tính, sau đó rửa trong dung dịch 1× SSC chứa SDS 0,1% ở nhiệt độ 50°C. Ngoài ra, để đạt được điều kiện ít nghiêm ngặt hơn, các bước rửa tiến hành sau bước lai có thể được thực hiện ở nồng độ muối cao hơn (ví dụ 5× SSC) trong điều kiện ít nghiêm ngặt được đề cập ở trên.

Các biến đổi trong các điều kiện khác nhau ở trên có thể được thực hiện thông qua thể vùi hoặc đột biến thay thế của chất phản ứng kim hãm được sử dụng để ức chế thông tin của các thử nghiệm lai. Thể vùi của chất phản ứng kim hãm có thể cần đến sự cải biến các điều kiện lai để có tính tương hợp.

ADN có khả năng lai trong các điều kiện nghiêm ngặt như được mô tả ở trên có thể có trình tự nucleotit mà có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn nếu ít nhất là 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 98%, đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 99% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 như được tính bằng cách sử dụng chương trình như BLAST hoặc FASTA với các thông số được đề cập ở trên.

Việc liệu ADN có khả năng lai với ADN được đề cập ở trên trong các điều kiện

nghiêm ngặt có mã hóa protein có hoạt tính enzym định trước hay không có thể được xác định bằng các kỹ thuật thông thường, như bằng cách biểu hiện protein đích trong thể biến nạp được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa protein đích vào *Escherichia coli* hoặc các sinh vật chủ khác, và xác định sự có mặt hoặc không có mặt chức năng của protein đích bằng phương pháp đo hoạt tính tương ứng.

ADN mã hóa CPT tốt hơn nếu là một trong số các ADN sau đây:

(1-1) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1; và

(2-1) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 trong điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có chức năng vốn có của chúng. Tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi ADN mã hóa CPT là một trong các ADN có các trình tự nêu trên, thì CPT đã được biểu hiện tương tác với NgBr. Trong trường hợp này, hoạt tính của CPT được mong đợi là được làm ổn định và tăng cường hơn nữa.

ADN mã hóa thụ thể Nogo-B (NgBr)

ADN mã hóa NgBr có thể là một trong các ADN sau đây:

(3) ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5; và

(4) ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 trong các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có chức năng vốn có của chúng.

Ở đây, chức năng vốn có của protein được mã hóa bằng ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 là giống như chức năng vốn có của protein có SEQ ID NO:6.

Thuật ngữ “lai” ở đây là như được mô tả ở trên. Ngoài ra, các điều kiện nghiêm ngặt cũng là như được mô tả ở trên.

ADN có khả năng lai trong các điều kiện nghiêm ngặt như được mô tả ở trên có

thể có trình tự nucleotit có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn nếu ít nhất là 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 98%, đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 99% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 như được tính bằng cách sử dụng chương trình như BLAST hoặc FASTA với các thông số được đề cập ở trên.

Việc liệu ADN có khả năng lai với ADN được đề cập ở trên trong các điều kiện nghiêm ngặt có mã hóa protein có cấu trúc định trước hay không có thể được xác định bằng các kỹ thuật thông thường, như bằng cách biểu hiện protein đích trong thể biến nạp được tạo ra bằng các đưa gen mã hóa protein đích vào *Escherichia coli* hoặc các sinh vật chủ khác, phá vỡ thể biến nạp này sau đó tách thành các phần cắt bằng cách ly tâm, và tiếp đó quan sát sự biểu hiện mạnh mẽ trong màng bằng kỹ thuật phân tích thâm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể của thụ thể kháng Nogo thương mại (ví dụ Millipore, GeneTex).

Các kỹ thuật thông thường có thể được sử dụng để nhận biết trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit của protein. Ví dụ, ARN tổng số được chiết từ cây đang sinh trưởng, ARN thông tin được tinh chế tùy ý, và ADN bổ trợ được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược. Sau đó, đoạn môi suy biến được thiết kế di truyền trên cơ sở trình tự axit amin của protein đã biết tương ứng với protein đích, mảnh ADN được khuếch đại một phần bằng RT-PCR, và trình tự này được nhận biết một phần. Tiếp đó, phương pháp RACE hoặc phương pháp tương tự được tiến hành để nhận biết trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ. Phương pháp RACE (sự khuếch đại nhanh của ADN bổ trợ kết thúc phương pháp này) dùng để chỉ phương pháp trong đó, khi trình tự nucleotit của ADN bổ trợ đã biết một phần, thì PCR được tiến hành trên cơ sở thông tin trình tự nucleotit của vùng đã biết này để tách dòng vùng chưa biết kéo dài đến đầu tận cùng ADN bổ trợ, và có khả năng tách dòng ADN bổ trợ có chiều dài đầy đủ bằng PCR mà không cần tạo thư viện ADN bổ trợ.

Tốt hơn nếu mỗi đoạn mỗi suy biến đều có thể được tạo ra từ trình tự có nguồn gốc thực vật có phần trình tự có độ tương tự cao với protein đích.

Nếu trình tự nucleotit mã hóa protein này đã biết, thì có thể nhận biết trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bằng cách thiết kế đoạn mỗi chứa codon khởi đầu và đoạn mỗi chứa codon kết thúc bằng cách sử dụng trình tự nucleotit đã biết, sau đó tiến hành RT-PCR bằng cách sử dụng ADN bổ trợ đã được tổng hợp làm khuôn.

Thế biến nạp

Gen mã hóa CPT và gen mã hóa NgBr được đưa vào vật chủ để tạo ra sinh vật (thế biến nạp) mà đã được biến nạp để biểu hiện CPT và NgBr. Do CPT và NgBr được biểu hiện đồng thời trong thế biến nạp này, nên hoạt tính của CPT được mong đợi là được làm ổn định và tăng cường. Do đó, được mong đợi rằng trong thế biến nạp, lượng sản phẩm được sinh tổng hợp thông qua các phản ứng được xúc tác bằng CPT và từ đó cả việc sản xuất polyisoprenoit được tăng cường, thích hợp dẫn đến việc gia tăng sản lượng polyisoprenoit.

Phần sau đây mô tả vắn tắt cách thức để tạo ra sinh vật (thế biến nạp) được biến nạp để biểu hiện CPT và NgBr. Thế biến nạp này có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết thông thường.

Cụ thể là, ví dụ, thế biến nạp có thể được tạo ra như sau: ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3, và ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 được chèn vào sau gen khởi đầu của vector biểu hiện thích hợp bằng các enzym giới hạn thích hợp và các enzym tương tự để tạo ra ADN tái tổ hợp. Sau đó ADN tái tổ hợp này có thể được đưa vào vật chủ tương thích được với vector biểu hiện, để thu được các tế bào được biến nạp. Theo cách khác, vector biểu hiện trong đó ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 được chèn vào

sau gen khởi đầu bằng các enzym giới hạn thích hợp và các enzym tương tự, và vectơ biểu hiện trong đó ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5 được chèn vào sau gen khởi đầu bằng các enzym giới hạn thích hợp và enzym tương tự được sử dụng để tạo ra ADN tái tổ hợp, và sau đó các ADN tái tổ hợp này có thể được đưa vào vật chủ tương thích được với vectơ biểu hiện, để thu được các tế bào biến nạp.

