(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) **1-0036196**

(51)[7] **C12N 9/10**; C12P 13/06; C12N 15/52; C12N 15/77

(13) **B**

(21) 1-2019-04022
(22) 20/10/2017
(86) PCT/KR2017/011622 20/10/2017
(87) WO 2018/124440 05/07/2018
(30) 10-2016-0181343 28/12/2016 KR
(45) 25/07/2023 424
(43) 25/10/2019 379A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) LEE, Ji Hye (KR); SONG, Byeong Cheol (KR); JEON, Ae Ji (KR); KIM, Jong Hyun (KR); KIM, Hye Won (KR).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) POLYPEPTIT ĐƯỢC BIẾN ĐỔI CÓ HOẠT TÍNH SYNTHAZA ISOPROPYLMALAT VÀ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit được biến đổi mới có hoạt tính synthaza isopropylmalat, polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi, vi sinh vật bao gồm polynucleotit, và phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit được biến đổi mới có hoạt tính synthaza isopropylmalat, polynucleotit mã hóa polypeptit này, vi sinh vật bao gồm polypeptit này, và phương pháp sản xuất L-leuxin bằng việc nuôi cấy vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-leuxin là axit amin thiết yếu, một loại axit amin đắt tiền và được sử dụng phổ biến trong dược phẩm, thực phẩm, phụ gia thức ăn chăn nuôi, công nghiệp hóa chất, v.v. Ngoài ra, L-leuxin được sản xuất chủ yếu bằng cách sử dụng vi sinh vật. Quá trình lên men của các axit amin mạch nhánh bao gồm L-leuxin được thực hiện chủ yếu thông qua vi sinh vật của chi *Escherichia* hoặc vi sinh vật của chi *Corynebacterium*, được biết là 2-ketoisocaproat sinh tổng hợp như tiền chất từ axit pyruvic thông qua một vài bước (các Patent Hàn Quốc số 10-0220018 và 10-0438146).

Synthaza isopropylmalat (sau đây được gọi là "IPMS"), là enzym có trong quá trình sinh tổng hợp của leuxin, là enzym ở bước thứ nhất trong quá trình sinh tổng hợp của leuxin, mà chuyển đổi 2-ketoisovalerat, được sản xuất trong suốt con đường sinh tổng hợp valin thành isopropylmalat, cho phép sinh tổng hợp của leuxin thay vì valin, và do đó IPMS là enzym quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp leuxin. Tuy nhiên, IPMS phải chịu sự ức chế phản hồi bởi L-leuxin, mà là sản phẩm cuối cùng, hoặc các dẫn xuất của chúng. Theo đó, mặc dù có nhiều lĩnh vực kỹ thuật trước đó liên quan đến các biến thể IPMS mà giải phóng sự ức chế phản hồi đối với mục đích sản xuất nồng độ cao leuxin (công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015-0079641, và patent Mỹ số 6403342), nghiên cứu vẫn đang tiếp tục để phát hiện các biến thể tốt hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã cố gắng để phát triển biến thể IPMS mà có thể được sử dụng đối với việc sản xuất L-leuxin với nồng độ cao, và kết quả là, các tác giả sáng

chế đã phát triển biến thể IPMS mới. Các biến thể được xác nhận là đã giải phóng sự ức chế phản hồi bằng L-leuxin, mà là sản phẩm cuối cùng, và tăng cường hoạt tính của chúng sao cho biến thể có khả năng sản xuất L-leuxin với hiệu suất cao từ các vi sinh vật chứa L-leuxin, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng là đề xuất polypeptit được biến đổi có hoạt tính synthaza isopropylmalat.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật của chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin, bao gồm polypeptit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường.

