



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

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

(11)



1-0035442

(51)¹⁹ C12N 15/77; C12P 19/32; C12N 9/00

(13) B

(21) 1-2019-05800

(22) 08/04/2019

(86) PCT/KR2019/004119 08/04/2019

(87) WO 2020/175735 03/09/2020

(30) 10-2019-0022546 26/02/2019 KR

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/02/2021 395

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BAEK, MIN JI (KR); LEE, Ji Hye (KR); PARK, So Jung (KR); BAE, Jee Yeon (KR).

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

(54) POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT ĐỘNG VÙNG GEN KHỞI ĐỘNG, CHẾ PHẨM CHO BIỂU HIỆN GEN, VECTƠ CHỨA GEN MÃ HÓA, VI SINH VẬT, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PURIN NUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động, chế phẩm cho biểu hiện gen chứa polynucleotit, vectơ chứa gen mã hóa polynucleotit, vi sinh vật chứa gen, và phương pháp điều chế purin nucleotit sử dụng vi sinh vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polynucleotit có hoạt động của vùng gen khởi động, chế phẩm để biểu hiện gen chứa polynucleotit, vector chứa gen mã hóa polynucleotit, vi sinh vật chứa gen, phương pháp điều chế purin nucleotit sử dụng vi sinh vật, và sử dụng polynucleotit để tăng biểu hiện của protein đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

5'-Inosin monophosphat (sau đây gọi là IMP), vật liệu có bản chất là axit nucleic là một dạng trung gian của hệ thống trao đổi chất sinh tổng hợp axit nucleic được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau (như trong dược phẩm, ứng dụng y tế khác, v.v.). Ngoài ra, IMP là nguyên liệu được sử dụng rộng rãi như chất phụ gia cho gia vị thực phẩm hoặc thực phẩm cùng với 5'-guanin monophosphat (sau đây gọi là GMP). Như đã biết rằng bản thân IMP sản sinh hương vị thịt bò và làm tăng cường hương vị của axit glutamic (MSG) như GMP, vì thế được chú ý đến như loại gia vị axit nucleic làm tăng hương vị.

Phương pháp để điều chế IMP có thể bao gồm phương pháp phân hủy enzym axit ribonucleic được chiết xuất từ các tế bào nấm men, phương pháp để phosphoryl hóa inosin được sản xuất bằng cách lên men (*Agri. Biol. Chem.*, 36, 1511(1972), v.v.), phương pháp nuôi cấy vi sinh vật có thể trực tiếp sản sinh IMP và thu hồi IMP từ môi trường nuôi cấy, v.v. Trong các phương pháp này, phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất là phương pháp sử dụng vi sinh vật có khả năng sản xuất trực tiếp IMP.

Ngoài ra, phương pháp điều chế GMP có thể bao gồm phương pháp biến đổi xanthosin 5'-monophosphat (sau đây gọi là XMP) được sản xuất bằng lên men vi sinh vật thành GMP sử dụng vi khuẩn coryneform và phương pháp biến đổi XMP được sản xuất bằng lên men vi sinh vật thành GMP sử dụng vi khuẩn *Escherichia coli*. Trong các phương pháp trên, khi GMP được sản xuất theo phương pháp mà tại đó XMP được sản xuất trước và sau đó được chuyển đổi thành GMP, năng suất của XMP (tức là tiền chất của phản ứng biến đổi trong suốt quá trình lên men vi sinh vật) phải được tăng

cường, và ngoài ra, cả XMP và GMP đã được sản xuất trong toàn bộ quá trình phản ứng chuyển đổi phải được bảo vệ khỏi bị mất.

Trong khi đó, do các enzyme trong tự nhiên không phải lúc nào cũng thể hiện các tính chất tối ưu về hoạt tính, tính ổn định, tính đặc hiệu của chất nền đối với các đồng phân quang học, v.v. yêu cầu trong các ứng dụng công nghiệp, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện enzyme cho phù hợp với mục đích sử dụng bằng cách sửa đổi trình tự axit amin của chúng. Trong số này, thiết kế hợp lý và gây đột biến định hướng điểm của các enzyme đã được áp dụng để cải thiện các chức năng enzyme trong nhiều trường hợp; tuy nhiên, các phương pháp này có nhược điểm là thông tin về cấu trúc của enzyme đích là không phù hợp hoặc mối tương quan cấu trúc-chức năng không rõ ràng, do đó chúng không thể được áp dụng một cách hiệu quả. Trong trường hợp này, đã có báo cáo cho rằng hoạt tính của các enzyme có thể được tăng cường bằng cách cải thiện enzyme thông qua phương pháp tiến hóa có định hướng, trong đó enzyme của các tính trạng mong muốn được sàng lọc từ thư viện các enzyme được tạo ra thông qua các sửa đổi ngẫu nhiên của các gen enzyme.

Các tác giả của sáng chế đã thực hiện nghiên cứu sâu rộng để sản xuất purin nucleotit năng suất cao thông qua quá trình lên men vi sinh vật. Kết quả là, họ đã phát hiện ra vùng gen khởi động có hiệu quả hơn cho năng suất purin nucleotit cao hơn, do đó hoàn thành sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất polynucleotit có hoạt động của vùng gen khởi động.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm cho biểu hiện gen chứa polynucleotit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vector chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa vector.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế purin nucleotit bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sử dụng polynucleotit để tăng biểu hiện của protein đích.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được nuôi cấy bằng cách sử dụng polynucleotit có hoạt động của vùng gen khởi động mới của sáng chế, có thể sản xuất purin nucleotit với năng suất cao. Ngoài ra, purin nucleotit được điều chế có thể được áp dụng không chỉ cho thức ăn chăn nuôi và phụ gia cho thức ăn chăn nuôi mà còn cho các sản phẩm khác như thực phẩm cho con người, phụ gia thực phẩm, thuốc, v.v.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Trong đó, các phần mô tả tương ứng và các phương án được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác. Do đó, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau trong sáng chế thuộc về phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không nên bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 có hoạt động vùng gen khởi động, trong đó trình tự polynucleotit chứa ít nhất một thay thế nucleotit trong đó. Cụ thể, sáng chế đề xuất polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 có hoạt động vùng gen khởi động trong đó trình tự polynucleotit chứa ít nhất một thay thế nucleotit trong đó, và thay thế polynucleotit là ít nhất một thay thế được lựa chọn từ nhóm thay thế của nucleotit thứ 143 và thay thế của nucleotit thứ 189.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động, trong đó trình tự polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1, i) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T); ii) nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T); hoặc iii) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T) và nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến chuỗi DNA có chiều dài dài hơn chiều dài nhất định dưới dạng polyme nucleotit, là chuỗi các đơn vị

phân tử nucleotit dài được nối với nhau bằng các liên kết cộng hóa trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động” đề cập đến vùng DNA có mặt trong vùng lân cận của khu vực, có liên quan đến sự phiên mã của gen đích bao gồm RNA polymeraza, vùng gen tăng cường, v.v., cho sự biểu hiện của gen đích được kết nối cùng hướng của chúng. Đối với mục đích của sáng chế, polynucleotit có thể được sử dụng như là vùng gen khởi động suy giảm cho sử dụng chung, ví dụ, như là vùng gen khởi động có thể làm giảm biểu hiện của adenylosuccinat synthetaza. Ngoài ra, polynucleotit đề cập đến polynucleotit tham gia vào sản xuất hoặc tăng cường của purin nucleotit, nhưng polynucleotit không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, SEQ ID NO: 1 đề cập đến trình tự polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động. Trình tự polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 có thể thu được từ Ngân hàng gen thuộc Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI), cơ sở dữ liệu đã biết. Trong phương án của sáng chế, trình tự polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 có thể được lấy từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, polynucleotit có thể là một trong các polynucleotit có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1, nucleotit thứ 143 và/hoặc nucleotit thứ 189 được thay thế bằng nucleotit khác. Polynucleotit này có thể đề cập đến trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 và/hoặc trình tự nucleotit chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc cao hơn 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1, trong đó nucleotit thứ 143 và/hoặc nucleotit thứ 189 được thay thế bằng nucleotit khác. Trình tự nucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể là một trong những tỷ lệ trong phạm vi nêu trên, ngoại trừ trình tự có chứa 100% đồng nhất, hoặc có thể trình tự có chứa ít hơn 100% đồng nhất.