Vật chủ (tế bào vật chủ) bất kỳ có khả năng biểu hiện các gen đang nói đến có thể được sử dụng như vi sinh vật, nấm men, tế bào động vật, tế bào côn trùng, tế bào cây, và các sinh vật khác, tốt hơn nếu là sinh vật có nhân điển hình. Do năng suất polyisoprenoit cải thiện và hiệu suất polyisoprenoit gia tăng có thể được đặc biệt mong đợi khi CPT và NgBR được biểu hiện trong các sinh vật có khả năng sinh tổng hợp polyisoprenoit, nên vật chủ tốt hơn nếu là cây, tốt hơn nữa nếu cây sản sinh isoprenoit, trong số các vật chủ khác, và tế bào vật chủ tốt hơn nếu là tế bào cây, tốt hơn nữa nếu là tế bào của cây sản sinh isoprenoit. Do đó, theo một phương án thích hợp khác của sáng chế, vật chủ là cây sản sinh isoprenoit.

Cây sản sinh isoprenoit không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có khả năng sản sinh ra isoprenoit. Các ví dụ bao gồm các cây thuộc giống *Hevea*, như *Hevea brasiliensis*; các cây thuộc giống *Sonchus*, như *Sonchus oleraceus*, *Sonchus asper*, và *Sonchus brachyotus*; các cây thuộc giống *Solidago*, như *Solidago altissima*, *Solidago virgaurea* subsp. *asiatica*, *Solidago virgaurea* subsp. *leipcarpa*, *Solidago virgaurea* subsp. *leipcarpa* f. *paludosa*, *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea*, và *Solidago gigantea* Ait. var. *leiophylla* Fernald; các cây thuộc giống *Helianthus*, như *Helianthus annuus*, *Helianthus argophyllus*, *Helianthus atrorubens*, *Helianthus debilis*, *Helianthus decapetalus*, và *Helianthus giganteus*; các cây thuộc giống *Taraxacum*, như bồ công anh Trung Quốc (*Taraxacum*), *Taraxacum venustum* H. Koidz, *Taraxacum hondoense* Nakai, *Taraxacum platycarpum* Dahlst, *Taraxacum japonicum*, *Taraxacum officinale* Weber, và *Taraxacum kok-saghyz*; các cây thuộc giống *Ficus*, như *Ficus carica*, *Ficus*

elastica, *Ficus pumila* L., *Ficus erecta* Thumb., *Ficus ampelas* Burm. f., *Ficus benguetensis* Merr., *Ficus irisana* Elm., *Ficus microcarpa* L.f., *Ficus septica* Burm. f., và *Ficus benghalensis*; các cây thuộc giống *Parthenium*, như *Parthenium argentatum*, *Parthenium hysterophorus*, và *Ambrosia artemisiifolia* (*Parthenium hysterophorus*); cây rau diếp (*Lactuca sativa*) (*Lactuca serriola*), và *Ficus benghalensis*. Cây sản sinh isoprenoit tốt hơn nếu là ít nhất một trong số các cây được chọn từ nhóm bao gồm các cây thuộc giống *Hevea*, *Sonchus*, *Taraxacum*, và *Parthenium*, tốt hơn nữa nếu là ít nhất một trong số các cây được chọn từ nhóm bao gồm *Hevea brasiliensis*, *Sonchus oleraceus*, *Parthenium argentatum*, và *Taraxacum kok-saghyz*, trong số các giống khác.

Vectơ biểu hiện có thể là vectơ có khả năng tái bản tự trị trong các thể bào vật chủ hoặc được kết hợp vào nhiễm sắc thể của chúng, và chứa gen khởi đầu tại vị trí cho phép sự phiên mã của ADN tái tổ hợp.

Trong trường hợp trong đó các tế bào cây được sử dụng làm tế bào vật chủ, thì vectơ pBI, vectơ pUC, Ti plasmit hoặc vectơ virus khảm thuốc lá, ví dụ, có thể được sử dụng làm vectơ biểu hiện.

Có thể sử dụng gen khởi đầu bất kỳ mà thực hiện chức năng trong các tế bào cây. Các ví dụ bao gồm gen khởi đầu 35S của virus khảm súp lơ (CaMV), gen khởi đầu actin-1 ở lúa, gen khởi đầu của gen nopal synthase, gen khởi đầu 35S của virus khảm thuốc lá, và gen khởi đầu của actin ở lúa.

Được ưu tiên theo sáng chế là các vectơ biểu hiện với gen khởi đầu được biểu hiện đặc hiệu trong các mô mà trong đó hợp chất isoprenoit được sinh tổng hợp, như tế bào cây có nhựa mủ. Sự chậm sinh trưởng của cây và các tác động bất lợi khác có thể được làm giảm bớt bằng cách biểu hiện đặc hiệu trong mô mà trong đó isoprenoit được sinh tổng hợp.

Vectơ tái tổ hợp có thể được đưa vào bằng phương pháp bất kỳ mà cho phép ADN

được đưa vào tế bào vật chủ. Các ví dụ bao gồm phương pháp sử dụng *Agrobacterium* (JP S59-140885 A, JP S60-70080 A, WO94/00977), kỹ thuật điện di (JP S60-251887 A), và phương pháp sử dụng súng bắn hạt (súng bắn gen) (JP 2606856 B, JP 2517813 B).

Thế biến nạp (tế bào cây chuyển gen) có thể được tạo ra bằng phương pháp nêu trên hoặc các phương pháp khác.

Sáng chế cũng đề cập đến cây sản sinh isoprenoit mà gen mã hóa CPT và gen mã hóa NgBr được đưa vào. Cây sản sinh isoprenoit không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó là cây sản sinh isoprenoit chứa các tế bào cây chuyển gen. Cây sản sinh isoprenoit về cơ bản không chỉ bao gồm các tế bào cây chuyển gen được tạo ra bằng các phương pháp được mô tả ở trên, mà còn bao gồm cả, ví dụ, tất cả các thể hệ con hoặc dòng vô tính của chúng và thậm chí cả các cây thể hệ con thu được bằng cách cấy chuyển các tế bào này. Ngay khi thu được các tế bào cây chuyển gen mà ADN hoặc vector trong hệ gen được đưa vào, thì thể hệ con hoặc dòng vô tính có thể thu được từ các tế bào cây chuyển gen đó bằng kỹ thuật sinh sản hữu tính hoặc vô tính, kỹ thuật nuôi cấy mô, kỹ thuật nuôi cấy tế bào, kỹ thuật dung hợp tế bào, hoặc các kỹ thuật khác. Hơn nữa, các tế bào cây chuyển gen, hoặc thể hệ con hoặc dòng vô tính của chúng có thể được sử dụng để thu được vật liệu sinh sản (ví dụ hạt giống, quả, cành giâm, thân củ, thân rễ, chồi, chồi bất định, phôi bất định, thể sần, chất nguyên sinh), mà sau đó có thể được sử dụng để tạo ra cây sản xuất isoprenoit trên quy mô lớn.