Lợi ích của sáng chế

Polypeptit được biến đổi có hoạt tính của synthaza isopropylmalat là polypeptit trong đó hoạt tính được tăng so với polypeptit kiểu dại và sự ức chế phản hồi bởi L-leuxin được giải phóng và nhờ đó L-leuxin có thể được sản xuất với hiệu suất cao bằng cách sử dụng polypeptit được biến đổi này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích của sáng chế, khía cạnh của sáng chế đề xuất polypeptit được biến đổi mới có hoạt tính synthaza isopropylmalat. Polypeptit được biến đổi mới có thể là polypeptit được biến đổi có hoạt tính synthaza isopropylmalat, trong đó arginin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin ngoài arginin, hoặc glyxin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin khác ngoài glyxin. Polypeptit được biến đổi của sáng chế không chỉ có hoạt tính cao hơn polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1 có hoạt tính synthaza isopropylmalat, mà còn có đặc tính ức chế phản hồi bởi L-leuxin được giải phóng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "synthaza isopropylmalat" đề cập đến enzym chuyển hóa 2-ketoisovalerat thành isopropylmalat, mà là tiền chất của L-leuxin, bằng phản ứng với axetyl-CoA. Synthaza isopropylmalat của sáng chế có thể được bao gồm miễn là enzym có hoạt động chuyển hóa, không phân biệt nguồn gốc của vi sinh vật. Cụ thể là, synthaza isopropylmalat có thể là enzym được lấy từ vi sinh vật của chi *Corynebacterium*. Cụ thể hơn nữa là, synthaza isopropylmalat có thể là synthaza isopropylmalat có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, và cụ thể là, nó có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, synthaza isopropylmalat có thể bao gồm polypeptit có độ tương đồng ít nhất là 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Ví dụ, rõ ràng là trình tự axit amin có độ tương đồng như vậy và thể hiện hiệu quả tương ứng với synthaza isopropylmalat có thể nằm trong phạm vi của sáng chế ngay cả khi nó có trình tự axit amin trong đó một số trình tự được xóa, được biến đổi, được thế hoặc được thêm vào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm tăng hoạt tính của synthaza isopropylmalat" đề cập đến sự gia tăng hoạt động chuyển hóa thành isopropylmalat. Do đó, polypeptit được biến đổi của sáng chế có mức hoạt động chuyển hóa isopropylmalat cao hơn so với polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1 có hoạt tính của synthaza isopropylmalat. Hoạt động chuyển hóa isopropylmalat có thể được xác nhận trực tiếp bằng cách đo mức độ của isopropylmalat được sản xuất, hoặc có thể được xác nhận gián tiếp bằng cách đo mức độ của CoA được sản xuất. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm tăng hoạt tính" có thể được dùng kết hợp với "hoạt tính được tăng cường". Hơn nữa, isopropylmalat là tiền chất của L-leuxin, và do đó việc sử dụng polypeptit được biến đổi theo sáng chế dẫn đến việc sản xuất hàm lượng cao hơn của L-leuxin so với polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1 có hoạt tính của synthaza isopropylmalat.

Ngoài ra, không giống như polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1 có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, polypeptit được biến đổi theo sáng chế có thể được đặc trưng ở chỗ sự ức chế phản hồi bởi L-leuxin, mà là sản phẩm cuối cùng, hoặc dẫn xuất của chúng được giải phóng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự ức chế phản hồi" đề cập đến sự ức chế của phản ứng ở trạng thái sớm của hệ thống enzym bằng sản phẩm

cuối cùng trong hệ thống enzym. Đối với các mục đích của sáng chế, sự ức chế phản hồi có thể là sự ức chế phản hồi trong đó L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng thể hiện hoạt tính của synthaza isopropylmalat, mà sắp xếp bước thứ nhất của con đường sinh tổng hợp, nhưng không bị giới hạn ở đó. Do đó, khi sự ức chế phản hồi của synthaza isopropylmalat được giải phóng, hiệu suất của L-leuxin có thể được gia tăng so với trường hợp không giải phóng L-leuxin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự biến đổi", "được biến đổi", hoặc "biến thể" đề cập đến môi trường nuôi cấy hoặc cá thể thể hiện sự biến đổi không di truyền hoặc không kế thừa có kiểu hình ổn định. Cụ thể là, thuật ngữ "biến thể" có thể được dùng để chỉ một biến thể trong đó hoạt tính của nó được tăng lên một cách hiệu quả bởi vì trình tự axit amin tương ứng với synthaza isopropylmalat có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* được biến đổi so với kiểu dại, biến thể trong đó sự ức chế phản hồi bởi L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng được giải phóng, hoặc biến thể trong đó việc gia tăng hoạt tính và sự ức chế phản hồi đều được giải phóng.

Cụ thể là, polypeptit được biến đổi của sáng chế có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, có thể là polypeptit được biến đổi có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, trong đó arginin, axit amin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin ngoài arginin, hoặc glyxin, gốc axit amin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin khác ngoài glyxin. Các axit amin khác ngoài arginin có thể bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, methionin, glyxin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin, glutamin, lysin, histidin, axit aspartic, và axit glutamic; và các axit amin khác ngoài glyxin có thể bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, methionin, arginin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin, glutamin, lysin, histidin, axit aspartic, và axit glutamic; tuy nhiên không giới hạn chỉ ở các axit amin này. Cụ thể hơn là, polypeptit được biến đổi có thể là polypeptit được biến đổi, trong đó arginin, gốc axit amin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với histidin, alanin, hoặc glutamin; hoặc glyxin, gốc axit amin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, được thế với axit aspartic, arginin, hoặc tyrosin, nhưng không bị giới

hạn ở đó. Ngoài ra, polypeptit được biến đổi có thể là polypeptit trong đó arginin ở vị trí 558 được thế với histidin, alanin hoặc glutamin, và glyxin ở vị trí 561 được thế với axit aspartic, arginin, hoặc tyrosin, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể nhất là, polypeptit được biến đổi có thể bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 21 đến SEQ ID NO: 35.