Trong phương án của sáng chế, trình tự polynucleotit của sáng chế có thể là một trong số trình tự polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1, i) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T); ii) nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T); hoặc iii) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T) và nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T), nhưng polynucleotit không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, trình tự

polynucleotit của sáng chế có thể chứa trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, nhưng trình tự polynucleotit không bị giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, trong trình tự polynucleotit của sáng chế, polynucleotit trong đó nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T) có thể chứa trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 2; polynucleotit trong đó nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T) có thể chứa trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 3; hoặc polynucleotit trong đó nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T) và nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T) có thể chứa trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 4, nhưng trình tự polynucleotit của sáng chế không bị giới hạn ở các trình tự đó. Polynucleotit có thể chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc cao hơn 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4. Trình tự polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể là một trong những tỷ lệ trong phạm vi nêu trên, ngoại trừ trình tự có chứa 100% đồng nhất, hoặc có thể trình tự có chứa ít hơn 100% đồng nhất.

Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ polynucleotit nào chứa trình tự polynucleotit bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung vào trong một phần của trình tự cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là polynucleotit có hoạt tính tương đương hoặc tương ứng với polypeptit chứa trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO, ngay cả khi nó được mô tả như là “polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO cụ thể” trong sáng chế. Ví dụ, miễn là biến thể polynucleotit có hoạt tính tương đương hoặc tương ứng với biến thể polypeptit, không loại trừ bổ sung trình tự giả cùng hướng hoặc ngược hướng với trình tự tương ứng với trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO, đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến im lặng, ngoài việc sửa đổi cụ thể ở vị trí 143 hoặc 189 từ đó cung cấp hoạt tính cụ thể, và việc bổ sung hoặc đột biến trình tự như vậy cũng nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Tương đồng và đồng nhất đề cập đến mức độ liên quan giữa hai trình tự nucleotit và có thể được biểu thị dưới dạng phần trăm.

Thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” có thể thường được sử dụng để thay thế cho nhau.

Trình tự tương đồng hoặc đồng nhất của polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và các điểm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình đang dùng có thể được sử dụng kết hợp. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai hóa dưới điều kiện vừa phải hoặc nghiêm ngặt cao dọc theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất là khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80% hoặc khoảng 90% toàn bộ chiều dài của trình tự. Liên quan đến các polynucleotit được lai hóa, các polynucleotit chứa đơn vị mã hóa thoái hóa thay vì đơn vị mã hóa cũng có thể được xem xét.

Cho dù hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có tính tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng, ví dụ thuật toán máy tính đã biết, như là chương trình “FASTA” sử dụng tham số mặc định như trong Pearson et al., (1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444). Ngoài ra, nó có thể được xác định bằng thuật toán Needleman-Wunsch (Needman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở sinh học của khu vực Châu Âu, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16:276 đến 277) (phiên bản 5.0 hoặc các phiên bản sau đó) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., Nghiên cứu về axit nucleic 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [et al., *J Molec Biol* 215]: 403 (1990); Hướng dẫn máy tính khổng lồ, Martin J. Bishop, [ED.,] Nhà xuất bản Học thuật, San Diego, 1994 và [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Ứng dụng Toán 48: 1073). Ví dụ, tính tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit có thể có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP (ví dụ, Needleman et al. (1970), *J Mol Biol* 48: 443) được công bố bởi Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa tính tương tự là số lượng các dấu hiệu được căn chỉnh (nghĩa là, nucleotit hoặc axit amin) là tương tự nhau, được chia cho tổng số dấu hiệu trong trình tự ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm (1) ma trận so sánh đơn (chứa giá trị 1 cho giống nhau và 0 cho không giống nhau) và ma trận so sánh trọng lượng (hoặc EDNAFULL (EMBOSS phiên bản của NCBI NUC4,4) ma trận thay thế)

của Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, được công bố bởi Schwartz và Dayhoff, biên tập, Atlas về trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353-358 (1979); (2) Trừ 3,0 điểm cho mỗi khoảng trống, và trừ 0,10 điểm cho mỗi dấu hiệu trong mỗi khoảng trống (hoặc mở khoảng trống trừ 10 điểm và mở rộng khoảng trống trừ 0,5 điểm); và (3) không bị trừ điểm đối với các khoảng trống cuối. Theo đó, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” được sử dụng đề cập đến sự liên quan giữa các trình tự.

Ngoài ra, do sự thoái hóa của đơn vị mã hóa hoặc bằng cách xem xét các đơn vị mã hóa được ưu tiên trong sinh vật học, nơi polynucleotit được biểu hiện, nhiều sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa của polynucleotit trong phạm vi không làm thay đổi trình tự polynucleotit. Bất kỳ trình tự polypeptit nào trong đó nucleotit thứ 143 và/hoặc nucleotit thứ 189 của trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng nucleotit khác có thể được bao gồm nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Ngoài ra, bất kỳ trình tự polynucleotit nào trong đó nucleotit thứ 143 và/hoặc nucleotit thứ 189 của trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng nucleotit khác có thể được lai hóa dưới điều kiện nghiêm ngặt với bất kỳ đầu dò nào có thể được điều chế từ các trình tự gen đã biết (ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit trên) có thể được bao gồm nhưng không giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện có khả năng lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Những điều kiện như vậy được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ, J Sambrook *et al.*). Ví dụ, các điều kiện có thể bao gồm thực hiện lai tạo giữa các gen có tính tương đồng cao, tương đồng 40% trở lên, tốt hơn là 80% trở lên, 85% trở lên, 90% trở lên, 95% trở lên, 97% trở lên, và tốt nhất là 99% trở lên, trong khi không thực hiện lai hóa giữa các gen có tương đồng thấp hơn các tương đồng được mô tả ở trên; hoặc thực hiện lai một lần, cụ thể là lai hai hoặc ba lần, trong các điều kiện rửa thông thường để lai southern ở 60°C, 0,1 × SSC (saline-sodium citrate: saline-natri xitrat), và 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate: natri dodecyl sulfat), tốt hơn là ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 0,1 × SSC, và 0,1% SDS, và tốt nhất là ở 68°C, 0,1 × SSC, và 0,1% SDS.

Lai hóa yêu cầu hai axit nucleic có các trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ có thể phụ thuộc vào tính nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ

sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai hóa với nhau. Ví dụ, với khía cạnh là DNA, adenosin bổ sung cho thymin và xytoxin bổ sung cho guanin. Theo đó, sáng chế cũng có thể bao gồm các đoạn axit nucleic được tách chiết bổ sung cho toàn bộ trình tự cũng như trình tự axit nucleotit tương tự nhau.

Cụ thể, polynucleotit có tương đồng có thể được phát hiện ở giá trị T_m là 55°C khi sử dụng điều kiện lai bao gồm bước lai và sử dụng các điều kiện được mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C , 63°C hoặc 65°C , nhưng sáng chế không giới hạn ở nhiệt độ này và có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo mục đích của nó.

Mức độ phù hợp nghiêm ngặt của việc lai các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ bổ sung của polynucleotit, và các biến đổi liên quan được biết đến trong kỹ thuật này (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9,50 đến 9,51, 11,7 đến 11,8).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm cho biểu hiện gen có chứa polynucleotit.

Chế phẩm cho biểu hiện gen đề cập đến chế phẩm có khả năng biểu hiện gen có thể được biểu hiện bằng vùng gen khởi động của sáng chế. Ví dụ, chế phẩm cho biểu hiện gen có thể bao gồm polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động mới, và có thể còn bao gồm bất kỳ thành phần nào có khả năng vận hành polynucleotit như là vùng gen khởi động mà không giới hạn. Trong chế phẩm cho gen biểu hiện của sáng chế, polynucleotit có thể được tạo thành chứa vector để biểu hiện gen hoạt động được liên kết trong tế bào chủ mà có polynucleotit được đưa vào.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động, hoặc vector chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích. Cụ thể, protein đích có thể là adenylosuccin synthetaza nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc DNA chứa trình tự nucleotit mã hóa polynucleotit đích, được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát thích hợp sao cho polypeptit đích được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát có thể bao gồm vùng gen khởi động để bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự khởi động nào để kiểm soát phiên mã như vậy, trình tự mã hóa cho vị trí gắn với ribosom trên ARN thông tin thích hợp, và trình tự để kiểm soát việc kết thúc phiên mã và dịch mã. Khi được biến nạp vào trong tế bào chủ thích hợp, vector có thể được sao

chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen của tế bào chủ, hoặc có thể tích hợp vào chính bộ gen của nó.

Vector được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể nào miễn là vector được sao chép trong tế bào chủ, và bất kỳ vector được biết đến trong kỹ thuật có thể được sử dụng. Ví dụ về vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virút và thực khuẩn thể. Ví dụ, vector phage hoặc vector cosmit như là: pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng, và các vector plasmid, các vector có bản chất là pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể là các vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC v.v. có thể được sử dụng.

