



(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)



1-0033359

(51)⁷ C12P 21/02; C07K 1/30; C12P 21/00;
C07K 1/14; C07K 1/34

(13) B

(21) 1-2019-01109

(22) 10/08/2017

(86) PCT/JP2017/029033 10/08/2017

(87) WO2018/030499 15/02/2018

(30) 2016-157912 10/08/2016 JP; 2016-229227 25/11/2016 JP; 2017-048702 14/03/2017 JP; 2017-094144 10/05/2017 JP

(45) 26/09/2022 414

(43) 25/06/2019 375A

(73) SPIBER INC. (JP)

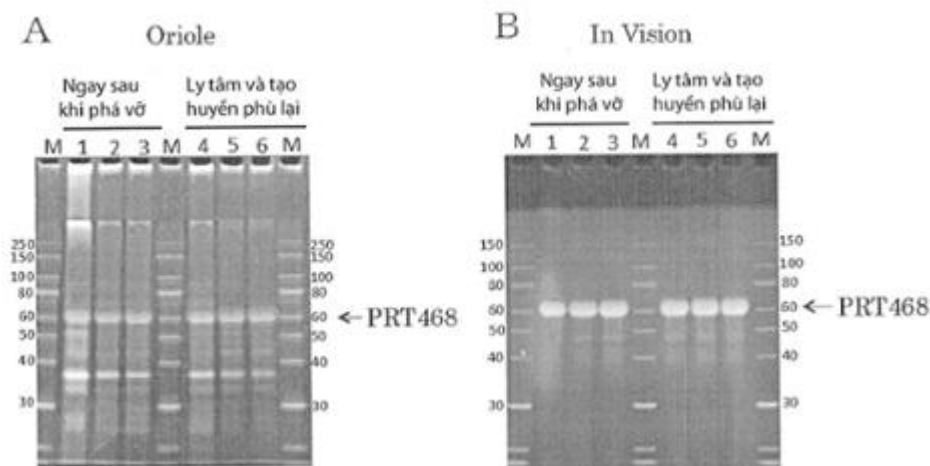
234-1, Aza Mizukami, Kakuganji, Tsuruoka-shi, Yamagata 9970052, Japan

(72) OSAWA Toshiaki (JP); SATO Yuya (JP); MORITA Keisuke (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ KẾT TỤ PROTEIN TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tách một cách hiệu quả các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng thể không hòa tan trong tế bào, bao gồm bước phá vỡ tế bào tái tổ hợp, kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp, và tách thể kết tụ thu được.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp không hòa tan bằng phương pháp tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp không hòa tan, và thể kết tụ protein tái tổ hợp không hòa tan thu được bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sản xuất protein đích ở quy mô công nghiệp đã được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào chủ tái tổ hợp di truyền. Nhiều phương pháp để phân lập và tinh chế protein tái tổ hợp được sản xuất bởi tế bào tái tổ hợp đã được báo cáo.

Trong trường hợp protein tái tổ hợp ở dạng thể không hòa tan được sản xuất theo kiểu kết chặt ở dạng các hạt không hòa tan trong tế bào tái tổ hợp, có thể phân lập các hạt không hòa tan này với năng suất tương đối cao và độ tinh khiết cao bằng cách ly tâm huyền phù có chứa thành phần như protein có nguồn gốc từ tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp phân lập protein đích từ các tế bào tái tổ hợp không hòa tan được hòa tan bằng hydroxit kim loại như natri hydroxit (tài liệu sáng chế 1), và các phương pháp tương tự đã được báo cáo.

Mặt khác, ví dụ, các phương pháp tinh chế sau đây đã được báo cáo trong trường hợp khó tách protein tái tổ hợp bằng cách ly tâm ngay cả trong trường hợp protein tái tổ hợp ở trạng thái hòa tan hoặc thể không hòa tan trong các tế bào tái tổ hợp, không giống như các hạt không hòa tan kết chặt. Tức là, ví dụ, phương pháp trong đó protein có nguồn gốc từ tế bào chủ được thủy phân bằng axit hữu cơ như axit formic hoặc axit propionic, các thể không hòa tan có nguồn gốc từ tế bào chủ được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc các cách tương tự, và sau đó protein tái tổ hợp đích được thu hồi ở trạng thái không bị biến tính và được tinh chế bằng kỹ thuật như sắc ký (tài liệu sáng chế 2) đã được báo cáo. Trong báo cáo này, protein đích vẫn ở trạng thái không bị biến tính ngay cả trong trường hợp axit hữu cơ được bổ sung vào và

không kết tụ.

Không phải protein tái tổ hợp đích nhất thiết phải được sản xuất dưới dạng hạt không hòa tan trong tế bào tái tổ hợp. Biết rằng trạng thái hình thành các hạt không hòa tan thay đổi rất nhiều tùy thuộc vào bản chất của chính protein tái tổ hợp đích hoặc các thông số khác nhau của quy trình nuôi cấy như thành phần môi trường tại thời điểm sản xuất, nhiệt độ nuôi cấy và tốc độ sản xuất. Do đó, các nghiên cứu hướng đến việc biến đổi protein tái tổ hợp hoặc phát triển phương pháp sản xuất hiệu quả để tạo ra các hạt lớn không hòa tan mà có thể được ly tâm càng dễ càng tốt.

Mặt khác, trong trường hợp có phương pháp có khả năng tách một cách dễ dàng các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan mịn vốn khó hoặc rất tốn thời gian để ly tâm, bằng cách ly tâm, lọc hoặc các cách tương tự, thì nó rất hữu ích về mặt công nghiệp, nhưng phương pháp như vậy chưa được biết đến.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số 2013-523665

Tài liệu sáng chế 2: Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số 2004-503204

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tách một cách hiệu quả các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào và phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng phương pháp tách này.

Giải quyết vấn đề

Là kết quả của các nghiên cứu sâu rộng về phương pháp có khả năng tách dễ dàng các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan mịn của protein tái tổ hợp vốn khó hoặc rất tốn thời gian để ly tâm, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng protein

tái tổ hợp có thể được tách ra một cách dễ dàng bằng cách kết tụ hiệu quả các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan để làm cho to lên. Sáng chế đã được hoàn thành dựa trên những phát hiện này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến, ví dụ, mỗi trong các đối tượng sau đây.

[1] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ở dạng thể kết tụ ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào, bao gồm phá vỡ tế bào tái tổ hợp, kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp, và tách thể kết tụ thu được.

[2] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [1], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng lực ly tâm là $10.000 \times g$ hoặc nhỏ hơn.

[3] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [1] hoặc [2], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng máy ly tâm được chọn từ nhóm bao gồm máy ly tâm loại tấm tách, máy ly tâm loại giỏ và máy ly tâm loại bình lắng.

[4] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [1], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách lọc hoặc lắng tự nhiên.

[5] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó sự kết tụ của các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion.

[6] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp, bao gồm các bước (A) đến (C) sau đây:

bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp;

bước (B) bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và

kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp; và

bước (C) tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù.

[7] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [6], còn bao gồm việc gia nhiệt trong bước (B).

[8] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [7], còn bao gồm việc khuấy trong bước (B).

[9] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5] đến [8], trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại kiềm thổ và muối kim loại thổ.

[10] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [9], trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm halogenua kim loại kiềm thổ, nitrat kim loại kiềm thổ, sulfat kim loại kiềm thổ, halogenua kim loại thổ, nitrat kim loại thổ, và sulfat kim loại thổ.

[11] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5] đến [10], trong đó axit là axit oxo.

[12] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [11], trong đó axit oxo là axit oxo được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, axit sulfuric, và axit xitric.

[13] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5] đến [12], trong đó chất kết bông anion là chất kết bông anion được chọn từ nhóm bao gồm polyacrylat, polyacrylamit anion, và copolyme acrylamit-acrylat.

[14] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [13], trong đó việc phá vỡ tế bào tái tổ hợp là phá vỡ bằng cơ học.

[15] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] và [6] đến [14], trong đó việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách lọc.

[16] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [15], trong đó tế bào tái tổ hợp là tế bào tái tổ hợp được biến nạp bằng vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào động vật.

[17] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [16], trong đó protein tái tổ hợp là protein cấu trúc.

[18] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục [17], trong đó protein cấu trúc là protein có nguồn gốc từ protein được chọn từ nhóm bao gồm keratin, collagen, elastin, resilin, tơ tằm, và tơ nhện.

[19] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [18], trong đó thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được có cỡ hạt là 4 μm hoặc lớn hơn và 50 μm hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng phương pháp vùng cảm biến điện.

[20] Thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [18], có cỡ hạt là 4 μm hoặc lớn hơn và 50 μm hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng phương pháp vùng cảm biến điện.

[21] Phương pháp tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng thể không hòa tan trong tế bào, bao gồm bước phá vỡ tế bào tái tổ hợp, kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp, và tách thể kết tụ thu được.

[22] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [21], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng lực ly tâm là $10.000 \times g$ hoặc nhỏ hơn.

[23] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [21] hoặc [22], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng máy ly tâm được chọn từ nhóm bao gồm máy ly tâm loại tấm tách, máy ly tâm loại giỏ và máy ly tâm loại bình lắng.

[24] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [21], còn bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách lọc hoặc lắng tự nhiên.

[25] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [24], trong đó sự kết tụ của các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion.

[26] Phương pháp tách protein tái tổ hợp, bao gồm các bước từ (A) đến (C) sau đây:

bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp;

bước (B) bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp; và

bước (C) tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù.

[27] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [26], còn bao gồm việc gia nhiệt trong bước (B).

[28] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [27], còn bao gồm việc khuấy trong bước (B).

[29] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [25] đến [28], trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại kiềm thổ và muối kim loại thổ.

[30] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [29], trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm halogenua kim loại kiềm thổ, nitrat kim loại kiềm thổ, sulfat kim loại kiềm thổ, halogenua kim loại thổ, nitrat kim loại thổ, và sulfat kim loại thổ.

[31] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [25] đến [30], trong đó axit là axit oxo.

[32] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [31], trong đó axit oxo là axit oxo được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, axit sulfuric, và axit xitric.

[33] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [25] đến [32], trong đó chất kết bông anion là chất kết bông anion được chọn từ nhóm bao gồm polyacrylat, polyacrylamit anion, và copolyme acrylamit-acrylat.

[34] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [33], trong đó việc phá vỡ tế bào tái tổ hợp là phá vỡ bằng cơ học.

[35] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [21] và [26] đến [34], trong đó việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách lọc.

[36] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [35], trong đó tế bào tái tổ hợp là tế bào tái tổ hợp được biến nạp bằng vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào động vật.

[37] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [36], trong đó protein tái tổ hợp là protein cấu trúc.

[38] Phương pháp tách protein tái tổ hợp theo mục [37], trong đó protein cấu trúc là protein có nguồn gốc từ protein được chọn từ nhóm bao gồm keratin, collagen, elastin, resilin, tơ tằm, và tơ nhện.

[39] Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng phương pháp tách theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [38], trong đó thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp tách này có cỡ hạt là 4 μm hoặc lớn hơn và 50 μm hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng phương pháp vùng cảm biến điện.

Hiệu quả của sáng chế

Theo phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp của sáng chế, vì các thể không hòa tan có thể được kết tụ và được làm cho to lên, nên thể kết tụ protein tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng cách tách một cách hiệu quả các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào bằng cách, ví dụ, lắng tự nhiên, ly tâm, hoặc lọc. Hơn nữa, không chỉ các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan của protein tái tổ

hợp, vốn không thể tách dễ dàng bằng cách ly tâm, lọc, hoặc phương pháp tương tự, có thể được tách dễ dàng, mà còn có thể cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp đã tách. Theo sáng chế, hiệu quả bất ngờ như vậy được tạo ra.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là ảnh cho thấy kết quả của việc nghiên cứu hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung muối kim loại trong ví dụ 1.

Fig.2 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung muối kim loại trong ví dụ 2.

Fig.3 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan của protein có các chỉ số thủy liệu pháp khác nhau bằng cách bổ sung muối kim loại trong ví dụ 3.

Fig.4 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan của protein có các chỉ số thủy liệu pháp khác nhau bằng cách bổ sung muối kim loại trong ví dụ 4.

Fig.5 là ảnh cho thấy kết quả của phân tích điện di trên gel polyacrylamit (SDS-PAGE) về việc cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp đích dựa trên sự kết tụ bổ sung muối kim loại trong ví dụ 4. A là ảnh cho thấy kết quả nhuộm màu bằng chất nhuộm gel huỳnh quang Oriole (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) có khả năng nhuộm tất cả các protein sau khi điện di, và B là ảnh cho thấy kết quả nhuộm màu bằng chất nhuộm trong gel thể His InVision (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific, Inc.) phản ứng với vùng thể His của PRT410, sau khi điện di.

Fig.6 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung axit trong ví dụ 5.

Fig.7 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung axit vào các thể không hòa tan sau khi rửa trong ví dụ 5.

Fig.8 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể

không hòa tan của protein có các chỉ số thủy liệu pháp khác nhau bằng cách bổ sung axit trong ví dụ 6.

Fig.9 là ảnh cho thấy kết quả phân tích SDS-PAGE về việc cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp đích dựa trên sự kết tụ bổ sung axit trong ví dụ 6.

Fig.10 là ảnh cho thấy kết quả của việc kiểm tra hiệu quả kết tụ của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung chất kết bông trong ví dụ 8.

Fig.11 là ảnh cho thấy kết quả phân tích SDS-PAGE về việc cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp đích dựa trên sự kết tụ bổ sung chất kết bông anion trong ví dụ 9.

Fig.12 là đồ thị thể hiện sự phân bố tần số và sự phân bố tích lũy của cỡ hạt để xác nhận hiệu quả kết tụ trong ví dụ 10.

Fig.13 là ảnh cho thấy kết quả phân tích SDS-PAGE về sự thoái biến của các protein nhiễm tạp dựa trên sự gia nhiệt trong ví dụ 12.

Fig.14 là ảnh cho thấy kết quả phân tích SDS-PAGE về việc cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp đích dựa trên sự gia nhiệt trong ví dụ 12.

Fig.15 là đồ thị thể hiện sự phân bố tần số và phân bố tích lũy của cỡ hạt của các mẫu C, X, 1, 2, và 3 để xác nhận hiệu quả kết tụ bằng cách gia nhiệt liên tục trong ví dụ 13.

Fig.16 là đồ thị thể hiện sự phân bố tần số và phân bố tích lũy của cỡ hạt của các mẫu 4, 5, 6, 7, và 8 để xác nhận hiệu quả kết tụ bằng cách gia nhiệt liên tục trong ví dụ 13.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án để thực hiện sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án sau đây.

Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo một phương án là phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ở dạng thể kết tụ ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng thể không hòa tan trong tế bào, bao gồm bước phá vỡ tế bào tái tổ

hợp, kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp, và tách thể kết tụ thu được. Trong phương pháp sản xuất này, việc kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp tốt hơn là được thực hiện bằng cách bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion.

Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo phương án khác bao gồm các bước từ (A) đến (C) sau đây:

bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp;

bước (B) bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp; và

bước (C) tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù.

(Protein tái tổ hợp)

Protein tái tổ hợp không hòa tan (đôi khi được gọi là "protein đích" trong bản mô tả này) được tách bằng phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo phương án này được biểu hiện dưới dạng thể không hòa tan trong tế bào tái tổ hợp sẽ được mô tả sau đây. Protein tái tổ hợp có thể là protein không hòa tan bất kỳ mà tốt hơn là được sản xuất ở quy mô công nghiệp, và các ví dụ của chúng bao gồm protein có thể được sử dụng cho mục đích công nghiệp, protein có thể được sử dụng cho mục đích y tế, và protein cấu trúc. Các ví dụ cụ thể về protein có thể được sử dụng cho mục đích công nghiệp hoặc y tế bao gồm enzym, protein điều hòa, thụ thể, hormon peptit, xytokin, màng và protein vận chuyển, kháng nguyên được sử dụng để tiêm phòng, vắc-xin, protein liên kết kháng nguyên, protein kích thích miễn dịch, chất gây dị ứng, kháng thể có chiều dài đầy đủ và đoạn kháng thể, và các dẫn xuất của chúng. Các ví dụ cụ thể về protein cấu trúc bao gồm keratin, collagen, elastin, resilin, tơ tằm và tơ nhện, và các protein có nguồn gốc từ đó.

Protein có nguồn gốc từ tơ nhện hoặc tơ tằm là protein giống fibroin có thể là,

ví dụ, protein chứa trình tự miền được đại diện bởi công thức 1: $[(A)_n \text{ motif-REP}]_m$ (trong đó, trong công thức 1, $(A)_n$ motif là trình tự axit amin gồm 4 đến 20 gốc axit amin và số gốc alanin trên tổng số gốc axit amin trong $(A)_n$ motif là 80% hoặc lớn hơn; REP là trình tự axit amin gồm 10 đến 200 gốc axit amin; m là số nguyên từ 8 đến 300; một số lượng lớn các $(A)_n$ motif có thể là cùng một trình tự axit amin hoặc các trình tự axit amin khác nhau; và một số lượng lớn của REP có thể là cùng một trình tự axit amin hoặc các trình tự axit amin khác nhau). Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm các protein chứa các trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 1 (PRT410), SEQ ID NO: 2 (PRT853), SEQ ID NO: 3 (PRT647), SEQ ID NO: 4 (PRT699), và SEQ ID NO: 5 (PRT698). Các chỉ số thủy liệu pháp của các protein này lần lượt là -0,81, -0,68, 0,04, 0,17, và 0,43. Giá trị của chỉ số thủy liệu pháp là giá trị được tính toán theo phương pháp được mô tả trong công bố quốc tế số WO2014/103846.

Protein có nguồn gốc từ collagen có thể là, ví dụ, protein chứa trình tự miền được đại diện bởi công thức 2: $[\text{REP2}]_o$ (trong đó, trong công thức 2, o là số nguyên từ 5 đến 300; REP2 là trình tự axit amin gồm Gly-X-Y Gly trong đó X và Y mỗi nhóm là gốc axit amin bất kỳ ngoài Gly và một số lượng lớn REP2 có thể là cùng một trình tự axit amin hoặc các trình tự axit amin khác nhau). Ví dụ cụ thể của chúng có thể là protein chứa trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 6 (Collagen-typ 4-Kai). Trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 6 là trình tự axit amin trong đó trình tự axit amin (trình tự thể và trình tự bản lề) được đại diện bởi SEQ ID NO: 10 đã được bổ sung vào đầu N của trình tự axit amin từ gốc thứ 301 đến gốc thứ 540 tương ứng với phần lặp lại và motif của trình tự một phần của collagen typ 4 của người (NCBI GenBank số truy cập: CAA56335.1, GI: 3702452) thu được từ cơ sở dữ liệu NCBI. Collagen-typ 4-Kai có chỉ số thủy liệu pháp là -0,75.

Protein có nguồn gốc từ resilin có thể là, ví dụ, protein chứa trình tự miền được đại diện bởi công thức 3: $[\text{REP3}]_p$ (trong đó, trong công thức 3, p là số nguyên từ 4 đến 300; REP3 là trình tự axit amin gồm Ser-J-J-Tyr-Gly-U-Pro trong đó J là gốc axit amin bất kỳ và đặc biệt tốt hơn là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asp,

Ser, và Thr, và U là gốc axit amin bất kỳ và đặc biệt tốt hơn là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Pro, Ala, Thr, và Ser, và một số lượng lớn của REP3 có thể là cùng một trình tự axit amin hoặc các trình tự axit amin khác nhau). Ví dụ cụ thể của chúng có thể là protein chứa trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 7. Trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 7 là trình tự axit amin trong đó trình tự axit amin (trình tự thể và trình tự bản lề) được đại diện bởi SEQ ID NO: 10 đã được bổ sung vào đầu N của trình tự axit amin từ gốc thứ 19 đến gốc thứ 321 của trình tự trong đó Thr ở gốc thứ 87 được thay thế bằng Ser và Asn ở gốc thứ 95 được thay thế bằng Asp, trong trình tự axit amin của resilin (NCBI GenBank số truy cập NP_611157. 1, GI: 24654243). Resilin-Kai (ID SEQ NO: 7) có chỉ số thủy liệu pháp là -1,22.

Ví dụ về protein có nguồn gốc từ elastin bao gồm các protein có trình tự axit amin như NCBI GenBank số truy cập AAC98395 (người), I47076 (cừu), và NP786966 (bò). Cụ thể, protein chứa trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 8 có thể được đề cập. Trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 8 là trình tự axit amin trong đó trình tự axit amin (trình tự thể và trình tự bản lề) được đại diện bởi SEQ ID NO: 10 đã được bổ sung vào đầu N của trình tự axit amin từ gốc thứ 121 đến gốc thứ 390 của trình tự axit amin của NCBI GenBank số truy cập AAC98395. Elastin ngắn (SEQ ID NO: 8) có chỉ số thủy liệu pháp là 0,42.

Protein có nguồn gốc từ keratin có thể là, ví dụ, keratin loại I của *Capra hircus*. Ví dụ cụ thể của chúng có thể là protein chứa trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 9 (trình tự axit amin của NCBI GenBank số truy cập ACY30466). Keratin 26 loại I (SEQ ID NO: 9) có chỉ số thủy liệu pháp là -0,53.

(Tế bào tái tổ hợp)

Tế bào tái tổ hợp theo phương án này là tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng thể không hòa tan trong tế bào và có thể thu được bằng một phương pháp chung sử dụng các kỹ thuật thao tác di truyền.

Tế bào tái tổ hợp có thể thu được, ví dụ, bằng cách biến nạp vật chủ (tế bào chủ) bằng vectơ biểu hiện có trình tự axit nucleic mã hóa protein đích và một hoặc

nhiều trình tự điều hòa liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic.

Trình tự điều hòa là trình tự điều khiển sự biểu hiện của protein tái tổ hợp trong vật chủ (ví dụ, trình tự khởi động, trình tự tăng cường, trình tự liên kết ribosom, hoặc trình tự kết thúc phiên mã) và có thể được lựa chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào loại vật chủ. Loại vector biểu hiện như vector plasmid, vector virus, vector cosmid, vector fosmid, hoặc vector nhiễm sắc thể nhân tạo có thể được lựa chọn phù hợp tùy thuộc vào loại vật chủ.

Cả tế bào nhân nguyên thủy và nhân điển hình như nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào động vật, và tế bào thực vật đều có thể được sử dụng phù hợp làm vật chủ. Được ưu tiên hơn là vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào động vật. Các ví dụ được ưu tiên của tế bào nhân nguyên thủy bao gồm *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, và *Lactococcus*, trong số đó các tế bào *Escherichia coli* được ưu tiên hơn.

Vector biểu hiện mà có thể sao chép tự động trong tế bào chủ hoặc có thể được tích hợp vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ và chứa trình tự khởi động ở vị trí có khả năng phiên mã axit nucleic mã hóa protein đích được sử dụng thích hợp làm vector biểu hiện. Trình tự liên kết ribosom, trình tự kết thúc phiên mã, trình tự gen điều khiển trình tự khởi động có thể được bao gồm trong vector biểu hiện.

Trình tự khởi động có thể là trình tự khởi động cảm ứng bất kỳ có chức năng trong tế bào chủ và có khả năng tạo ra sự biểu hiện của protein đích. Trình tự khởi động cảm ứng là trình tự khởi động có khả năng kiểm soát sự phiên mã do sự có mặt của chất gây cảm ứng (chất gây cảm ứng biểu hiện), sự không có mặt của phân tử ức chế, và các yếu tố vật lý như sự tăng hoặc giảm nhiệt độ, áp suất thẩm thấu, hoặc giá trị độ pH.

Ví dụ về vật chủ có nhân nguyên thủy bao gồm vi sinh vật thuộc giống *Escherichia*, *Brevibacillus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* và *Pseudomonas*.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Escherichia* bao gồm *Escherichia coli* BL21 (Novagen, Inc.), *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Life Technologies Corporation),

Escherichia coli BLR(DE3) (Merck KGaA), *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* GI698, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* K5 (ATCC 23506), *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), *Escherichia coli* No. 49, *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (Novagen, Inc.), *Escherichia coli* TB1, *Escherichia coli* Tuner (Novagen, Inc.), *Escherichia coli* Tuner (DE3) (Novagen, Inc.), *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), *Escherichia coli* XL1-Blue, và *Escherichia coli* XL2-Blue.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Brevibacillus* bao gồm *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus borstelensis*, *Brevibacillus centrosporus*, *Brevibacillus formosus*, *Brevibacillus invocatus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacillus limnophilus*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus reuszeri*, *Brevibacillus thermoruber*, *Brevibacillus brevis* 47 (FERM BP-1223), *Brevibacillus brevis* 47K (FERM BP-2308), *Brevibacillus brevis* 47-5 (FERM BP-1664), *Brevibacillus brevis* 47-5Q (JCM 8975), *Brevibacillus choshinensis* HPD31 (FERM BP-1087), *Brevibacillus choshinensis* HPD31-S (FERM BP-6623), *Brevibacillus choshinensis* HPD31-OK (FERM BP-4573), và chủng *Brevibacillus choshinensis* SP3 (được sản xuất bởi Takara Bio, Inc.).