Ngoài ra, polypeptit được biến đổi có thể bao gồm polypeptit có độ tương đồng ít nhất là 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 21 đến SEQ ID NO: 35. Ví dụ, rõ ràng là biến thể enzym có trình tự axit amin, trong đó một số trình tự được loại bỏ, được biến đổi, được thế, hoặc được thêm vào trong khi trình tự axit amin được biến đổi tương ứng với trình tự axit amin ở các vị trí 558 và/hoặc 561 được cố định, cũng nên nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là trình tự axit amin có độ tương đồng ở trên và thể hiện hiệu quả tương ứng với trình tự axit amin của synthaza isopropylmalat. Mặt khác, các vị trí 558 và 561, mà là các vị trí biến đổi cụ thể, để chỉ các vị trí mà được xác định dựa trên đầu N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và do đó, thực tế là các vị trí này được xác định bằng cách xem xét số lượng các axit amin mà được thêm vào hoặc loại bỏ khỏi đầu N của SEQ ID NO: 1 là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và do vậy cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, leuA, mà là gen mã hóa synthaza isopropylmalat, được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 bao gồm 616 axit amin. Tuy nhiên, trong một số tài liệu tham khảo, bộ ba mã hóa khởi đầu dịch mã được biểu thị 35 axit amin hướng xuống theo trình tự của gen leuA, tức là, gen bao gồm 581 axit amin. Trong trường hợp này, axit amin 558 được giải thích như axit amin 523 và axit amin 561 như axit amin 526, và do đó nằm trong phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "độ tương đồng" đề cập đến tỷ lệ phần trăm tương đồng của hai gốc polynucleotit hoặc polypeptit. Độ tương đồng giữa các trình tự gốc này với gốc còn lại có thể được xác định bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ tương đồng có thể được xác định bằng cách sắp xếp trực tiếp thông tin trình tự, tức là các thông số chẳng hạn như điểm số, độ tương đồng, độ tương tự, v.v. của hai gốc polynucleotit hoặc hai gốc polypeptit bằng cách sử dụng chương trình truy cập máy tính (ví dụ: BLAST 2.0). Ngoài ra, độ tương đồng giữa các

polynucleotit có thể được xác định bằng cách lai tạo các polynucleotit trong điều kiện sản xuất sợi đôi ổn định giữa các vùng tương đồng, tháo rời nucleaza cụ thể dạng sợi đơn, sau đó là xác định kích thước của các mảnh được tháo rời này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi.

Polynucleotit có thể là polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, trong đó arginin, axit amin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin khác ngoài arginin, hoặc glyxin, gốc axit amin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc axit amin khác ngoài glyxin. Cụ thể là, polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 đến 35 và hoạt tính của synthaza isopropylmalat; polypeptit được biến đổi có độ tương đồng ít nhất là 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với polypeptit ở trên; hoặc mã hóa polypeptit được biến đổi có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, trong đó một số trình tự được loại bỏ, được biến đổi, được thế hoặc được thêm vào trong khi trình tự axit amin được biến đổi ở các vị trí 558 và/hoặc 561, mà là các vị trí biến đổi cụ thể trong polypeptit ở trên, được cố định có thể bao gồm mà không giới hạn. Ngoài ra, các đoạn dò có thể được tạo ra từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự mã hóa protein có hoạt tính của synthaza isopropylmalat bằng cách lai trình tự bổ trợ cho tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit trong những điều kiện nghiêm ngặt, có thể được bao gồm nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dung ở đây, thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" để chỉ các điều kiện mà tạo ra thể lai được đề cập trong khi không tạo ra thể lai không đặc hiệu. Ví dụ về các điều kiện này bao gồm các điều kiện trong đó các gen có các mức độ tương đồng, chẳng hạn như các gen có độ tương đồng là 80% hoặc lớn hơn, cụ thể là 90% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn nữa là 97% hoặc lớn hơn, cụ thể nhất là 99% hoặc lớn hơn, lai với nhau trong khi các gen có các mức tương đồng thấp không lai với nhau, hoặc các điều kiện mà gen được rửa một lần, cụ thể là 2 và 3 lần ở nhiệt độ và nồng độ muối tương đương với 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, cụ thể là 60°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS, và cụ thể hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS, mà là các điều kiện để rửa của việc lai Southern thông thường (Sambrook *et al.*,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)).

Đoạn dò được sử dụng trong kỹ thuật lai có thể là một phần của trình tự bổ trợ của trình tự nucleotit. Đoạn dò có thể được xây dựng bằng PCR sử dụng oligonucleotit được tạo ra dựa trên trình tự đã biết làm mồi và đoạn gen chứa trình tự nucleotit làm khuôn. Ví dụ, đoạn gen có độ dài khoảng 300bp có thể được sử dụng như đoạn dò. Cụ thể hơn nữa là, trong trường hợp sử dụng đoạn dò có độ dài (khoảng 300bp), 50°C, 2×SSC, và 0,1% SDS có thể được đề xuất cho các điều kiện rửa của quá trình lai.

Mặt khác, polynucleotit có thể là polynucleotit có trình tự nucleotit của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36 đến SEQ ID NO: 50, và rõ ràng là polynucleotit cũng bao gồm một polynucleotit mà có thể được phiên mã thành polypeptit được biến đổi bởi sự thoái hóa bộ ba mã hóa.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vi sinh vật của chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin, bao gồm polypeptit được biến đổi.