Trong phương án, polynucleotit đích có thể được chèn vào trong nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn vào nhiễm sắc thể. Việc chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp nào được biết đến trong kỹ thuật (ví dụ, bằng cách tái tổ hợp tương đồng), nhưng sáng chế không được giới hạn ở phương pháp này. Dấu chọn lọc để xác nhận việc chèn vector vào trong nhiễm sắc thể có thể còn được bao gồm. Dấu hiệu chọn lọc được sử dụng để chọn các tế bào được biến nạp với vector (tức là, để xác nhận sự có mặt của việc chèn phân tử axit nucleic đích), và các dấu hiệu có khả năng cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc (ví dụ, kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng tác nhân gây độc tế bào và biểu hiện polypeptit bề mặt) có thể được sử dụng. Trong trường hợp có tác nhân chọn lọc được xử lý, chỉ có các tế bào có khả năng biểu hiện các dấu hiệu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các đặc điểm kiểu hình khác, và do đó các tế bào được biến nạp có thể được chọn.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa vector, trong đó vector bao gồm polynucleotit chứa hoạt động vùng gen khởi động của sáng chế và gen mã hóa protein đích.

Ngoài ra, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polynucleotit chứa hoạt động vùng gen khởi động của sáng chế và gen mã hóa protein đích.

Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật được điều chế bằng biến nạp thông qua

vector bao gồm polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích; hoặc vi sinh vật bao gồm polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích, nhưng vi sinh vật không được giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào bên trong tế bào chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Không quan trọng có hay không polynucleotit biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm ở đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit có thể chứa DNA và RNA mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào bất kỳ dưới hình thức nào miễn là polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ và biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện có cấu trúc gen chứa tất cả các yếu tố cần thiết cho sự tự biểu hiện. Catxet biểu hiện có thể chứa vùng gen khởi động, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã có thể liên kết hoạt động với polynucleotit. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện thực hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không giới hạn ở đây.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết hoạt động” đề cập đến liên kết chức năng giữa trình tự gen và trình tự vùng gen khởi động để bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã của polynucleotit chứa hoạt động của vùng gen khởi động của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật chứa polynucleotit và protein đích” đề cập đến vi sinh vật trong đó biểu hiện của protein đích được kiểm soát bằng polynucleotit. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit, vi sinh vật có thể là vi sinh vật tự nhiên có khả năng sản xuất purin nucleotit kém, hoặc vi sinh vật được cung cấp với khả năng sản sinh purin nucleotit trong đó chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh purin nucleotit. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của adenylosuccinat synthetaza, ví dụ, vi sinh vật chứa polynucleotit trong đó, trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1, nucleotit thứ 143 và/hoặc nucleotit thứ 189 được thay thế bằng nucleotit khác, nhưng vi sinh vật không được giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, vi sinh vật có thể là vi sinh vật chứa polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động, trong đó ít nhất một nucleotit trong trình tự

polynucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 được thay thế. Thay thế polynucleotit có thể bao gồm thay thế của nucleotit thứ 143 bằng thymine (T) và/hoặc thay thế nucleotit thứ 189 bằng thymine (T).

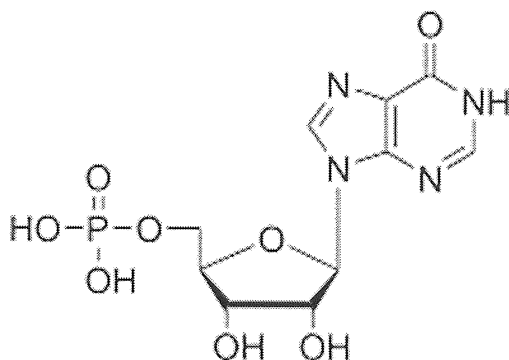
Đối với tế bào chủ hoặc vi sinh vật, để đạt được mục đích của sáng chế, bất kỳ tế bào chủ hoặc vi sinh vật nào trong đó có thể sản sinh purin nucleotit bằng cách chứa polynucleotit và protein đích có thể thuộc vào phạm vi của sáng chế.

Trong sáng chế, vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit có thể được sử dụng thay thế cho vi sinh vật sản sinh purin nucleotit và vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit.

Để đạt được mục đích của sáng chế, thuật ngữ “purin nucleotit” đề cập đến nucleotit có cấu trúc gốc purin, ví dụ, IMP, XMP hoặc GMP nhưng purin nucleotit không được giới hạn ở đây.

Cụ thể, thuật ngữ “5'-inosin monophosphat (IMP)” là vật liệu axit nucleic có công thức được thể hiện trong công thức 1 ở bên dưới.

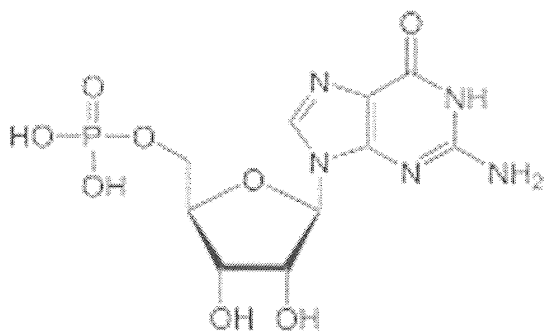
[Công thức 1]



IMP cũng được gọi tên theo Danh pháp Hóa học theo Liên minh Quốc tế về Hóa học thuần túy và Hóa học ứng dụng (IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry Nomenclature), 5'-inosin monophosphat hoặc axit 5'-inosin và IMP được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm như chất làm tăng hương vị cùng với XMP hoặc GMP.

Thuật ngữ “5'-guanine monophosphat (GMP)” đề cập đến vật liệu axit nucleic có công thức được thể hiện ở công thức 2 bên dưới.

[Công thức 2]



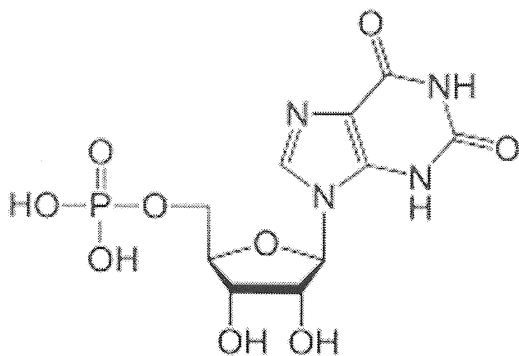
GMP cũng được gọi tên theo IUPAC, [(2R,3S,4R,5R)-5-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]metyl dihydrogen phosphat, axit 5'-guanidylic, 5'-guanylic, hoặc axit guanylic.

GMP ở dạng muối và được sử dụng rộng rãi làm phụ gia thực phẩm, như là natri guanylat, đikali guanylat và canxi guanylat. GMP có hiệu quả cuối cùng để tăng cường vị khi nó được sử dụng làm phụ gia cùng với IMP. GMP có thể được điều chế bằng cách biến đổi từ XMP, nhưng phương pháp điều chế GMP không được giới hạn ở đây. Như đã xác nhận trong phương án của sáng chế, vùng gen khởi động của sáng chế có thể tăng cường sản sinh của XMP, và GMP cũng có thể được chuyển đổi từ XMP do đó làm tăng lượng sản xuất của GMP. Do đó, rõ ràng là GMP cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “5'-xanthosin monophosphat (XMP)” là nguyên liệu trung gian của quá trình chuyển hóa purin có công thức được thể hiện trong công thức 3 bên dưới.

XMP cũng được gọi tên theo IUPAC, 5'-inosin monophosphat hoặc axit 5'-xanthylic. XMP có thể được tạo thành từ IMP thông qua phản ứng dehydrogenaza, hoặc có thể được chuyển đổi thành GMP thông qua hoạt động của GMP synthaza. Ngoài ra, XMP có thể được tạo thành từ XTP bằng deoxyribonucleoside triphosphat pyrophosphohydrolaza là enzym có hoạt tính XTPaza.