Các kỹ thuật để tạo ra cây từ tế bào cây chuyển gen là đã biết; ví dụ, tài liệu Doi et al. bộc lộ các kỹ thuật đối với cây bạch đàn (JP H11-127025 A), tài liệu Fujimura et al. bộc lộ các kỹ thuật đối với cây lúa (Fujimura et al., (1995), *Plant Tissue Culture Lett.*, vol. 2: p. 74-), tài liệu Shillito et al. bộc lộ các kỹ thuật đối với ngũ cốc (Shillito et al., (1989), *Bio/Technology*, vol. 7: p. 581-), tài liệu Visser et al. bộc lộ các kỹ thuật đối với khoai tây (Visser et al., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, vol. 78: p. 589-), và tài liệu Akama

et al. bộc lộ các kỹ thuật đối với *Arabidopsis thaliana* (Akama et al., (1992), Plant Cell Rep., vol. 12: p. 7-). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tái sinh cây từ các tế bào cây chuyển gen theo các tài liệu này.

Việc liệu gen protein đích có được biểu hiện trong cây đã tái sinh hay không có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, phép phân tích thẩm tách Western có thể được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện của protein đích.

Hạt giống có thể thu được từ cây chuyển gen, ví dụ, như sau: cây chuyển gen được cho ra rễ trong môi trường thích hợp, được trồng vào đất chứa nước trong chậu, và được phát triển trong các điều kiện trồng trọt thích hợp để cuối cùng cho ra hạt giống, tiếp đó được thu gom. Ngoài ra, các cây có thể được phát triển từ hạt giống, ví dụ, như sau: hạt giống thu được từ cây chuyển gen như được mô tả ở trên được gieo trong đất chứa nước, và được phát triển trong các điều kiện nuôi trồng thích hợp thành cây.

Theo sáng chế, mong đợi rằng cây sản sinh isoprenoit mà gen mã hóa CPT và gen mã hóa NgBr được đưa vào có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất polyisoprenoit để cải thiện năng suất polyisoprenoit. Cụ thể là, việc sản xuất polyisoprenoit có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy tế bào cây chuyển gen đã được tạo ra như được mô tả ở trên, thể sản thu được từ các tế bào cây chuyển gen này, các tế bào được biệt hóa lại từ thể sản, hoặc các bộ phận tương tự trong môi trường thích hợp, hoặc bằng cách phát triển các cây chuyển gen được tái sinh từ tế bào cây chuyển gen, các cây phát triển từ hạt giống thu được từ các cây chuyển gen, hoặc các cây tương tự trong các điều kiện trồng trọt thích hợp. Thể biến nạp theo sáng chế được mong đợi là có hoạt tính CPT ổn định và tăng cường do các protein được đưa vào trong đó. Do đó, mong đợi rằng lượng sản phẩm được sinh tổng hợp thông qua các phản ứng được xúc tác bằng CPT và do đó cả việc sản xuất polyisoprenoit được tăng cường, làm gia tăng sản lượng polyisoprenoit.

Thuật ngữ “polyisoprenoit” như được sử dụng trong bản mô tả là thuật ngữ di truyền được dùng để chỉ polyme có các đơn vị isopren (C_5H_8). Các ví dụ về

polyisoprenoit gồm polyme như monoterpen (C_{10}), sesquiterpen (C_{15}), diterpen (C_{20}), sesterterpen (C_{25}), triterpen (C_{30}), tetraterpen (C_{40}), và cao su tự nhiên. Thuật ngữ “isoprenoit” như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ hợp chất có các đơn vị isopren (C_5H_8), và về cơ bản bao gồm polyisoprenoit.

Như được mô tả ở trên, do CPT và NgBr được biểu hiện đồng thời theo sáng chế, nên hoạt tính của CPT được mong đợi là được làm ổn định và tăng cường. Do đó, mong đợi rằng lượng sản phẩm được sinh tổng hợp thông qua các phản ứng được xúc tác bằng CPT và từ đó cả việc sản xuất polyisoprenoit được tăng cường trong thể biến nạp, làm gia tăng sản lượng polyisoprenoit. Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thể biến nạp được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa CPT và gen mã hóa NgBr vào vật chủ để cho phép vật chủ này biểu hiện CPT và NgBr.

Các phương pháp có thể có để làm tăng sản lượng polyisoprenoit với sự có mặt của cả CPT và NgBr bao gồm, ngoài phương pháp sử dụng thể biến nạp được thiết kế di truyền để biểu hiện cả CPT và NgBr *in vivo* như được mô tả ở trên, còn có phương pháp liên quan đến sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro*, ví dụ, bằng cách chiết các enzym thô từ tế bào, tinh chế CPT và NgBr, và cho phép chúng cùng có mặt trong ống thử nghiệm.

Theo phương pháp liên quan đến sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro*, CPT và NgBr có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách chèn gen mã hóa CPT và/hoặc gen mã hóa NgBr vào vector thích hợp, và sử dụng *Escherichia coli* được biến nạp, nấm men, hoặc cây, hệ thống biểu hiện protein tự do trong tế bào, hoặc các phương tiện khác.

Nguồn CPT được sử dụng trong phương pháp liên quan đến sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro* không bị giới hạn cụ thể, và CPT tốt hơn nếu có nguồn gốc từ sinh vật có nhân điển hình, tốt hơn nữa nếu là cây, tốt hơn nữa nếu là cây sản sinh isoprenoit. CPT cũng có thể được cải biến bằng phương pháp bất kỳ, như bằng cách bổ sung nhóm

cải biến vào enzym (ví dụ phản ứng phosphoryl hóa, phản ứng metyl hóa, phản ứng axetyl hóa, phản ứng palmitoyl hóa, phản ứng myristoyl hóa, phản ứng farnesyl hóa, phản ứng cộng chuỗi đường, hoặc phản ứng ubiquitin hóa), hoặc bằng phản ứng oxy hóa/khử nhóm disulfua, hoặc bằng cách cải biến cấu trúc bằng proteaza.

Nguồn NgBr được sử dụng trong phương pháp liên quan đến sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro* không bị giới hạn cụ thể, và NgBr tốt hơn nếu có nguồn gốc từ sinh vật có nhân điển hình, tốt hơn nữa nếu là cây, tốt hơn nữa nếu là cây sản sinh isoprenoit. NgBr cũng có thể được cải biến bằng phương pháp bất kỳ, như bằng cách bổ sung nhóm cải biến vào enzym (ví dụ phản ứng phosphoryl hóa, phản ứng metyl hóa, phản ứng axetyl hóa, phản ứng palmitoyl hóa, phản ứng myristoyl hóa, phản ứng farnesyl hóa, phản ứng cộng chuỗi đường, hoặc phản ứng ubiquitin hóa), hoặc bằng phản ứng oxy hóa/khử nhóm disulfua, hoặc bằng cách cải biến cấu trúc bằng proteaza.

Như được mô tả ở trên, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng CPT được mã hóa bằng ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc ADN có khả năng lai với ADN có trình tự nucleotit bổ sung vào trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 trong các điều kiện nghiêm ngặt, và mã hóa protein có chức năng vốn có của chúng, tương tác với NgBr. Ngoài CPT, NgBr cũng được xem là tương tác với protein thứ ba. Các ví dụ về chế độ tương tác như vậy bao gồm hai chế độ sau đây:

(1) CPT tương tác với protein thứ ba thông qua NgBr, hoặc nói cách khác, NgBr, CPT, và protein thứ ba đồng thời tương tác với nhau.