Trong sáng chế, vi sinh vật có thể bao gồm tất cả các vi sinh vật được sản xuất nhân tạo thông qua sự biến đổi hoặc vi sinh vật có trong tự nhiên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự biến nạp" dùng để chỉ việc đưa gen vào trong tế bào chủ để biểu hiện. Trong sáng chế, phương pháp biến nạp bao gồm phương pháp bất kỳ mà đưa gen vào trong tế bào và có thể được thực hiện bằng cách chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về phương pháp biến nạp là kỹ thuật điện phân, đồng kết tủa canxi phosphat, tiêm retrovirut, vi tiêm, DEAE-dextran, liposom cation, phương pháp sốc nhiệt, v.v. nhưng không bị giới hạn ở đó.

Gen được biến nạp có thể bao gồm cả dạng được chèn vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ và dạng nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, gen bao gồm ADN và ARN như polynucleotit có khả năng mã hóa polypeptit, và gen bất kỳ mà có thể được đưa vào và được biểu hiện trong tế bào chủ có thể được dùng mà không giới hạn ở đó. Ví dụ, gen có thể được đưa vào trong tế bào chủ ở dạng băng biểu hiện, mà là cấu trúc polynucleotit chứa tất cả các

thành phần cần thiết cho việc tự biểu hiện. Băng biểu hiện thường bao gồm vùng gen khởi đầu được liên kết có thể hoạt động với gen, tín hiệu kết thúc phiên mã, các vị trí liên kết ribosom và tín hiệu kết thúc phiên mã. Băng biểu hiện có thể ở dạng vectơ biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, gen có thể là gen được đưa vào trong tế bào chủ của chính nó hoặc ở dạng của cấu trúc polynucleotit, tức là, dạng của vectơ, và được liên kết có thể hoạt động với trình tự được yêu cầu đối với việc biểu hiện trong tế bào chủ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vectơ" đề cập đến bất kỳ chất mang để tách dòng và/hoặc chuyển các nucleotit đến tế bào chủ. Vectơ có thể là đơn vị sao chép cho phép sao chép các đoạn được kết hợp với các mảnh ADN khác. "Đơn vị sao chép" dùng đề chỉ bất kỳ đơn vị gen hoạt động như tự sao chép cho đến khi sao chép ADN *in vivo*, tức là, có thể tự sao chép bằng việc tự điều hòa (ví dụ, plasmit, thực tế, cosmit, nhiễm sắc thể, và virut). Thuật ngữ "vectơ" có thể bao gồm các chất mang virut và chất mang không phải virut để đưa các nucleotit vào trong tế bào chủ *in vitro, ex vivo,* hoặc *in vivo* và cũng có thể bao gồm ADN hình cầu nhỏ. Ví dụ, vectơ có thể là plasmit mà không phải là trình tự ADN vi khuẩn. Việc loại bỏ trình tự ADN vi khuẩn mà giàu trong khu vực CpG đã được thực hiện để giảm sự im lặng của việc biểu hiện gen chuyển và để thúc đẩy việc biểu hiện liên tục nhiều hơn từ vectơ ADN plasmit (ví dụ Ehrhardt, A. *et al*. (2003) Hum Gene Ther 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) MoI Ther 5: 731-38; Chen, Z. Y. *et al*. (2004) Gene Ther 11: 856-64). Thuật ngữ "vectơ" có thể bao gồm gen nhảy chẳng hạn như Sleeping Beauty (Izsvak *et al*. J. Mol. Biol. 302:93-102 (2000)), hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo. Các ví dụ về các vectơ thường được sử dụng có thể là các plasmit tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virut, và thể thực khuẩn. Ví dụ, như vectơ thể thực khuẩn hoặc vectơ cosmit, pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng. Ngoài ra, vectơ plasmit, kiểu pDZ, kiểu pBR, kiểu pUC, kiểu pBluescriptII, kiểu pGEM, kiểu pTZ, kiểu pCL, kiểu pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể hơn là, vectơ pECCG117 có thể được sử dụng. Vectơ có thể được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và các vectơ biểu biện/vectơ thay thế đã biết có thể được sử dụng.

Ngoài ra, vectơ có thể là vectơ tái tổ hợp mà có thể bao gồm thêm nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen kháng kháng sinh" dùng để chỉ gen có