[Công thức 3]



Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh purin nucleotit” bao gồm cả vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật trong đó sửa đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo đã xảy ra, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể được tăng cường hoặc làm suy yếu do các nguyên nhân như chèn gen ngoại sinh, tăng cường hoặc làm bất hoạt gen nội sinh, v.v. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó sửa đổi gen đã xảy ra hoặc hoạt động của chúng được tăng cường cho mục đích sản xuất purin nucleotit. Để đạt được mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit khác biệt ở chỗ nó tăng năng suất các purin nucleotit mong muốn bằng cách chứa polynucleotit, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit có thể là vi sinh vật trong đó một số gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin nucleotit được tăng cường hoặc làm suy yếu, hoặc một số gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin nucleotit được tăng cường hoặc làm suy yếu, hoặc một phần của gen liên quan đến con đường suy thoái được tăng cường hoặc làm suy yếu. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó biểu hiện *purF* mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza hoặc biểu hiện của *purA* được tăng cường. Ngoài ra, theo purin nucleotit, biểu hiện của *guaB*, là gen mã hóa inosin-5'-monophosphat dehydrogenaza có thể được kiểm soát. Cụ thể, khi purin nucleotit là IMP, biểu hiện của *guaB* có thể được làm suy yếu, trong khi đó purin nucleotit là XMP hoặc GMP, biểu hiện của *guaB* có thể được tăng cường.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-purin nucleotit” đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh nucleotit tự nhiên hoặc bằng cách sửa đổi. Cụ thể, như được sử dụng ở đây, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit được cải

thiện do bao gồm polynucleotit chứa hoạt động vùng gen khởi động của sáng chế, hoặc do biến nạp bằng vector chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

“Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng được cải thiện sản sinh purin nucleotit” đề cập đến vi sinh vật có khả năng được cải thiện sản sinh purin nucleotit, so với chủng bố mẹ của chúng trước khi vi sinh vật được biến nạp hoặc không được sửa đổi. “Vi sinh vật không được sửa đổi” đề cập đến chủng kiểu dại của nó, vi sinh vật không chứa protein được sửa đổi sản sinh purin nucleotit, hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vector chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

Như được sử dụng ở đây, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium stationis*, v.v., nhưng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* không nhất thiết được giới hạn ở các vi sinh vật này.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế nguyên liệu đích bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường. Trong phương án, phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi nguyên liệu đích được tạo thành do vi sinh vật hoặc môi trường được nuôi cấy sau bước nuôi cấy. Cụ thể, nguyên liệu đích có thể là purin nucleotit nhưng nguyên liệu đích không bị giới hạn ở đây.

Trong phương pháp nêu trên, nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng các phương pháp được biết đến như nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ-bổ sung, v.v. nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở phương pháp nuôi cấy nào. Cụ thể, điều kiện nuôi cấy có thể không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH thích hợp (ví dụ, độ pH 5 đến pH 9, tốt hơn là độ pH 6 đến pH 8, và tốt nhất là độ pH 6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc amoniac) hoặc các hợp chất axit (ví dụ, axit photphoric hoặc axit sulfuric), và điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách thêm oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở 20°C đến 45°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, và nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, nhưng điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn ở đây. Purin nucleotit được sản xuất bằng nuôi cấy có thể được bài tiết vào trong môi trường hoặc có thể

được duy trì trong các tế bào.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy được sử dụng như là nguồn cacbon, sacarit và carbohydrat (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, ri đường, tinh bột và cellulosa), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu đậu phộng, và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol) và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở đây. Nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, canh thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và urê) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amonium sulfat, amoni clorua, amoni phosphat hoặc amoni cacbonat và amoni nitrat), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không bị giới hạn ở đây. Nguồn photpho, kali dihydrogen phosphat, đikali hydrogen phosphat, muối có chứa natri tương ứng, v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn photpho không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường cũng có thể bao gồm các yếu tố nguyên liệu kích thích tăng trưởng cần thiết như là các muối kim loại khác (ví dụ, magiê sufat hoặc sắt sufat), các axit amin hoặc các vitamin.

Phương pháp thu hồi purin nucleotit được sản xuất trong các bước nuôi cấy của sáng chế để thu hoạch các purin nucleotit mong muốn từ môi trường nuôi cấy bằng phương pháp thích hợp được biết đến trong kỹ thuật này theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), v.v. có thể được sử dụng, và purin nucleotit có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng các phương pháp được biết đến trong kỹ thuật này.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh sạch. Quá trình tinh sạch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp được biết đến trong kỹ thuật hiện có. Vì thế, thu hồi purin nucleotit có thể thu được dưới dạng tinh sạch hoặc dịch lên men vi sinh vật chứa purin nucleotit (Giới thiệu về công nghệ sinh học và kỹ thuật di truyền của A. J. Nair, 2008).

Ngoài ra, để đạt được mục đích của sáng chế, trong trường hợp vi sinh vật chứa polynucleotit có hoạt động của vùng gen khởi động được mô tả ở trên, vi sinh vật đặc trưng ở chỗ lượng nguyên liệu đích được tăng lên. Cụ thể, trong khi chủng kiểu đại

thuộc chi *Corynebacterium* không thể sản sinh purin nucleotit, hoặc có thể chỉ sản sinh với lượng rất nhỏ thậm chí là không thể, vì sinh vật của sáng chế chứa polynucleotit có hoạt động của vùng gen khởi động có thể tăng lượng sản xuất purin nucleotit.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sử dụng polynucleotit để tăng biểu hiện của protein đích.

Mô tả chi tiết của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các phương án ví dụ. Tuy nhiên, hiển nhiên rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiện có là những phương án ưu tiên này chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế chủng sản sinh IMP dựa trên chủng kiểu đại

Chủng kiểu đại thuộc chi *Corynebacterium* không thể sản sinh IMP hoặc có thể chỉ sản sinh với lượng rất nhỏ thậm chí là không thể sản sinh. Theo đó, chủng sản sinh IMP được điều chế dựa trên chủng *Corynebacterium stationis* ATCC6872 kiểu đại. Cụ thể hơn, chủng được điều chế trong đó hoạt động của gen *purF* mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza được tăng cường và hoạt động của *guaB* mã hóa IMP được làm suy yếu.

Ví dụ 1-1: Điều chế chủng được tăng cường *purF*

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa khởi động của gen *purF* được sửa đổi, chèn vector chứa gen *purF* được điều chế trước tiên. Để nhân dòng gen *purF* vào trong vector chèn, cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng bộ gen DNA của *Corynebacterium stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các đoạn mồi có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 cho 30 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. PCR được thực hiện lại sử dụng hai đoạn DNA thu được bằng PCR trên làm mạch khuôn và các đoạn mồi có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 9 cho 30 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút để thu được các đoạn DNA. Các đoạn DNA thu được được phân cắt với enzym giới hạn *XbaI*, và được nhân dòng vào trong vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn quốc tế số WO 2008-

033001) cũng được phân cắt với enzym giới hạn *Xba*I. Vector được điều chế như vậy được đặt tên là pDZ-purF-g1a.

Bảng 1

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
6	purF g1a-1	GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC
7	purF g1a-2	AAGTAGTGTTCACCATGACGCTGATTCTACTAAGTTT
8	purF g1a-3	AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCCCCAG
9	purF g1a-4	GCTCTAGACTGTGCGCCACGATATCCAG

Vector tái tổ hợp pDZ-purF-g1a được biến nạp vào trong *Corynebacterium stationis* ATCC6872 bằng điện biến nạp, và các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tách tổ hợp tương đồng được sàng lọc trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và các chủng đã được lựa chọn được sàng lọc được giải trình tự, do đó chủng cuối cùng có sửa đổi được chèn vào được lựa chọn. Chủng thu được được đặt tên là chủng 6872-purF(g1a).

Ví dụ 1-2: Điều chế chủng có gen *guaB* bị suy yếu

Để điều chế chủng chứa đơn vị mã hóa mở đầu của gen *guaB* được sửa đổi, vector chèn vào chứa gen *guaB* đã được điều chế. Để nhân dòng gen *guaB* vào trong vector chèn, cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng bộ gen DNA của *Corynebacterium stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14. PCR được thực hiện lại bằng cách sử dụng sản phẩm PCR thu được ở trên làm mạch khuôn và mồi có trình tự SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 14, sau đó các đoạn DNA đã thu được được nhân dòng như trong ví dụ 1-1. Vector được điều chế như trên được đặt tên là pDZ-guaB-alt. Vector được đưa vào trong 6872-purF(g1a) theo cách tương tự và chủng chứa sửa đổi như trên được đưa vào cuối cùng được chọn. Chủng được chọn cuối cùng sản sinh IMP được đặt tên là CJI2330.

Bảng 2

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
11	guaB alt-1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
12	guaB alt-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC

13	guaB alt-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTTTCT
14	guaB alt-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

Ví dụ 1-3: Kiểm tra chuẩn độ lên men của CJI2330

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) vào trong ống nghiệm (đường kính: 18 mm), ống nghiệm được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJI2330 được cấy lần lượt vào ống và ủ lắ ở 30°C trong 24h và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha trong mỗi bình tam giác 250 mL lắ được và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy vào trong môi trường lên men và được nuôi trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh với tốc độ lắ ở 170 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo bởi HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 3 bên dưới. Kết quả sau đây cho thấy rằng CJI2330 có khả năng sản sinh IMP.