(2) Sự tương tác giữa NgBr và CPT và sự tương tác giữa NgBr và protein thứ ba xuất hiện riêng lẻ.

Các ví dụ không giới hạn về protein thứ ba bao gồm yếu tố kéo dài mũ cao su (REF), protein cao su ở dạng phân tử nhỏ (SRPP), và farnesyl diphosphat (FPP) synthaza.

Trong phương pháp bao gồm sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro*, thì ngoài

CPT và NgBr, một enzym khác cũng có thể được bổ sung thêm vào để có mặt cùng nhau. Các ví dụ về enzym này bao gồm các enzym đã biết là có mặt trong nhựa mủ, như yếu tố kéo dài mũ cao su (REF), protein cao su ở dạng phân tử nhỏ (SRPP), protein liên kết GTP nhỏ, trong bản mô tả, β -1,3-glucanaza, farnesyl diphosphat (FPP) synthaza, và protein của chất ức chế proteaza. Trong số các enzym này, enzym tương tác với NgBr, như REF, được ưu tiên đặc biệt.

Trong phương pháp liên quan đến sự có mặt của cả CPT và NgBr *in vitro*, các thành phần khác mà có thể được bổ sung vào để có mặt cùng nhau ngoài CPT và NgBr không bị giới hạn ở enzym và có thể bao gồm màng nhằm kết hợp các sản phẩm phản ứng. Kiểu màng không bị giới hạn cụ thể, và có thể là màng tự nhiên như màng tế bào hoặc cao su phân tử nhỏ, hoặc màng nhân tạo như liposom.

Lipit tạo thành màng có thể là lipit mà có thể tạo ra màng lipit hai lớp, và các ví dụ bao gồm glyxeroglycolipit, sphingoglycolipit, cholesterol, và phospholipit đã biết.

Các ví dụ về glyxeroglycolipit gồm sulfoxylglycerit, diglycosyldiglycerit, digalactosyldiglycerit, galactosyldiglycerit, và glycosyldiglycerit. Các ví dụ về sphingoglycolipit gồm galactosylxerobrosit, lactosylxerobrosit, và gangliosit.

Các ví dụ về các phospholipit gồm phospholipit tự nhiên hoặc tổng hợp, như phosphatidylcholin, phosphatidyletanolamin, phosphatidylserin, axit phosphatidic, phosphatidylglyxerol, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholin, sphingomyelin, lexithin trong lòng đỏ trứng, lexithin đậu tương, và phospholipit được hydro hóa.

Các ví dụ về phosphatidylcholin gồm phosphatidylcholin đậu tương, phosphatidylcholin trong lòng đỏ trứng, dilauroylphosphatidylcholin, dimyristoylphosphatidylcholin, dipalmitoylphosphatidylcholin, dioleoylphosphatidylcholin, và distearoylphosphatidylcholin.

Các ví dụ về phosphatidyletanolamin gồm dioleoylphosphatidyletanolamin,

dilauroylphosphatidyletanolamin, dimyristoylphosphatidyletanolamin, dipalmitoylphosphatidyletanolamin, và distearoylphosphatidyletanolamin.

Các ví dụ về phosphatidylserin gồm dilauroylphosphatidylserin, dimyristoylphosphatidylserin, dipalmitoylphosphatidylserin, và distearoylphosphatidylserin.

Các ví dụ về phosphatidylglycerol gồm dilauroylphosphatidylglycerol, dimyristoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylglycerol, và distearoylphosphatidylglycerol.

Các ví dụ về phosphatidylinositol gồm dilauroylphosphatidylinositol, dimyristoylphosphatidylinositol, dipalmitoylphosphatidylinositol, và distearoylphosphatidylinositol.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả cụ thể dựa trên các ví dụ sau đây, nhưng không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Phương pháp tách dòng

Nhận biết trình tự axit amin và trình tự nucleotit của protein đích

ARN tổng số được chiết từ nhựa mủ *Hevea brasiliensis* bằng phương pháp phenol nóng. Bổ sung 6 mL dung dịch đệm natri axetat 100mM và 1mL dung dịch SDS 10% vào 6mL nhựa mủ, và tiếp đó 12mL phenol bão hòa trong nước được gia nhiệt sơ bộ ở nhiệt độ 65°C. Hỗn hợp này được ủ trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 65°C, được khuấy bằng cách sử dụng máy trộn xoáy, và được ly tâm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng với tốc độ 7000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi được chuyển vào một ống mới, 12mL dung dịch phenol:clorofom (tỷ lệ 1:1) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy bằng cách lắc trong thời gian 2 phút. Sau khi khuấy, hỗn hợp thu được được ly tâm lại trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng ở tốc độ 7000

vòng/phút, phần dịch nổi được chuyển vào một ống mới, 12mL rượu clorofom:isoamyl (tỷ lệ 24:1) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy bằng cách lắc trong thời gian 2 phút. Sau khi khuấy, hỗn hợp thu được được ly tâm lại trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng tại 7000 vòng/phút, phần dịch nổi được chuyển vào một ống mới, 1,2mL dung dịch natri axetat 3M và 13mL isopropanol được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy bằng cách sử dụng máy trộn xoáy. Hỗn hợp thu được được ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ -20°C để kết tủa ARN tổng số. Hỗn hợp đã ủ được ly tâm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 15000 vòng/phút, và phần dịch nổi được loại bỏ để thu gom chất kết tủa chứa ARN tổng số. ARN tổng số đã thu gom được rửa hai lần bằng ethanol 70%, và tiếp đó được hòa tan trong nước không chứa RNaza.

ADN bổ trợ được tổng hợp từ ARN tổng số đã gom được. Việc tổng hợp ADN bổ trợ được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit tổng hợp ADN bổ trợ chuỗi thứ nhất PrimeScript II (Takara) theo sơ tay hướng dẫn.

Các gen CPT và NgBr thu được bằng cách sử dụng ADN bổ trợ chuỗi thứ nhất làm mẫu. Kỹ thuật PCR được thực hiện bằng cách sử dụng KOD-plus-Neo (Toyobo Co., Ltd.) theo sơ tay hướng dẫn. Phản ứng PCR bao gồm 35 chu trình với mỗi chu trình bao gồm 10 giây ở nhiệt độ 98°C, 30 giây ở nhiệt độ 58°C, và 1 phút ở nhiệt độ 68°C.

Gen CPT thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây:

Đoạn mồi 1: 5'-tttgccattacggccatggaattatacaacggtgagagg-3',

Đoạn mồi 2: 5' -tttgccgagggcgccctattttaagtattcctatgtttc-3'.

Gen NgBr thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây:

Đoạn mồi 3: 5' -tttgccattacggccatggatttgaaacctggag-3' ,

Đoạn mồi 4: 5' -tttgccgagggcgccctcatgtaccataatttgctgcac-3' .