khả năng kháng kháng sinh, và các tế bào bao gồm gen này sống sót thậm chí trong môi trường được xử lý với kháng sinh tương ứng. Do đó, gen kháng kháng sinh có thể được sử dụng hiệu quả như chất đánh dấu chọn lọc cho việc sản xuất quy mô lớn của các plasmit trong vi sinh vật, chẳng hạn *E.coli*, v.v.. Trong sáng chế, do gen kháng kháng sinh không phải là yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả biểu hiện có được nhờ sự kết hợp tối ưu các thành phần của vectơ, đó là dấu hiệu chính của sáng chế, nên có thể sử dụng bất kỳ gen kháng kháng sinh thông thường có thể được sử dụng như chất đánh dấu lựa chọn mà không giới hạn. Cụ thể là, các gen kháng lại ampixilin, tetraxyclin, kanamyxin, chloramphenicol, streptomyxin, hoặc neomyxin có thể được sử dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được liên kết có thể hoạt động" dùng để chỉ việc liên kết có thể hoạt động của trình tự điều hòa để biểu hiện nucleotit với trình tự nucleotit mã hóa protein đích để thực hiện chức năng chung của nó, nhờ đó tác động đến việc biểu hiện trình tự nucleotit mã hóa. Liên kết có thể hoạt động với vectơ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và việc phân cắt và gắn ADN vị trí cụ thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng enzym giới hạn và ligaza đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào chủ trong đó vectơ được đưa vào (được biến đổi)" để chỉ tế bào được vận chuyển với vectơ có gen mã hóa một hoặc nhiều protein đích. Tế bào chủ có thể bao gồm bất kỳ vi sinh vật nhân sơ và vi sinh vật nhân chuẩn miễn là vi sinh vật bao gồm polypeptit được biến đổi có khả năng sản xuất synthaza isopropylmalat bằng các đưa vectơ ở trên vào. Ví dụ, chủng vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Providencia*, *Corynebacterium*, và *Brevibacterium* có thể được bao gồm. Ví dụ về vi sinh vật của chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Vi sinh vật của chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin, mà có khả năng biểu hiện polypeptit được biến đổi có hoạt tính của synthaza isopropylmalat, bao gồm tất cả các vi sinh vật có thể biểu hiện polypeptit được biến đổi bằng nhiều phương pháp đã biết khác nhau, ngoài việc đưa vectơ vào.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-leuxin bao gồm

các bước: (a) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin; và (b) thu hồi L-leuxin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường được nuôi cấy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nuôi cấy" để chỉ việc nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện môi trường được kiểm soát phù hợp. Quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện phụ thuộc vào môi trường thích hợp và điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quá trình nuôi cấy có thể được điều chỉnh dễ dàng và được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào chủng được chọn. Cụ thể là, nuôi cấy có thể bao gồm nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy theo mẻ lên men, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Các nguồn cacbon có trong môi trường có thể bao gồm đường và cacbonhydrat, chẳng hạn như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo, chẳng hạn như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa, v.v.; các axit béo, chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu, chẳng hạn như glyxerol và etanol; và các axit hữu cơ, chẳng hạn như axit axetic. Các chất này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Các nguồn nitơ có trong môi trường có thể bao gồm các nguồn nitơ hữu cơ, chẳng hạn như pepton, chiết xuất men, nước thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô ngâm, và đậu tương; và các nguồn nitơ vô cơ, như urê, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với nhau, nhưng không bị giới hạn ở đó. Các nguồn phospho có trong môi trường có thể bao gồm kali đihydrogen phosphat, đikali hydrogen phosphat, và các muối chứa natri tương ứng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, các muối kim loại như magie sulfat và sắt sulfat có thể được bao gồm. Ngoài ra, các axit amin, vitamin, tiền chất thích hợp, v.v. có thể được bao gồm. Môi trường hoặc tiền chất có thể được thêm vào quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc quá trình nuôi cấy liên tục để nuôi cấy, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Độ pH của mẫu nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong suốt quá trình nuôi cấy bằng cách thêm hợp chất thích hợp chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric, và việc hình thành bọt có thể bị ức chế trong quá trình nuôi cấy bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như este của polyglycol axit béo. Để duy trì các điều kiện hiếu khí của mẫu nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy có thể

được bơm vào trong môi trường nuôi cấy. Để duy trì các điều kiện hiếu khí và các điều kiện ưa khí, không bơm khí hoặc bơm nitơ, hydro, cacbon dioxit vào. Nhiệt độ của việc nuôi cấy có thể là 27°C đến 37°C, và cụ thể hơn là 30°C đến 35°C, nhưng không bị giới hạn ở đó. Giai đoạn nuôi cấy có thể được tiếp tục miễn là lượng mong muốn của chất hữu hiệu được thu hồi, và tốt hơn là trong vòng từ 10 đến 100 giờ, nhưng thời gian nuôi cấy không bị giới hạn ở đó.

Bước thu hồi L-leuxin được sản xuất trong bước nuôi cấy theo sáng chế có thể thu thập L-leuxin mong muốn từ vi sinh vật hoặc môi trường bằng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này phụ thuộc vào các phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC. v.v. có thể được sử dụng, và phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để thu hồi L-leuxin mong muốn, từ môi trường hoặc vi sinh vật. Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh sạch.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết cùng với các phương án minh họa kèm theo. Tuy nhiên, các phương án minh họa này được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được coi là làm giới hạn phạm vi kỹ thuật của sáng chế.

Ví dụ 1: Xác nhận trình tự nucleotit leuA của KCCM11661 P, vi sinh vật sản xuất leuxin.