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Serratia* bao gồm *Serratia liquefacience* ATCC 14460, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, và *Serratia rubidaea*.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* bao gồm *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Microbacterium* bao gồm *Microbacterium amoniophilum* ATCC 15354.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Brevibacterium* bao gồm *Brevibacterium divaricatum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020, *Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067) ATCC 13826, ATCC 14067,

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869) ATCC 13665, ATCC 13869, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium tiogenitalis* ATCC 19240, *Brevibacterium album* ATCC 15111, và *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* bao gồm *Corynebacterium amoniacgenes* ATCC 6871, ATCC 6872, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ12340 (FERM BP-1539), và *Corynebacterium herculis* ATCC 13868.

Ví dụ về vi sinh vật thuộc giống *Pseudomonas* bao gồm *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas fulva*, và *Pseudomonas sp.* D-0110.

Để làm phương pháp để đưa vector biểu hiện vào trong tế bào chủ nhân nguyên thủy đã nói ở trên, phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó đưa ADN vào trong tế bào chủ. Các ví dụ về chúng bao gồm phương pháp sử dụng các ion canxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)], phương pháp tế bào nguyên sinh (công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số S63-248394), hoặc phương pháp được mô tả trong tài liệu Gene, 17, 107 (1982) hoặc Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979).

Việc biến nạp vi sinh vật thuộc giống *Brevibacillus* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp của Takahashi và các đồng tác giả (J. Bacteriol., 1983, 156: 1130-1134), phương pháp của Takagi và các đồng tác giả (Agric. Biol. Chem., 1989, 53: 3099-3100), hoặc phương pháp của Okamoto và các đồng tác giả (Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61: 202-203).

Ví dụ về vector mà axit nucleic mã hóa protein đích được đưa vào đó (sau đây, được gọi một cách đơn giản là “vector”) bao gồm pBTrp2, pBTac1, và pBTac2 (tất cả có bán trên thị trường từ Boehringer Mannheim GmbH), pKK233-2 (được sản xuất bởi Pharmacia Corporation), pSE280 (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation), pGEMEX-1 (được sản xuất bởi Promega Corporation), pQE-8 (được sản xuất bởi QIAGEN Corporation), pKYP10 (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số S58-110600), pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (được sản xuất bởi Stratagene Corporation), pTrs30 [được tạo ra từ *Escherichia coli* JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [được tạo ra từ *Escherichia coli* JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [được tạo ra từ *Escherichia coli* IGHA2 (FERM B-400), công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số S60-221091], pGKA2 [được tạo ra từ *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số S60-221091], pTerm2 (US 4686191, US 4939094, US 5160735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (được sản xuất bởi Pharmacia Corporation), và hệ pET (được sản xuất bởi Novagen, Inc.).

Trong trường hợp mà *Escherichia coli* được sử dụng làm vật chủ, pUC18, pBluescriptII, pSupex, pET22b, pCold, hoặc các loại tương tự có thể được đề cập làm vector thích hợp.

Các ví dụ cụ thể về các vector thích hợp cho vi sinh vật thuộc giống *Brevibacillus* bao gồm pUB110 hoặc pHY500 (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số H2-31682), pNY700 (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số H4-278091), pHY4831 (J. Bacteriol., 1987, 1239-1245), pNU200 (UDAKA Shigezou, Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1987, 61: 669-676), pNU100 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 30: 75-80), pNU211 (J. Biochem., 1992, 112: 488-491), pNU211R2L5 (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số H7-170984), pNH301 (Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58: 525-531), pNH326, pNH400 (J. Bacteriol., 1995, 177: 745-749), và pHT210 (Công bố sáng chế Nhật

chưa được thẩm định số H6-133782), pHT110R2L5 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 42: 358-363), chúng được biết là vector *Bacillus subtilis*; và pNCO2 (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số 2002-238569) là vector con thoi giữa *Escherichia coli* và vi sinh vật thuộc giống *Brevibacillus*.

Trình tự khởi động trong trường hợp mà tế bào nhân nguyên thủy được sử dụng làm vật chủ không bị giới hạn miễn là nó hoạt động trong tế bào chủ. Ví dụ về các trình tự khởi động bao gồm các trình tự khởi động có nguồn gốc từ *Escherichia coli* hoặc thể thực khuẩn như trình tự khởi động trp (Ptrp), trình tự khởi động lac, trình tự khởi động PL, trình tự khởi động PR, và trình tự khởi động T7. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các trình tự khởi động được thiết kế nhân tạo và được biến đổi, như trình tự khởi động (Ptrp $\times$ 2) trong đó hai Ptrp được kết nối thành chuỗi, trình tự khởi động tac, trình tự khởi động lacT7 và trình tự khởi động let I cũng có thể được sử dụng. Tốt hơn là sử dụng plasmid trong đó khoảng cách giữa trình tự Shine-Dalgarno, tức là trình tự liên kết ribosom, và codon khởi đầu được điều chỉnh đến một khoảng cách thích hợp (ví dụ, 6 đến 18 bazơ). Trong vector biểu hiện ở trên, trình tự kết thúc phiên mã không phải lúc nào cũng cần thiết cho sự biểu hiện của axit nucleic, nhưng tốt hơn là sắp xếp trình tự kết thúc phiên mã ngay dưới axit nucleic mã hóa protein đích.

Ví dụ về vật chủ nhân điển hình bao gồm nấm men, nấm sợi (nấm mốc và các loại tương tự), và tế bào côn trùng.

Ví dụ về nấm men bao gồm nấm men thuộc giống *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Yarrowia*, *Hansenula*, và các loại tương tự. Các ví dụ cụ thể hơn về nấm men bao gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida utilis*, *Pichia pastoris*, *Pichia angusta*, *Pichia methanolica*, *Pichia polymorpha*, *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, và *Hansenula polymorpha*.

Tốt hơn là vector biểu hiện trong trường hợp mà nấm men được sử dụng

làm tế bào chủ thường bao gồm điểm khởi đầu sao chép (trong trường hợp mà quá trình khuếch đại ở vật chủ là bắt buộc), trình tự đánh dấu chọn lọc để truyền vector trong *Escherichia coli*, trình tự khởi động và trình tự kết thúc cho sự biểu hiện protein tái tổ hợp trong nấm men, và trình tự đánh dấu chọn lọc cho nấm men.

Trong trường hợp mà vector biểu hiện là vector không tích hợp, tốt hơn là còn bao gồm trình tự sao chép tự động (autonomously replicating sequence - ARS). Điều này có thể giúp cải thiện tính ổn định của các vector biểu hiện trong các tế bào (Myers, A. M., et al. (1986) *Gene* 45: 299-310).

Ví dụ về vector trong trường hợp mà nấm men được sử dụng làm vật chủ bao gồm YEP13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419), YIp, pHS19, pHS15, pA0804, pHIL3Ol, pHIL-S1, pPIC9K, pPICZ α , pGAPZ α , và pPICZ B.

Ví dụ cụ thể về trình tự khởi động trong trường hợp mà nấm men được sử dụng làm vật chủ không bị giới hạn miễn là nó có thể được biểu hiện ở nấm men. Ví dụ về trình tự khởi động bao gồm trình tự khởi động của gen phân hủy đường như hexosa kinaza, trình tự khởi động PHO5, trình tự khởi động PGK, trình tự khởi động GAP, trình tự khởi động ADH, trình tự khởi động gal 1, trình tự khởi động gal 10, trình tự khởi động polypeptit sốc nhiệt, trình tự khởi động MF α 1, trình tự khởi động CUP 1, trình tự khởi động pGAP, trình tự khởi động pGCW14, trình tự khởi động AOX1, và trình tự khởi động MOX.

Để làm phương pháp để đưa vector biểu hiện vào trong nấm men, phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó đưa ADN vào trong nấm men. Các ví dụ về chúng bao gồm phương pháp điện chuyển (Methods Enzymol., 194, 182 (1990)), phương pháp sử dụng tế bào có vách không hoàn chỉnh (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)), phương pháp lithi axetat (J. Bacteriol., 153, 163 (1983)), và phương pháp được mô tả trong Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978).

Ví dụ về nấm sợi bao gồm nấm thuộc giống *Acremonium*, *Aspergillus*, *Ustilago*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Penicillium*, *Myceliophthora*, *Botrytis*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Metarhizium*, *Monascus*, *Rhizopus*, và

Rhizomucor.

Các ví dụ cụ thể về nấm sợi bao gồm *Acremonium alabamense*, *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sake*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus phoenicus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Thermoascus*, *Sporotrichum*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Talaromyces*, *Thielavia terrestris*, *Thielavia*, *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium canescens*, *Penicillium emersonii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Myceliophthora thermophilum*, *Mucor ambiguus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor fragilis*, *Mucor hiemalis*, *Mucor inaequisporus*, *Mucor oblongiellipticus*, *Mucor racemosus*, *Mucor recurvus*, *Mucor saturninus*, *Mucor subtilissimus*, *Ogataea polymorpha*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, và *Rhizopus arrhizus*.

Ví dụ cụ thể về trình tự khởi động trong trường hợp mà nấm sợi được sử dụng làm vật chủ có thể là trình tự bất kỳ của gen liên quan đến hệ thống phân hủy đường, gen liên quan đến sự biểu hiện cơ định, gen enzym liên quan đến sự thủy phân và các gen tương tự. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm amyB, glaA, agdA, glaB, TEF1, gen xynF1 tanaza, No. 8AN, gpdA, pgkA, enoA, melO, sodM, catA, và catB.

Việc đưa vector biểu hiện vào trong nấm sợi có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết thông thường. Ví dụ về chúng bao gồm phương pháp của Cohen và các đồng tác giả (phương pháp canxi clorua) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)], phương pháp tế bào nguyên sinh [Mol. Gen. Genet., 168:111 (1979)], phương pháp khả nạp [J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)], và phương pháp điện chuyển.

Các tế bào côn trùng bao gồm, ví dụ, tế bào côn trùng sâu bọ cánh vảy, cụ thể hơn là các tế bào côn trùng có nguồn gốc từ *Spodoptera frugiperda* như Sf9 và Sf21,

và các tế bào côn trùng có nguồn gốc từ *Trichoplusia ni* như High 5.

Ví dụ về vectơ trong trường hợp mà tế bào côn trùng được sử dụng làm vật chủ bao gồm baculovirut như virut đa diện nhân *Autographa californica* là một loại virut lây nhiễm côn trùng thuộc họ *Noctuidae* (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)).

Trong trường hợp mà tế bào côn trùng được sử dụng làm vật chủ, polypeptit có thể được biểu hiện bằng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Current Protocols in Molecular Biology, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992), hoặc Bio/Technology, 6, 47 (1988). Tức là, vectơ chuyển gen tái tổ hợp và baculovirut được cùng đưa vào tế bào côn trùng để thu được virut tái tổ hợp (vectơ biểu hiện) trong dịch nổi nuôi cấy tế bào côn trùng, và sau đó virut tái tổ hợp được gây nhiễm tiếp vào trong tế bào côn trùng, nhờ đó polypeptit có thể được biểu hiện. Ví dụ về vectơ chuyển gen được sử dụng trong phương pháp trên bao gồm pVL1392, pVL1393, và pBlueBacIII (tất cả được sản xuất bởi Invitrogen Corporation).

Để làm phương pháp để cùng đưa vectơ chuyển gen tái tổ hợp và baculovirut vào trong tế bào côn trùng để tạo nên virut tái tổ hợp, ví dụ, phương pháp canxi phosphat (Công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số H2-227075), phương pháp chuyển nhiễm vào liposom (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)), hoặc phương pháp tương tự có thể được đề cập.

Vectơ tái tổ hợp tốt hơn là còn chứa một gen đánh dấu chọn lọc để chọn thể biến nạp. Ví dụ, ở *Escherichia coli*, các gen kháng đối với các loại thuốc khác nhau như tetracycline, ampicillin, và kanamycin có thể được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc. Gen đánh dấu chọn lọc lặn có khả năng hỗ trợ cho đột biến gen liên quan đến dinh dưỡng thụ động cũng có thể được sử dụng. Trong nấm men, gen kháng geneticin có thể được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc, và gen hỗ trợ cho đột biến gen liên quan đến dinh dưỡng thụ động, hoặc gen đánh dấu chọn lọc như LEU2, URA3, TRP1, hoặc HIS3 cũng có thể được sử dụng. Ví dụ về gen đánh dấu chọn lọc đối với nấm sợi bao gồm gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm niaD (Biosci.

Biotechnol. Biochem., 59, 1795-1797 (1995)), *argB* (Enzyme Microbiol Technol, 6, 386-389, (1984)), *sC* (Gene, 84, 329-334, (1989)), *ptrA* (BiosciBiotechnol Biochem, 64, 1416-1421, (2000)), *pyrG* (BiochemBiophys Res Commun, 112, 284-289, (1983)), *amdS* (Gene, 26, 205-221, (1983)), gen kháng aureobasidin (Mol Gen Genet, 261, 290-296, (1999)), gen kháng benomyl (Proc Natl Acad Sci USA, 83, 4869-4873, (1986)) và gen kháng hygromycin (Gene, 57, 21-26, (1987)), và gen hỗ trợ dinh dưỡng thụ động leuxin. Ngoài ra, trong trường hợp mà vật chủ là chủng đột biến dinh dưỡng thụ động, gen kiểu đại hỗ trợ cho dinh dưỡng thụ động cũng có thể được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc.

Việc lựa chọn vật chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện đã nói ở trên có thể được thực hiện bằng phương pháp lai vết tan, lai khuẩn lạc, hoặc phương pháp tương tự sử dụng đầu dò liên kết chọn lọc với axit nucleic đã nói ở trên. Để làm đầu dò, có thể sử dụng đầu dò thu được bằng cách biến đổi đoạn ADN một phần được khuếch đại bằng phương pháp PCR dựa trên thông tin trình tự của axit nucleic đã nói ở trên bằng đồng vị phóng xạ hoặc digoxigenin

(Biểu hiện protein tái tổ hợp)

Trong tế bào tái tổ hợp được biến nạp bằng vector biểu hiện để biểu hiện protein đích, protein tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng thể không hòa tan trong tế bào. Protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện bằng cách nuôi cấy tế bào tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy. Phương pháp nuôi cấy tế bào tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp thường được sử dụng để nuôi cấy vật chủ.

Trong trường hợp mà vật chủ là tế bào nhân nguyên thủy như *Escherichia coli* hoặc tế bào nhân điển hình như nấm men, môi trường bất kỳ trong số môi trường tự nhiên và môi trường tổng hợp có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy miễn là nó chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, muối vô cơ, và các loại tương tự có thể được đồng hóa bởi vật chủ và nó có khả năng nuôi cấy vật chủ một cách hiệu quả.

Để làm nguồn cacbon, nguồn cacbon bất kỳ có thể được đồng hóa bởi vật chủ có thể được sử dụng. Ví dụ về nguồn cacbon có thể được sử dụng bao gồm hydrat

cacbon như glucoza, fructoza, sucroza, và rỉ đường, tinh bột và sản phẩm thủy phân tinh bột có chứa chúng, axit hữu cơ như axit axetic và axit propionic, và rượu như etanol và propanol.

Ví dụ về nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm muối amoni của axit vô cơ hoặc hữu cơ như amoniac, amoni clorua, amoni sulfat, amoni axetat và amoni phosphat, các hợp chất chứa nitơ khác, pepton, chiết xuất từ thịt, chiết xuất nấm men, dịch ngâm ngô, sản phẩm thủy phân casein, bã đậu tương và sản phẩm thủy phân bã đậu tương, các tế bào vi khuẩn lên men khác nhau và các sản phẩm được phân cắt của chúng.

Ví dụ về muối vô cơ có thể được sử dụng bao gồm kali dihydro phosphat, dikali phosphat, magie phosphat, magie sulfat, natri clorua, sắt (II) sulfat, mangan sulfat, đồng sulfat, và canxi cacbonat.

Việc nuôi cấy tế bào nhân nguyên thủy như *Escherichia coli* hoặc tế bào nhân điển hình như nấm men có thể được thực hiện trong điều kiện ưa khí như nuôi cấy lắc hoặc nuôi cấy thông khí sâu có khuấy. Nhiệt độ nuôi cấy là, ví dụ, 15°C đến 40°C. Thời gian nuôi cấy thường là 16 giờ đến 7 ngày. Tốt nhất là duy trì độ pH của môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy ở mức 3,0 đến 9,0. Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng axit vô cơ, axit hữu cơ, dung dịch kiềm, ure, canxi cacbonat, amoniac, hoặc các chất tương tự.

Ngoài ra, các thuốc kháng sinh như ampicillin và tetracycline có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy khi cần thiết trong quá trình nuôi cấy. Trong trường hợp nuôi cấy vi sinh vật được biến nạp bằng vector biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự khởi động cảm ứng làm trình tự khởi động, chất cảm ứng có thể được bổ sung vào môi trường khi cần thiết. Ví dụ, trong trường hợp nuôi cấy vi sinh vật được biến nạp bằng vector biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự khởi động lac, isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid hoặc chất tương tự được sử dụng, và trong trường hợp nuôi cấy vi sinh vật được biến nạp bằng vector biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự khởi động trp, axit indoleacrylic hoặc các chất tương tự có thể được bổ sung vào môi trường.

Để làm môi trường nuôi cấy cho tế bào côn trùng, môi trường TNM-FH thường được sử dụng (được sản xuất bởi Pharmingen Inc.), môi trường Sf-900 II SFM (được sản xuất bởi Life Technologies Corporation), ExCell 400 và ExCell 405 (cả hai được sản xuất bởi JRH Biosciences Inc.), môi trường Grace's Insect (Nature, 195, 788 (1962)), và các môi trường tương tự có thể được sử dụng.

Việc nuôi cấy tế bào côn trùng có thể được thực hiện, ví dụ, trong thời gian nuôi cấy từ 1 đến 5 ngày trong điều kiện như pH 6 đến 7 của môi trường nuôi cấy và nhiệt độ nuôi cấy 25°C đến 30°C. Ngoài ra, thuốc kháng sinh như gentamicin có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy khi cần thiết trong quá trình nuôi cấy.

Trong trường hợp mà vật chủ là tế bào thực vật, tế bào thực vật được biến nạp có thể được nuôi cấy trực tiếp, hoặc nó có thể được biệt hóa vào trong cơ quan thực vật và sau đó được nuôi cấy. Để làm môi trường nuôi cấy để nuôi cấy tế bào thực vật, ví dụ, môi trường Murashige và Skoog (MS) thường được sử dụng, môi trường White, hoặc môi trường trong đó hormon thực vật như auxin hoặc xytokinin được bổ sung vào các môi trường này có thể được sử dụng.

Việc nuôi cấy tế bào động vật có thể được thực hiện, ví dụ, trong thời gian nuôi cấy từ 3 đến 60 ngày trong điều kiện như độ pH từ 5 đến 9 của môi trường nuôi cấy và nhiệt độ nuôi cấy từ 20°C đến 40°C. Ngoài ra, thuốc kháng sinh như kanamycin hoặc hygromycin có thể được bổ sung vào môi trường khi cần thiết trong quá trình nuôi cấy.

Theo phương pháp nêu trên, protein đích có thể được biểu hiện ở dạng thể không hòa tan trong tế bào tái tổ hợp.

Bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp

Bước (A) là bước phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp.

Sự phá vỡ tế bào tái tổ hợp có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết. Tức là, sự phá vỡ tế bào tái tổ hợp có thể được thực hiện bằng cách phá vỡ tế bào bằng cách xử lý bằng enzym như lysozym, mutanolysin, lyticaza, hoặc zymolyaza;

phá vỡ tế bào bằng cách tiếp xúc với dung môi hữu cơ hoặc tương tự; phá vỡ tế bào bằng áp suất thẩm thấu; phá vỡ tế bào vật lý/cơ học bằng máy nghiền bi, bình ép kiểu Pháp, máy đồng nhất áp suất cao, xử lý bằng siêu âm, hoặc các cách tương tự; và sự kết hợp của chúng.

Đối với việc phá vỡ tế bào tái tổ hợp, dung dịch nuôi cấy thu được từ việc nuôi cấy nói trên có thể được sử dụng như vậy, nhưng tốt nhất là sử dụng huyền phù tế bào tái tổ hợp đã rửa để cải thiện độ tinh khiết của protein tái tổ hợp thu được sau này.

Huyền phù chứa các tế bào tái tổ hợp đã rửa có thể được chuẩn bị bằng phương pháp sau. Tức là, tế bào tái tổ hợp được tách ra khỏi dung dịch nuôi cấy bằng cách ly tâm, lọc, hoặc các cách tương tự. Xem xét các bước tiếp theo, tốt nhất là rửa các tế bào tái tổ hợp bằng nước, và tốt hơn là nên rửa thêm các tế bào tái tổ hợp bằng nước sau khi rửa bằng dung dịch nước đệm hoặc dung dịch tương tự. Huyền phù chứa các tế bào tái tổ hợp đã rửa có thể được chuẩn bị bằng cách tạo huyền phù các tế bào tái tổ hợp thu được trong dung dịch phù hợp với phương pháp phá vỡ ở trên để có được nồng độ thích hợp.

Ngoài ra, cũng có thể sử dụng huyền phù thu được theo cách mà tế bào tái tổ hợp thu được từ dung dịch nuôi cấy được xử lý bằng dung môi hữu cơ hoặc các chất tương tự, phần hòa tan như protein có nguồn gốc từ vật chủ của tế bào tái tổ hợp được loại bỏ, và sau đó, phần không hòa tan được bổ sung vào dung dịch thích hợp cho phương pháp phá vỡ ở trên để thu được nồng độ thích hợp. Tại thời điểm này, trong trường hợp mà các tế bào vi khuẩn bị phá vỡ bằng cách xử lý bằng dung môi hữu cơ hoặc các chất tương tự, việc xử lý bằng dung môi hữu cơ hoặc các chất tương tự (tiếp xúc với dung môi hữu cơ hoặc các chất tương tự) có thể được coi là xử lý phá vỡ nêu trên. Tức là, sau khi xử lý bằng dung môi hữu cơ hoặc các chất tương tự, bước kết tụ (B) sau đây của thể không hòa tan protein tái tổ hợp có thể được thực hiện.

Ví dụ về dung dịch thích hợp bao gồm nước như nước công nghiệp, nước khử ion, nước thẩm thấu ngược (reverse osmosis - RO), và dung dịch nước đệm. Dung dịch nước đệm có thể là, ví dụ, dung dịch đệm Tris/HCl.

Huyền phù bị phá vỡ thu được có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ

hợp. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể không hòa tan" dùng để chỉ protein không hòa tan được trong dung dịch (huyền phù), mà có thể tạo thành các hạt không hòa tan trong một số trường hợp.

Ngoài ra, huyền phù bị phá vỡ chứa các mảnh tế bào có thể được ly tâm một cách dễ dàng, và bước kết tụ sau đây có thể được thực hiện bằng cách sử dụng huyền phù sau khi loại bỏ các mảnh tế bào này.

Ngoài ra, các hạt không hòa tan trong huyền phù bị phá vỡ có thể liên quan đến tạp chất và có thể được tách ra bằng cách ly tâm. Trong trường hợp như vậy, quá trình ly tâm có thể được thực hiện và phần kết tủa có chứa các hạt không hòa tan thu được có thể được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước đệm để tiến hành bước kết tụ sau đây.

Bước kết tụ (B) các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp

Trong bước (B), một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp được kết tụ để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp. Trong bước (B), việc gia nhiệt và/hoặc khuấy có thể được thực hiện khi cần thiết.

In Tyr Gmuối kim loại bao gồm muối kim loại kiềm thổ và muối kim loại thổ. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm halogenua kim loại kiềm thổ, nitrat kim loại kiềm thổ, sulfat kim loại kiềm thổ, halogenua kim loại thổ, nitrat kim loại thổ, và sulfat kim loại thổ. Muối kim loại tốt hơn là muối kim loại hóa trị hai hoặc đa hóa trị cao hơn.

Ví dụ về halogenua kim loại kiềm thổ bao gồm canxi clorua, magie clorua, magie bromua, canxi bromua, magie iodua, và canxi iodua.

Ví dụ về nitrat kim loại kiềm thổ bao gồm canxi nitrat, magie nitrat, stronti nitrat, và bari nitrat.

Ví dụ về sulfat kim loại kiềm thổ bao gồm canxi sulfat, magie sulfat, stronti sulfat, và bari sulfat.

Ví dụ về halogenua kim loại thổ bao gồm nhôm triclорua và gali triclорua.

Ví dụ về nitrat kim loại thổ bao gồm nhôm nitrat và gali nitrat.

Ví dụ về sulfat kim loại thổ bao gồm nhôm sulfat và gali sulfat.

Các muối kim loại này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều muối kim loại.

Ví dụ thích hợp về muối kim loại bao gồm halogenua kim loại kiềm và halogenua kim loại kiềm thổ, và ví dụ đặc biệt thích hợp về muối kim loại bao gồm lithi clorua và canxi clorua.

Trong trường hợp mà protein tái tổ hợp tạo thành các hạt không hòa tan kết chặt trong huyền phù bị phá vỡ, thì muối kim loại có hiệu quả ngay cả khi bổ sung một lượng nhỏ. Ví dụ, muối kim loại có thể được bổ sung vào với lượng từ 0,01 đến 20 mM và tốt hơn là từ 1 đến 10 mM. Trong trường hợp các thể không hòa tan mà không tạo thành các hạt không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan cần thời gian để kết tủa bằng cách ly tâm, muối kim loại có thể được bổ sung vào với lượng từ 2 đến 50 mM và tốt hơn là từ 5 đến 10 mM.