Hai kiểu gen CPT (HRT1 và HRT2) và một kiểu gen NgBr (NgBr) thu được như trên. Ba kiểu gen được giải trình tự để nhận biết trình tự nucleotit và trình tự axit amin

có chiều dài đầy đủ. Trình tự nucleotit của HRT1 được thể hiện bằng SEQ ID NO:1, trình tự nucleotit của HRT2 được thể hiện bằng SEQ ID NO:3, và trình tự nucleotit của NgBr được thể hiện bằng SEQ ID NO:5. Trình tự axit amin của HRT1 được thể hiện bằng SEQ ID NO:2, trình tự axit amin của HRT2 được thể hiện bằng SEQ ID NO:4, và trình tự axit amin của NgBr được thể hiện bằng SEQ ID NO:6.

Cấu trúc vector

Ba kiểu mảnh ADN đã khuếch đại thu được được bổ sung dA và tiếp đó được chèn vào các vector pGEM-T Easy bằng cách sử dụng hệ vector pGEM-T Easy (Promega) để tạo ra pGEM-HRT1, pGEM-HRT2, và pGEM-NgBr.

Biến nạp *E. coli*

Escherichia coli DH5 α được biến nạp bằng các vector đã tạo ra, thể biến nạp được nuôi cấy trên môi trường agar LB chứa ampicillin và X-gal, và các tế bào *E. coli* mang các gen hướng đích đã được đưa vào được lựa chọn bằng cách sàng lọc theo màu xanh/trắng.

Các tế bào *E. coli* đã biến nạp bằng plasmid có các gen đích được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C trên môi trường lỏng LB. Sau khi nuôi cấy, các tế bào được thu gom, và plasmid cũng được thu gom. Bộ kit mini plasmid FastGene (Nippon Genetics Co., Ltd.) được sử dụng để thu gom plasmid.

Phép phân tích trình tự xác nhận rằng không có đột biến trong trình tự nucleotit của các gen được chèn vào plasmid đã thu gom được.

Tạo nấm men biến nạp để biểu hiện gen mã hóa CPT và gen mã hóa NgBr

Các gen HRT1, HRT2, và NgBr cần được chèn vào vector biểu hiện nấm men thu được bằng PCR bằng cách sử dụng các vector được tạo ra trong phần "cấu trúc vector" nêu trên làm mẫu.

Các gen HRT1 và HRT2 thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây:

Đoạn mồi 5: 5'-gacgcccgggaggccatgaa-3',

Đoạn mồi 6: 5'-cagcttctccccgggctttg-3'.

Gen NgBr thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây:

Đoạn mồi 7: 5'-tttctcgagatggatttgaaacctggagctg-3',

Đoạn mồi 8: 5'-tttctcgagtgtaccataattttgctgcac-3'.

Các mảnh ADN thu được được bổ sung dA và sau đó được chèn vào vector pGEM-T Easy bằng cách sử dụng hệ vector pGEM-T Easy (Promega) để tạo ra pGEM-HRT1 YE, pGEM-HRT2 YE, và pGEM-NgBr YE.

Việc biến nạp *E. coli*, thu gom plasmit, và xác nhận trình tự nucleotit được thực hiện như được mô tả trong phần “biến nạp *E. coli*” ở trên nhưng sử dụng các vector đã được tạo ra. pGEM-HRT1 YE và pGEM-HRT2 YE, được xác nhận là không có đột biến trong trình tự nucleotit, được xử lý bằng enzym giới hạn SmaI và được chèn vào pGK426 đã được xử lý tương tự bằng SmaI, để tạo ra pGK-HRT1 và pGK-HRT2.

Tương tự, pGEM-NgBr YE, được xác nhận là không có đột biến trong trình tự nucleotit, được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và được chèn vào pGK425 đã được xử lý tương tự bằng XbaI, để tạo ra pGK-NgBr.

Chủng nấm men SNH23-7D được biến nạp bằng plasmit đã tạo ra. Phương pháp PEG được sử dụng để biến nạp kép nấm men. Các tế bào biến nạp được nuôi cấy ở nhiệt độ 23°C trong thời gian ba ngày trên môi trường SD thiếu hụt Leu và Ura để sàng lọc. Các cặp được sử dụng để tạo ra thể biến nạp kép của nấm men là như sau.

- (1) SNH23-7D/pGK426, pGK425 (không có gen được đưa vào)
- (2) SNH23-7D/pGK-HRT1, pGK425 (chúng chỉ biểu hiện HRT1)
- (3) SNH23-7D/pGK-HRT2, pGK425 (chúng chỉ biểu hiện HRT2)
- (4) SNH23-7D/pGK-HRT1, pGK-NgBr (chúng biểu hiện đồng thời HRT1/NgBr)

(5) SNH23-7D/pGK-HRT2, pGK-NgBr (chúng biểu hiện đồng thời HRT2/NgBr)

Không thu được thể biến nạp SNH23-7D/pGK426, pGK-NgBr (chúng chỉ biểu hiện NgBr).

Phương pháp sàng lọc lai đôi ở nấm men

Các gen đích được chèn vào các plasmit đã thu gom được trong phần “phương pháp tách dòng” nêu trên được phân cắt bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn SfiI để chèn các gen đích vào plasmit dùng để sàng lọc lai đôi ở nấm men.

Xây dựng cấu trúc vector

Các gen đã phân cắt được chèn vào plasmit lai đôi ở nấm men bằng cách sử dụng phần mềm Ligation phiên bản 2 (Toyobo). Plasmit mỗi lai đôi ở nấm men được sử dụng làm vector mỗi pBT3-SUC, và plasmit vật mỗi lai đôi ở nấm men được sử dụng làm vector vật mỗi pPR3-N. HRT1 hoặc HRT2 được chèn vào vector vật mỗi (pPR-HRT1, pPR-HRT2), và HRT1, HRT2, hoặc NgBr được chèn vào vector mỗi (pBT-HRT1, pBT-HRT2, pBT-NgBr).

Biến nạp *E. coli*

Escherichia coli DH5 α được biến nạp bằng vector lai đôi ở nấm men được tạo ra như trên. Các tế bào biến nạp được nuôi cấy trên môi trường aga LB chứa ampicilin, và các tế bào *E. coli* mang các gen đích đã đưa vào được lựa chọn.

Các tế bào *E. coli* biến nạp bằng plasmit có các gen đích được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C trên môi trường lỏng LB. Sau khi nuôi cấy, các tế bào được thu gom, và plasmit cũng được thu gom. Bộ kit mini Plasmid FastGene (Nippon Genetics Co., Ltd.) được sử dụng để thu gom plasmit.

Biến nạp kép nấm men

Chủng nấm men NMY-51 được biến nạp bằng plasmit đã thu gom được. Phương

pháp PEG được sử dụng để biến nạp kép nấm men. Các tế bào biến nạp được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian ba ngày trên môi trường SD thiếu hụt Trp và Leu để sàng lọc. Bảng 1 thể hiện các cặp được sử dụng để tạo ra thể biến nạp kép của nấm men.