Corynebacterium glutamicum ATCC14067 được đưa vào trong môi trường nhân giống có các thành phần được mô tả bên dưới ở 121°C trong 15 phút, sau đó được nuôi cấy trong 13 giờ, và sau đó, 25mL môi trường nuôi cấy được thu hồi. Môi trường nuôi cấy được thu hồi được rửa với 100 mM chất đệm xitrat được xử lý bằng *N*-metyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (NTG) trong 30 phút đến khi nồng độ cuối cùng là 400 μg/mL. Sau đó, chất thu được được rửa với 100 mM chất đệm phosphat. Tỷ lệ chết của các chủng được xử lý với NTG được xác định là 99,6% là kết quả khi phết các chủng trong môi trường tối thiểu có các thành phần được mô tả bên dưới. Để đạt được các biến thể kháng norleuxin (NL), các chủng được xử lý NTG được phết lên môi trường tối thiểu với các nồng độ cuối cùng lần lượt là 20mM, 40mM, được cấy ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày, và sau đó các biến thể kháng NL được thu lại.

Môi trường nhân giống

Glucoza (20 g), pepton (10 g), chiết xuất men (5 g), cacbamit (1,5 g), KH_2PO_4 (4 g), K_2HPO_4 (8 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), biotin (100 µg), thiamin hydroclorua (1,000 µg), axit canxi-pantothenic (2000 µg), nicotinamit (2,000 µg); trên 1 lít nước pha loãng), độ pH là 7,0.

Môi trường sản xuất

Glucoza (100 g), $(NH_4)_2SO_4$ (40 g), protein đậu nành (2,5 g), rượu ngô rắn (5 g), urê (3 g), KH_2PO_4 (1 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), biotin (100 µg), thiamin hydroclorua (1000 µg), axit canxi-pantothenic (2000 µg), nicotinamit (3,000 µg), $CaCO_3$ (30 g; trên 1 lít nước pha loãng), độ pH là 7,0.

Các biến thể thu được bằng phương pháp nêu trên được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28 và được gửi đến trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (Korean Culture Center of Microorganisms), cơ quan có thẩm quyền quốc tế, vào ngày 22 tháng 01 năm 2015, theo Hiệp ước Budapest, và kết quả là, *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28 được lưu giữ theo các số truy cập lần lượt là KCCM11661P và KCCM11662P. *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28 sản xuất L-leuxin với nồng độ lần lượt là 2,7 g/L và 3,1 g/L. Do đó, hiệu suất của L-leuxin được sản xuất từ các biến thể được xác nhận là gấp hơn 10 lần so với kiểu dại.

Ngoài ra, các nỗ lực được thực hiện để xác nhận xem biến thể của leuA mã hóa synthaza isopropylmalat (IPMS) có xảy ra trong biến thể KCCM11661P không. Trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của leuA kiểu dại được xác nhận bằng cách tham chiếu đến WP_003863358.1 của ngân hàng gen. ADN nhiễm sắc thể của biến thể được khuếch đại bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là "PCR"). Mặc dù, người ta biết rằng gen leuA bao gồm 616 axit amin, trong một số tài liệu tham khảo, được công bố là bộ ba mã hóa khởi đầu dịch mã được biểu thị 35 axit amin hướng xuống theo trình tự của gen leuA, và nhờ đó gen leuA bao gồm 581 axit amin. Trong trường hợp này, số lượng vị trí biểu thị sự biến đổi của axit amin tương ứng có thể khác nhau. Do đó, trong trường hợp gen leuA được xem là bao gồm 581

axit amin, vị trí biến thể được chỉ định thêm trong ngoặc đơn.

Cụ thể là, PCR được thực hiện bằng cách dùng ADN nhiễm sắc thể của biến thể làm khuôn và sử dụng các mồi nêu trong SEQ ID NO: 3 và 4 theo các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong vòng 1 phút; ủ ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút sử dụng Taq ADN polymeraza. PCR được lặp lại tổng cộng 28 lần để khuếch đại một đoạn có khoảng 2700 cặp bazơ. Trình tự nucleotit của đoạn được phân tích bằng cách sử dụng mồi giống nhau, và kết quả là, xác nhận được G, là nucleotit 1673 của leuA trong KCCM11661P, được thế với A. Kết quả này chỉ ra rằng arginin này, là axit amin 558 (hoặc axit amin 523; sau đây chỉ gọi là axit amin 558) được thế với histidin. Ngoài ra, xác nhận được GC, là các nucleotit thứ 1682 và 1683 được thế với AT. Kết quả này chỉ ra rằng glyxin, là axit amin 561 (hoặc axit amin 526, sau đây chỉ gọi là axit amin 561) được thế với axit aspartic.