Bảng 3

Chủng	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2330	0,50

- Môi trường nuôi cấy giống: 1% glucoza, 1% pepton, 1% canh thịt, 1% dịch chiết nấm men, 0,25% natri clorua, 100 mg/L adenin, 100 mg/L guanin, độ pH 7,5.

- Môi trường lên men: 0,1% natri glutamat, 1% amoni clorua, 1,2% magiê sunfat, 0,01% canxi clorua, 20 mg/L sắt sunfat, 20 mg/L mangan sunfat, 20 mg/L kẽm sunfat, 5 mg/L đồng sunfat, 23 mg/L L-xystein, 24 mg/L alanin, 8 mg/L axit nicotinic, 45 µg/L biotin, 5 mg/L thiamin hydroclorit, 30 mg/L adenin, 1,9% axit phosphoric (85%), 2,55% glucoza, 1,45% fructoza.

Ví dụ 2: Phát hiện biến thể trong đó hoạt động của vùng gen khởi động *purA* được làm suy yếu.

Làm suy yếu biểu hiện của adenylosuccinat synthetaza để cải thiện khả năng sản sinh purin nucleotit, thư viện chứa biến thể của gen *purA* mã hóa adenylosuccinat synthetaza được điều chế và những thử nghiệm đã được thực hiện để phát hiện sửa đổi

bị làm suy yếu vùng gen khởi động trong đó hoạt động của vùng gen khởi động được làm suy yếu để tăng cường sản xuất purin nucleotit.

Ví dụ 2-1: Điều chế vectơ chứa vùng gen khởi động *purA*

Để điều chế thư viện biến thể của vùng gen khởi động *purA*, vectơ biểu hiện protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP) chứa vùng gen khởi động *purA* được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 được điều chế trước tiên. PCR được thực hiện sử dụng bộ gen DNA của *Corynebacterium stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và mỗi có trình tự SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 cho 30 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. Các đoạn DNA thu được được xử lý với *KpnI* và *EcoRV* và được nhân dòng vào trong vectơ p117-gfp (Patent Hàn Quốc số 10-0620092) đã được xử lý trước với các enzym giới hạn tương tự, và vectơ được điều chế như vậy được đặt tên là p117-PpurA-gfp.

Bảng 4

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
15	vùng gen khởi động <i>purA</i> F	GGGGTACCGGCAAAATTGCCGCCGCAGCT
16	vùng gen khởi động <i>purA</i> R	GGGATATCGGTTATTCACTTCCTAGATTT
17	vùng gen khởi động <i>purA</i> lib R	TTATTTGTAGAGCTCATCCAT

Ví dụ 2-2: Điều chế thư viện biến thể của vùng gen khởi động *purA*

Thư viện biến thể gen *purA* được điều chế dựa trên vectơ được điều chế trong ví dụ 2-1. Thư viện được điều chế sử dụng kit PCR tạo đột biến ngẫu nhiên (Clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit). Trong điều kiện mà ở đó các sửa đổi có thể xảy ra, PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 17. Cụ thể, dưới các điều kiện trong đó 2 đến 4 sửa đổi có thể xảy ra trên 1.000 bp, gia nhiệt trước khi thực hiện ở 94°C trong 30 giây, tiếp theo là 25 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây và 68°C trong 1 phút 30 giây. Sản phẩm PCR thu được được sử dụng để PCR sử dụng megaprimer (500 ng đến 125 ng) trong 25 chu kỳ của 95°C trong 50 giây, 60°C trong 50 giây, và 68°C trong 12 phút, được xử lý với *DpnI*, biến nạp vào *E. coli* DH5α và cấy trên môi trường thạch LB đặc chứa kanamycin

(25 mg/L). Sau khi lựa chọn 20 loại khuẩn lạc khác nhau được biến nạp, plasmit thu được được giải trình tự. Kết quả là, xác nhận rằng các sửa đổi được đưa vào tại các vị trí khác nhau với tần suất là 3,5 sửa đổi/kb. Khoảng 10.000 khuẩn lạc *E. coli* được thu và plasmit được tách, được đặt tên là thư viện p117-PpurA-gfp.

Ví dụ 3: Đánh giá thư viện được điều chế và chọn các biến thể

Ví dụ 3-1: Đánh giá thư viện

Thư viện p117-PpurA-gfp được điều chế trong ví dụ 2-2 được biến nạp vào trong chủng CJI2330 được điều chế trong ví dụ 1 bằng điện biến nạp, và chủng được cấy trải trên môi trường dinh dưỡng chứa 25 mg/L kanamycin để thu được 5.000 khuẩn lạc có chứa vector sửa đổi được chèn vào. Mỗi khuẩn lạc được đặt tên tương ứng là CJI2330_p117-PpurA(mt1) đến CJI2330_p117-PpurA(mt5000)".

- Môi trường dinh dưỡng: 1% pepton, 1% canh thịt, 0,25% natri clorua, 1% dịch chiết nấm men, 2% agar, độ pH 7,2.

Mỗi khuẩn lạc trong số 5.000 khuẩn lạc được cấy chuyển vào trong 200 μ L của môi trường nuôi cấy giống đã được hấp tiệt trùng, và được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng, lắc ở 30°C, 1200 vòng/phút trong 24 giờ sử dụng máy lắc vi đĩa (TAITEC), và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men được hấp tiệt trùng (290 μ L) được chia vào các giếng của đĩa 96 giếng, và 20 μ L môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào mỗi giếng, tiếp theo nuôi cấy được lắc dưới cùng điều kiện như trên trong 72 giờ để thu được các tế bào. Sau đó, các tế bào thu được được rửa với đệm phosphat salin 1X (NaCl (80 g), KCl (2 g), natri phosphat (14,4 g), kali phosphat (2,4 g), và nước tiệt trùng (0,8 l), được pha loãng trong cùng loại đệm, và được đo cường độ huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang được đo bằng sự chiếu xạ của ánh sáng kích thích ở 488 nm, và ánh sáng phát ra từ đó được đo ở 511 nm sử dụng máy đọc vi đĩa, do đó đo được mức độ biểu hiện gen GFP. Khi đó, hai khuẩn lạc đột biến được chọn (tức là PpurA(mt3) và PpurA(mt378) trong đó cường độ huỳnh quang bị giảm so với *PpurA-gfp* kiểu dại.

Ví dụ 3-2: Xác nhận sửa đổi của vùng gen khởi động *purA*

Để xác nhận sửa đổi gen của chủng đột biến, PCR được thực hiện trong mỗi chủng PpurA(mt3) và PpurA(mt378) sử dụng mồi có trình tự SEQ ID NO: 15 và SEQ

ID NO: 17, và sản phẩm PCR được giải trình tự, do đó xác nhận sự có mặt của sửa đổi trong vùng gen khởi động *purA*.

Cụ thể, đã xác nhận rằng PpurA(mt3) chứa trình tự polynucleotit trong đó nucleotit thứ 189 của trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng thymine (T). Ngoài ra, đã xác nhận rằng PpurA(mt378) chứa trình tự polynucleotit trong đó nucleotit thứ 143 của trình tự SEQ ID NO: 1 được thay bằng thymine (T). Theo đó, trong các ví dụ bên dưới, các thí nghiệm đã được thực hiện để xác nhận có hay không sửa đổi trên có ảnh hưởng đến lượng sản xuất purin nucleotit trong mỗi vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Ví dụ 4: Xác nhận khả năng sản xuất IMP trong chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872

Chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872 được điều chế, và sửa đổi được xác nhận trong ví dụ 3 được đưa vào bên trong chủng và khả năng sản sinh IMP của chủng đó đã được xác nhận.

Ví dụ 4-4: Chọn chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ chủng ATCC6872

Để điều chế chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ chủng ATCC6872, nuôi cấy ATCC6872 được pha loãng trong đệm phosphat (độ pH 7,0) hoặc đệm xitrat (độ pH 5,5) có mật độ 10^7 tế bào/ml đến 10^8 tế bào/ml và được xử lý với UV ở nhiệt độ phòng hoặc 32°C trong 20 phút đến 40 phút để gây đột biến. Chủng được rửa hai lần với dung dịch salin 0,85% và cấy trái, sau pha loãng, trên môi trường tối thiểu chứa agar 1,7% được bổ sung với nguyên liệu cung cấp sức đề kháng ở nồng độ thích hợp, do đó thu được các khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng và sau đó được nuôi cấy vào môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy mỗi khuẩn lạc được nuôi trong môi trường lên men trong 3 đến 4 ngày, các khuẩn lạc biểu hiện sản sinh IMP tốt tích lũy trong môi trường nuôi cấy được chọn. Để điều chế chủng sản sinh IMP ở nồng độ cao, khuyết dưỡng adenine, rò rỉ guanine, nhạy cảm với lysozyme, kháng 3,4-dehydroproline, kháng streptomycin, kháng sulfaguanidine, kháng norvalin, và kháng trimethoprim được cung cấp bằng cách thực hiện các quy trình tương ứng một cách tuần tự. Kết quả là, chủng CJI2332 được cung cấp có sức đề kháng với các nguyên liệu ở trên và có năng suất IMP tốt cuối cùng đã được chọn. Sức đề kháng của chủng CJI2332 liên quan đến các chủng ATCC6872 đã được so sánh và

kết quả được thể hiện trong Bảng 7 bên dưới.