Bảng 1

Số	Môi	Vật môi
1	pPR3N	pBT3-SUC
2	pPR3N	pBT-HRT1
3	pPR3N	pBT-HRT2
4	pBR-HRT1	pBT3-SUC
5	pBR-HRT1	pBT3-NgBr
6	pBR-HRT1	pBR-HRT2
7	pBR-HRT2	pBT3-SUC
8	pBR-HRT2	pBT-HRT1
9	pBR-HRT2	pBT3-NgBr

Các tương tác giữa các enzym của các thể biến nạp kép của nấm men được quan sát thông qua phương pháp sàng lọc lai đôi ở nấm men bằng cách nuôi cấy trên môi trường SD thiếu hụt Trp, Leu, Ade và His trong thời gian ba ngày ở nhiệt độ 30°C. Trong thử nghiệm này, nấm men có thể phát triển trên môi trường chọn lọc chỉ khi protein mã hóa bằng gen đã được đưa vào trong plasmit môi tương tác với protein mã hóa bởi gen đã được đưa vào trong plasmit vật môi.

Các kết quả của các phép phân tích sàng lọc lai đôi ở nấm men được thể hiện trên Fig.1. Fig.1(a) thể hiện các kết quả cho thấy HRT1 có tương tác với HRT2 hoặc NgBr hay không. Fig.1(b) thể hiện các kết quả cho thấy HRT2 có tương tác với HRT1 hoặc NgBr hay không. Trên Fig.1(a), các phần tính theo chiều kim đồng hồ từ trên cùng bên phải lần lượt tương ứng với các kết quả của các cặp số 1, 4, 5, 6, và 3, trong bảng 1. Trên Fig.1(b), các phần tính theo chiều kim đồng hồ từ trên cùng bên phải lần lượt tương ứng với các kết quả của các cặp số 1, 7, 8, 9, và 2, trong bảng 1.

Như được thể hiện trên Fig.1, chỉ kết quả của cặp số 5 trong bảng 1, nghĩa là cặp HRT1 và NgBr, trên Fig.1(a) là thể hiện sự tương tác. Điều này chỉ ra rằng NgBr tương tác với HRT1, một loại CPT có trong nhựa mủ, nhưng không tương tác với HRT2. Như vậy, đã chứng minh được rằng NgBr không tương tác với tất cả các loại CPT mà chỉ tương tác với một CPT cụ thể.

Từ những kết quả này, thấy rằng hoạt tính của HRT1 có thể được làm ổn định và tăng cường hơn nữa khi HRT1 được kết hợp với NgBr.

Danh sách các số chỉ dẫn:

- 1: cặp plasmit vật môi pPR3N và plasmit môi pBT3-SUC
- 2: cặp plasmit vật môi pPR3N và plasmit môi pBT-HRT1
- 3: cặp plasmit vật môi pPR3N và plasmit môi pBT-HRT2
- 4: cặp plasmit vật môi pPR-HRT1 và plasmit môi pBT3-SUC
- 5: cặp plasmit vật môi pPR-HRT1 và plasmit môi pBT-NgBr
- 6: cặp plasmit vật môi pPR-HRT1 và plasmit môi pBT-HRT2
- 7: cặp plasmit vật môi pPR-HRT2 và plasmit môi pBT3-SUC
- 8: cặp plasmit vật môi pPR-HRT2 và plasmit môi pBT-HRT1
- 9: cặp plasmit vật môi pPR-HRT2 và plasmit môi pBT-NgBr

Phần văn bản không chứa danh mục trình tự

SEQ ID NO:1: trình tự nucleotit của gen mã hóa HRT1 từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:2: trình tự axit amin của HRT1 từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:3: trình tự nucleotit của gen mã hóa HRT2 từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:4: trình tự axit amin của HRT2 từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:5: trình tự nucleotit của gen mã hóa NgBr từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:6: trình tự axit amin của NgBr từ *Hevea brasiliensis*

SEQ ID NO:7: Đoạn môi 1

SEQ ID NO:8: Đoạn môi 2

SEQ ID NO:9: Đoạn môi 3

SEQ ID NO:10: Đoạn môi 4

SEQ ID NO:11: Đoạn môi 5

SEQ ID NO:12: Đoạn môi 6

SEQ ID NO:13: Đoạn môi 7

SEQ ID NO:14: Đoạn môi 8

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ biến nạp của tế bào *Hevea* hoặc *Taraxacum*, được tạo ra bằng cách đưa gen mã hóa cis-prenyltransferaza và gen mã hóa thụ thể Nogo-B vào tế bào *Hevea* hoặc *Taraxacum* để tế bào này biểu hiện cis-prenyltransferaza và thụ thể Nogo-B, trong đó gen mã hóa thụ thể Nogo-B là một trong số các ADN sau:

ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5; và

ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:5,

trong đó gen mã hóa cis-prenyltransferaza là một trong số các ADN sau:

ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3; và

ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3.

2. Thẻ biến nạp theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ cây.

3. Thẻ biến nạp theo điểm 2, trong đó ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ cây sản sinh isoprenoit.

4. Thẻ biến nạp theo điểm 3, trong đó ít nhất một trong số gen mã hóa cis-prenyltransferaza hoặc gen mã hóa thụ thể Nogo-B có nguồn gốc từ *Hevea brasiliensis*.

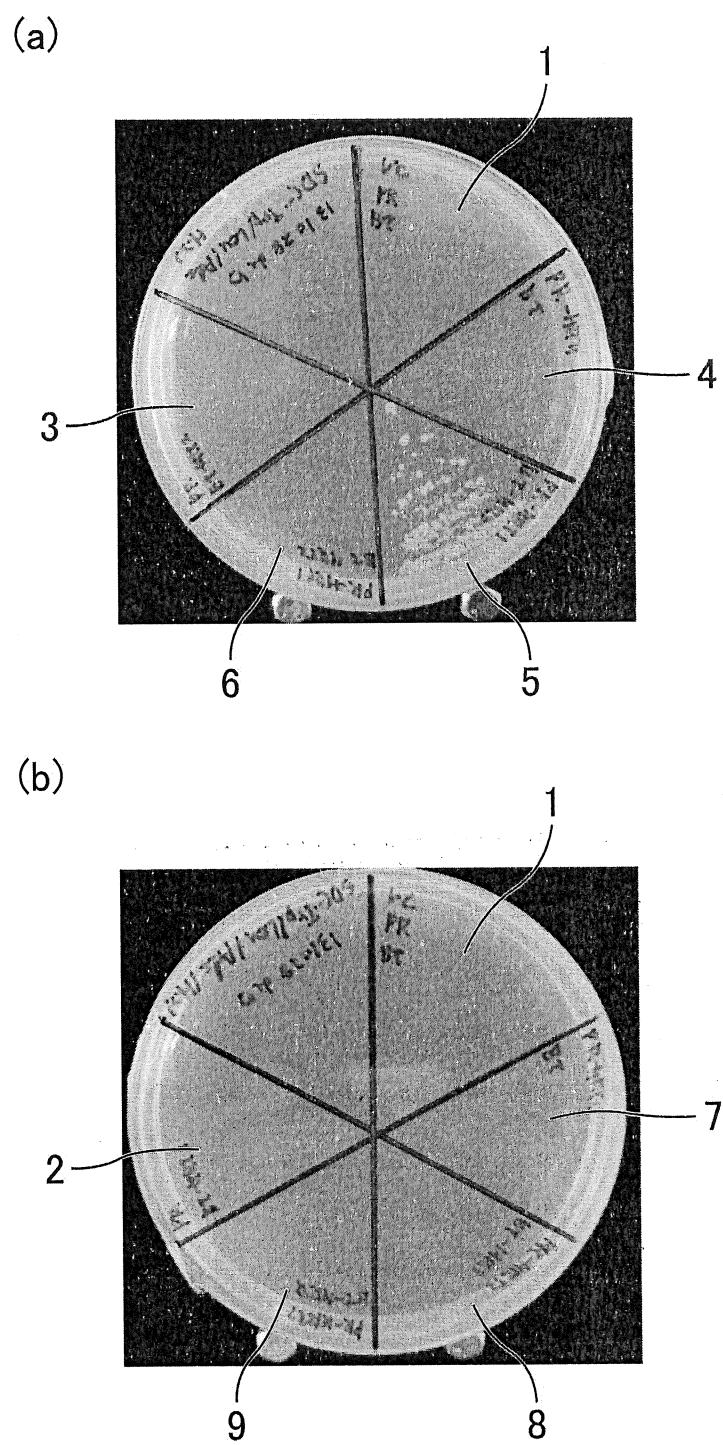
5. Thẻ biến nạp theo điểm 1, trong đó gen mã hóa cis-prenyltransferaza là một trong số các ADN sau:

ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1; và

ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1.