Axit vô cơ và axit hữu cơ bất kỳ có thể được sử dụng làm axit. Axit thích hợp có thể là, ví dụ, axit oxo.

Ví dụ về axit oxo thuộc axit vô cơ bao gồm axit sulfuric, axit nitric, và axit phosphoric. Ví dụ về axit oxo thuộc axit hữu cơ bao gồm axit formic, axit axetic, axit xitric, và axit tartaric. Axit oxo tốt hơn là axit axetic, axit sulfuric, hoặc axit xitric, và tốt hơn nữa là axit xitric.

Trong trường hợp mà protein tái tổ hợp tạo thành các hạt không hòa tan kết chặt trong huyền phù bị phá vỡ, thì axit có hiệu quả ngay cả khi bổ sung một lượng nhỏ. Ví dụ, axit có thể được bổ sung vào với lượng từ 0,01 đến 20 mM, tốt hơn là từ 1 đến 20 mM, và tốt hơn nữa là từ 5 đến 20 mM. Trong trường hợp các thể không hòa tan không tạo thành các hạt không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan cần thời gian để kết tủa bằng cách ly tâm, axit có thể được bổ sung vào với lượng từ 2 đến 50 mM và tốt hơn là từ 10 đến 30 mM.

Các axit này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều axit.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất kết bông anion" dùng để chỉ chất kết

bông polyme (polyme) có một nhóm anion hữu cơ. Ví dụ về chất kết bông anion bao gồm chất kết bông anion dựa trên polyacrylat, chất kết bông anion dựa trên polyacrylamit anion, và chất kết bông anion dựa trên copolyme acrylamit-acrylat. Các ví dụ cụ thể về chất kết bông anion bao gồm các loại KURIFARM PA (PA-923, PA-896, PA-895, PA-893, PA-865, PA-823, PA-813, PA-804, PA-465, PA-404, PA-402, PA-265, và các loại tương tự) được sản xuất bởi Kurita Water Industries Ltd., ACCOFLOC (A-95 đến A-100, A-110 đến A-150, A-190, A-235 H đến A-250, và các loại tương tự) và SUMIFLOC (FA-40 đến FA-70) được sản xuất bởi MT Aquapolymer, Inc., các loại DIAFLOC AP (AP335B, AP741B, AP825C, và các loại tương tự) được sản xuất bởi Mitsubishi Rayon Co., Ltd., các loại TAKIFLOC A (A-102~A-106, A-108, A-142, và A-162) được sản xuất bởi Taki Chemical Co., Ltd., và TOGAMIFLOC (TA-089, TA-104, TA-109, TA-124, TA-144, TAE-2325, TAE-2335, TAE-2644, và các loại tương tự) được sản xuất bởi Togami Electric Mfg. Co. Ltd.

Trong số các chất kết bông này, có những trường hợp mà chính các chất kết bông có tác dụng kết tụ các tế bào chủ. Do đó, trong trường hợp mà chất kết bông được sử dụng, tốt hơn là sử dụng huyền phù bị phá vỡ mà từ đó các mảnh tế bào được loại bỏ trước. Liên quan đến lượng chất kết bông anion được bổ sung vào, chất kết bông anion được bổ sung vào để protein tái tổ hợp chiếm 0,001 đến 0,1% và tốt hơn là 0,01 đến 0,05% trong huyền phù bị phá vỡ.

Việc bổ sung muối kim loại, axit, hoặc chất kết bông anion kết hợp với nhau thay vì chỉ thêm từng loại mang lại hiệu quả bằng cách bổ sung nồng độ thấp.

Trong bước kết tụ (B), một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion có thể được bổ sung vào, tiếp đó gia nhiệt để việc kết tụ được thúc đẩy và thể kết tụ trở nên lớn hơn. Các biện pháp gia nhiệt không bị giới hạn cụ thể. Nhiệt độ gia nhiệt (nhiệt độ đỉnh) không bị giới hạn cụ thể, nhưng từ quan điểm thu được hiệu quả các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan và từ quan điểm tiêu diệt tế bào vi khuẩn, thì nhiệt độ gia nhiệt là, ví dụ, 60°C hoặc cao hơn, tốt hơn là 70°C hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa là 80°C hoặc cao hơn, tùy thuộc

vào loại protein tái tổ hợp đích. Ngoài ra, từ quan điểm ngăn chặn sự phân hủy protein đích và cải thiện độ tinh khiết của protein đích, nhiệt độ gia nhiệt là, ví dụ, 130°C hoặc thấp hơn, tốt hơn là 110°C hoặc thấp hơn, và tốt hơn nữa là 90°C hoặc thấp hơn, tùy thuộc vào loại protein đích.

Thời gian gia nhiệt (thời gian để duy trì nhiệt độ gia nhiệt) không bị giới hạn cụ thể, nhưng từ quan điểm thu được hiệu quả các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan và từ quan điểm tiêu diệt tế bào vi khuẩn, thời gian gia nhiệt là, ví dụ, 0,5 giờ hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 1 giờ hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 2 giờ hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào loại protein tái tổ hợp đích. Ngoài ra, từ quan điểm ngăn chặn sự phân hủy protein đích và cải thiện hiệu quả công việc, thời gian gia nhiệt là, ví dụ, 15 giờ hoặc ít hơn, tốt hơn là 10 giờ hoặc ít hơn, và tốt hơn nữa là 5 giờ hoặc ít hơn, tùy thuộc vào loại protein đích.

Thời gian gia nhiệt để thu được các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan có thể được rút ngắn đáng kể bằng cách gia nhiệt liên tục huyền phù bị phá vỡ. Nhiệt độ trong trường hợp gia nhiệt liên tục huyền phù bị phá vỡ không bị giới hạn cụ thể, nhưng từ quan điểm của việc thu được hiệu quả các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan và từ quan điểm tiêu diệt tế bào vi khuẩn, thì nhiệt độ gia nhiệt là, ví dụ, 70°C hoặc cao hơn, tốt hơn là 80°C hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa là 90°C hoặc cao hơn, tùy thuộc vào loại protein tái tổ hợp đích. Ngoài ra, từ quan điểm ngăn chặn sự phân hủy protein đích và cải thiện độ tinh khiết của protein đích, thì nhiệt độ gia nhiệt là, ví dụ, 140°C hoặc thấp hơn, tốt hơn là 120°C hoặc thấp hơn, và tốt hơn nữa là 100°C hoặc thấp hơn, tùy thuộc vào loại protein đích.

Thời gian gia nhiệt để thu được các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan trong trường hợp gia nhiệt liên tục huyền phù lỏng bị phá vỡ không bị giới hạn cụ thể, nhưng từ quan điểm của việc thu được hiệu quả các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan và từ quan điểm tiêu diệt tế bào vi khuẩn, thì thời gian gia nhiệt là, ví dụ, 1 giây hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 10 giây hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 30 giây hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào loại protein tái tổ hợp đích. Ngoài ra, từ quan điểm ngăn chặn sự phân hủy protein đích và cải thiện hiệu quả công việc, thì thời gian

gia nhiệt là, ví dụ, 120 giây hoặc ít hơn, tốt hơn là 90 giây hoặc ít hơn, và tốt hơn nữa là 60 giây hoặc ít hơn, tùy thuộc vào loại protein đích.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với phương pháp gia nhiệt liên tục huyền phù bị phá vỡ, và điều đó đủ để các thể không hòa tan hoặc các hạt không hòa tan có thể được gia nhiệt đến 70°C hoặc cao hơn và 140°C hoặc thấp hơn và nhiệt độ sau khi gia nhiệt có thể được giữ trong vòng 120 giây. Sử dụng thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục hoặc thiết bị tương tự có thể được đề cập. Đặc biệt, thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục MINI UHT T-20 (được sản xuất bởi Powerpoint International Ltd.) có thể được đề cập.

Trong bước kết tụ (B), ngoài việc gia nhiệt, có thể tiến hành thêm việc khuấy để thể kết tụ trở nên lớn hơn. Các thiết bị khuấy không bị giới hạn cụ thể. Tốc độ khuấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng từ quan điểm thu được các hạt không hòa tan một cách hiệu quả, tốc độ mà tại đó thể kết tụ chứa các thể không hòa tan trong dung dịch không kết tủa tốt hơn là, ví dụ, 70 vòng/phút hoặc lớn hơn, tốt hơn là 150 vòng/phút hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 300 vòng/phút hoặc lớn hơn. Từ quan điểm ngăn chặn việc phá vỡ các thể không hòa tan được hình thành, tốc độ khuấy là 1500 vòng/phút hoặc thấp hơn, tốt hơn là 1000 vòng/phút hoặc thấp hơn, và tốt hơn nữa là 500 vòng/phút hoặc thấp hơn. Việc khuấy có thể được thực hiện vào thời điểm bất kỳ trong bước kết tụ (B). Trong trường hợp gia nhiệt, việc khuấy tốt hơn là được thực hiện cùng với việc gia nhiệt.

Bước (C) tách thể kết tụ protein tái tổ hợp

Bước (C) là bước tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù. Việc kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp được bắt đầu cùng lúc với việc bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ, và sau đó, các biện pháp tách thích hợp như lắng tự nhiên, ly tâm, hoặc lọc có thể được sử dụng để tách thể kết tụ. Sau khi bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion, việc gia nhiệt và tùy ý khuấy thêm thúc đẩy sự kết tụ và làm cho thể kết tụ lớn hơn, điều này giúp cho việc tách trở nên dễ dàng hơn.

Trong một ví dụ, thể kết tụ có thể được thu hồi bằng cách ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 5 đến 30 phút. Trong trường hợp mà protein tái tổ hợp tạo thành các hạt không hòa tan mà ban đầu có thể ly tâm được trong huyền phù bị phá vỡ, một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion được bổ sung vào, tiếp đó gia nhiệt và tùy ý khuấy sao cho các hạt không hòa tan có thể được làm cho to hơn nữa và do đó, lắng một cách tự nhiên. Các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp vốn khó tách bằng cách ly tâm cũng có thể được tách ra bằng cách ly tâm, lọc, hoặc các cách tương tự, bằng cách bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion, tiếp đó gia nhiệt và tùy ý khuấy để các hạt không hòa tan có thể được làm cho to hơn nữa.

Cho đến nay vẫn chưa có báo cáo nào cho thấy quá trình lắng có thể được thực hiện với lực ly tâm thấp như $2.500 \times g$ trong quá trình ly tâm các hạt không hòa tan, và thiết bị ly tâm hình trụ có lực ly tâm cao thường là $12.000 \times g$ hoặc lớn hơn đã được sử dụng. Tuy nhiên, theo sáng chế, protein tái tổ hợp không hòa tan có thể được kết tủa dưới dạng thể kết tụ với lực ly tâm thấp hơn, do đó có nghĩa là thiết bị ly tâm loại tấm (loại đĩa) để tách và thiết bị ly tâm loại bình lắng, như WESTFALIA, CLARIFIER, và ALFA LAVAL, mà chỉ có thể được sử dụng cho việc tách các tế bào vi khuẩn cho đến nay, ngoài ra, ví dụ, thiết bị ly tâm loại giỏ có thể được sử dụng để tách các protein tái tổ hợp không hòa tan. Các thiết bị ly tâm loại tấm tách và loại bình lắng có thể là một phương tiện rất hữu ích trong sản xuất công nghiệp do có lực ly tâm $10.000 \times g$ hoặc nhỏ hơn và có khả năng tách liên tục một lượng lớn huyền phù.

Ngoài ra, trong trường hợp mà bước kết tụ nêu trên không được thực hiện, ngay cả các hạt không hòa tan lớn có thể dễ dàng lắng đọng bằng cách ly tâm thông thường rất có thể gây ra tắc nghẽn trong quá trình lọc màng, nhưng thực hiện bước kết tụ này có thể dễ dàng tách các hạt lớn không hòa tan bằng màng. Đặc biệt, sau khi một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion được bổ sung vào, việc gia nhiệt và tùy ý khuấy được thực hiện, sao cho việc tách bằng màng của các hạt lớn không hòa tan trở nên dễ dàng hơn.

Hơn nữa, các tạp chất có nguồn gốc từ tế bào chủ có thể tách ra khỏi các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp có thể được loại bỏ chỉ bằng hoạt động tách, và do đó, độ tinh khiết của protein tái tổ hợp có thể được cải thiện. Ngoài ra, trong trường hợp mà các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp đã tách được tạo huyền phù lại và sau đó được kết tụ và tách một lần nữa, độ tinh khiết của protein tái tổ hợp có thể được cải thiện hơn nữa.

Cỡ hạt của thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được bằng bước (C) tách thể kết tụ protein tái tổ hợp có thể được xác định bằng, ví dụ, phương pháp vùng cảm biến điện. Cỡ hạt của thể kết tụ protein tái tổ hợp là, ví dụ, 4 μm hoặc lớn hơn, tốt hơn là 5 μm hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 10 μm hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 15 μm hoặc lớn hơn, theo quan điểm cải thiện khả năng lọc. Giới hạn trên của cỡ hạt của thể kết tụ không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 50 μm hoặc nhỏ hơn, 40 μm hoặc nhỏ hơn, 30 μm hoặc nhỏ hơn, hoặc 20 μm hoặc nhỏ hơn.

Để làm phương pháp vùng cảm biến điện, phương pháp đo sự phân bố theo cỡ hạt theo JIS Z 8832 có thể được đề cập. Cụ thể, phương pháp đo sử dụng máy phân tích cỡ hạt CDA-1000 (Sysmex Corporation) có thể được đề cập.

Thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp tách có thể được tinh chế thêm bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, công bố sáng chế Nhật chưa được thẩm định số 2013-523665 để cải thiện độ tinh khiết của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn có dựa vào các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau.

(1) Cấu trúc của chủng biểu hiện protein đích (tế bào tái tổ hợp)

GEN495, GEN971, GEN740, GEN797, và GEN796, là các axit nucleic mã hóa các fibroin có trình tự nguồn gốc từ tơ nhện có trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 1 (PRT410), SEQ ID NO: 2 (PRT853), SEQ ID NO: 3 (PRT647), SEQ ID NO: 4 (PRT699), và SEQ ID NO: 5 (PRT698), lần lượt được tổng hợp. Đối với mỗi axit nucleic, vị trí NdeI được bổ sung ở đầu 5' và vị trí EcoRI được bổ sung

xuôi dòng codon kết thúc. Chỉ số thủy liệu pháp (hydropathy index-HI) và khối lượng phân tử của mỗi protein là như được thể hiện trong bảng 1.

[Bảng 1]

SEQ ID NO	Tên protein	Tên axit nucleic	Chỉ số thủy liệu pháp (HI)	Khối lượng phân tử (kDa)
1	PRT410	GEN495	-0,81	53,6
2	PRT853	GEN971	-0,68	218,3
3	PRT647	GEN740	0,04	54,1
4	PRT699	GEN797	0,17	48,8
5	PRT698	GEN796	0,43	48,5

Năm loại axit nucleic này mỗi loại được tách dòng vào trong vector tách dòng (pUC118). Sau đó, các axit nucleic giống nhau mỗi loại được cắt ra bằng các enzym giới hạn NdeI và EcoRI và sau đó kết hợp vào trong vector biểu hiện protein pET-22 b(+) để thu được các vector biểu hiện. *Escherichia coli* BLR(DE3) được biến nạp bằng mỗi trong số năm vector biểu hiện để thu được *Escherichia coli* biến nạp (tế bào tái tổ hợp) biểu hiện protein đích.

(2) Biểu hiện protein đích

Escherichia coli biến nạp ở trên được nuôi cấy trong 2 mL môi trường LB có chứa ampicillin trong 15 giờ. Dung dịch nuôi cấy này được bổ sung vào 100 mL môi trường nuôi cấy hạt giống (Bảng 2) có chứa ampicillin để OD₆₀₀ là 0,005. Nhiệt độ của dung dịch nuôi cấy được duy trì ở 30°C và nuôi cấy bằng bình được thực hiện (khoảng 15 giờ) cho đến khi OD 600 là 5, nhờ đó thu được dung dịch nuôi cấy hạt giống.

[Bảng 2]

Môi trường nuôi cấy hạt giống	
Chất phản ứng	Nồng độ (g/L)
Glucose	5,0
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₄	9,3
Chiết xuất nấm men	6,0
Ampicillin	0,1

Dung dịch nuôi cấy hạt giống đã được bổ sung vào thiết bị lên men dạng bình trong đó 500 ml môi trường sản xuất (Bảng 3) đã được bổ sung vào để OD₆₀₀ là 0,05.

Việc nuôi cấy được thực hiện với sự kiểm soát ổn định ở độ pH 6,9 trong khi nhiệt độ của dung dịch nuôi cấy được duy trì ở 37°C. Hơn nữa, nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy được duy trì ở mức 20% nồng độ bão hòa oxy hòa tan.

[Bảng 3]

Môi trường sản xuất	
Chất phản ứng	Nồng độ (g/L)
Glucosa	12,0
KH ₂ PO ₄	9,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,4
Chiết xuất nấm men	15
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,04
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,04
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04
ADECANOL (Adeka Corporation, LG-295S)	0,1(mL/L)

Ngay sau khi glucosa trong môi trường sản xuất được tiêu thụ hoàn toàn, một dung dịch thức ăn (455 g/1L glucosa, 120 g/1L chiết xuất nấm men) được bổ sung vào với tốc độ 1 mL/phút. Việc nuôi cấy được thực hiện với sự kiểm soát ổn định ở pH 6,9 trong khi nhiệt độ của dung dịch nuôi cấy được duy trì ở 37°C. Hơn nữa, việc nuôi cấy được thực hiện trong 20 giờ trong khi nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy được duy trì ở mức 20% nồng độ bão hòa oxy hòa tan. Sau đó, isopropyl-β-thiogalactopyranosit (IPTG) 1M được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy ở nồng độ cuối cùng là 1 mM để gây ra sự biểu hiện của protein đích. Hai mươi giờ sau khi bổ sung IPTG, dung dịch nuôi cấy được ly tâm để thu hồi các tế bào vi khuẩn. SDS-PAGE được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào vi khuẩn được điều chế từ dung dịch nuôi cấy trước khi bổ sung IPTG và sau khi bổ sung IPTG, và chứng minh được rằng protein đích được biểu hiện ở dạng các thể không hòa tan do sự xuất hiện của dải kích thước protein đích tùy thuộc vào sự bổ sung IPTG.

[Ví dụ 1: Hiệu quả của việc bổ sung muối kim loại – phần 1]

1,8 µg/g tế bào vi khuẩn ước của DNaza (Sigma-Aldrich Co. LLC) và 164 µg/g tế bào vi khuẩn ước của Lysozym (Thermo Fisher Scientific, Inc.) được bổ sung vào huyền phù nước RO của *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT853 (HI: -0,68) ở dạng các thể không hòa tan, sau đó được xử lý bốn lần bằng thiết bị làm đồng nhất áp

suất cao (GEA, PANDA PLUS) ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, các thể không hòa tan thu được bằng cách sử dụng máy ly tâm (TOMY MX-305) ở $11.000 \times g$ trong 5 phút. Do đó, các thể không hòa tan là các hạt không hòa tan tương đối nhỏ, cần được ly tâm trong một khoảng thời gian đáng kể để thu được. Sau khi tạo huyền phù các hạt không hòa tan trong nước, các muối kim loại thể hiện trong bảng 4 được bổ sung vào ở nồng độ 0,5 M. Fig.1 là ảnh của mỗi mẫu trong trường hợp được ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây sau khi bổ sung muối kim loại.

Bằng cách bổ sung muối kim loại đa hóa trị, chúng mình được rằng các thể không hòa tan có thể được kết tủa nhờ ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây.

[Bảng 4]

Số	Muối kim loại
(1)	Không bổ sung
(2)	natri clorua 0,5 M
(3)	magie clorua 0,5 M
(4)	kali clorua 0,5 M
(5)	canxi clorua 0,5M
(6)	lithi clorua 0,5M
(7)	magie sulfat 0,5 M
(8)	kali sulfat 0,5 M
(9)	natri nitrat 0,5 M
(10)	magie nitrat 0,5 M
(11)	kali nitrat 0,5 M
(12)	lithi nitrat 0,5 M
(13)	natri axetat 0,5 M
(14)	lithi axetat 0,5 M
(15)	natri cacbonat 0,5 M
(16)	trinatri xitrat 0,5 M

[Ví dụ 2: Hiệu quả của việc bổ sung muối kim loại – phần 2]

Đối với các muối kim loại (magie clorua, canxi clorua, magie sulfat, và magie nitrat) có hiệu quả kết tụ tuyệt vời trong ví dụ 1, hiệu quả kết tụ ở nồng độ thấp được chứng minh khi sử dụng các thể không hòa tan của PRT853 (xem bảng 5). Fig.2 là ảnh của mỗi mẫu trong trường hợp được ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây sau khi bổ sung muối kim loại.

Hiệu quả kết tụ đã được quan sát với muối kim loại bất kỳ ở nồng độ 1 mM,

nhưng hiệu quả kết tụ đáng chú ý đã được quan sát ở nồng độ 5 mM hoặc lớn hơn.

[Bảng 5]

Số	Muối kim loại
(1)	Không bổ sung
(2)	magie clorua 10 mM
(3)	magie clorua 5 mM
(4)	magie clorua 1 mM
(5)	canxi clorua 10 mM
(6)	canxi clorua 5 mM
(7)	canxi clorua 1 mM
(8)	magie sulfat 10 mM
(9)	magie sulfat 5 mM
(10)	magie sulfat 1 mM
(11)	magie nitrat 10 mM
(12)	magie nitrat 5 mM
(13)	magie nitrat 1 mM

[Ví dụ 3: Hiệu quả trong protein có HI khác nhau]

Hiệu quả của việc bổ sung muối kim loại trong protein với tính kỵ nước khác nhau đã được xác nhận. Đối với bốn thể không hòa tan của PRT410 (HI: -0,81), PRT647 (HI: 0,04), PRT699 (HI: 0,17), và PRT698 (HI: 0,43), hiệu quả kết tụ bằng cách bổ sung muối kim loại (canxi clorua và magie clorua) được chứng minh theo cách giống như như trong ví dụ 1.

1,8 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ước của DNaza và 164 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ước của Lysozym đã được bổ sung vào huyền phù nước RO của *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện mỗi thể không hòa tan, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao ở nhiệt độ trong phòng và ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, canxi clorua hoặc magie clorua được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ 10 đến 150 mM, tiếp đó ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây để xác nhận trạng thái kết tụ. Fig.3 là ảnh của mỗi mẫu trong trường hợp được ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây sau khi bổ sung muối kim loại.

Thông qua hoạt động ly tâm này, các thể không hòa tan của PRT410 và PRT699 có thể được kết tủa mà không cần bổ sung muối kim loại (canxi clorua và magie clorua), nhưng chứng minh được rằng ngay cả lượng nhỏ có thể kết tủa các thể không hòa tan một cách chặt chẽ hơn nhờ bổ sung muối kim loại. Mặt khác, PRT647

và PRT698 không thể được kết tủa trong các điều kiện ly tâm hiện tại trừ khi muối kim loại được bổ sung vào, nhưng có thể được kết tủa và kết tủa bằng cách bổ sung muối kim loại. Đặc biệt, nồng độ muối kim loại cao hơn có thể dẫn đến sự kết tủa và kết tủa chặt chẽ hơn của các thể không hòa tan (xem Fig.3).

Do tác dụng bổ sung của muối kim loại đã được quan sát thấy trong các protein có tính kỵ nước khác nhau, nên cho rằng phương pháp bổ sung muối kim loại này có thể được áp dụng cho việc kết tủa các thể không hòa tan của các protein khác nhau.

[Ví dụ 4: Cải thiện độ tinh khiết khi tinh chế]

Bốn thể không hòa tan của PRT410, PRT647, PRT699, và PRT698 có thể được kết tủa trong 5 phút trong trường hợp được ly tâm ở $11.000 \times g$, 20°C . Các phân kết tủa thu được từ quá trình ly tâm mỗi phần được tạo huyền phù trong nước RO, và hiệu quả của việc bổ sung muối kim loại vào huyền phù này (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm) đã được xác nhận.

Đối với các thể không hòa tan được tạo huyền phù lại trong nước RO, hiệu quả của việc bổ sung muối kim loại được chứng minh theo cách giống như như trong Ví dụ 3. Fig.4 là ảnh của mỗi mẫu trong trường hợp được ly tâm ở mức $2.680 \times g$ trong 10 giây sau khi bổ sung muối kim loại. Như được thể hiện trên Fig.4, hiệu quả bổ sung muối kim loại đã được quan sát như trong Ví dụ 3. Ngoài ra, như sẽ được mô tả dưới đây, độ tinh khiết của các thể không hòa tan có thể được cải thiện nhờ sự tạo huyền phù lại này.

Fig.5 và bảng 6 hiển thị kết quả của độ tinh khiết được cải thiện của các thể không hòa tan bằng cách bổ sung muối kim loại và hoạt động tạo huyền phù lại bằng ly tâm. Fig.5 là ảnh cho thấy kết quả (kết quả điện di) của phân tích SDS-PAGE của từng chất lỏng xử lý PRT410 thu được trong Ví dụ 3 và Ví dụ 4. Trong ảnh A và B của Fig.5, huyền phù (huyền phù bị phá vỡ) của PRT410 ngay sau khi phá vỡ các tế bào vi khuẩn bằng máy làm đồng nhất áp suất cao được áp dụng cho lần 1; phân kết tủa thu được bằng cách bổ sung canxi clorua vào huyền phù bị phá vỡ với nồng độ 10 mM, sau đó kết tủa và ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 5 phút được áp dụng cho lần 2; phân kết tủa thu được bằng cách bổ sung magie clorua vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ

10 mM, sau đó kết tủa và ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 5 phút được áp dụng cho lần 3; và protein đánh dấu khối lượng phân tử đã được áp dụng cho lần M.