Ví dụ 2: Sản xuất vectơ thế của biến thể IPMS

Để sản xuất vectơ chứa trình tự nucleotit được biến đổi được xác nhận trong Ví dụ 1, PCR được thực hiện bằng cách dùng ADN nhiễm sắc thể của biến thể làm khuôn và sử dụng các mồi của các SEQ ID NO: 5 và 6 theo các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong vòng 1 phút; ủ ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút bằng cách dùng Pfu ADN polymeraza. PCR được lặp lại tổng cộng 25 lần để khuếch đại một đoạn khoảng 1460 cặp bazơ với các vị trí enzym giới hạn SalI và XbaI. Đoạn khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn, SalI và XbaI, và sau đó pDZ-leuA (R558H, G561D) được tạo ra bằng cách gắn với vectơ pDZ ((Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn sáng chế quốc tế 2008-033001) được xử lý với các enzym tương tự. Ngoài ra, để tạo ra vectơ với mỗi biến thể, ATCC14067 được sử dụng làm khuôn, và sau đó 2 đoạn được khuếch đại bằng cách sử dụng các mồi 5 và 7, và các mồi 8 và 6, tương ứng. PCR được thực hiện bằng cách dùng hai mảnh được tạo ra làm mẫu theo các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong vòng 1 phút; ủ ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút dùng Pfu ADN polymeraza. PCR được lặp lại tổng cộng số 25 lần để khuếch đại một đoạn khoảng 1460 cặp bazơ với các vị trí enzym giới hạn SalI và XbaI. Đoạn khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn, SalI và XbaI, và sau đó pDZ-leuA (R558H) được tạo ra bằng cách gắn với pDZ được xử lý với các enzym tương tự. pDZ-leuA (G561D) đã được tạo ra bằng cách

sử dụng mồi 5 và 9, và mồi 10 và 6 bằng phương pháp tương tự ở trên.

Ví dụ 3: Sản xuất chủng thay thế của biến thể IPMS

Corynebacterium glutamicum ATCC14067 được sử dụng làm chủng gốc để tạo ra chủng chứa trình tự nucleotit leuA được biến đổi đã được tìm thấy trong chủng biến đổi ở trên.

Corynebacterium glutamicum ATCC14067 được biến đổi với các vectơ pDZ-leuA (R558H), pDZ-leuA (G561D), và pDZ-leuA (R558H, G561D), mà đã được tạo ra trong Ví dụ 2 bằng kỹ thuật điện phân. Mỗi chủng được tạo ra thông qua liên kết ngang phụ được chỉ định là 14067: leuA (R558H), 14067::leuA (G561D), và 14067::leuA (R558H, G561D). Để xác nhận xem nucleotit của leuA được thế, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các mồi của các SEQ ID NO: 3 và 4 theo các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong vòng 1 phút; ủ ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút dùng Taq ADN polymeraza. PCR được lặp lại tổng cộng 28 lần để khuếch đại một đoạn có khoản 2700 cặp bazơ. Sau đó, việc thế của nucleotit của leuA được xác nhận bằng cách phân tích trình tự nucleotit với các mồi tương tự.

Chủng 14067:: leuA (R558H, G561D) mà được biến đổi với vectơ pDZ-leuA (R558H, G561D), đã được chỉ định là KCJ-0148, và được gửi đến Trung tâm nuôi cấy các vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 25 tháng 1 năm 2016, và kết quả là, chủng được lưu giữ theo số truy cập KCCM11811P.

Ví dụ 4: Sản xuất L-leuxin trong chủng thay thế của biến thể IPMS.

Để sản xuất L-leuxin từ *Corynebacterium glutamicum* 14067::leuA (R558H), 14067::leuA (G561D), và 14067::leuA (R558H, G561D), mà đã được tạo ra trong ví dụ 3, việc nuôi cấy được tiến hành theo cách dưới đây.

Vòng bạch kim của mỗi chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, và *Corynebacterium glutamicum* 14067 được tạo ra:: leuA (R558H), 14067::leuA (G561D), và 14067::chủng leuA (R558H, G561D) được cấy vào bình góc vách ngăn (250 ml) có trong môi trường sản xuất (25 ml). Sau đây, L-leuxin được sản xuất bằng cách ủ trong bể nước lắc ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 60 giờ.

Sau khi hoàn thành việc ủ, lượng sản xuất L-leuxin được đo bằng sắc kỷ lỏng cao áp. Nồng độ của L-leuxin trong môi trường nuôi cấy cho mỗi chủng thử nghiệm được thể hiện trong bảng 1 bên dưới.

Bảng 1: Việc sản xuất L-leuxin trong chủng thay thế của biến thể IPMS.

Chủng	Nồng độ L-leuxin (g/L)
ATCC14067	0,1
14067::leuA (R558H)	1,2
14067::leuA (G561D)	1,6
14067::leuA (R558H, G561D)	2,5

Như được thể hiện trên Bảng 1 ở trên, xác nhận hiệu suất sản xuất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::leuA (R558H), 14067::leuA (G561D), và 14067::leuA (R558H, G561D), trong đó có các biến thể G561D R558H, G561D, hoặc R558H ở gen leuA, được tăng từ 12 đến 25 lần so với các chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067.