6. Phương pháp sản xuất polyisoprenoit bằng cách sử dụng thẻ biến nạp theo điểm 1.

Fig.1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SUMITOMO RUBBER INDUSTRIES, LTD.

<120> THẺ BIẾN NẠP ĐỂ BIỂU HIỆN CIS-PRENYLTRANFERAZA VÀ THỤ THỂ NOGO B VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYISOPRENOIT BẰNG CÁCH SỬ DỤNG THẺ BIẾN NẠP NÀY

<130> SR2058WO

<140> PCT/JP2015/050077

<141> 2015-01-06

<150> JP 2014-007779

<151> 2014-01-20

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 873

<212> ADN

<213> Hevea brasiliensis

<400> 1

atggaattat acaacggtga gaggccaagt gtgttcagac ttttagggaa gtatatgaga	60
aaagggttat atagcatcct aaccaggggt cccatcccta ctcatattgc cttcatattg	120
gatggaaaca ggaggtttgc taagaagcat aaactgccag aaggaggtgg tcataaggct	180
ggatttttag ctcttctgaa cgtactaact tattgctatg agttaggagt gaaatatgag	240
actatctatg ccttttagcat cgataatttt cgaaggaaac ctcatgaggt tcagtagcta	300
atggatctaa tgctggagaa gattgaagg atgatcatgg aagaaagtat catcaatgca	360
tatgatattt gcgtacgttt tgtgggtaac ctgaagcttt taagtgagcc agtcaagacc	420
gcagcagata agattatgag ggctactgcc aacaattcca aatgtgtgct tctcattgct	480
gtatgctata cttcaactga tgagatcgtg catgctgttg aagaatcctc tgaattgaac	540
tccaatgaag tttgtaacaa tcaagaattg gaggaggcaa atgcaactgg aagcggtagt	600
gtgattcaaa ttgagaacat ggagtcgtat tctggaataa aacttgtaga ccttgagaaa	660
aacacctaca taaatcctta tcctgatgtt ctgattcgaa cttctgggga gaccgcgtctg	720
agcaactact tactttggca gactactaat tgcatactgt attctcctca tgcactgtgg	780
ccagagattg gtcttcgaca cgtgggtgtgg gcagtaatta acttccaacg tcattattct	840
tacttggaga aacataagga atacttaaaa taa	873

<210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Hevea brasiliensis

<400> 2

```

Met Glu Leu Tyr Asn Gly Glu Arg Pro Ser Val Phe Arg Leu Leu Gly
1          5          10          15
Lys Tyr Met Arg Lys Gly Leu Tyr Ser Ile Leu Thr Gln Gly Pro Ile
          20          25          30
Pro Thr His Ile Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asn Arg Arg Phe Ala Lys
          35          40          45
Lys His Lys Leu Pro Glu Gly Gly Gly His Lys Ala Gly Phe Leu Ala
          50          55          60
Leu Leu Asn Val Leu Thr Tyr Cys Tyr Glu Leu Gly Val Lys Tyr Ala
65          70          75          80
Thr Ile Tyr Ala Phe Ser Ile Asp Asn Phe Arg Arg Lys Pro His Glu
          85          90          95
Val Gln Tyr Val Met Asp Leu Met Leu Glu Lys Ile Glu Gly Met Ile
          100          105          110
Met Glu Glu Ser Ile Ile Asn Ala Tyr Asp Ile Cys Val Arg Phe Val
          115          120          125
Gly Asn Leu Lys Leu Leu Ser Glu Pro Val Lys Thr Ala Ala Asp Lys
          130          135          140
Ile Met Arg Ala Thr Ala Asn Asn Ser Lys Cys Val Leu Leu Ile Ala
145          150          155          160
Val Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Glu Ile Val His Ala Val Glu Glu Ser
          165          170          175
Ser Glu Leu Asn Ser Asn Glu Val Cys Asn Asn Gln Glu Leu Glu Glu
          180          185          190
Ala Asn Ala Thr Gly Ser Gly Thr Val Ile Gln Ile Glu Asn Met Glu
          195          200          205
Ser Tyr Ser Gly Ile Lys Leu Val Asp Leu Glu Lys Asn Thr Tyr Ile
          210          215          220
Asn Pro Tyr Pro Asp Val Leu Ile Arg Thr Ser Gly Glu Thr Arg Leu
225          230          235          240
Ser Asn Tyr Leu Leu Trp Gln Thr Thr Asn Cys Ile Leu Tyr Ser Pro
          245          250          255
His Ala Leu Trp Pro Glu Ile Gly Leu Arg His Val Val Trp Ala Val
          260          265          270
Ile Asn Phe Gln Arg His Tyr Ser Tyr Leu Glu Lys His Lys Glu Tyr
          275          280          285
Leu Lys
          290

```

<210> 3
 <211> 855

<212> ADN

<213> Hevea brasiliensis

<400> 3

```

atggaattat acaacggtga gaggccaagt gtgttcagac ttttagggaa gtatatgaga      60
aaagggttat atagcatcct aaccaggggt cccatcccta ctcatattgc cttcatattg      120
gatggaaacg ggaggtttgc taagaagcat aaactgccag aaggaggtgg tcataaggct      180
ggatttttag ctcttctgaa cgtactaact tattgctatg agttaggagt gaaatatgcg      240
actatctatg ccttttagcat cgataatfff cgaaggaaac ctcatgaggt tcagtacgta      300
atgaatctaa tgctggagaa gattgaaggg atgatcatgg aagaaagtat catcaatgca      360
tatgatattt gcgtgcgttt tgttggtaat ctgaagcttt tagatgagcc actcaagacc      420
gcagcagata agataatgag ggctaactgcc aaaaattcca aatttgtgct tctccttgct      480
gtatgctaca cttcaactga tgagatcgtg catgctgttg aagaatcctc taaggataaa      540
ttgaaatccg atgaaatttg caacgatgga aacggagatt gtgtgattaa aattgaggag      600
atggagccat attctgaaat aaaacttgta gagcttgaga gaaacactta cataaatcct      660
tattctgatg tcttgattcg aacttctggg gagaccgctc tgagcaacta cctactttgg      720
cagactacta attgcatact gtattctcct catgcactgt ggccagagat tgggtcttga      780
cacgtggtgt gggcagtaat taactgccaa cgtcattatt cttacttgga gaaacataag      840
gaataacttaa aataa