Ảnh A trên Fig.5 là ảnh cho thấy kết quả của việc nhuộm màu bằng chất nhuộm gel huỳnh quang Oriole (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) có khả năng nhuộm tất cả các protein sau khi điện di, và B trên Fig.5 là ảnh cho thấy kết quả nhuộm bằng chất nhuộm trong gel đuôi His InVision (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific, Inc.) phản ứng với vùng thẻ His PRT410, sau khi điện di. PRT410 với khối lượng phân tử theo lý thuyết là 53,6 kDa được phát hiện là một dải gần chất đánh dấu khối lượng phân tử là 60 kDa.

Sử dụng bộ tạo ảnh gel EZ Gel Doc (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.), dải điện di của gel được nhuộm Oriole được phân tích để tính độ tinh khiết tinh chế của PRT410 trong mỗi chất lỏng xử lý. Các kết quả được thể hiện trong bảng 6 (ngay sau khi phá vỡ).

Độ tinh khiết của phần kết tủa thu được mà không cần bổ sung muối kim loại là 10,5%, nhưng do sự kết tụ và kết tủa chặt chẽ hơn có thể được tạo ra bằng cách bổ sung muối kim loại, độ tinh khiết có thể được cải thiện lên đến 30,7% nhờ bổ sung canxi clorua và 34,1% nhờ bổ sung magie clorua (xem các lần từ 1 đến 3 trên Fig.5, và bảng 6 (ngay sau khi phá vỡ)).

Ngoài ra, trong ảnh A và B của Fig.5, huyền phù (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm) thu được bằng cách kết tủa huyền phù bị phá vỡ (lần 1) bằng cách ly tâm ở $11.000 \times g$ ở 20°C trong 5 phút, và tạo huyền phù phần kết tủa thu được một lần nữa trong nước RO được áp dụng đối với lần 4; phần kết tủa thu được bằng cách bổ sung canxi clorua vào huyền phù được tạo lại bằng ly tâm ở nồng độ là 10 mM, tiếp đó ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5 phút được áp dụng đối với lần 5; và phần kết tủa thu được bằng cách bổ sung magie clorua vào huyền phù được tạo lại bằng ly tâm ở nồng độ là 10 mM, tiếp đó ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5 phút được áp dụng đối với lần 6. Độ tinh khiết có thể được cải thiện từ 10,5% đến 34,8% (xem lần 4 trên Fig.5, và bảng 6 (được ly tâm và được tạo huyền phù lại)) bằng cách kết tủa huyền phù ngay sau khi phá vỡ các tế bào vi khuẩn bằng máy làm đồng nhất áp suất cao

bằng cách ly tâm ở $11.000 \times g$ ở 20°C trong 5 phút, và tạo huyền phù lại phần kết tủa thu được một lần nữa trong nước RO (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm), nhưng bằng cách bổ sung canxi clorua hoặc magie clorua vào huyền phù được tạo lại bằng ly tâm ở nồng độ là 10 mM, và kết tụ các thể không hòa tan, việc tách có thể được thực hiện bằng cách ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5 phút, và độ tinh khiết của phần kết tủa thu được được cải thiện lần lượt đến 48,6% và 50,1% (xem các lần 5 và 6 trên Fig.5, và bảng 6 (được ly tâm và được tạo huyền phù lại)). Do đó, có thể cải thiện đáng kể độ tinh khiết bằng cách bổ sung muối kim loại.

Chứng minh được rằng phương pháp bổ sung muối kim loại này không chỉ hữu hiệu đối với việc kết tụ các thể không hòa tan mà còn là phương pháp hữu hiệu để loại bỏ các tạp chất có nguồn gốc từ các tế bào chủ.

[Bảng 6]

	Độ tinh khiết (%)		
	Không bổ sung	Canxi clorua 10 mM	Magie clorua 10 mM
Ngay sau khi phá vỡ	10,5	30,7	34,1
Được ly tâm và được tạo huyền phù lại	34,8	48,6	50,1

Ngoài ra, muối kim loại 50 mM được bổ sung vào mỗi trong số các huyền phù được tạo lại bằng ly tâm và huyền phù bị phá vỡ chứa bốn thể không hòa tan của PRT410, PRT647, PRT699, và PRT698, tiếp đó kết tụ và ly tâm ở $2.680 \times g$ trong 10 giây. Đối với phần kết tủa thu được trong mỗi trường hợp, tỷ lệ thu hồi protein được xác định. Các kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Tỷ lệ thu hồi được tính bằng cách đo độ hấp thụ ở 595nm bằng bộ đọc vi đĩa (TECAN, Infinite F200), giả sử rằng giá trị bằng số của độ hấp thụ trước khi ly tâm là 0% và giá trị bằng số của độ hấp thụ của dịch nổi sau khi xử lý $11.000 \times g$ trong 10 phút là 100%.

[Bảng 7]

Tên protein	Tỷ lệ thu hồi (%)		
	Không bổ sung	Canxi clorua 50 mM	Magie clorua 50 mM
PRT410	18	98	97
PRT647	0	100	97
PRT699	15	99	98
PRT698	2	97	94

Như rõ ràng từ bảng 7, các thể không hòa tan có thể được thu hồi với hiệu suất rất cao bằng cách bổ sung muối kim loại.

Chứng minh được rằng phương pháp bổ sung muối kim loại này không bị giới hạn ở loại protein miễn là nó là protein không hòa tan, là phương pháp rất hiệu quả cho việc kết tụ các thể không hòa tan và loại bỏ các tạp chất có nguồn gốc từ các tế bào chủ, không phân biệt dạng của thể hòa tan có phải là hạt không hòa tan kết chặt hay không, và cũng là phương pháp hoàn hảo có khả năng thu hồi các thể không hòa tan với hiệu suất rất cao.

[Ví dụ 5: Hiệu quả của việc bổ sung axit – phần 1]

1,8 µg/g tế bào vi khuẩn ứot của DNaza (Sigma-Aldrich Co. LLC) và 164 µg/g tế bào vi khuẩn ứot của Lysozym (Thermo Fisher Scientific, Inc.) được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT853 (HI: -0,68) ở dạng các thể không hòa tan, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao (GEA, PANDA PLUS) ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất 600 bar để thu được huyền phù bị phá vỡ chứa các tế bào vi khuẩn.

Axit axetic, axit xitric, hoặc axit sulfuric được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 10 đến 100 mM (đối với mỗi quan hệ giữa số lượng mẫu và nồng độ axit, xem bảng 8), tiếp đó ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 30 giây để xác nhận trạng thái kết tụ của các thể không hòa tan. Fig.6 là ảnh của mỗi mẫu sau khi ly tâm. Khi không bổ sung axit (mẫu 1), các thể không hòa tan không thể kết tủa và thu được dưới các điều kiện ly tâm tốc độ thấp này. Tuy nhiên, với việc bổ sung axit, thể kết tụ của các thể không hòa tan có thể thu được dưới các điều kiện ly tâm tốc độ thấp này, ngay cả với nồng độ bất kỳ của axit được nêu trong bảng 8 (Các mẫu 2 đến 10).

Hiệu quả của việc bổ sung axit trong các thể không hòa tan sau khi tạo huyền

phù lại trong nước RO (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm) cũng được kiểm tra. Tức là, huyền phù bị phá vỡ của các tế bào vi khuẩn được xử lý bằng máy ly tâm (TOMY MX-305) ở $11.000 \times g$ trong 5 phút để thu được các thể không hòa tan. Do đó, các thể không hòa tan này là các hạt không hòa tan tương đối nhỏ mà cần được ly tâm ở lực ly tâm và thời gian đáng kể để thu được mà không cần bổ sung axit. Sau khi tạo huyền phù các thể không hòa tan trong nước RO (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm), axit có nồng độ nêu trong bảng 8 được bổ sung như trên, tiếp đó ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 30 giây để xác nhận trạng thái kết tụ của các thể không hòa tan. Fig.7 là ảnh của mỗi mẫu sau khi ly tâm. Đã chứng minh được rằng, ngay cả trong huyền phù được tạo lại bằng ly tâm được tạo huyền phù lại trong nước RO, việc kết tụ các thể không hòa tan có thể được thực hiện hiệu quả nhờ axit. Ngoài ra, là kết quả của việc tạo huyền phù lại trong nước RO, các hạt được rửa sạch và do đó môi trường và các thành phần có nguồn gốc từ các tế bào vi khuẩn được loại bỏ, do đó có thể thu được các thể không hòa tan tinh khiết ngay cả bằng mắt, so với các thể không hòa tan mà không được tạo huyền phù lại trong nước RO.

[Bảng 8]

Số	Axit
1	không bổ sung
2	axit axetic 0,10 M
3	axit axetic 0,05 M
4	axit axetic 0,01 M
5	axit xitric 0,10 M
6	axit xitric 0,05 M
7	axit xitric 0,01 M
8	axit sulfuric 0,10 M
9	axit sulfuric 0,05 M
10	axit sulfuric 0,01 M

[Ví dụ 6: Hiệu quả của việc bổ sung axit trong protein có HI khác nhau]

Đối với bốn thể không hòa tan của PRT410 (HI: -0,81), PRT647 (HI: 0,04), PRT699 (HI: 0,17), và PRT698 (HI: 0,43) với tính kỵ nước khác nhau, theo cách giống như trong ví dụ 5, axit xitric 5 đến 30 mM được bổ sung vào và hiệu quả kết tụ các thể không hòa tan được chứng minh như sau.

1,8 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ướt của DNaza và 164 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ướt của Lysozym được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện mỗi thể không hòa tan, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao ở nhiệt độ trong phòng và ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, axit xitric được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 5 đến 30 mM, tiếp đó ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 30 giây để xác nhận trạng thái kết tụ. Fig.8 là ảnh của mỗi mẫu sau khi ly tâm.

Trên Fig.8, 0, 5, 10, 20, và 30 chỉ ra nồng độ (mM) của axit xitric được bổ sung vào (0 mM: không bổ sung axit xitric). H là mẫu thu được bằng cách ly tâm huyền phù không có bổ sung axit xitric ở $11.000 \times g$ trong 5 phút.

Các thể không hòa tan của protein bất kỳ không thể thu được trừ khi điều kiện ly tâm là $11.000 \times g$ trong 5 phút, trong trường hợp mà axit không được bổ sung, nhưng các thể không hòa tan có thể thu được bằng cách ly tâm tốc độ thấp trong protein bất kỳ bằng cách bổ sung axit xitric 10 mM hoặc lớn hơn. Việc kết tụ cũng có thể được quan sát khi bổ sung axit xitric 5 mM, nhưng việc lắng là không hoàn toàn trong thời gian ngắn 30 giây (xem Fig.8).

Do hiệu quả bổ sung axit đã được quan sát thấy trong các protein có tính kỵ nước khác nhau, nên cho rằng phương pháp bổ sung axit này có thể được áp dụng cho việc kết tụ các thể không hòa tan của các loại protein khác nhau.

Đối với mỗi một trong bốn phần kết tủa của PRT410, PRT647, PRT699, và PRT698 đã được thu hồi bằng cách ly tâm tốc độ thấp, sau khi bổ sung axit xitric 10 mM, tỷ lệ thu hồi protein được xác định theo cách giống như trong ví dụ 4. Các kết quả được thể hiện trong bảng 9.

[Bảng 9]

Protein	Tỷ lệ thu hồi (%)
PRT410	101
PRT647	103
PRT699	104
PRT698	103

Như rõ ràng từ bảng 9, các thể không hòa tan có thể được thu hồi mà không

hao hụt nhờ bổ sung axit trong protein bất kỳ.

Tiếp theo, độ tinh khiết của các thể không hòa tan PRT410 được thu hồi được phân tích bằng SDS-PAGE. Fig.9 là ảnh cho thấy các kết quả (kết quả điện di) trong phân tích SDS-PAGE của mỗi chất lỏng xử lý PRT410. Trên Fig.9, protein đánh dấu khối lượng phân tử được áp dụng đối với làn M; huyền phù bị phá vỡ mà không bổ sung axit được áp dụng đối với làn 1; và các thể không hòa tan được thu hồi sau khi bổ sung axit xitric 10 mM vào huyền phù bị phá vỡ được áp dụng cho làn 2 sao cho nồng độ protein có thể là 1,5 µg. Để nhuộm màu sau khi điện di, hai hóa chất nhuộm màu là chất nhuộm gel huỳnh quang Oriole™ (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) có khả năng nhuộm tất cả các protein và chất nhuộm trong gel thể His InVision™ (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific, Inc.) phản ứng với vùng thể His của PRT410 được sử dụng. PRT410 với khối lượng phân tử theo lý thuyết là 53,6 kDa được phát hiện là một dải gần chất đánh dấu khối lượng phân tử là 60 kDa.

Bằng cách sử dụng bộ tạo ảnh gel EZ Gel Doc (nhãn hiệu) (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.), dải điện di của gel được nhuộm Oriole được phân tích để tính độ tinh khiết tinh chế của PRT410 trong mỗi chất lỏng xử lý. Các kết quả được thể hiện trong bảng 10.

[Bảng 10]

Không bổ sung (%)	axit xitric 10 mM (%)
11,6	23,7

Độ tinh khiết của phần kết tủa thu được mà không bổ sung axit là 11,6%, nhưng do sự kết tủa và kết tụ chặt có thể được thực hiện nhờ bổ sung axit, nên độ tinh khiết có thể được cải thiện tới 23,7% (xem Fig.9).

Đã chứng minh được rằng phương pháp bổ sung axit này không chỉ rất hiệu quả đối với việc kết tụ các thể không hòa tan, mà còn là phương pháp hiệu quả để loại bỏ các tạp chất có nguồn gốc từ các tế bào chủ.

Đã chứng minh được rằng phương pháp bổ sung axit này không bị giới hạn ở loại protein miễn là nó là protein không hòa tan, là phương pháp rất hiệu quả cho việc kết tụ các thể không hòa tan và loại bỏ các tạp chất có nguồn gốc từ các tế bào chủ,

không phân biệt dạng của thể hòa tan có phải là hạt không hòa tan kết chặt hay không, và cũng là phương pháp hoàn hảo có khả năng thu hồi các thể không hòa tan với hiệu suất rất cao.

[Ví dụ 7: Hiệu quả loại bỏ lipopolysaccharit (LPS)]

Escherichia coli được sử dụng làm tế bào chủ có LPS được gọi là nội độc tố có nguồn gốc từ thành tế bào duy nhất đối với vi khuẩn gram âm. Trong trường hợp mà nội độc tố hiện diện quá mức, nó được biết là có tác dụng như gây sốt, suy đa tạng, và chứng tim đập nhanh. Do đó, tốt hơn là giảm nội độc tố. Hàm lượng LPS trong các thể không hòa tan được kết tụ nhờ bổ sung muối kim loại hoặc axit theo sáng chế đã được đo lường để xác nhận hiệu quả giảm LPS.

Các thể không hòa tan (1) không được bổ sung muối kim loại hoặc axit thu được bằng phương pháp sau.

Tức là, 1,8 µg/g tế bào vi khuẩn ướn của DNaza (Sigma-Aldrich Co. LLC) và 164 µg/g tế bào vi khuẩn ướn của Lysozym (Thermo Fisher Scientific, Inc.) được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT853, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao (GEA, PANDA PLUS) ở nhiệt độ trong phòng và ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, xử lý bằng máy ly tâm (TOMY MX-305) ở $11.000 \times g$ trong 20 phút. Phần kết tủa được tạo huyền phù lần nữa trong nước RO và được xử lý ở $11.000 \times g$ trong 30 phút. Thao tác rửa này được thực hiện hai lần. Phần kết tủa thu được được tạo huyền phù lần nữa trong nước RO và được xử lý ở $11.000 \times g$ trong 60 phút để thu được các thể không hòa tan (1) ở dạng phần kết tủa. Các thể không hòa tan (1) thu được ở 20°C.

Các thể không hòa tan (2) được kết tụ bằng cách bổ sung muối kim loại thu được bằng phương pháp sau.

Tức là, việc xử lý được thực hiện bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao, và cho đến khi các tế bào vi khuẩn bị phá vỡ, quy trình giống như trên được thực hiện. Sau khi phá vỡ, canxi clorua 10 mM được bổ sung vào để kết tụ các thể không hòa tan mà sau đó được xử lý ở $2.500 \times g$ trong 10 phút. Phần kết tủa thu được được

tạo huyền phù lần nữa trong nước RO và được xử lý ở $2.500 \times g$ trong 10 phút. Thao tác rửa này được thực hiện hai lần để thu được các thể không hòa tan (2) bằng cách bổ sung muối kim loại ở dạng phân kết tủa.

Các thể không hòa tan (3) được kết tủa bằng cách bổ sung axit thu được bằng phương pháp sau.

Tức là, các thể không hòa tan (3) bằng cách bổ sung axit thu được theo cách giống như khi thu được các thể không hòa tan (2) với việc bổ sung muối kim loại, ngoại trừ việc axit xitric 10 mM được bổ sung vào thay cho việc bổ sung muối kim loại.

Hàm lượng LPS trong ba loại thể không hòa tan này được xác định bằng phương pháp sau đây.

(A) Chuẩn bị mẫu đo

Khoảng 75 mg (các thể không hòa tan (1): 75,5 mg, các thể không hòa tan (2): 75,1 mg, và các thể không hòa tan (3): 75,0 mg) của mỗi trong ba loại mẫu thể không hòa tan nêu trên được cân và nước cất để tiêm (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) được bổ sung vào đó với nồng độ là 50 mg/mL để tạo ra huyền phù. Sau khi khuấy bằng máy trộn xoáy, độ pH được kiểm tra, và dung dịch nước natri hydroxit 5N (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) được bổ sung vào để điều chỉnh thành trung tính. Mẫu thể không hòa tan được xử lý nhiệt ở 90°C trong 20 phút bằng cách sử dụng thiết bị gia nhiệt khối. Sau khi giải phóng nhiệt, quá trình ly tâm được thực hiện ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch nổi được thu hồi và được sử dụng làm dung dịch gốc để đo.

(A) Xác định hàm lượng LPS

Bằng cách sử dụng Limulus ES-il single test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) theo tài liệu giải thích đính kèm, phân tích thời gian đo độ đục bằng cách sử dụng máy đo độ đục tổ (ET-6000/J, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) được thực hiện. Để đo lường, CSE (*E. coli* UKT-B) được gắn vào kit được sử dụng làm nội độ tổ tiêu chuẩn. Đối với mỗi mẫu thử, trước hết, dung dịch gốc đo được pha loãng 1.000 lần và được đo. Các giá trị đo thu được bằng cách pha loãng 1.000 lần các thể

không hòa tan (1) và các thể không hòa tan (2), nhưng vì các thể không hòa tan (3) thấp hơn giới hạn phát hiện ($<0,01$ EU/mL), nên giá trị đo có thể đạt được ở độ pha loãng 10 lần bằng cách thay đổi tỷ lệ pha loãng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 11.

[Bảng 11]

Mẫu	Hàm lượng LPS ($\mu\text{g/g}$)
Các thể không hòa tan (1)	3,10
Các thể không hòa tan (2)	1,19
Các thể không hòa tan (3)	0,008

Đã chứng minh được rằng hàm lượng LPS đã giảm trong các thể không hòa tan (2) và (3) được kết tụ bằng cách bổ sung muối kim loại hoặc axit, so với các thể không hòa tan (1) thu được mà không bổ sung muối kim loại hoặc axit. Cụ thể, hàm lượng LPS rất thấp trong các thể không hòa tan (3) thu được bằng cách kết tụ bằng axit. Phương pháp kết tụ và thu được các thể không hòa tan bằng cách bổ sung muối kim loại hoặc axit là một phương pháp tuyệt vời còn có khả năng làm giảm hàm lượng LPS.

[Ví dụ 8: Hiệu quả kết tụ bằng chất kết bông anion]

1,8 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ướn của DNaza và 164 $\mu\text{g/g}$ tế bào vi khuẩn ướn của Lysozym được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT853 (HI: -0,68) ở dạng các hạt không hòa tan, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn để thu được huyền phù bị phá vỡ. Sau khi phá vỡ, chất kết bông được nêu trong bảng 12 được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 0,05%, và trạng thái lắng của các hạt không hòa tan được chứng minh bằng cách để yên hoặc ly tâm ($2.680 \times \text{g}$ trong 10 giây). Các kết quả được thể hiện trên Fig.10.

Chỉ có chất kết bông dựa trên polyacrylat anion (KURIFARM PA-896) có thể làm kết tủa hiệu quả các hạt không hòa tan ở cả quá trình tách tĩnh và tách bằng ly tâm.

[Bảng 12]

Số	Chất kết bông
1	KURIFARM PA-896 (chất kết bông anion)
2	KURIFARM PN-901 (chất kết bông không ion)
3	KURIFARM PC-601 (chất kết bông cation)
4	KURIFARM PC-668 (chất kết bông cation)
5	KURIFARM PC-696 (chất kết bông cation)
6	KURIFARM PC-702 (chất kết bông cation)
7	KURIFARM PC-797 (chất kết bông cation)
8	KURIFUTURE PF-512 (chất kết bông lưỡng tính)
9	KURIFUTURE PF-833 (chất kết bông lưỡng tính)
10	PRESS AID111 (chất kết bông cation)

[Ví dụ 9: Hiệu quả cải thiện độ tinh khiết bằng chất kết bông anion]

Hiệu quả của việc bổ sung chất kết bông anion KURIFARM PA-896, mà hiệu quả kết tụ của nó được chứng minh trong ví dụ 8, vào huyền phù bị phá vỡ và huyền phù được tạo lại bằng ly tâm chứa các tế bào vi khuẩn đã được chứng minh. Huyền phù được tạo lại bằng ly tâm này là huyền phù trong đó huyền phù bị phá vỡ được ly tâm ở $11.000 \times g$ ở 20°C trong 5 phút và phần kết tủa thu được được tạo huyền phù lại một lần nữa trong nước RO. Huyền phù bị phá vỡ chứa các tế bào vi khuẩn thu được theo cách giống như trong ví dụ 8, ngoại trừ việc *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT410 (HI: -0,81) ở dạng các hạt không hòa tan được sử dụng.

Sau khi bổ sung chất kết bông, việc ly tâm được thực hiện ở $2.500 \times g$ trong 5 phút, và độ tinh khiết của các thể không hòa tan trong phần kết tủa thu được được phân tích bằng SDS-PAGE. Các kết quả được thể hiện trên Fig.11. Trên Fig.11, huyền phù (huyền phù bị phá vỡ) của PRT410 ngay sau khi phá vỡ các tế bào vi khuẩn bằng máy làm đồng nhất áp suất cao được áp dụng đối với làn 1; phần kết tủa thu được bằng cách bổ sung KURIFARM PA-896 vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 0,01%, tiếp đó kết tủa và ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 5 phút được áp dụng đối với làn 2; huyền phù (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm) thu được bằng cách kết tủa huyền phù bị phá vỡ (làn 1) bằng cách ly tâm ở $11.000 \times g$ ở 20°C trong 5 phút, và tạo huyền phù phần kết tủa thu được một lần nữa trong nước RO được áp dụng đối với làn 3; và phần kết tủa thu được bằng cách bổ sung KURIFARM PA-896 vào huyền phù được tạo lại bằng ly tâm ở nồng độ là 0,01%, tiếp đó ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5

phút được áp dụng đối với làn 4. Đối với việc nhuộm màu sau khi điện di, hai hóa chất nhuộm màu là chất màu gel huỳnh quang Oriole™ (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) có khả năng nhuộm tất cả các protein và chất nhuộm trong gel thể His InVision™ (được sản xuất bởi Thermo Fisher Scientific, Inc.) phản ứng với vùng thể His của PRT410 được sử dụng. PRT410 với khối lượng phân tử theo lý thuyết là 53,6 kDa được phát hiện là dải ở gần chất đánh dấu khối lượng phân tử là 60 kDa.

Trong trường hợp bổ sung KURIFARM PA-896 vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 0,01% và kết tụ các thể không hòa tan, việc tách có thể được thực hiện bằng cách ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5 phút, và độ tinh khiết của phần kết tủa thu được được cải thiện từ 12,2% đến 53,5% (xem các làn 1 và 2 trên Fig.11, và bảng 13 (ngay sau khi phá vỡ)). Độ tinh khiết của phần kết tủa có thể được cải thiện từ 12,2% đến 36,3% (xem các làn 1 và 3 trên Fig.11, và bảng 13 (được ly tâm và được tạo huyền phù lại)) bằng cách kết tủa huyền phù ngay sau khi phá vỡ các tế bào vi khuẩn bằng máy làm đồng nhất áp suất cao bằng cách ly tâm ở $11.000 \times g$ ở 20°C trong 5 phút, và tạo huyền phù lại phần kết tủa thu được một lần nữa trong nước RO (huyền phù được tạo lại bằng ly tâm), nhưng bằng cách bổ sung KURIFARM PA-896 vào huyền phù được tạo lại bằng ly tâm ở nồng độ là 0,01% và kết tụ các thể không hòa tan, việc tách có thể được thực hiện bằng cách ly tâm tốc độ thấp ở $2.500 \times g$ trong 5 phút, và độ tinh khiết của phần kết tủa thu được được cải thiện lần nữa từ 36,3% đến 51,8% (xem các làn 3 và 4 trên Fig.11, và bảng 13 (được ly tâm và được tạo huyền phù lại)). Do đó, có thể cải thiện đáng kể độ tinh khiết bằng cách bổ sung chất kết bông anion.