Bảng 7

Đặc điểm	ATCC6872	CJI2332
Khuyết dưỡng Adenin	Không khuyết dưỡng	Khuyết dưỡng
Rò rỉ Guanin	Không rò rỉ	Rò rỉ
Nhạy cảm với Lysozym	80 µg/mL	8 µg/mL
Kháng 3,4-Dehydroprolin	1.000 µg/mL	3.500 µg/mL
Kháng Streptomycin	500 µg/mL	2.000 µg/mL
Kháng Sulfaguanidin	50 µg/mL	200 µg/mL
Kháng Norvalin	0,2 mg/mL	2 mg/mL
Kháng Trimethoprim	20 µg/mL	100 µg/mL

- Môi trường tối thiểu: 2% glucoza, 0,3% natri sulfat, 0,1% KH_2PO_4 , 0,3% K_2HPO_4 , 0,3% magiê sunfat, 10 mg/L canxi clorua, 10 mg/L sắt sulfat, 1 mg/L kẽm sunfat, 3,6 mg/L mangan clorua, 20 mg/L L-xystein, 10 mg/L canxi pantothenat, 5 mg/L thiamin hydroclorua, 30 µg/L biotin, 20 mg/L adenin, 20 mg/L guanin, điều chỉnh độ pH 7,3.

Chủng CJI2332 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 22 tháng 6 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký số KCCM12277P.

Ví dụ 4-2: Kiểm tra chuẩn độ lên men của CJI2332

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) vào trong ống nghiệm (đường kính: 18 mm), các ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJI2332 được cấy chuyển vào ống và nuôi lắ ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha vào mỗi bình tam giác 250 mL, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy chuyển vào môi trường lên men và nuôi cấy trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh với tốc độ lắ 170 vòng/ phút, 30°C, độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo bằng HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 8 bên dưới.

Bảng 8

Chủng	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2332	1,74

Ví dụ 4-3: Điều chế vector chèn chứa sửa đổi của vùng gen khởi động *purA*

Để đưa sửa đổi được chọn trong ví dụ 3 vào trong các chủng, vector chèn được điều chế. Quá trình để điều chế vector để đưa các sửa đổi PpurA(c143t), PpurA(a189t), và PpurA(c143t, a189t) vào được thực hiện như sau.

PCR được thực hiện sử dụng bộ gen DNA của chủng ATCC6872 làm mạch khuôn và trình tự mỗi SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút; 20 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và trùng hợp ở 72°C trong 5 phút. PCR được thực hiện lại bằng cách tương tự sử dụng các đoạn DNA thu được làm mạch khuôn và trình tự mỗi SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21, và các đoạn gen thu được được phân cắt với *XbaI*. Mỗi đoạn gen được nhân dòng vào trong vector pDZ tuyến tính được phân cắt với *XbaI* sử dụng T4 ligaza, do đó vector pDZ-purA(c143t)-purA được điều chế.

Sau đó, PCR được thực hiện sử dụng bộ gen DNA của chủng ATCC6872 làm mạch khuôn và trình tự mỗi SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 21. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút, 20 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và trùng hợp ở 72°C trong 5 phút. PCR được thực hiện lại bằng cách tương tự sử dụng các đoạn DNA thu được làm mạch khuôn và trình tự mỗi SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21, các đoạn gen thu được như vậy được phân cắt với *XbaI*. Mỗi đoạn DNA thu được được nhân dòng vào trong vector pDZ tuyến tính được phân cắt với *XbaI* sử dụng T4 ligaza, và do đó vector pDZ-purA(a189t)-purA đã được điều chế.

Ngoài ra, để kiểm tra ảnh hưởng của việc đưa hai sửa đổi đồng thời, vector trong đó hai sửa đổi đưa vào được điều chế. Sau đó, đột biến định hướng điểm được thực hiện sử dụng pDZ-purA(c143t) đã được điều chế đóng vai trò chính. Cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng mồi có trình tự SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25 trong các điều kiện sau: 18 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C

trong 30 giây và trùng hợp ở 68°C trong 1 phút; và trùng hợp ở 72°C trong 12 phút. Các sản phẩm PCR thu được được phân cắt với *DpnI*, biến nạp vào trong DH5 α , và do đó vector pDZ-PpurA(c143t, a189t)-purA đã thu được.

Bảng 9

SEQ ID NO	Mỗi	Trình tự (5' đến 3')
18	PDZ purA F	GCTCTAGA ACGGTCACGCGCAAATCAG
19	purA c143t-1R	CTACCTTTATCGCCAaTGATAATGTATTTAGCCATG
20	purA c143t-2F	CTAAATACATTATCAaTGGCGATAAAGGTAGAGTT
21	PDZ purA R	GCTCTAGA TCGTAGGCGACGCAAATAGG
22	purA a189t-1R	GGTTATTCACTACCTAGATTTAAG
23	purA a189t-2F	TTAAATCTAGGtAGTGAATAACC
24	Đột biến định hướng điểm F	TAGCCTTAAATCTAGGTAGTGAATAACCATGGCAGCTA
25	Đột biến định hướng điểm R	TAGCTGCCATGGTTATTCACTACCTAGATTTAAGGCTA

Ví dụ 4-4: Đưa các biến thể vùng gen khởi động *purA* vào trong chủng CJI2330 và chủng CJI2332 có nguồn gốc từ ATCC6872 và đánh giá chúng

Sửa đổi vùng gen khởi động *purA* được đưa vào mỗi chủng CJI2330 sản sinh IMP có nguồn gốc từ chủng kiểu dại được điều chế trong ví dụ 1 và chủng CJI2332 được chọn trong ví dụ 4-1, lượng IMP được sản sinh bởi mỗi chủng được đánh giá. Để xác nhận sự có mặt của sửa đổi trong vùng gen khởi động gen *purA* của chủng CJI2332, bộ gen DNA của chủng CJI2332 được khuếch đại bằng PCR. Cụ thể, đầu tiên, các đoạn của vùng gen khởi động *purA* được khuếch đại bằng PCR sử dụng bộ gen DNA của chủng CJI2332 làm mạch khuôn và trình tự mỗi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 21, trong đó PCR được thực hiện 28 chu kỳ của biến tính 94°C trong 1 phút; ủ để gắn mỗi ở 58°C trong 30 giây và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút sử dụng Taq DNA polymeraza. Các trình tự nucleotit thu được của các đoạn vùng gen khởi động *purA* đã khuếch đại được phân tích, và kết quả là, đã xác nhận rằng trình tự nucleotit của vùng gen khởi động *purA* của chủng CJI2332 giống như chủng kiểu dại của *Corynebacterium stationis* ATCC6872.

Sau đó, các vector pDZ-PpurA(c143t)-purA, pDZ-PpurA(a189t)-purA, và pDZ-PpurA(c143t, a189t)-purA được biến nạp vào trong chủng CJI2330 và CJI2332, và các chủng trong đó mỗi vector được chèn vào trong nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp

tương đồng trình tự được chọn trên môi trường kanamycin (25 mg/L). Chủng sơ cấp được chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và nhờ đó các chủng trong đó sửa đổi trong vùng gen khởi động của gen đích đưa vào được chọn. Để xác nhận việc đưa vào sửa đổi gen trong chủng biến nạp cuối cùng, PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 21 và các sản phẩm PCR được xác nhận bằng giải trình tự. Kết quả là, đã được xác nhận rằng là sửa đổi gen được đưa vào trong các chủng. Các chủng được điều chế như vậy lần lượt được đặt tên tương ứng là CJI2330_PpurA(c143t)-purA, CJI2330_PpurA(a189t)-purA, CJI2330_PpurA(c143t, a189t)-purA, CJI2332_PpurA(c143t)-purA, và CJI2332_PpurA(a189t)-purA, CJI2332_PpurA(c143t, a189t)-purA.