```

855

<210> 4

<211> 284

<212> PRT

<213> Hevea brasiliensis

<400> 4

```

Met Glu Leu Tyr Asn Gly Glu Arg Pro Ser Val Phe Arg Leu Leu Gly
1           5           10          15
Lys Tyr Met Arg Lys Gly Leu Tyr Ser Ile Leu Thr Gln Gly Pro Ile
          20          25          30
Pro Thr His Ile Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asn Gly Arg Phe Ala Lys
          35          40          45
Lys His Lys Leu Pro Glu Gly Gly Gly His Lys Ala Gly Phe Leu Ala
          50          55          60
Leu Leu Asn Val Leu Thr Tyr Cys Tyr Glu Leu Gly Val Lys Tyr Ala
65          70          75          80
Thr Ile Tyr Ala Phe Ser Ile Asp Asn Phe Arg Arg Lys Pro His Glu
          85          90          95
Val Gln Tyr Val Met Asn Leu Met Leu Glu Lys Ile Glu Gly Met Ile
          100         105         110
Met Glu Glu Ser Ile Ile Asn Ala Tyr Asp Ile Cys Val Arg Phe Val

```

115	120	125
Gly Asn Leu Lys Leu Leu Asp Glu Pro Leu Lys Thr Ala Ala Asp Lys		
130	135	140
Ile Met Arg Ala Thr Ala Lys Asn Ser Lys Phe Val Leu Leu Leu Ala		
145	150	155
Val Cys Tyr Thr Ser Thr Asp Glu Ile Val His Ala Val Glu Glu Ser		
165	170	175
Ser Lys Asp Lys Leu Lys Ser Asp Glu Ile Cys Asn Asp Gly Asn Gly		
180	185	190
Asp Cys Val Ile Lys Ile Glu Glu Met Glu Pro Tyr Ser Glu Ile Lys		
195	200	205
Leu Val Glu Leu Glu Arg Asn Thr Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Asp Val		
210	215	220
Leu Ile Arg Thr Ser Gly Glu Thr Arg Leu Ser Asn Tyr Leu Leu Trp		
225	230	235
Gln Thr Thr Asn Cys Ile Leu Tyr Ser Pro His Ala Leu Trp Pro Glu		
245	250	255
Ile Gly Leu Arg His Val Val Trp Ala Val Ile Asn Cys Gln Arg His		
260	265	270
Tyr Ser Tyr Leu Glu Lys His Lys Glu Tyr Leu Lys		
275	280	

<210> 5

<211> 774

<212> ADN

<213> Hevea brasiliensis

<400> 5

atggatttga aacctggagc tggagggcag agagttaatc gattagtgga tccgattagt	60
tatcattttc ttcaatttct gtggcgctact ctacatcttc ttgtcagctt atggtacctt	120
caagttagta tgggtccaaat gatcgaaggc tttctaattct ctagtggact tgtgaaacgc	180
tatggagccc tcgatattga caaggtccgg taccttgcca ttgtggtaga tagtgaagaa	240
gcttaccaaaa tttctaaagt tattcagctt ttgaaatggg tggaagatat ggggtgtgaaa	300
catttatgcc tctatgattc aaaaggagtt ctcaagacaa acaagaaaac catcatggag	360
agtttgaaca atgctatgcc atttgaggaa gcagttgaaa aagatgtttt actggaccag	420
aaacagatga ctgtggaatt tgcttcacgc tccgatggaa aggaagcaat aaccagggca	480
gctaacgtac totttatgaa gtatttgaag tatgctaaaa ctggtgtagg aaaggaagaa	540
ccatgcttta cagaagatca aatggatgag gcactaaaag ctatagggtta caaagggccg	600
gaacctgact tgctattaat ttatggacct gttagatgcc atctagggtt ctcaccgtgg	660
agacttcgat atactgagat ggtgcatatg ggaccottga ggtacatgaa cctcggttca	720
ctaaaaaagg ccattcacag gttcacaaca gtgcagcaaa attatggtac atga	774

<210> 6

<211> 257
 <212> PRT
 <213> Hevea brasiliensis

<400> 6

```

Met Asp Leu Lys Pro Gly Ala Gly Gly Gln Arg Val Asn Arg Leu Val
1          5          10          15
Asp Pro Ile Ser Tyr His Phe Leu Gln Phe Leu Trp Arg Thr Leu His
          20          25          30
Leu Leu Val Ser Leu Trp Tyr Leu Gln Val Ser Met Val Gln Met Ile
          35          40          45
Glu Gly Phe Leu Ile Ser Ser Gly Leu Val Lys Arg Tyr Gly Ala Leu
          50          55          60
Asp Ile Asp Lys Val Arg Tyr Leu Ala Ile Val Val Asp Ser Glu Glu
65          70          75          80
Ala Tyr Gln Ile Ser Lys Val Ile Gln Leu Leu Lys Trp Val Glu Asp
          85          90          95
Met Gly Val Lys His Leu Cys Leu Tyr Asp Ser Lys Gly Val Leu Lys
          100          105          110
Thr Asn Lys Lys Thr Ile Met Glu Ser Leu Asn Asn Ala Met Pro Phe
          115          120          125
Glu Glu Ala Val Glu Lys Asp Val Leu Leu Asp Gln Lys Gln Met Thr
          130          135          140
Val Glu Phe Ala Ser Ser Ser Asp Gly Lys Glu Ala Ile Thr Arg Ala
145          150          155          160
Ala Asn Val Leu Phe Met Lys Tyr Leu Lys Tyr Ala Lys Thr Gly Val
          165          170          175
Gly Lys Glu Glu Pro Cys Phe Thr Glu Asp Gln Met Asp Glu Ala Leu
          180          185          190
Lys Ala Ile Gly Tyr Lys Gly Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Ile Tyr
          195          200          205
Gly Pro Val Arg Cys His Leu Gly Phe Ser Pro Trp Arg Leu Arg Tyr
          210          215          220
Thr Glu Met Val His Met Gly Pro Leu Arg Tyr Met Asn Leu Gly Ser
225          230          235          240
Leu Lys Lys Ala Ile His Arg Phe Thr Thr Val Gln Gln Asn Tyr Gly
          245          250          255
Thr

```

<210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mối xuôi với CPT

<400> 7
 tttggccatt acggccatgg aattatacaa cggtgagagg

<210> 8
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi ngược với CPT

 <400> 8
 tttggccgag gcggccttat tttaagtatt ccttatgttt c 41

 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi xuôi với NgBr

 <400> 9
 tttggccatt acggccatgg atttgaaacc tggag 35

 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi ngược với NgBr

 <400> 10
 tttggccgag gcggcctcat gtaccataat tttgctgcac 40

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi xuôi với HRT1,HRT2

 <400> 11
 gacgcccggg aggccatgaa 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi ngược với HRT1,HRT2

<400> 12

cagcttcctc ccgggctttg

20

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi xuôi với NgBr

<400> 13

tttctcgaga tggatttgaa acctggagct g

31

<210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi ngược với NgBr

<400> 14

tttctcgagt gtaccataat tttgctgcac

30