[Bảng 13]

	Độ tinh khiết (%)	
	Không bổ sung	Bổ sung chất kết bông
Ngay sau khi phá vỡ	12,2	53,5
Được ly tâm và được tạo huyền phù lại	36,3	51,8

[Ví dụ 10: Hiệu quả bằng cách bổ sung axit, gia nhiệt, và khuấy]

Hiệu quả kết tụ bằng cách gia nhiệt được chứng minh bằng cách sử dụng các thể không hòa tan của PRT410. 1,8 µg/g tế bào vi khuẩn ước của DNaza và 164 µg/g tế bào vi khuẩn ước của Lysozym được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT410, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, ly tâm ở $2.500 \times g$ trong 10 phút, và dịch nổi được gạn ra để điều chỉnh đến nồng độ gấp 2,5 lần. Sau đó, nồng độ được pha loãng 2,5 lần bằng nước RO. Axit xitric được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 20 mM, và sau đó việc gia nhiệt và khuấy được thực hiện nếu cần để thu được thể kết tụ. Mỗi mẫu được xử lý dưới các điều kiện được mô tả trong bảng 14. Việc gia nhiệt được thực hiện bằng cách sử dụng bể nước nóng và thời gian gia nhiệt là thời gian duy trì từ thời gian trong trường hợp mà bể nước nóng đạt được 80°C. Việc khuấy được thực hiện ở tốc độ 200 vòng/phút. Liên quan đến thể kết tụ thu được, nồng độ hạt và đường kính trung bình được xác định bằng cách sử dụng máy phân tích cỡ hạt CDA-1000 (Sysmex Corporation). Các kết quả được thể hiện trong bảng 14. Fig.12 cho thấy sự phân bố tần số và sự phân bố tích lũy của các đường kính trung bình.

Mẫu X được tạo ra mà không bổ sung axit và không khuấy, mẫu 1 được tạo ra chỉ có gia nhiệt và không bổ sung axit, và mẫu 2 được tạo ra mà không bổ sung axit và có gia nhiệt và khuấy cho thấy gần như không có hiệu quả kết tụ. Mặt khác, mẫu 3 được tạo ra chỉ bổ sung axit và không gia nhiệt/khuấy cho thấy sự gia tăng cỡ hạt, so với các mẫu X, 1 và 2. Hơn nữa, trong mẫu 7 được gia nhiệt ở 80°C trong 2 giờ, sự gia tăng cỡ hạt đã được quan sát so với mẫu 3. Các mẫu 4 đến 6, có thời gian gia nhiệt

khác nhau và được khuấy thêm, đã được thấy là có hiệu quả tăng cỡ hạt nhiều hơn bằng cách khuấy. Sự kết tụ phụ thuộc vào thời gian xử lý, nhưng hiệu quả được quan sát từ ít nhất 0,5 giờ. Xu hướng này được chứng minh trên Fig.12. Vì khả năng lọc cải thiện ở dạng đỉnh của sự phân bố cỡ hạt trở nên rõ ràng hơn, đã chứng minh được từ Fig.12 rằng việc bổ sung axit, gia nhiệt, và khuấy cải thiện khả năng lọc.

[Bảng 14]

Số	pH	Khuấy	Nhiệt độ xử lý (°C)	Thời gian xử lý (giờ)	Nồng độ hạt (hạt/ml)	Đường kính trung bình (μm)		
						d10%	d50%	d90%
X	Không điều chỉnh (6,0)	Không khuấy	22	-	$4,68 \times 10^{10}$	0,90	2,72	5,08
1	Không điều chỉnh (6,0)	Không khuấy	80	2	$2,57 \times 10^{10}$	1,37	3,23	6,40
2	Không điều chỉnh (6,0)	Được khuấy	80	2	$8,04 \times 10^9$	1,381	5,679	7,505
3	3,75	Không khuấy	22	-	$4,62 \times 10^9$	2,359	3,955	7,472
4	3,75	Được khuấy	80	0,5	$7,09 \times 10^{10}$	4,37	7,51	9,90
5	3,75	Được khuấy	80	1	$4,44 \times 10^8$	4,75	8,62	12,28
6	3,75	Được khuấy	80	2	$2,09 \times 10^8$	7,67	10,39	12,37
7	3,75	Không khuấy	80	2	$9,98 \times 10^8$	3,84	5,62	8,57

[Ví dụ 11: Hiệu quả cải thiện khả năng lọc theo loại axit]

Hiệu quả cải thiện khả năng lọc bằng cách bổ sung axit được chứng minh bằng cách sử dụng các thể không hòa tan của PRT410. Do chứng minh được rằng việc lọc có thể được thực hiện bằng cách bổ sung axit, nên hiệu quả cải thiện khả năng lọc tùy thuộc vào loại axit được so sánh đối với ba loại axit; axit xitric, axit clohydric, và axit sulfuric. Phương pháp thí nghiệm giống như trong ví dụ 10, ngoại trừ axit là khác nhau. Đối với việc xử lý axit, bảng 15 và 16 cho thấy ví dụ về các kết quả liên quan đến mối quan hệ giữa lượng lọc tối đa và thời gian lọc và thông lượng thẩm sau khi gia nhiệt và khuấy ở 80°C trong 2 giờ. Là kết quả của sự so sánh, chứng minh được rằng axit xitric đã vượt trội về mặt công nghiệp vì axit xitric thể hiện lượng lọc tối đa

lớn nhất và thông lượng thẩm ổn định.

[Bảng 15]

	Diện tích lọc (cm ²)	Lượng lọc tối đa (m ³ /m ²)
Không bổ sung	45,3	Không lọc được
Axit xitric	45,3	0,276
Axit clohydric	45,3	0,100
Axit sulfuric	45,3	0,092

[Bảng 16]

Độ pH	Nhiệt độ gia nhiệt (°C)	Thời gian gia nhiệt (giờ)	Nồng độ hạt (hạt/ml)	Đường kính trung bình (µm)		
				d10%	d50%	d90%
3,75 (Axit xitric)	80	2	$1,34 \times 10^8$	7,928	9,980	12,365
3,75 (Axit clohydric)	80	2	$1,88 \times 10^8$	7,374	9,641	12,755
3,75 (Axit sulfuric)	80	2	$2,49 \times 10^8$	7,283	9,430	11,835

[Ví dụ 12: Hiệu quả cải thiện độ tinh khiết protein bằng cách gia nhiệt]

Độ tinh khiết của các thể không hòa tan của PRT799 (SEQ ID NO: 11, 200 kDa) và PRT587 (SEQ ID NO: 12, 100 kDa) đã gia nhiệt được phân tích bằng SDS-PAGE. Fig.13 và 14 là ảnh cho thấy các kết quả (kết quả điện di) của phép phân tích SDS-PAGE của mỗi chất lỏng xử lý của PRT799 và PRT587. Axit xitric được bổ sung vào mỗi chất lỏng xử lý, và độ pH được điều chỉnh đến 3,75. Trên Fig.13, huyền phù bị phá vỡ được gia nhiệt ở 80°C trong 3 giờ được áp dụng đối với làn 1; và huyền phù bị phá vỡ không được gia nhiệt được áp dụng đối với làn 2. Đã chứng minh được trong huyền phù bị phá vỡ của làn 1 rằng protein nhiễm tạp được phân hủy bằng cách gia nhiệt. Trên Fig.14, huyền phù bị phá vỡ không được gia nhiệt được áp dụng đối với làn 1; và huyền phù bị phá vỡ được gia nhiệt ở 80°C trong 2 giờ được áp dụng đối với làn 2. Đã chứng minh được rằng dải gần chất đánh dấu phân tử 40 kDa được phân hủy, và sự cải thiện về độ tinh khiết của protein đích bằng cách gia nhiệt được chứng minh khi cường độ phát hiện của dải (protein đích) được phát hiện gần chất đánh dấu phân tử 100 kDa trong làn 2 cao hơn 1,2 lần so với dải của làn 1 không được gia

nhiệt.

[Ví dụ 13: Hiệu quả bằng cách gia nhiệt liên tục]

Hiệu quả kết tụ bằng cách gia nhiệt liên tục được chứng minh bằng cách sử dụng các thể không hòa tan của PRT799. 1,8 µg/g tế bào vi khuẩn ướn của DNaza và 164 µg/g tế bào vi khuẩn ướn của Lysozym được bổ sung vào huyền phù nước RO chứa *Escherichia coli* BLR(DE3) biểu hiện PRT799, sau đó được xử lý bốn lần bằng máy làm đồng nhất áp suất cao ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất 600 bar để phá vỡ các tế bào vi khuẩn. Sau khi phá vỡ, ly tâm bằng máy ly tâm (TOMY MX-305) ở $2.500 \times g$ trong 10 phút, và dịch nổi được gạn ra để điều chỉnh đến nồng độ gấp 2,5 lần. Sau đó, nồng độ được pha loãng 2,5 lần bằng nước RO. Axit xitric được bổ sung vào huyền phù bị phá vỡ ở nồng độ là 20 mM, và sau đó việc gia nhiệt được thực hiện để thu được thể kết tụ. Mỗi mẫu được xử lý dưới các điều kiện được mô tả trong bảng 17. Việc gia nhiệt được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục MINI UHT T-20 (được sản xuất bởi Powerpoint International Ltd.). Nhiệt độ gia nhiệt là 80°C, 85°C, 90°C, hoặc 95°C, và thời gian gia nhiệt của huyền phù bị phá vỡ là 30 giây hoặc 60 giây. Đối với thể kết tụ thu được, nồng độ hạt và đường kính trung bình được xác định bằng cách sử dụng máy phân tích cỡ hạt CDA-1000 (Sysmex Corporation). Các kết quả được thể hiện trong bảng 17. Fig.14 và 15 cho thấy sự phân bố tần số và sự phân bố tích lũy của đường kính trung bình.

[Bảng 17]

Số	pH	Nhiệt độ xử lý (°C)	Thời gian xử lý	Nồng độ hạt (hạt/ml)	Đường kính trung bình (µm)		
					d10%	d50%	d90%
C	Trước khi gia nhiệt (3,75)	25	Không được gia nhiệt	$1,52 \times 10^{10}$	0,959	2,940	4,861
X	3,75	80	2 giờ	$5,08 \times 10^8$	4,001	6,412	8,685
1	3,75	80	30 giây	$1,32 \times 10^9$	3,987	7,824	10,275
2	3,75	80	60 giây	$1,09 \times 10^9$	3,951	8,163	11,415
3	3,75	85	30 giây	$6,48 \times 10^8$	5,166	8,778	11,415
4	3,75	85	60 giây	$4,19 \times 10^8$	4,865	9,070	12,525
5	3,75	90	30 giây	$1,44 \times 10^8$	6,773	11,045	13,825
6	3,75	90	60 giây	$2,51 \times 10^8$	5,434	10,845	13,810
7	3,75	95	30 giây	$8,27 \times 10^7$	5,664	11,825	14,510
8	3,75	95	60 giây	$1,02 \times 10^8$	3,035	11,535	14,475

Từ các kết quả trong bảng 17, trong trường hợp mà thể kết tụ của mẫu X thu được bằng cách gia nhiệt sử dụng bể nước nóng ở nhiệt độ gia nhiệt là 80°C trong thời gian gia nhiệt 2 giờ được so sánh với thể kết tụ của mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 thu được bằng cách sử dụng thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục MINI UHT T-20 (được sản xuất bởi Powerpoint International Ltd.) ở nhiệt độ gia nhiệt là 80°C, 85°C, 90°C, hoặc 95°C trong thời gian gia nhiệt 30 giây hoặc 60 giây, thể kết tụ thu được bằng cách sử dụng thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục MINI UHT T-20 (được sản xuất bởi Powerpoint International Ltd.) có cỡ hạt bằng hoặc lớn hơn so với cỡ hạt của thể kết tụ thu được bằng cách gia nhiệt trong bể nước nóng.

Đã chứng minh được từ Fig.15 và 16 rằng thể kết tụ có thể được làm cho to lên một cách hiệu quả bằng cách gia nhiệt huyền phù bị phá vỡ ở nhiệt độ cao trong khoảng thời gian ngắn.

[Ví dụ 14: Hiệu quả cải thiện khả năng lọc bằng cách gia nhiệt liên tục]

Kết quả của diện tích lọc và lượng lọc tối đa của các mẫu X, 5, 6, 7, và 8 được thể hiện trong bảng 18. Theo bảng 18, khả năng lọc trong trường hợp gia nhiệt ở nhiệt độ cao trong khoảng thời gian ngắn bằng cách sử dụng thiết bị khử trùng chất lỏng liên tục là bằng hoặc bằng hoặc lớn hơn so với khả năng lọc thu được bằng cách gia nhiệt sử dụng bể nước nóng trong 2 giờ, và đã chứng minh được rằng khả năng lọc

được cải thiện trong trường hợp mà huyền phù bị phá vỡ được gia nhiệt ở nhiệt độ cao trong khoảng thời gian ngắn.

[Bảng 18]

Số	pH	Nhiệt độ xử lý (°C)	Thời gian xử lý	Diện tích lọc (cm ²)	Lượng lọc tối đa (m ³ /m ²)
X	3,75	80	2 giờ	45,3	0,078
5	3,75	90	30 giây	45,3	0,099
6	3,75	90	60 giây	45,3	0,101
7	3,75	95	30 giây	45,3	0,103
8	3,75	95	60 giây	45,3	0,099

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách tách các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp ở dạng thể kết tụ ra khỏi tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào, bao gồm các bước:

bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp;

bước (B) bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp; và

bước (C) tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù, trong đó protein tái tổ hợp là protein cấu trúc.

2. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp bao gồm các bước từ (A) đến (C) sau đây:

bước (A) phá vỡ tế bào tái tổ hợp biểu hiện protein tái tổ hợp đích ở dạng các thể không hòa tan trong tế bào để thu được huyền phù bị phá vỡ có chứa các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp;

bước (B) bổ sung một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại, axit và chất kết bông anion vào huyền phù bị phá vỡ thu được trong bước (A), và kết tụ các thể không hòa tan của protein tái tổ hợp để thu được thể kết tụ protein tái tổ hợp; và

bước (C) tách thể kết tụ thu được trong bước (B) ra khỏi huyền phù, trong đó protein tái tổ hợp về cơ bản không được hòa tan trong huyền phù bị phá vỡ.

3. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước (C) bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng lực ly tâm là $10.000 \times g$ hoặc nhỏ hơn.

4. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước (C) bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng máy ly tâm được chọn từ nhóm bao gồm máy ly tâm loại tằm tách, máy ly tâm loại giỏ và máy ly tâm loại bình lắng.
5. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bước (C) bao gồm việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp bằng cách lọc hoặc lắng tự nhiên.
6. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 1 hoặc 2, còn bao gồm:
việc gia nhiệt trong bước (B).
7. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 6, còn bao gồm:
việc khuấy trong bước (B).
8. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm muối kim loại kiềm thổ và muối kim loại thổ.
9. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 8, trong đó muối kim loại là muối kim loại được chọn từ nhóm bao gồm halogenua kim loại kiềm thổ, nitrat kim loại kiềm thổ, sulfat kim loại kiềm thổ, halogenua kim loại thổ, nitrat kim loại thổ, và sulfat kim loại thổ.
10. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó axit là axit oxo.
11. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 10, trong đó axit oxo

là axit oxo được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, axit sulfuric, và axit xitric.

12. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chất kết bông anion là chất kết bông anion được chọn từ nhóm bao gồm polyacrylat, polyacrylamit anion, và copolyme acrylamit-acrylat.

13. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó việc phá vỡ tế bào tái tổ hợp là phá vỡ bằng cơ học.

14. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 5 đến 13, trong đó việc tách thể kết tụ protein tái tổ hợp được thực hiện bằng cách lọc.

15. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó tế bào tái tổ hợp là tế bào tái tổ hợp được biến nạp bằng vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào động vật.

16. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó protein tái tổ hợp là protein cấu trúc.

17. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3 đến 16, trong đó protein cấu trúc là protein có nguồn gốc từ protein được chọn từ nhóm bao gồm keratin, collagen, elastin, resilin, tơ tằm, và tơ nhện.

18. Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó thể kết tụ protein tái tổ hợp thu được có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 4 μ m đến 50 μ m như được xác định bằng phương pháp vùng cảm biến điện.