Chủng CJI2332_PpurA(c143t)-purA được đặt tên là CJI2352 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký số KCCM12315P. Ngoài ra, CJI2332_PpurA(a189t)-purA được điều chế được đặt tên là CJI2365 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký số KCCM12314P.

Khả năng sản sinh IMP của mỗi chủng được đánh giá. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng sản xuất IMP được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 10 bên dưới.

Bảng 10

Chủng	IMP (g/L)
CJI2330	0,50
CJI2330_PpurA(c143t)-purA	0,58
CJI2330_PpurA(a189t)-purA	0,67
CJI2330_PpurA(c143t, a189t)-purA	0,72
CJI2332	1,74
CJI2332_PpurA(c143t)-purA	2,01
CJI2332_PpurA(a189t)-purA	2,29
CJI2332_PpurA(c143t, a189t)-purA	2,42

Ví dụ 5: Xác nhận khả năng sản sinh axit 5'-xanthylic khi đưa biến thể của vùng gen khởi động *purA* vào.

Ví dụ 5-1: Chọn các chủng sản sinh XMP có nguồn gốc từ chủng ATCC6872

Để điều chế chủng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat (XMP) có nguồn gốc từ ATCC6872, chủng *Corynebacterium stationis* ATCC6872 được hòa tan trong đệm phosphat (độ pH 7,0) và đệm xitrat (độ pH 5,5) có mật độ 10^7 tế bào/mL đến 10^8 tế bào/mL và được xử lý với UV ở nhiệt độ phòng hoặc 32°C trong 20 phút đến 40 phút để gây đột biến. Chủng được rửa 2 lần với dung dịch salin 0,85% và cấy trải, sau khi pha loãng trên môi trường tối thiểu chứa agar 1,7% được bổ sung nguyên liệu cung cấp sức đề kháng ở nồng độ thích hợp, do đó thu được các khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được cấy trong môi trường dinh dưỡng và sau đó được cấy trong môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, mỗi khuẩn lạc được nuôi trong môi trường lên men trong 3 đến 4 ngày, các khuẩn lạc biểu hiện sản sinh tốt XMP được tích lũy trong môi trường nuôi cấy được chọn. Cụ thể, chủng được chọn từ các chủng có thể phát triển trong môi trường có bổ sung thêm fluorotryptophan theo nồng độ (môi trường bổ sung), và cụ thể hơn là từ những chủng có thể phát triển trong môi trường chứa fluorotryptophan có nồng độ 100 mg/L và nồng độ axit 5'-xanthylic được tăng cường. Chủng được chọn được đặt tên là CJX1664.

- Môi trường tối thiểu: glucoza 20 g/L, KH_2PO_4 1g/L, K_2HPO_4 1g/L, urê 2 g/L, amoni sulfat 3 g/L, magiê sulfat 1 g/L, canxi clorua 100 mg/L, sắt sulfat 20 mg/L, mangan sulfat 10 mg/L, kẽm sulfat 10 mg/L, biotin 30 $\mu\text{g/L}$, thiamin hydroclorit 0,1 mg/L, đồng sulfat 0,8 mg/L, adenin 20 mg/L, guanin 20 mg/L, độ pH 7,2.

- Môi trường bổ sung: môi trường trong đó fluorotryptophan có các nồng độ 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L, và 200 mg/L được thêm vào trong môi trường tối thiểu.

Các đặc tính hóa sinh của chủng CJX1664 được thể hiện trong Bảng 11 bên dưới. Dựa vào Bảng 11, chủng CJX1664 có thể phát triển trong môi trường có fluorotryptophan được thêm vào có nồng độ 100 mg/L.

Bảng 11

Đặc điểm	ATCC6872	CJX1664
Kháng Fluorotryptophan	10 mg/L	100 mg/L

Chủng CJX1664 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 6 tháng 7 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số

đăng ký số KCCM12285P.

Ví dụ 5-2: Kiểm tra chuẩn độ lên men CJX1664

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) vào trong ống nghiệm (đường kính: 18 mm), ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJX1664 được cấy lần lượt vào và ủ lắ ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha trong mỗi bình tam giác lắ 250 mL và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy vào trong môi trường lên men và được nuôi trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh với tốc độ lắ ở 170 vòng/phút, 30°C và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo bởi HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 12 bên dưới.

Bảng 12

Chủng	XMP (g/L)
ATCC6872	0
CJX1664	4,72

Ví dụ 5-3: Đưa các biến thể vào trong chủng CJX1664 và đánh giá chúng

Để xác nhận sự có mặt của sửa đổi trong vùng gen khởi động của *purA* của chủng CJX1664 được chọn trong ví dụ 5-1, bộ gen DNA của chủng CJX1664 được khuếch đại bằng PCR. Cụ thể, đầu tiên, các đoạn vùng gen khởi động *purA* được khuếch đại bằng PCR sử dụng bộ gen DNA của chủng CJX1664 làm mạch khuôn và trình tự môi SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, trong đó PCR được thực hiện trong 28 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn môi ở 58°C trong 30 giây, trùng hợp ở 72°C trong 1 phút sử dụng Taq DNA polymeraza. Trình tự nucleotit thu được của các đoạn vùng gen khởi động *purA* được khuếch đại được phân tích, và kết quả là, xác nhận rằng là trình tự nucleotit của vùng gen khởi động *purA* của chủng CJI2332 là tương tự với chủng *Corynebacterium stationis* ATCC6872 kiểu dại.

Từng vector được điều chế trong các ví dụ 4-3 được biến nạp vào trong chủng CJX1664, và các chủng trong đó vector được chèn vào trong nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/l). Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và các chủng trong đó có

sửa đổi trong vùng gen khởi động của gen đích đưa vào được chọn. Sự có mặt của gen sửa đổi được đưa vào trong chủng được biến nạp cuối cùng được xác nhận bằng phân tích giải trình tự nucleotit.

Khả năng sản sinh XMP của các chủng CJX1664, CJX1664_PpurA(c143t)-purA, CJX1664_PpurA(a189t)-purA, và CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-purA được đánh giá. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng XMP sản xuất được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và các kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 13 bên dưới.

CJX1664_PpurA(c143t)-purA được đặt tên là CJX1680 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký số KCCM12311P. Ngoài ra, CJX1664_PpurA(a189t)-purA được đặt tên là CJX1668 và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký số KCCM12310P.

Bảng 13

Chủng	XMP (g/L)
CJX1664	4,72
CJX1664_PpurA(c143t)-purA	5,47
CJX1664_PpurA(a189t)-purA	5,91
CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-purA	6,01

Như có thể thấy trong Bảng 13 bên trên, đã xác nhận rằng các chủng CJX1664_PpurA(c143t)-purA, CJX1664_PpurA(a189t)-purA, và CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-purA đã biểu hiện tăng lượng sản xuất XMP là 27% so với chủng CJX1664 (tức là, chủng sản sinh XMP có nguồn gốc là ATCC6872).

Từ phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiện có của sáng chế sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không sửa đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm thiết yếu của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án ưu tiên được thực hiện ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án ưu tiên mà còn bao gồm nhiều phương án, sửa đổi, tương đương và các phương án khác có thể nằm trong nguyên lý và phạm vi của sáng chế như đã được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit có hoạt động vùng gen khởi động, trong đó, trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 1 có i) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine (T); ii) nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T); hoặc iii) nucleotit thứ 143 được thay thế bằng thymine và nucleotit thứ 189 được thay thế bằng thymine (T).
2. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4.
3. Chế phẩm cho biểu hiện gen chứa polynucleotit theo điểm 1.
4. Vectơ chứa gen mã hóa polynucleotit theo điểm 1 và protein đích.
5. Vectơ theo điểm 4, trong đó protein đích là adenylosuccinat synthetaza.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa vectơ theo điểm 4 hoặc 5.
7. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa gen mã hóa polynucleotit theo điểm 1 và protein đích.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó protein đích là adenylosuccinat synthetaza.
9. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium stationis*.
10. Phương pháp điều chế purin nucleotit bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 7 trong môi trường nuôi cấy.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp còn bao gồm thu hồi purin nucleotit từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy sau khi nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT ĐỘNG VÙNG GEN KHỞI ĐỘNG, CHẾ PHẨM CHO BIỂU HIỆN GEN, VECTƠ CHỨA GEN MÃ HÓA, VI SINH VẬT, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PURIN NUCLEOTIT

<130> OPA19089

<150> KR 10-2019-0022546

<151> 2019-02-26

<160> 25

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 200

<212> DNA

<213> Chưa xác định

<220>

<223> Vùng gen khởi động purA WT

<400> 1

```

ggcaaaattg ccgccgcagc ttcacgcgatt attttcagtt cttgacgcgt cggaatcgcc 60
gatacctggg gatattcaac atctggcacc gggacatcac cgcagcgcaa aatacgaact 120
tgcatggcta aatacattat cactggcgat aaaggtagag ttaacgcgta tttagcctta 180
aatctaggaa gtgaataacc                                     200

```

<210> 2

<211> 200

<212> DNA

<213> Chưa xác định

<220>

<223> Vùng gen khởi động được sửa đổi purA (a189t)

<400> 2

```

ggcaaaattg ccgccgcagc ttcacgcgatt attttcagtt cttgacgcgt cggaatcgcc 60
gatacctggg gatattcaac atctggcacc gggacatcac cgcagcgcaa aatacgaact 120
tgcatggcta aatacattat cactggcgat aaaggtagag ttaacgcgta tttagcctta 180
aatctaggta gtgaataacc                                     200

```

<210> 3

<211> 200
 <212> DNA
 <213> Chưa xác định

<220>
 <223> Vùng gen khởi động được sửa đổi purA(c143t)

<400> 3

```
ggcaaaattg ccgccgcagc ttcacgcgatt attttcagtt cttgacgcgt cggaatcgcc 60
gatacctggt gatattcaac atctggcacc gggacatcac cgcagcgcaa aatacgaact 120
tgcatggcta aatacattat cattggcgat aaaggtagag ttaacgcgta tttagcctta 180
aatctaggaa gtgaataacc 200
```

<210> 4
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Chưa xác định

<220>
 <223> Vùng gen khởi động được sửa đổi purA(c143t, a189t)

<400> 4

```
ggcaaaattg ccgccgcagc ttcacgcgatt attttcagtt cttgacgcgt cggaatcgcc 60
gatacctggt gatattcaac atctggcacc gggacatcac cgcagcgcaa aatacgaact 120
tgcatggcta aatacattat cattggcgat aaaggtagag ttaacgcgta tttagcctta 180
aatctaggta gtgaataacc 200
```

<210> 5
 <211> 1500
 <212> DNA
 <213> Chưa xác định

<220>
 <223> purF

<400> 5

```
gtggtgaaca ctactttccc cagcgcgctg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc 60
cgcaagagat gcggtgtctt tggcgtctgg gctcctggtg aagatgttgc gacactgacc 120
tactttgggtc tgttcgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggtat cggcgtcgggt 180
gatggagacc gcctcggttg cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat tttcgatgag 240
```



```

tccatttttaa attccctcca tggctccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctcgactgcc 300
ggtggcaaaag agtggtcgaa tgtccagccg atgtttaata ccacctcaaa tggggtagac 360
atcgcttttgt gccacaacgg caacttggtg aactaccaag aactgcgcga tgaagcagta 420
gctctgggac tttaccgaga gaatgaaaaa tccctgtcgg attccatgat catgacagct 480
ttgctggcgc acggagtcgg ggaaggcaac tctgtctttg acgccgctaa gcaactgctg 540
ccaagcatca aaggcgcttt ttgcttgacc tttaccgatg gcaagacctt gtacgccgcg 600
cgtgacccgc acgggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttggt 660
gcttccgaaa cctgtgcgct ggatatcgtg ggcgcacagt ttatccgtga ggtagagccc 720
ggtgaactta tctctgtcaa tgaggcagga atccacagcg aaaaattcgc tgagccgaag 780
cgccagggct gcgtctttga atacgtctac ttggcacgctc cagacaccgt gatcaaaggc 840
cgcaacgttc acgcgacgcg cgtggatatt ggtcgcgcac ttgcgaaatc tcaccctgcg 900
ccagaagctg acatggtcat ccccggtcca gaatccgaa acccggcagc tgttggtctac 960
gcccggaat cgggcctgac atttgcgcac ggcttgggtca aaaacgccta cgtgggtcga 1020
accttcattc agcccacca gaccttgcgc cagctgggta ttgcctcaa gctcaacccc 1080
ctgcgcgagg tcatcgaggg caagtcactc gttgtttag atgactctat tgtccgcggc 1140
aacacccaac gcgcgctggt gcgcatgctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgcacgtg 1200
cgcatgtgtt caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgcctcgcct 1260
ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatcctc aggtagtaac cgatgcagtg 1320
tgcaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca 1380
acgcaccaac ctatcaattc cttgtgtacc gcttgctttg atggcaacta cgaactcgga 1440
cttccgaccg ctaaccccaa tgctgacgct gtgcgaactt tgctcagcca aaagaactga 1500

```

```

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> purF gla-1

```

```

<400> 6

```

```

gctctagacc actctaagac gcggccacc

```

29

```

<210> 7
<211> 37
<212> DNA

```

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> purF gla-2

<400> 7

aagtagtggt caccatgacg ctgattctac taagttt

37

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> purF gla-3

<400> 8

agtagaatca gcgtcatggt gaacactact ttccccag

38

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> purF gla-4

<400> 9

gctctagact gtgcgcccac gatatccag

29

<210> 10

<211> 1821

<212> DNA

<213> Chưa xác định

<220>

<223> guaB

<400> 10

atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataaggttgc attgcatggc 60

ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggttcc gtcggaagta 120

gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgttttaggta ttcctttggc atcggctgcg 180

atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cacgccaggg tggcattggt 240

gtcttgcacc gcaacttgtc ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc 300

atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataaggttgc attgcatggc 360

```

ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta 420
gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgtttaggta ttcctttggc atcggctgcg 480
atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cacgccaggg tggcattggt 540
gtcttgccacc gcaacttgtc ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc 600
tctgagtccg gcatggtcac cgaccctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa 660
gttgatgacc tgtgtgcacg cttccgcac tctggtcttc ctgtggtcaa cgaagacggc 720
accttggttg gcatattgcac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgaag 780
gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa 840
gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac 900
aacaagctgg tcggtctgat taccgttaaa gactttgtta agaccgaaca gttcccgaat 960
tcctccaagg atgcttcggg ccgcttgcta gtagcagcag gtattggtac cggcgaggag 1020
tcttatgagc gtgcaggctt gcttgctgat gccggcgtgg acgttctcat tgtcgactcc 1080
gcacacgcgc acaataaccg cgtgctggaa atgggtctgc gcgtcaagaa tgacttcggc 1140
tccaagattg atgttgctcg cggaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcgatgatt 1200
gaggctggcg cagacgccat caagggtggg attggtcctg gttctatctg caccaccctg 1260
gtggttgctg gtggttggtg accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct 1320
tctgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcggcatgc agtactccgg tgacgttgct 1380
aaggcttttg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcgc aggcaccctg 1440
gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg 1500
ggttcgatgg gcgctatgca aggccgtggc ctctccggcg agaagcgttc ttactccaag 1560
gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1620
ggcaaggttc cttaccgcgg cgaaattggt cagattacc accagattgt gggcggtttg 1680
cgcgcgga tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1740
gtgcgtatta cactgctgg cttggctgag tcgcacccgc accacctgca gcaaactgta 1800
gaagctccga actaccgtta a 1821

```

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> guaB alt-1

<400> 11

gctctagact acgacaacac ggtgcctaa

29

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> guaB alt-2

<400> 12

cacgattttc ggtcaatacg ggtcttctcc ttcgcac

37

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> guaB alt-3

<400> 13

aggagaagac ccgtattgac cgaaaatcgt gtttct

36

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> guaB alt-4

<400> 14

gctctagaat cgacaagcaa gcctgcacg

29

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng gen khởi động purA F

<400> 15

ggggtaccgg caaaattgcc gccgcagct

29

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng gen khởi động purA R
 <400> 16
 gggatatcgg ttattcactt cctagattt 29
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> purA lib.R
 <400> 17
 ttatttgtag agctcatcca t 21
 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Vùng gen khởi động purA F để nhân vector PDZ
 <400> 18
 gctctagaac ggtcacgcgc aaatcag 27
 <210> 19
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> purA c143t-1R
 <400> 19
 ctacctttat cgccaatgat aatgtattta gccatg 36
 <210> 20
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> purA c143t-2F
 <400> 20
 ctaaatacat tatcattggc gataaaggta gagtt 35
 <210> 21

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng gen khởi động purA R để nhân vector PDZ

 <400> 21

 gctctagatc gtaggcgacg caaatagg 28

 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA a189t-1R

 <400> 22

 ggttattcac tacctagatt taag 24

 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA a189t-2F

 <400> 23

 ttaaatctag gtagtgaata acc 23

 <210> 24
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đột biến định hướng điểm F

 <400> 24

 tagccttaaa tctaggtagt gaataaccat ggcagcta 38

 <210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đột biến định hướng điểm R

 <400> 25

 tagctgccat gggtattcac tacctagatt taaggcta 38