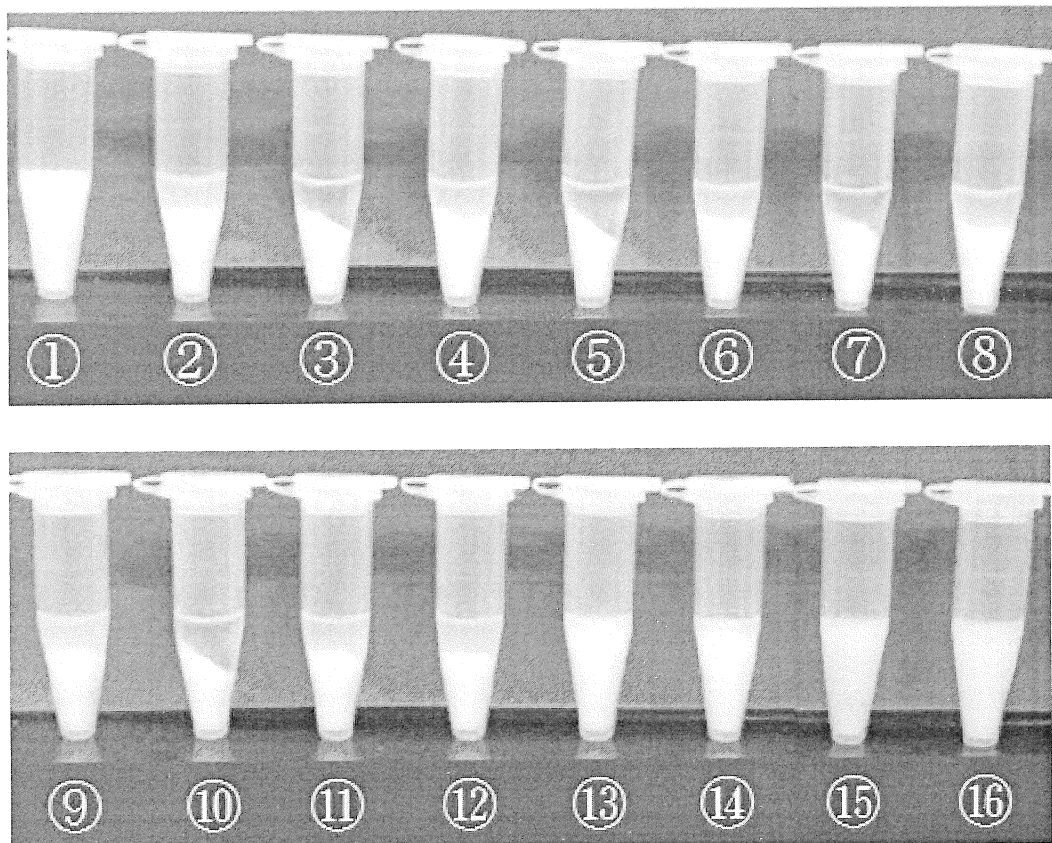
Fig.1

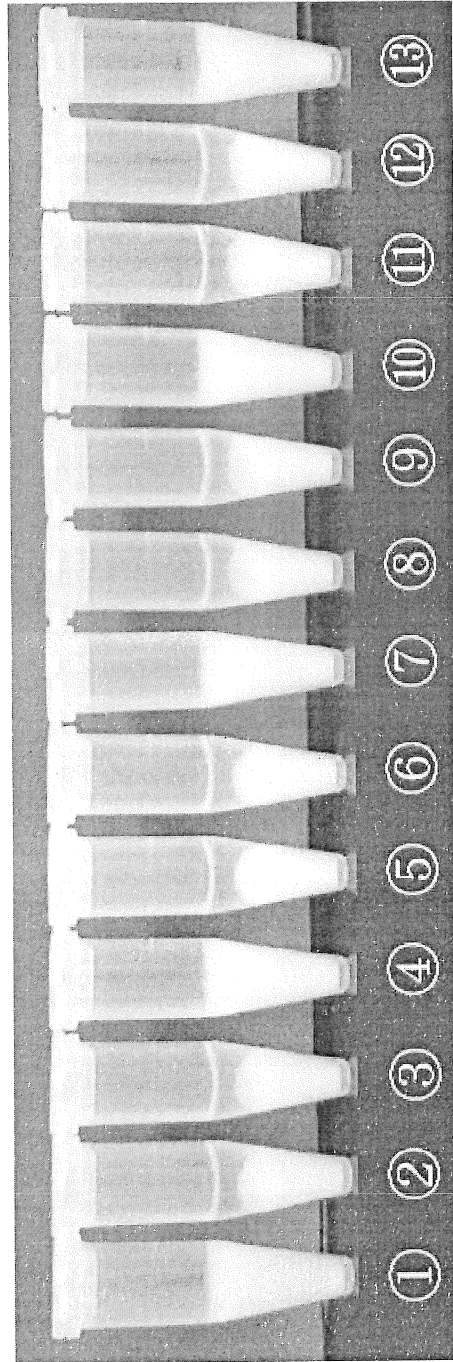
Fig.2

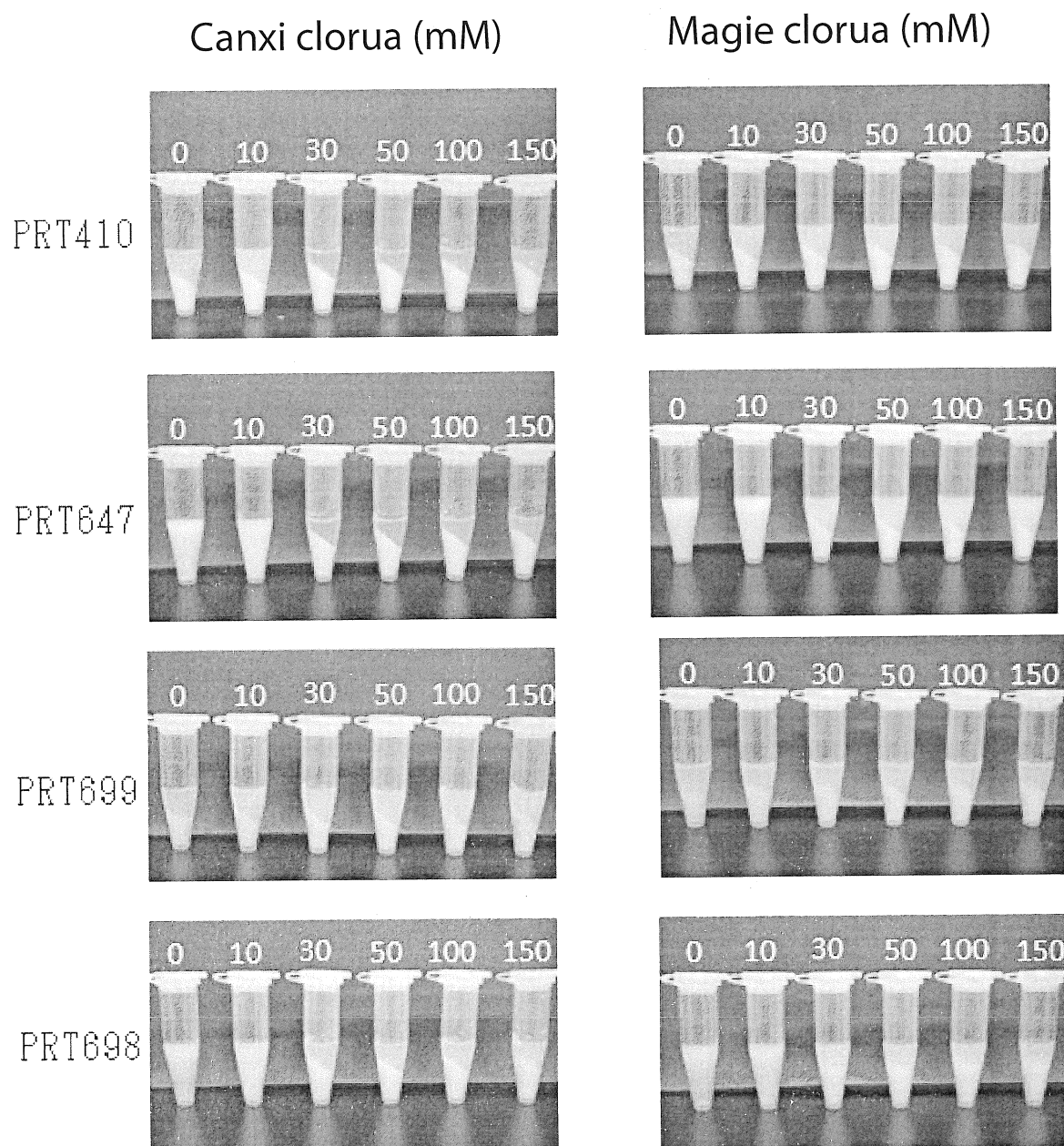
Fig.3

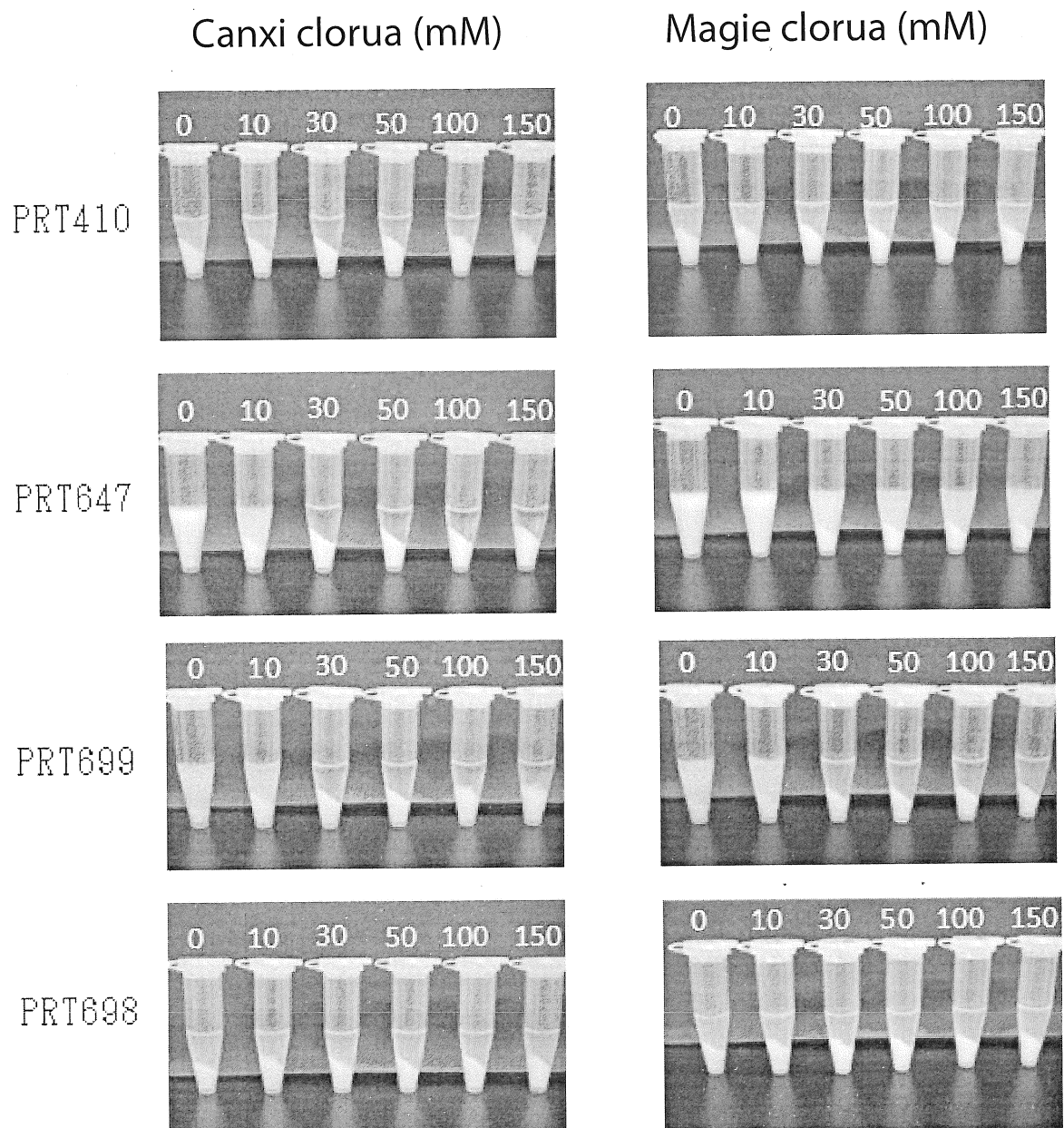
Fig.4

Fig.5

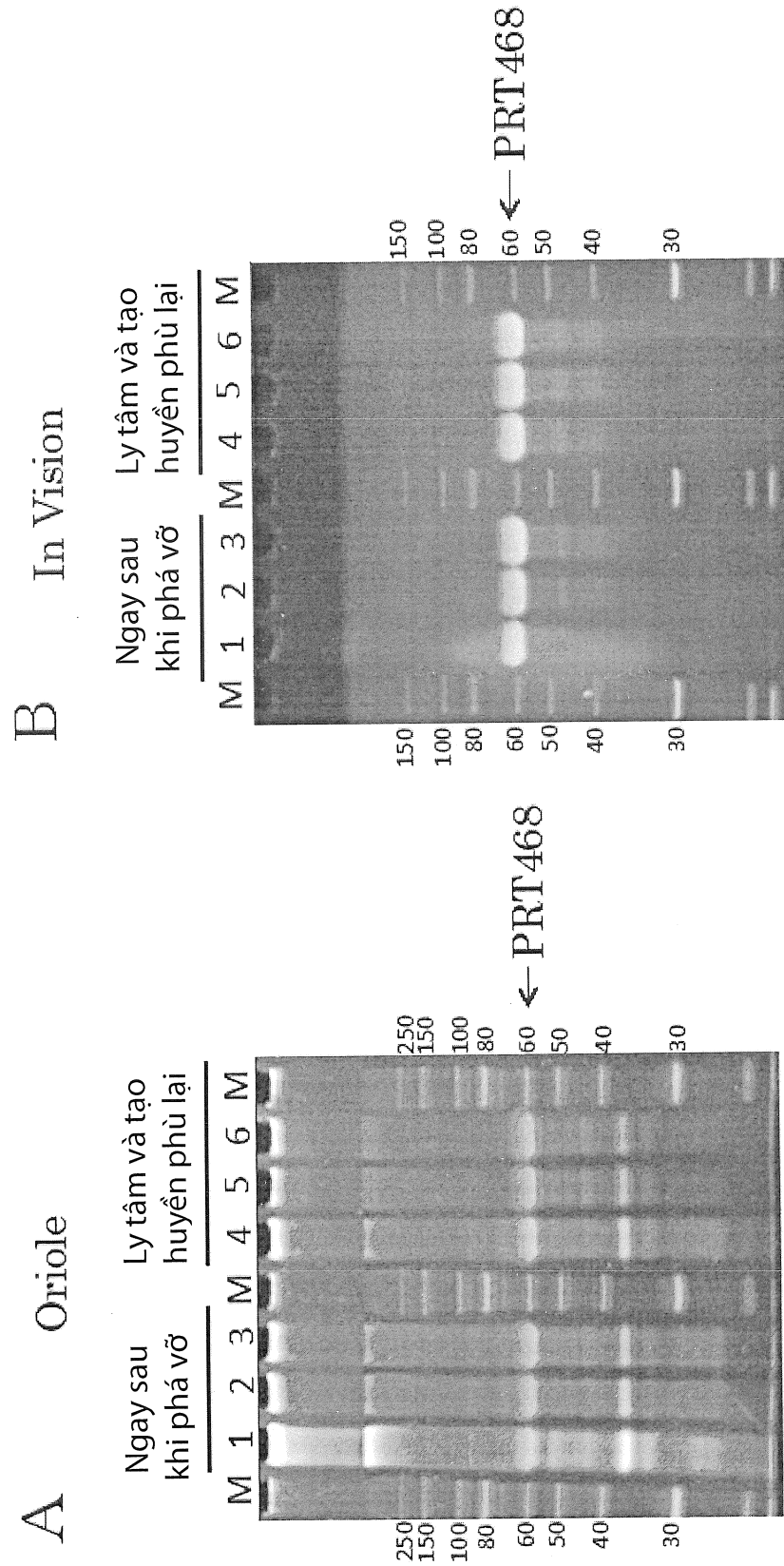


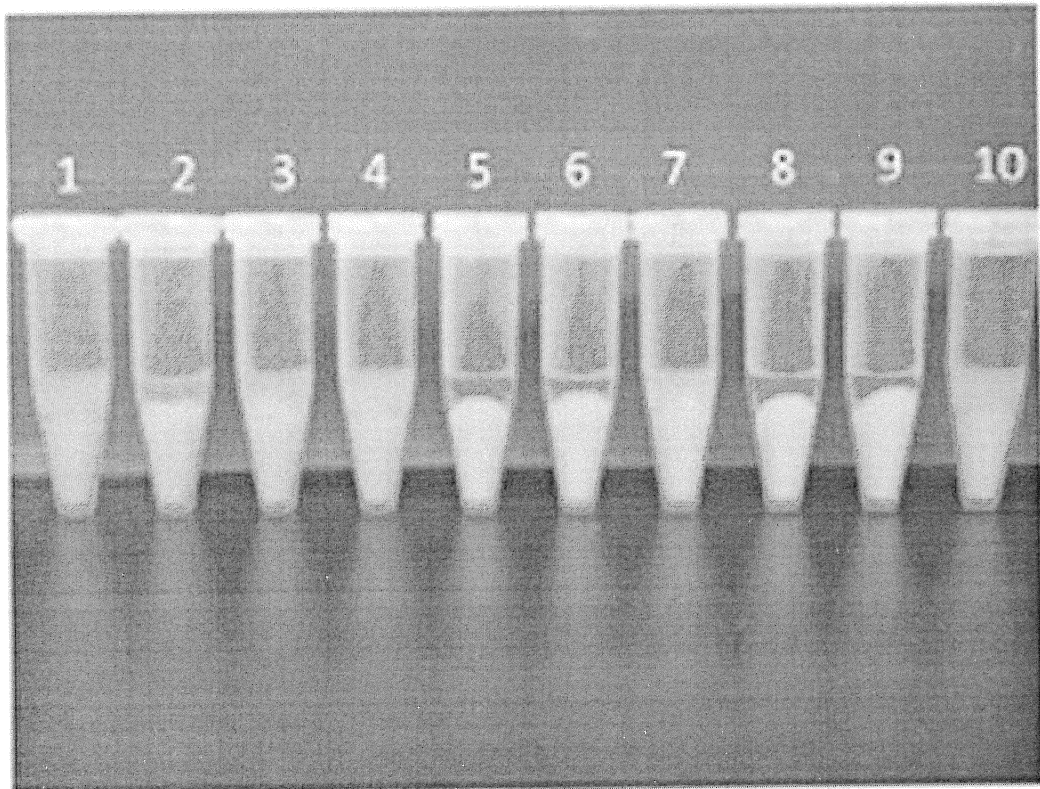
Fig.6

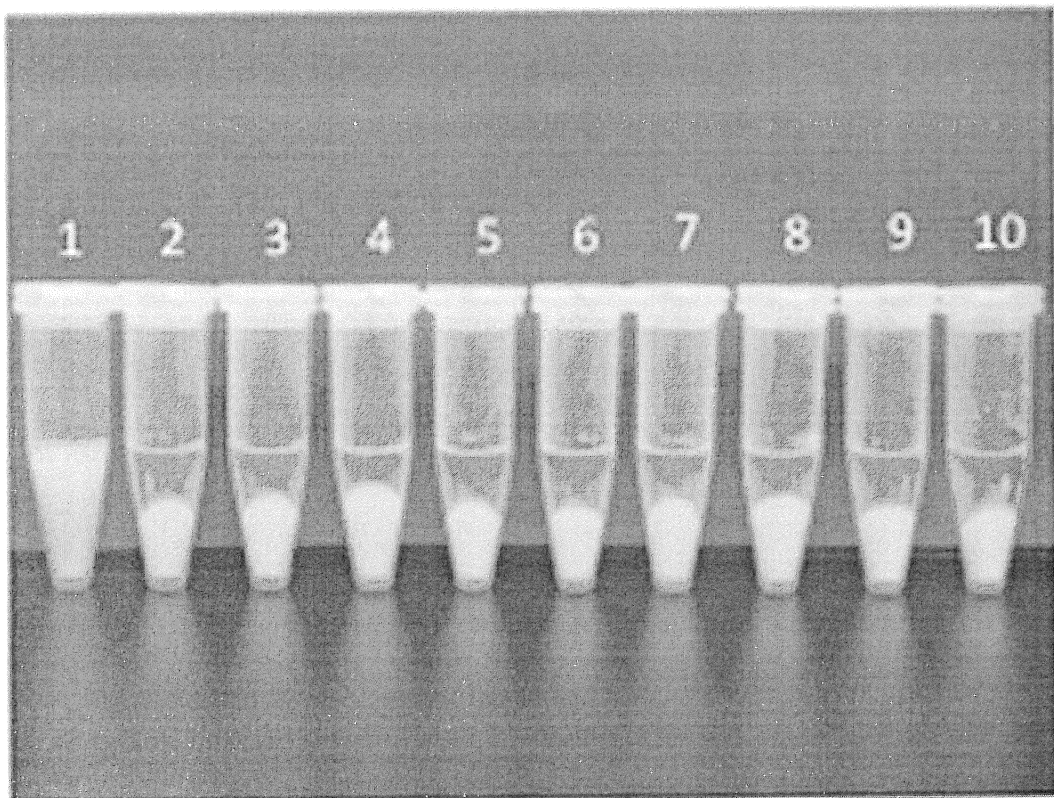
Fig.7

Fig.8

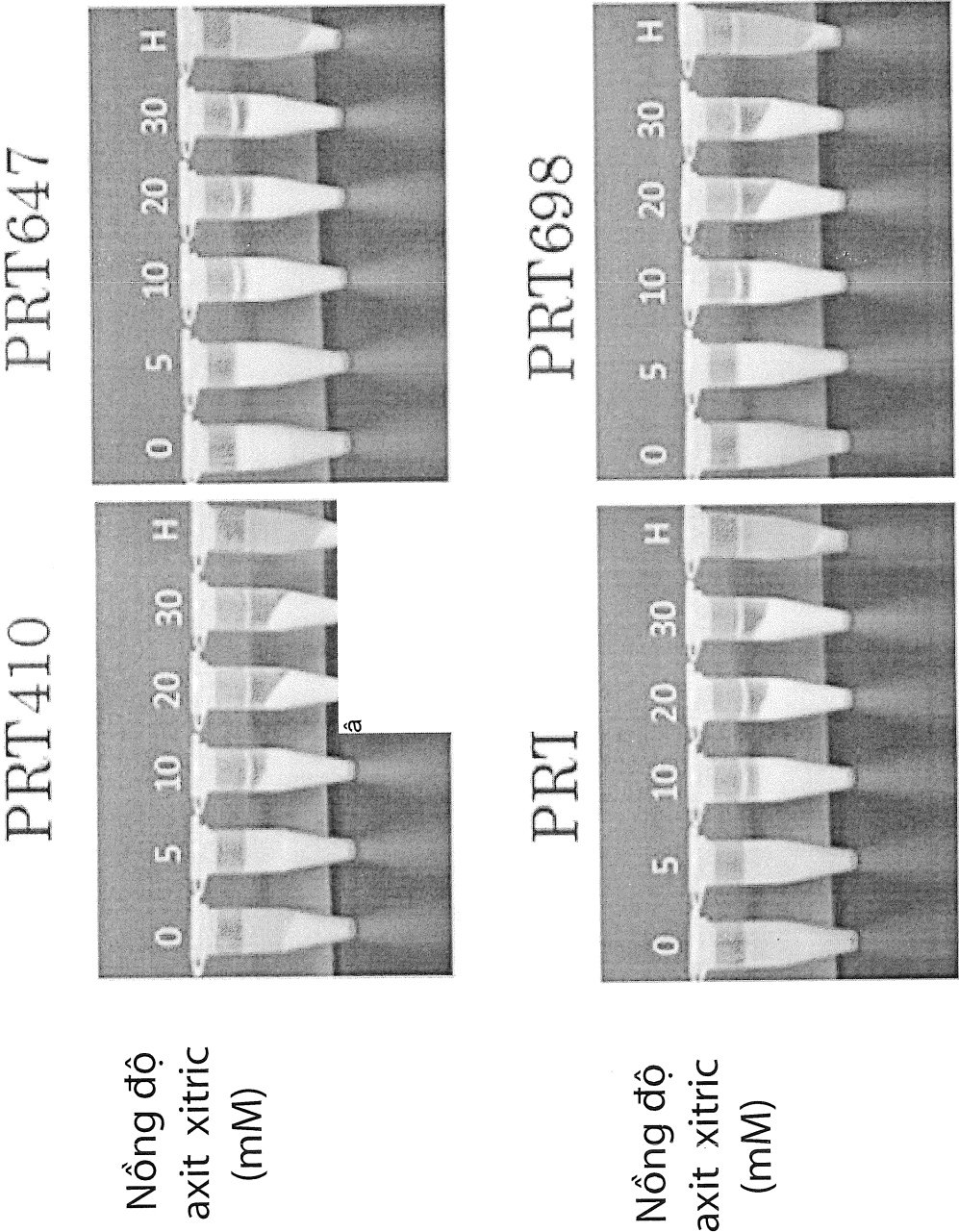


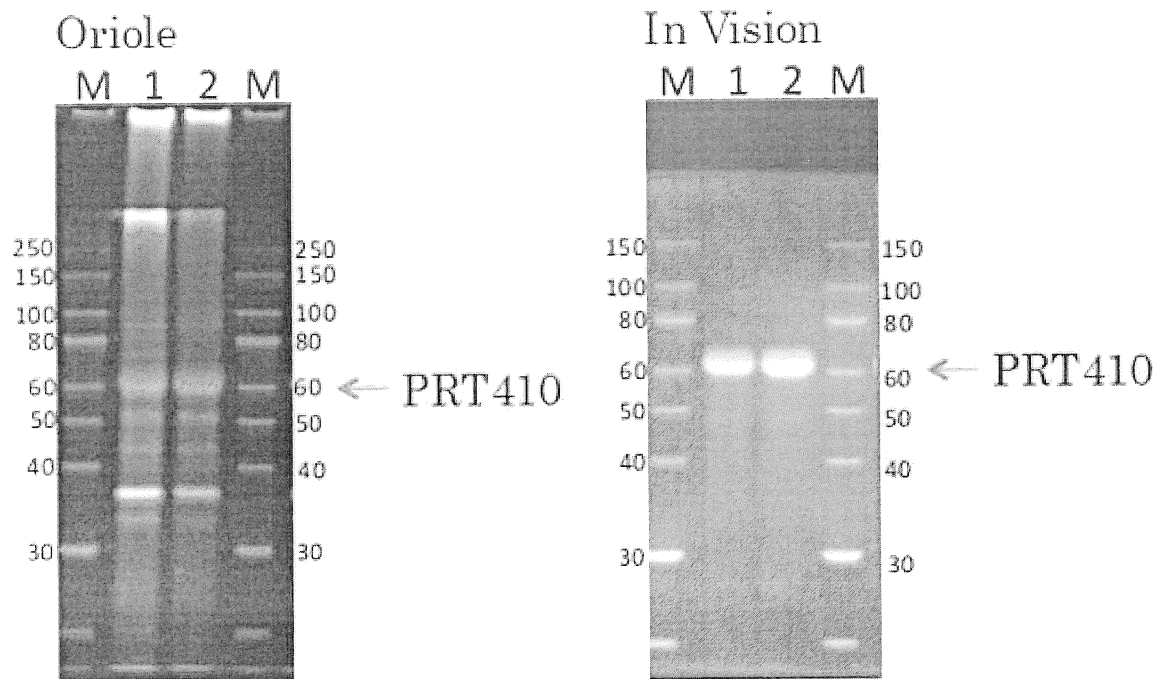
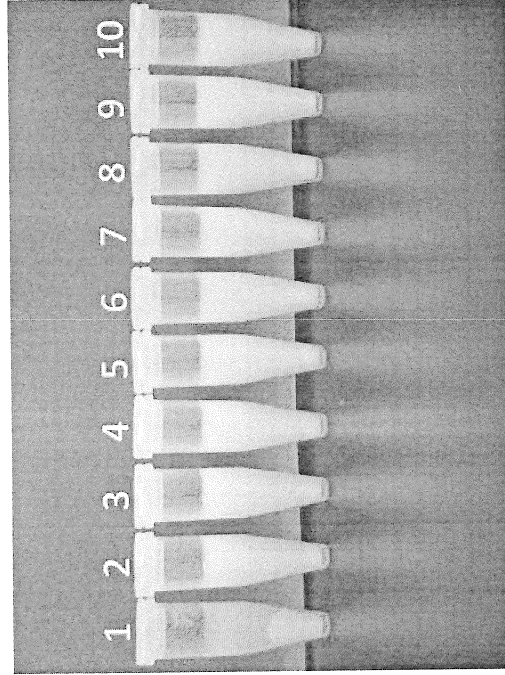
Fig.9

Fig.10

Sau khi ly tâm



Để yên 30 phút

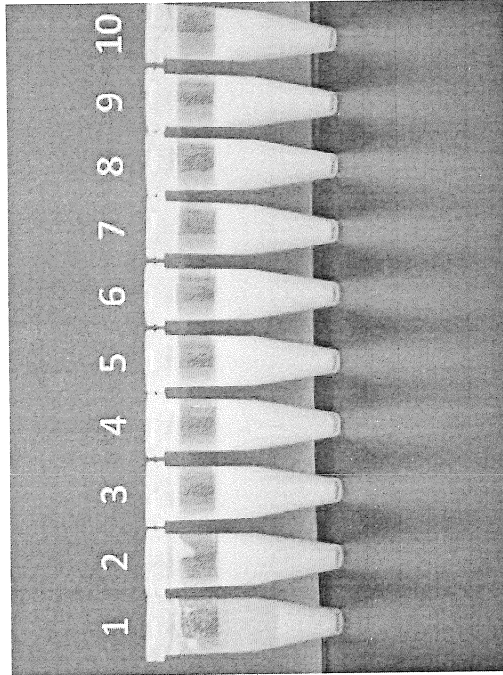


Fig.11

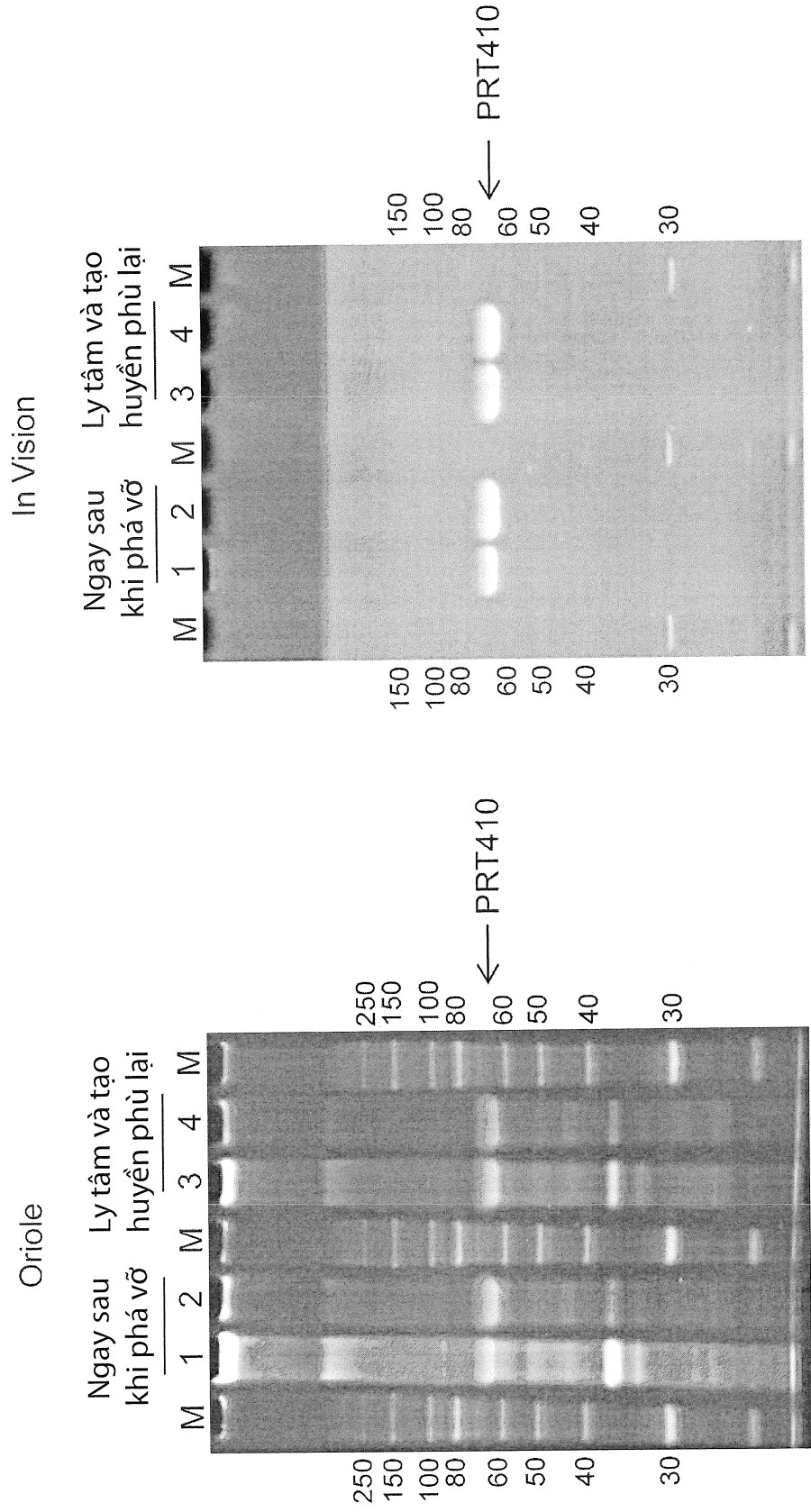


Fig.12

X

1

2

3

4

5

6

7

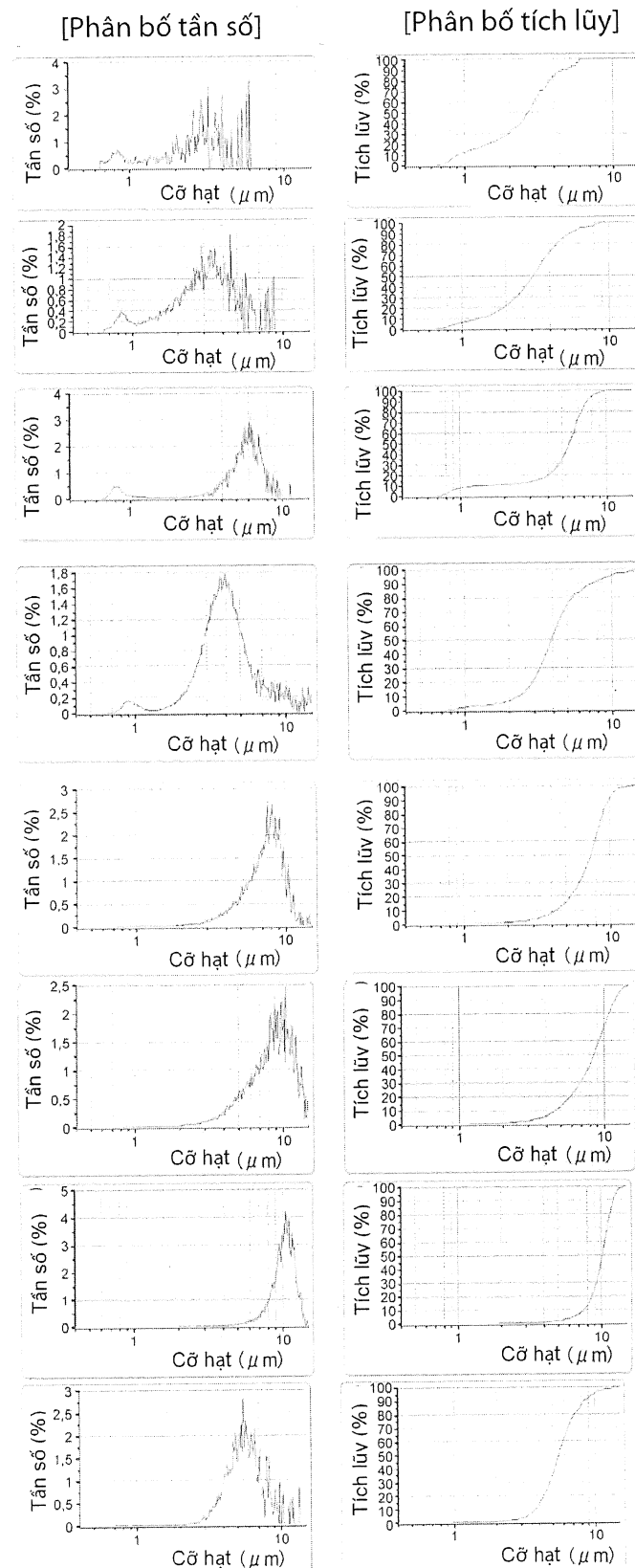


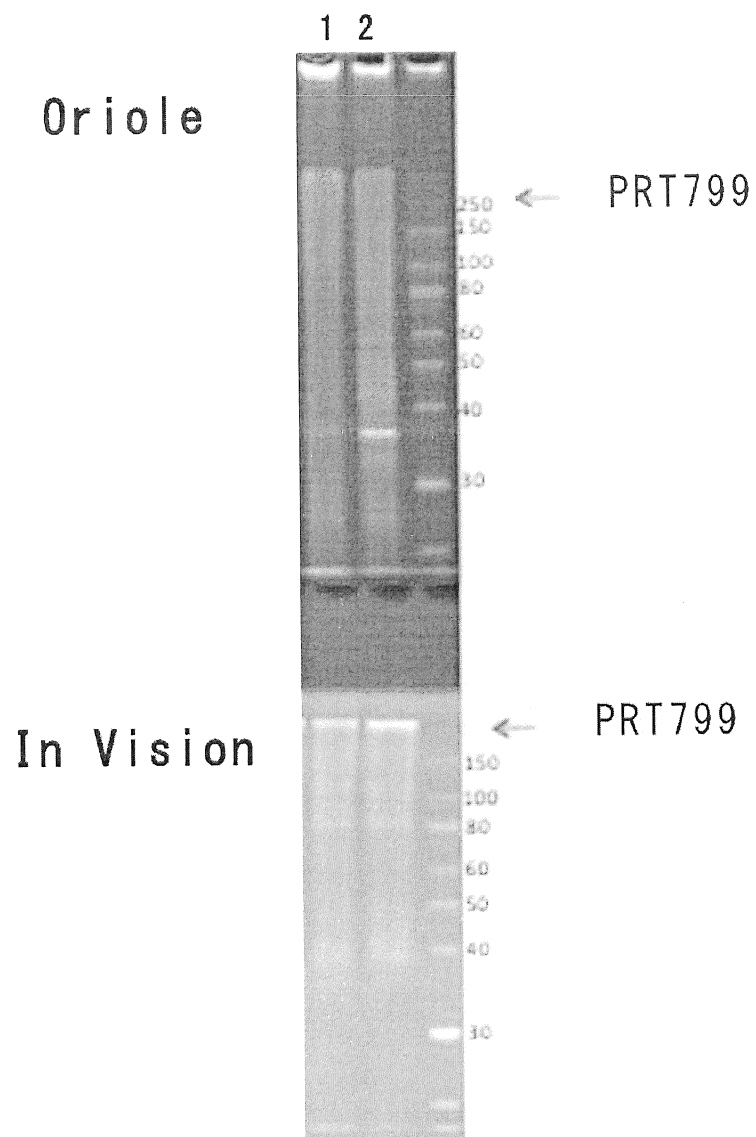
Fig.13

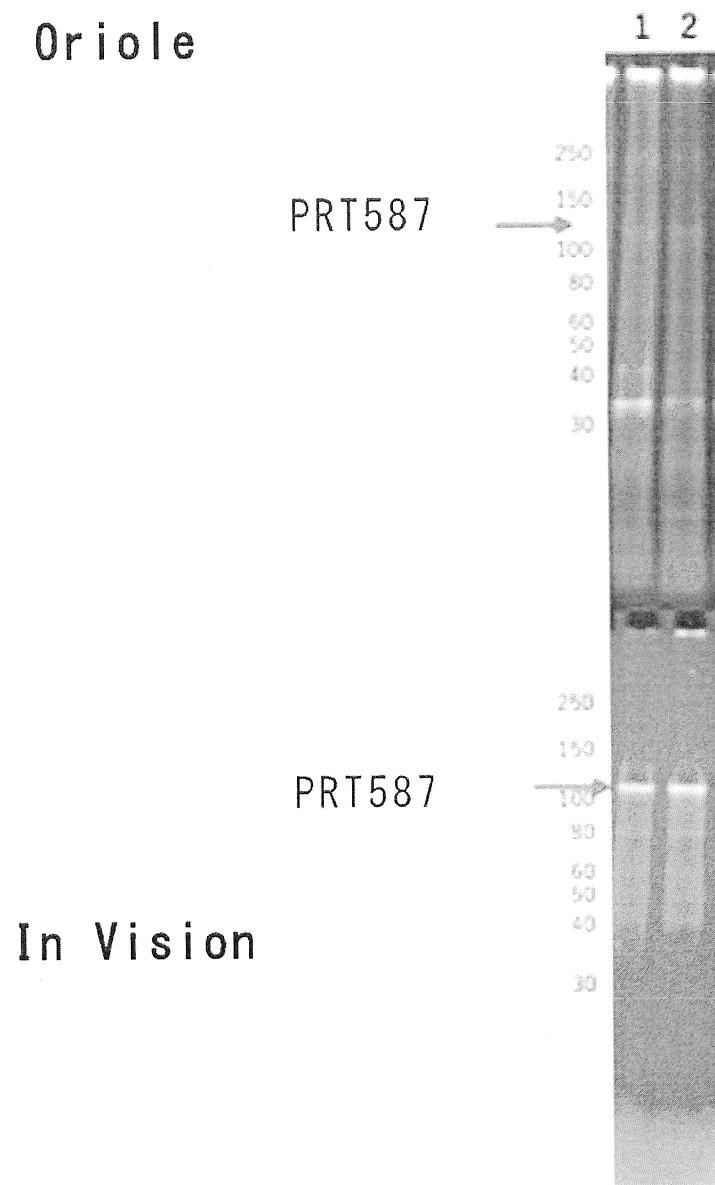
Fig.14

Fig.15

[Phân bố tần số]

[Phân bố tích lũy]

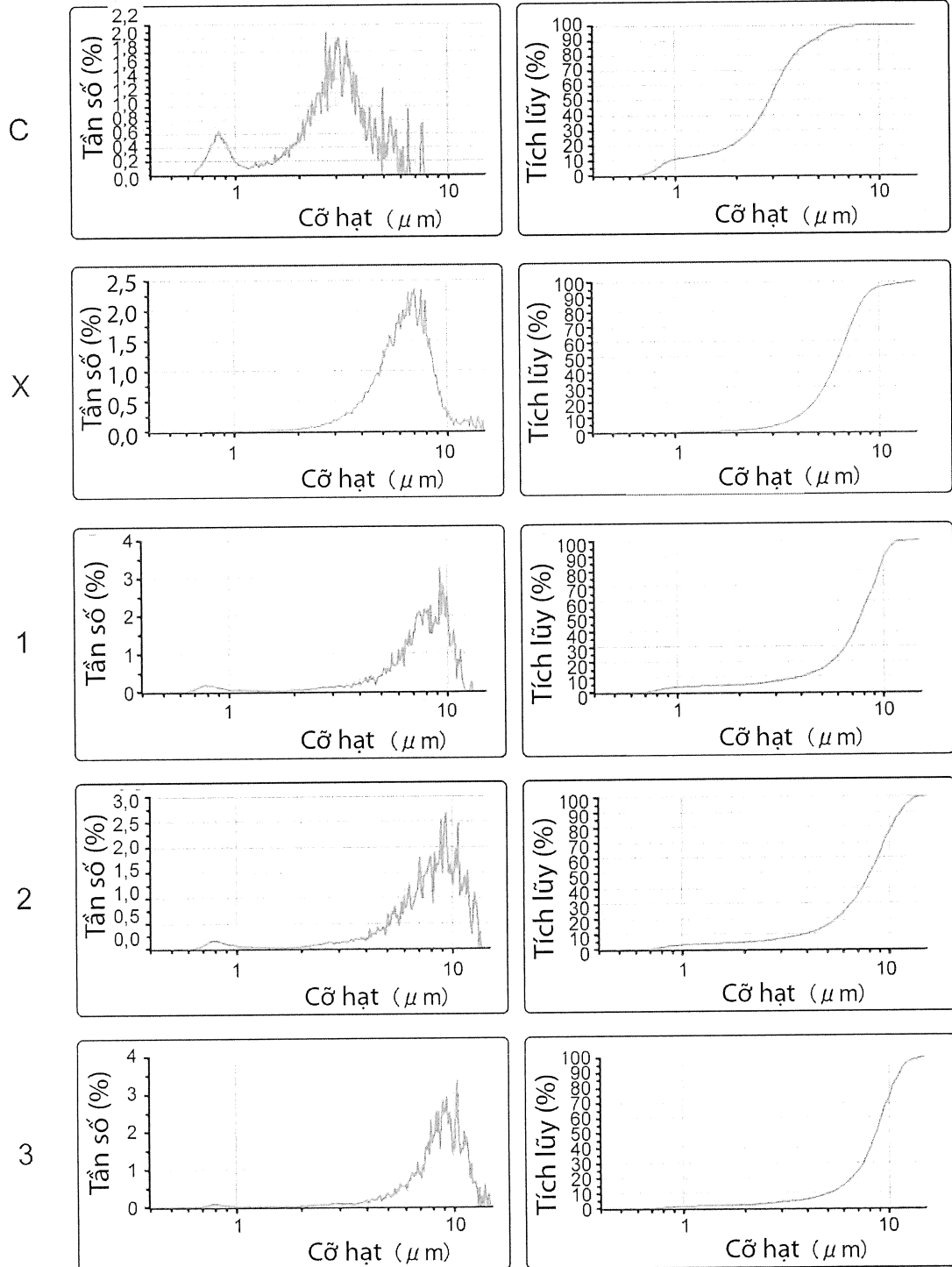
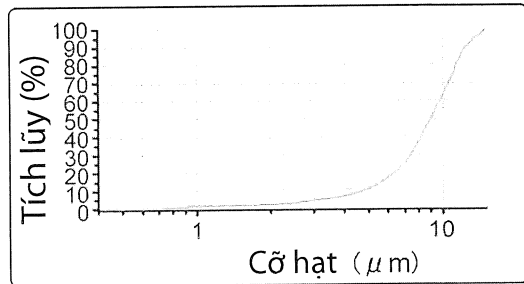
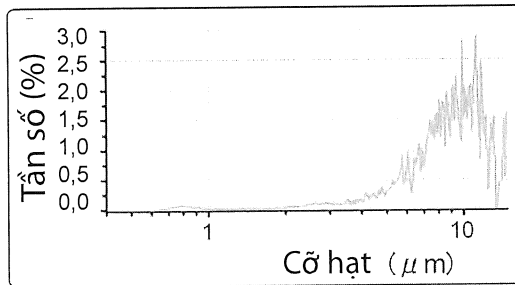


Fig.16

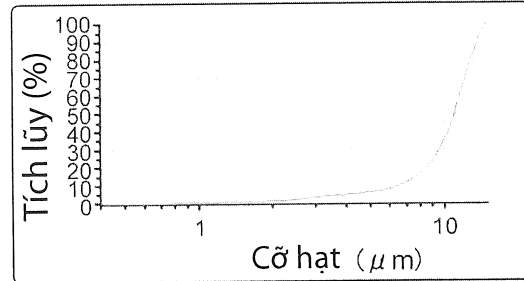
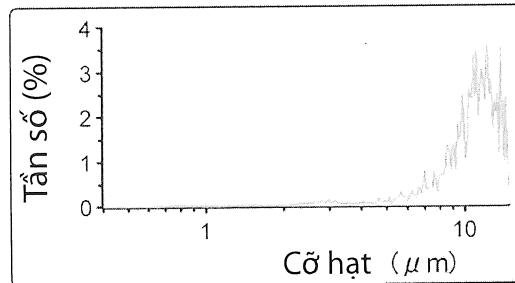
[Phân bố tần số]

[Phân bố tích lũy]

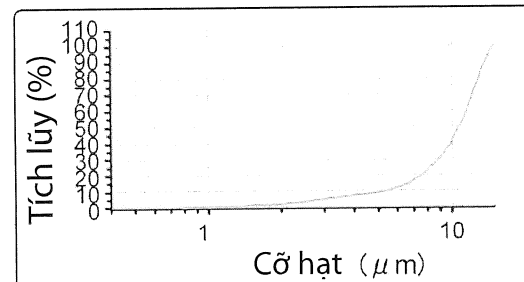
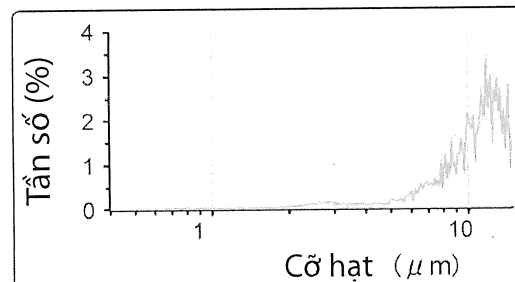
4



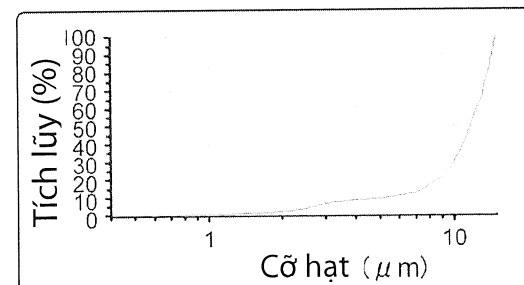
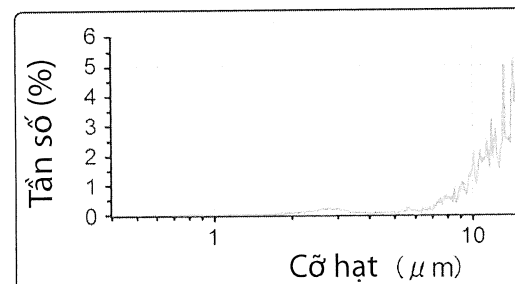
5



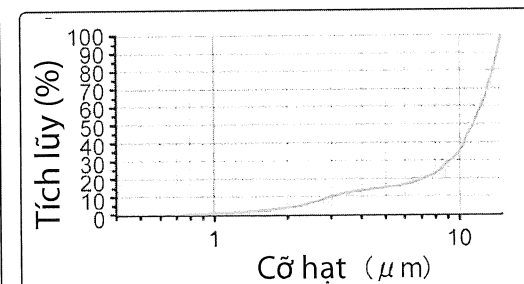
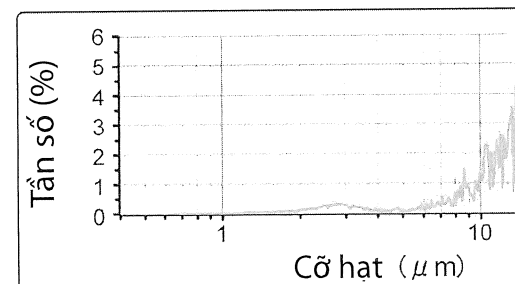
6



7



8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Spiber Inc.
 KOJIMA INDUSTRIES CORPORATION

<120> Phương pháp sản xuất thể kết tụ protein tái tổ hợp

<130> 17-0442-00

<140> PCT/JP2017/029033
 <141> 10-08-2017

<150> JP2016-157912
 <151> 10-08-2016

<150> JP2016-229227
 <151> 25-11-2016

<150> JP2017-048702
 <151> 14-03-2017

<150> JP2017-094144
 <151> 10-05-2017

<160> 12

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PRT410

<400> 1

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
 20 25 30

Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln Tyr
 35 40 45

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly
85 90 95

Pro Gly Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln
100 105 110

Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser
115 120 125

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Gly
130 135 140

Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala
165 170 175

Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro
180 185 190

Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly
195 200 205

Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly
210 215 220

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Gly Pro
225 230 235 240

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
245 250 255

Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
260 265 270

Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln
275 280 285

Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln
290 295 300

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
305 310 315 320

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly
325 330 335

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
340 345 350

Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln
355 360 365

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln
370 375 380

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
385 390 395 400

Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly
405 410 415

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
420 425 430

Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser
435 440 445

Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
450 455 460

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
465 470 475 480

Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly
485 490 495

Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln
500 505 510

Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala
515 520 525

Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
530 535 540

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln
545 550 555 560

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro
565 570 575

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
580 585 590

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser
595 600

<210> 2
<211> 2476
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PRT853

<400> 2

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln
1 5 10 15

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
20 25 30

Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln
35 40 45

Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln
65 70 75 80

Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly
85 90 95

Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 100 105 110

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 115 120 125

Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala
 130 135 140

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 165 170 175

Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly
 180 185 190

Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 195 200 205

Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln
 210 215 220

Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 245 250 255

Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro
 260 265 270

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro
 275 280 285

Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala
 290 295 300

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln
 325 330 335

Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 340 345 350

Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
 355 360 365

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala
 370 375 380

Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 405 410 415

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 420 425 430

Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
 435 440 445

Gly Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly
 450 455 460

Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
 465 470 475 480

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 485 490 495

Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser
 500 505 510

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly
 515 520 525

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala
 530 535 540

Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
 545 550 555 560

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly
 565 570 575

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln
 580 585 590

Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 595 600 605

Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala
 610 615 620

Ala Ala Ala Ala Glu Phe Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
 625 630 635 640

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 645 650 655

Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 660 665 670

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 675 680 685

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala
 690 695 700

Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser Gly
 705 710 715 720

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser
 725 730 735

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln
 740 745 750

Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser
 755 760 765

Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly
 770 775 780

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 785 790 795 800

Ala Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Ala
 805 810 815

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln
 820 825 830

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro
 835 840 845

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 850 855 860

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 865 870 875 880

Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 885 890 895

Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 900 905 910

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
 915 920 925

Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 930 935 940

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 945 950 955 960

Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala
 965 970 975

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 980 985 990

Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln
 995 1000 1005

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro
 1010 1015 1020

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 1025 1030 1035

Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser
 1040 1045 1050

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro
 1055 1060 1065

Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro Gly Ser
 1070 1075 1080

Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 1085 1090 1095

Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 1100 1105 1110

Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser
 1115 1120 1125

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser
 1130 1135 1140

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala
 1145 1150 1155

Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 1160 1165 1170

Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
 1175 1180 1185

Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln
 1190 1195 1200

Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Ala
1205						1210					1215			
Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly
1220						1225					1230			
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly	Gln
1235						1240					1245			
Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
1250						1255					1260			
Gly	Gln	Asn	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser
1265						1270					1275			
Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
1280						1285					1290			
Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gln	Tyr	Gly
1295						1300					1305			
Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
1310						1315					1320			
Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr
1325						1330					1335			
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser
1340						1345					1350			
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln
1355						1360					1365			
Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly
1370						1375					1380			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly
1385						1390					1395			
Pro	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala
1400						1405					1410			

Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Tyr
1415						1420					1425			
Gly	Pro	Tyr	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly
1430						1435					1440			
Ser	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Gly
1445						1450					1455			
Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Ala	Ser	Ala
1460						1465					1470			
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro
1475						1480					1485			
Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Gly
1490						1495					1500			
Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn
1505						1510					1515			
Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly
1520						1525					1530			
Gln	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
1535						1540					1545			
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr
1550						1555					1560			
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser
1565						1570					1575			
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala
1580						1585					1590			
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr
1595						1600					1605			
Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gln
1610						1615					1620			

Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly
1625 1630 1635

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala
1640 1645 1650

Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
1655 1660 1665

Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly
1670 1675 1680

Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro Gly
1685 1690 1695

Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
1700 1705 1710

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
1715 1720 1725

Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
1730 1735 1740

Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly
1745 1750 1755

Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala
1760 1765 1770

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln
1775 1780 1785

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
1790 1795 1800

Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
1805 1810 1815

Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
1820 1825 1830

Ala Ser	Ala Ala Ala Ala	Ala Ala	Ala Gly Pro Gly Ser	Gly Gln Gln
1835		1840		1845
Gly Pro	Gly Ala Ser Ala	Ala Ala	Ala Ala Ala Ala	Ala Lys Leu Gly
1850		1855		1860
Gln Gln	Gly Pro Tyr Gly	Pro Gly	Gly Ala Ser Ala	Ala Ala Ala
1865		1870		1875
Ala Gly	Gln Asn Gly Pro	Gly Ser	Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Gln
1880		1885		1890
Ser Gly	Gln Tyr Gly Pro	Gly Gln	Gln Gly Pro Gly	Gln Gln Gly
1895		1900		1905
Pro Gly	Ser Ser Ala Ala	Ala Ala	Ala Ala Ala Gly	Pro Gly Gln Tyr
1910		1915		1920
Gly Pro	Gly Gln Gln Gly	Pro Ser	Ala Ser Ala Ala	Ala Ala Ala
1925		1930		1935
Ala Gly	Pro Gly Ser Gly	Gln Gln	Gly Pro Gly Ala	Ser Gly Gln
1940		1945		1950
Tyr Gly	Pro Gly Gln Gln	Gly Pro	Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Ser
1955		1960		1965
Ser Ala	Ala Ala Ala Ala	Ala Gly	Gln Tyr Gly Ser	Gly Pro Gly
1970		1975		1980
Gln Gln	Gly Pro Tyr Gly	Ser Ala	Ala Ala Ala Ala	Ala Ala Gly Pro
1985		1990		1995
Gly Ser	Gly Gln Tyr Gly	Gln Gly	Pro Tyr Gly Pro	Gly Ala Ser
2000		2005		2010
Gly Pro	Gly Gln Tyr Gly	Pro Gly	Gln Gln Gly Pro	Ser Ala Ser
2015		2020		2025
Ala Ala	Ala Ala Ala Ala	Gly Ser	Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Gln
2030		2035		2040

Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
 2045 2050 2055

Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser
 2060 2065 2070

Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser
 2075 2080 2085

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
 2090 2095 2100

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr
 2105 2110 2115

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln
 2120 2125 2130

Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 2135 2140 2145

Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 2150 2155 2160

Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
 2165 2170 2175

Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser
 2180 2185 2190

Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala
 2195 2200 2205

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 2210 2215 2220

Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
 2225 2230 2235

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
 2240 2245 2250

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 2255 2260 2265

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 2270 2275 2280

Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser
 2285 2290 2295

Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro
 2300 2305 2310

Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
 2315 2320 2325

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 2330 2335 2340

Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 2345 2350 2355

Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro
 2360 2365 2370

Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser
 2375 2380 2385

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln
 2390 2395 2400

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 2405 2410 2415

Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 2420 2425 2430

Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 2435 2440 2445

Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 2450 2455 2460

Gln Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 2465 2470 2475

<210> 3
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PRT647

<400> 3

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Thr Thr Met Asn
 1 5 10 15

Trp Ser Thr Arg Leu Val Leu Ser Ile Leu Val Val Leu Cys Thr Gln
 20 25 30

Ser Leu Cys Ala Leu Gly Gln Ala Asn Thr Pro Trp Ser Ser Lys Glu
 35 40 45

Asn Ala Asp Ala Phe Ile Gly Ala Phe Met Asn Ala Ala Ser Gln Ser
 50 55 60

Gly Ala Phe Ser Ser Asp Gln Ile Asp Asp Met Ser Val Ile Ser Asn
 65 70 75 80

Thr Leu Met Ala Ala Met Asp Asn Met Gly Gly Arg Ile Thr Gln Ser
 85 90 95

Lys Leu Gln Ala Leu Asp Met Ala Phe Ala Ser Ser Val Ala Glu Ile
 100 105 110

Ala Val Ala Asp Gly Gln Asn Val Gly Ala Ala Thr Asn Ala Ile Ser
 115 120 125

Asp Ala Leu Arg Ser Ala Phe Tyr Gln Thr Thr Gly Val Val Asn Asn
 130 135 140

Gln Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ser Leu Ile Gly Met Phe Ala Gln Val
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Glu Val Ser Tyr Ser Ser Ala Gly Ser Ser Ser Ala Ala
 165 170 175

Ala Ser Glu Ala Val Ser Ala Gly Gln Gly Pro Ala Ala Gln Pro Val
 180 185 190

Tyr Ala Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Ala Ala
 195 200 205

Pro Ala Ile Gln Gln Ala Tyr Glu Arg Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ala
 210 215 220

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Ser Gly Tyr Gly Gln Gly Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ser
 245 250 255

Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Pro Ala Ala Tyr Gly Pro Ser Gly
 260 265 270

Pro Ser Gly Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Ala Ala Ala
 275 280 285

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Ser Gly Tyr Gly Pro Gly
 290 295 300

Ala Gly Gly Pro Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 305 310 315 320

Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Gln Ala Ser Tyr Gly
 325 330 335

Pro Ser Gly Pro Ser Gly Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly
 340 345 350

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Phe Gly Gly
 355 360 365

Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 370 375 380

Ala Gly Gly Ala Gly Pro Gly Arg Gln Gln Ala Tyr Gly Pro Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Ser
 405 410 415

Gly Tyr Gly Pro Ser Ala Ala Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly
 420 425 430

Ala Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Phe Gly Gln Gly Pro Ala Gly
 435 440 445

Tyr Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gly Ala
 450 455 460

Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Gly
 465 470 475 480

Pro Ser Gln Tyr Val Pro Ser Ser Val Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ala
 485 490 495

Ala Ser Ala Leu Ser Ser Pro Thr Thr His Ala Arg Ile Ser Ser His
 500 505 510

Ala Ser Thr Leu Leu Ser Ser Gly Pro Thr Asn Ala Ala Ala Leu Ser
 515 520 525

Asn Val Ile Ser Asn Ala Val Ser Gln Val Ser Ala Ser Asn Pro Gly
 530 535 540

Ser Ser Ser Cys Asp Val Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Ile Ile Thr
 545 550 555 560

Ala Leu Ile Ser Ile Leu Asp Ser Ser Ser Val Gly Gln Val Asn Tyr
 565 570 575

Gly Ser Ser Gly Gln Tyr Ala Gln Ile Val Gly Gln Ser Met Gln Gln
 580 585 590

Ala Met Gly
 595

<210> 4
 <211> 576

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PRT699

<400> 4

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Val
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30

Gly Ser Asn Gly Pro Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Gln Ser Gly
 35 40 45

Gln Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Ser
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 65 70 75 80

Val Leu Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 85 90 95

Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 100 105 110

Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr
 130 135 140

Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly
 165 170 175

Pro Gly Val Leu Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 180 185 190

Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala
 195 200 205

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Val Leu
 210 215 220

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly
 225 230 235 240

Val Leu Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 245 250 255

Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 260 265 270

Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly
 275 280 285

Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro
 290 295 300

Gly Val Leu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 305 310 315 320

Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 325 330 335

Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Gln Tyr
 340 345 350

Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 355 360 365

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val
 370 375 380

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 405 410 415

Ala Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 420 425 430

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Val Leu
 435 440 445

Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly
 450 455 460

Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Val Leu Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 485 490 495

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro
 500 505 510

Tyr Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
 515 520 525

Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser
 530 535 540

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala
 545 550 555 560

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ala Ser
 565 570 575

<210> 5
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PRT698

<400> 5

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Val
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30

Gly Ser Asn Gly Pro Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ile Ser Gly
 35 40 45

Ile Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Ser
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ile Tyr Gly Pro Gly
 65 70 75 80

Val Leu Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 85 90 95

Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ala Ser Gly Ile Tyr Gly Pro Gly
 100 105 110

Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr
 130 135 140

Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ile Tyr
 145 150 155 160

Gly Ile Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Ile Tyr Gly
 165 170 175

Pro Gly Val Leu Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 180 185 190

Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ile Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala
 195 200 205

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Val Leu
 210 215 220

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ile Ser Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly
 225 230 235 240

Val Leu Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 245 250 255

Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 260 265 270

Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly
 275 280 285

Pro Gly Ala Ser Gly Ile Asn Gly Pro Gly Ser Gly Ile Tyr Gly Pro
 290 295 300

Gly Val Leu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 305 310 315 320

Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 325 330 335

Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Ile Tyr
 340 345 350

Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 355 360 365

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val
 370 375 380

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Val Leu Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 405 410 415

Ala Ser Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 420 425 430

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ile Tyr Gly Pro Gly Val Leu
 435 440 445

Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly
 450 455 460

Ser Gly Pro Gly Ile Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ile Ser Gly Pro
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Val Leu Gly Ile Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
485 490 495

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro
500 505 510

Tyr Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
515 520 525

Ser Gly Ile Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Ile Asn Gly Pro Gly Ser
530 535 540

Gly Ile Tyr Gly Pro Gly Val Leu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala
545 550 555 560

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Val Leu Gly Pro Gly Ala Ser
565 570 575

```
<210> 6
<211> 252
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<223> Collagen-typ4-Kai
```

$\langle 400 \rangle$ 6

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Lys Asp Gly Val
1 5 10 15

Pro Gly Phe Pro Gly Ser Glu Gly Val Lys Gly Asn Arg Gly Phe Pro
20 25 30

Gly Leu Met Gly Glu Asp Gly Ile Lys Gly Gln Lys Gly Asp Ile Gly
35 40 45

Pro Pro Gly Phe Arg Gly Pro Thr Glu Tyr Tyr Asp Thr Tyr Gln Glu
50 55 60

Lys Gly Asp Glu Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Ala Arg
65 70 75 80

Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Val Pro Gly Ser Pro Gly
85 90 95

Ser Ser Arg Pro Gly Leu Arg Gly Ala Pro Gly Trp Pro Gly Leu Lys
100 105 110

Gly Ser Lys Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Lys Asp Ala Met Gly Thr
115 120 125

Pro Gly Ser Pro Gly Cys Ala Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gly Ser Pro
130 135 140

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Asp Ile Val Phe Arg Lys Gly Pro Pro
145 150 155 160

Gly Asp His Gly Leu Pro Gly Tyr Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly
165 170 175

Val Asp Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Leu Leu Cys Thr Gln Cys Pro
180 185 190

Tyr Ile Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Leu His Gly
195 200 205

Val Lys Gly Ile Pro Gly Arg Gln Gly Ala Ala Gly Leu Lys Gly Ser
210 215 220

Pro Gly Ser Pro Gly Asn Thr Gly Leu Pro Gly Phe Pro Gly Phe Pro
225 230 235 240

Gly Ala Gln Gly Asp Pro Gly Leu Lys Gly Glu Lys
245 250

<210> 7
<211> 315
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Resilin-Kai

<400> 7

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Pro Glu Pro Pro
1 5 10 15

Val Asn Ser Tyr Leu Pro Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gln
 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Gly Arg Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gly
 35 40 45

Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Gly
 50 55 60

Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Ala Gly Lys Pro Ser Asp
 65 70 75 80

Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asp Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser
 85 90 95

Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp
 100 105 110

Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser Asp Thr
 115 120 125

Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Asn Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser
 130 135 140

Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Gly Gln Gly Asn Gly Asn Gly Gly
 145 150 155 160

Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg
 165 170 175

Pro Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro
 180 185 190

Ser Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Asn Gly Gly Arg Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Gly Arg Pro Ser
 210 215 220

Asp Thr Tyr Gly Ala Pro Gly Gly Gly Asn Gly Asn Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Gly Gln Gly Gly Phe
245 250 255

Gly Gly Arg Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Asn Gln Lys
260 265 270

Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Ser Gly Asn Gly Asn Gly Gly
275 280 285

Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Pro Gly Ser Gly Pro Gly Gly Arg
290 295 300

Pro Ser Asp Ser Tyr Gly Pro Pro Ala Ser Gly
305 310 315

<210> 8
<211> 282
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> elastin ngắn

<400> 8

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Gly Val Ser
1 5 10 15

Ala Gly Ala Val Val Pro Gln Pro Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys
20 25 30

Val Pro Gly Val Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro Gly Gly Val Leu Pro
35 40 45

Gly Ala Arg Phe Pro Gly Val Gly Val Leu Pro Gly Val Pro Thr Gly
50 55 60

Ala Gly Val Lys Pro Lys Ala Pro Gly Val Gly Gly Ala Phe Ala Gly
65 70 75 80

Ile Pro Gly Val Gly Pro Phe Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Leu
85 90 95

Gly Tyr Pro Ile Lys Ala Pro Lys Leu Pro Gly Gly Tyr Gly Leu Pro
 100 105 110

Tyr Thr Thr Gly Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Val Ala
 115 120 125

Gly Ala Ala Gly Lys Ala Gly Tyr Pro Thr Gly Thr Gly Val Gly Pro
 130 135 140

Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Phe Gly Ala
 145 150 155 160

Gly Ala Ala Gly Val Leu Pro Gly Val Gly Gly Ala Gly Val Pro Gly
 165 170 175

Val Pro Gly Ala Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ile Ala Gly Val Gly Thr
 180 185 190

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr
 195 200 205

Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Gly Pro Gly Phe Gly Pro Gly
 210 215 220

Val Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 225 230 235 240

Ala Gly Ile Pro Val Val Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Ala Ala Val
 245 250 255

Pro Gly Val Val Ser Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala
 260 265 270

Ala Lys Tyr Gly Ala Arg Pro Gly Val Gly
 275 280

<210> 9
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> keratin 26 typ I

<400> 9

Met Ser Phe Arg Leu Ser Gly Val Ser Arg Arg Leu Cys Ser Gln Ala
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Arg Leu Thr Gly Gly Arg Thr Gly Phe Arg Ala Gly Asn
 20 25 30

Val Cys Ser Gly Leu Gly Ala Gly Ser Ser Phe Ser Gly Pro Leu Gly
 35 40 45

Ser Val Ser Ser Lys Gly Ser Phe Ser His Gly Gly Gly Gly Leu Gly
 50 55 60

Ser Gly Val Cys Thr Gly Phe Leu Glu Asn Glu His Gly Leu Leu Pro
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Lys Val Thr Leu Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu Ala Ser
 85 90 95

Tyr Leu Asp His Val Cys Thr Leu Glu Glu Ala Asn Ala Asp Leu Glu
 100 105 110

Gln Lys Ile Lys Gly Trp Tyr Glu Lys Tyr Gly Pro Gly Ser Gly Arg
 115 120 125

Gln Leu Ala His Asp Tyr Ser Lys Tyr Phe Ser Val Thr Glu Asp Leu
 130 135 140

Lys Arg Gln Ile Ile Ser Val Thr Thr Cys Asn Ala Ser Ile Val Leu
 145 150 155 160

Gln Asn Glu Asn Ala Arg Leu Thr Ala Asp Asp Phe Arg Leu Lys Cys
 165 170 175

Glu Asn Glu Leu Ala Leu His Gln Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly
 180 185 190

Leu His Arg Val Met Asp Glu Leu Thr Leu Cys Thr Ser Asp Leu Glu
 195 200 205

Met Gln Cys Glu Ala Leu Ser Glu Glu Leu Thr Tyr Leu Lys Lys Asn
 210 215 220

His Gln Glu Glu Met Lys Val Met Gln Gly Ala Ala Arg Gly Asn Val
 225 230 235 240

Asn Val Glu Ile Asn Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Thr Val Leu Leu
 245 250 255

Asn Asn Met Arg Ala Glu Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Gln Asn His Glu
 260 265 270

Asp Ala Glu Ala Trp Phe Ser Glu Lys Ser Thr Ser Leu His Gln Gln
 275 280 285

Ile Ser Asp Asp Ala Gly Ala Ala Met Ala Ala Arg Asn Glu Leu Met
 290 295 300

Glu Leu Lys Arg Asn Leu Gln Thr Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Leu
 305 310 315 320

Leu Ala Met Lys His Ser Tyr Glu Cys Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ser
 325 330 335

Asn Tyr Cys His Gln Leu Gln Gln Ile Gln Glu Gln Ile Gly Ala Met
 340 345 350

Glu Asp Gln Leu Gln Gln Ile Arg Met Glu Thr Glu Gly Gln Lys Leu
 355 360 365

Glu His Glu Arg Leu Leu Asp Val Lys Ile Phe Leu Glu Lys Glu Ile
 370 375 380

Glu Met Tyr Cys Lys Leu Ile Asp Gly Glu Gly Arg Lys Ser Lys Ser
 385 390 395 400

Thr Cys Tyr Lys Ser Glu Gly Arg Gly Pro Lys Asn Ser Glu Asn Gln
 405 410 415

Val Lys Asp Ser Lys Glu Glu Ala Val Val Lys Thr Val Val Gly Glu
 420 425 430

Leu Asp Gln Leu Gly Ser Val Leu Ser Leu Arg Val His Ser Val Glu
 435 440 445

Glu Lys Ser Ser Lys Ile Ser Asn Ile Thr Met Glu Gln Arg Leu Pro
 450 455 460

Ser Lys Val Pro
 465

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

<220>
 <223> thể His

<400> 10

Met Glu Thr His Ile Ser His Ile Ser His Ile Ser His Ile Ser His
 1 5 10 15

Ile Ser His Ile Ser Ser Glu Arg Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ser Glu
 20 25 30

Arg Ser Glu Arg
 35

<210> 11
 <211> 2375
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PRT799

<400> 11

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
 20 25 30

Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln Tyr
 35 40 45

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
65 70 75 80

Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly
85 90 95

Pro Gly Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln
100 105 110

Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser
115 120 125

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
130 135 140

Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala
165 170 175

Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro
180 185 190

Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly
195 200 205

Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly
210 215 220

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
225 230 235 240

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
245 250 255

Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
260 265 270

Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln
275 280 285

Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln
 290 295 300

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr
 305 310 315 320

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly
 325 330 335

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala
 340 345 350

Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln
 355 360 365

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln
 370 375 380

Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly
 405 410 415

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
 420 425 430

Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser
 435 440 445

Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
 450 455 460

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
 465 470 475 480

Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly
 485 490 495

Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 500 505 510

Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 515 520 525

Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
 530 535 540

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln
 545 550 555 560

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro
 565 570 575

Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
 580 585 590

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
 595 600 605

Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser
 610 615 620

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln
 625 630 635 640

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 645 650 655

Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala
 660 665 670

Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser Gly
 675 680 685

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser
 690 695 700

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln
 705 710 715 720

Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln
 725 730 735

Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Tyr
740 745 750

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
755 760 765

Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala
770 775 780

Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
785 790 795 800

Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly
805 810 815

Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
820 825 830

Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr
835 840 845

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn
850 855 860

Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln
865 870 875 880

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
885 890 895

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln
900 905 910

Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly
915 920 925

Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly
930 935 940

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala
945 950 955 960

Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 965 970 975

Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
 980 985 990

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
 995 1000 1005

Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly
 1010 1015 1020

Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro Gly
 1025 1030 1035

Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala
 1040 1045 1050

Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 1055 1060 1065

Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly
 1070 1075 1080

Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly
 1085 1090 1095

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala
 1100 1105 1110

Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 1115 1120 1125

Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser
 1130 1135 1140

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser
 1145 1150 1155

Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala
 1160 1165 1170

Ala Ala	Ala Gly	Pro Gly	Ser	Gly Gln	Gln Gly	Pro	Gly Ala	Ser
1175			1180				1185	
Gly Gln	Gln Gly	Pro Tyr	Gly	Pro Gly	Ala Ser	Ala	Ala Ala	Ala
1190			1195				1200	
Ala Gly	Gln Asn	Gly Pro	Gly	Ser Gly	Gln Gln	Gly	Pro Gly	Gln
1205			1210				1215	
Ser Gly	Gln Tyr	Gly Pro	Gly	Gln Gln	Gly Pro	Gly	Gln Gln	Gly
1220			1225				1230	
Pro Gly	Ser Ser	Ala Ala	Ala	Ala Ala	Gly Pro	Gly	Gln Tyr	Gly
1235			1240				1245	
Pro Gly	Gln Gln	Gly Pro	Ser	Ala Ser	Ala Ala	Ala	Ala Ala	Gly
1250			1255				1260	
Pro Gly	Ser Gly	Gln Gln	Gly	Pro Gly	Ala Ser	Gly	Gln Tyr	Gly
1265			1270				1275	
Pro Gly	Gln Gln	Gly Pro	Gly	Gln Gln	Gly Pro	Gly	Ser Ser	Ala
1280			1285				1290	
Ala Ala	Ala Ala	Gly Gln	Tyr	Gly Ser	Gly Pro	Gly	Gln Gln	Gly
1295			1300				1305	
Pro Tyr	Gly Ser	Ala Ala	Ala	Ala Ala	Gly Pro	Gly	Ser Gly	Gln
1310			1315				1320	
Tyr Gly	Gln Gly	Pro Tyr	Gly	Pro Gly	Ala Ser	Gly	Pro Gly	Gln
1325			1330				1335	
Tyr Gly	Pro Gly	Gln Gln	Gly	Pro Ser	Ala Ser	Ala	Ala Ala	Ala
1340			1345				1350	
Ala Gly	Ser Gly	Gln Gln	Gly	Pro Gly	Gln Tyr	Gly	Pro Tyr	Ala
1355			1360				1365	
Ser Ala	Ala Ala	Ala Ala	Gly	Gln Tyr	Gly Ser	Gly	Pro Gly	Gln
1370			1375				1380	

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly
 1385 1390 1395

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 1400 1405 1410

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala
 1415 1420 1425

Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
 1430 1435 1440

Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr
 1445 1450 1455

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 1460 1465 1470

Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 1475 1480 1485

Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln
 1490 1495 1500

Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly
 1505 1510 1515

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly
 1520 1525 1530

Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala
 1535 1540 1545

Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
 1550 1555 1560

Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala
 1565 1570 1575

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln
 1580 1585 1590

Gln Gly	Pro Ser Ala Ser Ala	Ala Ala Ala Ala Gly	Gln Tyr Gly
1595	1600	1605	
Ser Gly	Pro Gly Gln Tyr Gly	Pro Tyr Gly Pro Gly	Gln Ser Gly
1610	1615	1620	
Pro Gly	Ser Gly Gln Gln Gly	Gln Gly Pro Tyr Gly	Pro Gly Ala
1625	1630	1635	
Ser Ala	Ala Ala Ala Ala Gly	Gln Tyr Gly Pro Gly	Gln Gln Gly
1640	1645	1650	
Pro Tyr	Gly Pro Gly Gln Ser	Ala Ala Ala Ala Ala	Gly Pro Gly
1655	1660	1665	
Ser Gly	Gln Tyr Gly Pro Gly	Ala Ser Gly Gln Asn	Gly Pro Gly
1670	1675	1680	
Ser Gly	Gln Tyr Gly Pro Gly	Gln Gln Gly Pro Gly	Gln Ser Ala
1685	1690	1695	
Ala Ala	Ala Ala Gly Gln Tyr	Gln Gln Gly Pro Gly	Gln Gln Gly
1700	1705	1710	
Pro Tyr	Gly Pro Gly Ala Ser	Ala Ala Ala Ala Ala	Gly Gln Tyr
1715	1720	1725	
Gly Ser	Gly Pro Gly Gln Gln	Gly Pro Tyr Gly Pro	Gly Gln Ser
1730	1735	1740	
Gly Ser	Gly Gln Gln Gly Pro	Gly Gln Gln Gly Pro	Tyr Ala Ser
1745	1750	1755	
Ala Ala	Ala Ala Ala Gly Pro	Gly Ser Gly Gln Gln	Gly Pro Gly
1760	1765	1770	
Ala Ser	Gly Gln Gln Gly Pro	Tyr Gly Pro Gly Ala	Ser Ala Ala
1775	1780	1785	
Ala Ala	Ala Gly Gln Asn Gly	Pro Gly Ser Gly Gln	Gln Gly Pro
1790	1795	1800	

Gly Gln Ser Gly Gln Tyr Gly	Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Gln
1805	1810	1815
Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala	Ala Ala Ala Ala Gly	Pro Gly Gln
1820	1825	1830
Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Ser Ala Ser Ala	Ala Ala Ala
1835	1840	1845
Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln	Gln Gly Pro Gly Ala	Ser Gly Gln
1850	1855	1860
Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Gly Ser
1865	1870	1875
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly	Gln Tyr Gly Ser Gly	Pro Gly Gln
1880	1885	1890
Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala	Ala Ala Ala Ala Gly	Pro Gly Ser
1895	1900	1905
Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro	Tyr Gly Pro Gly Ala	Ser Gly Pro
1910	1915	1920
Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln	Gln Gly Pro Ser Ala	Ser Ala Ala
1925	1930	1935
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gln	Gln Gly Pro Gly Gln	Tyr Gly Pro
1940	1945	1950
Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala	Ala Gly Gln Tyr Gly	Ser Gly Pro
1955	1960	1965
Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly	Pro Gly Gln Ser Gly	Ser Gly Gln
1970	1975	1980
Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Tyr Ala Ser Ala	Ala Ala Ala
1985	1990	1995
Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly	Pro Tyr Gly Pro Gly	Ser Ser Ala
2000	2005	2010

Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly
2015 2020 2025

Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly
2030 2035 2040

Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala
2045 2050 2055

Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser
2060 2065 2070

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
2075 2080 2085

Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro
2090 2095 2100

Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly
2105 2110 2115

Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala
2120 2125 2130

Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
2135 2140 2145

Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
2150 2155 2160

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro
2165 2170 2175

Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln
2180 2185 2190

Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln
2195 2200 2205

Ser Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro
2210 2215 2220

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln
2225 2230 2235

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
2240 2245 2250

Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly
2255 2260 2265

Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln
2270 2275 2280

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln
2285 2290 2295

Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly
2300 2305 2310

Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly
2315 2320 2325

Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr
2330 2335 2340

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly
2345 2350 2355

Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His
2360 2365 2370

His His
2375

<210> 12
<211> 1188
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PRT587

<400> 12

Met His His His His His His Ser Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln

1	5	10	15
Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln	20	25	30
Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Gly Gln Tyr	35	40	45
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala	50	55	60
Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro	65	70	75
Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly	85	90	95
Pro Gly Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln	100	105	110
Gln Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser	115	120	125
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly	130	135	140
Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser	145	150	155
Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala	165	170	175
Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro	180	185	190
Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly	195	200	205
Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly	210	215	220
Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro			

225		230		235		240
Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala						
		245		250		255
Gly Gln Tyr Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly						
		260		265		270
Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln						
		275		280		285
Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln						
		290		295		300
Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr						
305		310		315		320
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly						
		325		330		335
Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala						
		340		345		350
Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln						
		355		360		365
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln						
		370		375		380
Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr						
385		390		395		400
Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly						
		405		410		415
Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln						
		420		425		430
Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser						
		435		440		445
Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala						

450		455		460											
Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
465						470				475					480
Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly
				485						490				495	
Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln
			500					505					510		
Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
		515					520					525			
Gly	Gln	Tyr	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly
	530					535					540				
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Gln
545					550					555					560
Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro
				565				570						575	
Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly
			580					585					590		
Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Tyr	Gly
		595					600					605			
Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Asn	Gly	Pro	Gly	Ser
	610					615					620				
Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln
625					630					635					640
Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly
				645					650					655	
Pro	Gly	Gln	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala
		660						665					670		
Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly

675		680		685
Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ser				
690		695		700
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln				
705		710		715 720
Gly Pro Tyr Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln				
		725		730 735
Tyr Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Tyr				
		740		745 750
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly				
		755		760 765
Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala				
		770		775 780
Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr				
		785		790 795 800
Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly				
		805		810 815
Pro Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro				
		820		825 830
Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Tyr				
		835		840 845
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn				
		850		855 860
Gly Pro Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln				
		865		870 875 880
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro				
		885		890 895
Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln				

900	905	910
Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly		
915	920	925
Pro Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly		
930	935	940
Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala		
945	950	955 960
Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro		
965	970	975
Gly Ala Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser		
980	985	990
Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly		
995	1000	1005
Pro Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Gly		
1010	1015	1020
Pro Gly Gln Tyr Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Pro Gly		
1025	1030	1035
Ser Gly Gln Gln Gly Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Ala		
1040	1045	1050
Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr		
1055	1060	1065
Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly		
1070	1075	1080
Gln Tyr Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ser Gly		
1085	1090	1095
Gln Tyr Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Ser Ala Ala Ala		
1100	1105	1110
Ala Ala Gly Gln Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr		

1115	1120	1125
Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Ser 1130 1135 1140		
Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Gly Ser 1145 1150 1155		
Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Ala 1160 1165 1170		
Ala Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Gln Gln Gly Pro Gly Ala Ser 1175 1180 1185		