Ví dụ 5: Sản xuất vectơ biểu hiện quá mức biến thể IPMS

Để sản xuất vectơ biểu hiện chứa trình tự nucleotit được biến đổi xác nhận trong Ví dụ 1, PCR được thực hiện bằng cách dùng ATCC14067 và ADN nhiễm sắc thể của 3 biến thể được tạo ra trong ví dụ 3 làm mẫu và sử dụng các mồi của các SEQ ID NO: 11 và 12 theo các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong 1 phút; ủ ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút dùng Pfu ADN polymeraza. PCR được lặp lại tổng cộng số 25 lần để khuếch đại một đoạn khoảng 2.050 cặp bazơ với các vị trí enzym giới hạn Nde*I* và XbaI. Đoạn được khuếch đại được xử lý bằng enzym giới hạn, NdeI và XbaI, và các vectơ biểu hiện p117_PCJ7-leuA (WT), p117_PCJ7-leuA (R558H), p117_PCJ7-leuA (G561D), và p117_ PCJ7-leuA (R558H, G561D) đã được tạo ra bằng cách thắt băng cách sử dụng p117_PCJ7 trong đó vùng gen khởi đầu PCJ7 được chèn trong vectơ pECCG117 (Biotechnology letters Vol. 13, No. 10, p. 721-726 (1991)) được xử lý bằng các enzym tương tự. Vùng gen khởi đầu PCJ7 là vùng gen khởi đầu mà làm tăng biểu hiện gen, và được công bố trong Patent Hàn Quốc. 10-0620092 và Công bố đơn Sáng chế quốc tế 2006-065095.

Ví dụ 6: Sản xuất chủng được biến đổi với các vectơ biểu hiện quá mức biến thể IPMS

Để sản xuất chủng được biến đổi với vectơ biểu hiện quá mức chứa trình tự nucleotit được biến đổi leuA được tạo ra trong ví dụ 5, chủng gốc, đó là *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại, và các chủng sản xuất leuxin KCCM11661P và KCCM11662P được sử dụng.

Mỗi vectơ p117_PCJ7-leuA (WT), p117_PCJ7-leuA (R558H), p117_PCJ7-leuA (G561D), và p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), được tạo ra trong ví dụ 5, được biến đổi với *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, KCCM11661P, và KCCM11662P bởi kỹ thuật điện phân. Kết quả là, 14067::p117_PCJ7-leuA (WT), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561D), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H,G561D); KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (WT), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (G561D), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D); và KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (WT), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (G561D), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D) được sản xuất.

Ví dụ 7: Sản xuất L-leuxin trong chủng biến đổi với các vectơ biểu hiện quá mức biến thể IPMS

Để sản xuất L-leuxin từ các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117_PCJ7-leuA (WT), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561D), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D); KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (WT), KCCM11661P::117PCJ7-leuA (R558H), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (G561D), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D); và KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (WT), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (G561D), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), được tạo ra trong ví dụ 6, việc nuôi cấy được thực hiện theo cách sau đây.

Vòng bạch kim của mỗi chủng gốc *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, KCCM11661P, và KCCM11662P, và các chủng được sản xuất trong Ví dụ 6 được ủ trong bình góc vách ngăn (250 ml) có trong môi trường sản xuất (25 ml). Sau đây,

L-leuxin được sản xuất bằng cách ủ trong bể nước lắc ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 60 giờ.

Sau khi hoàn thành việc ủ, lượng L-leuxin được sản xuất được đo bằng sắc ký lỏng cao áp. Nồng độ của L-leuxin trong môi trường nuôi cấy cho mỗi chủng thử nghiệm được thể hiện trong bảng 2 bên dưới.

Bảng 2: Việc sản xuất L-leuxin trong chủng biểu hiện quá mức biến thể IPMS.

Chủng	Nồng độ L-leuxin (g/L)
ATCC14067	0,1
14067:: p117_PCJ7-leuA (WT)	0,3
14067:: p117_PCJ7-leuA (R558H)	4,5
14067::p117_PCJ7-leuA (G561D)	5,1
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H,G561D)	9,8
KCCM11661P	2,7
KCCM11661P:: p117_PCJ7-leuA (WT)	3,0
KCCM11661P:: p117_PCJ7-leuA (R558H)	6,1
KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (G561D)	6,8
KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H,G561D)	12,3
KCCM11662P	3,1
KCCM11662P:: p117_PCJ7-leuA (WT)	3,3
KCCM11662P:: p117_PJ7-leuA (R558H)	6,3

KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (G561D)	6,9
KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H,G561D)	13,1

Như được thể hiện trong bảng 2 ở trên, được xác nhận rằng việc sản xuất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561D), và 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), mà được biến nạp với biến thể chứa vectơ biểu hiện quá mức của gen leuA trong chủng ATCC14067, được tăng lên 45 đến 98 lần so với chuỗi gốc ATCC14067; việc sản xuất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H), KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (G561D), và KCCM11661P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), mà được biến đổi với biến thể chứa vectơ biểu hiện quá mức của gen leuA trong chủng KCCM11661P, được tăng lên 2,3 đến 4,5 lần so với chuỗi gốc KCCM11661P; và việc sản xuất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H), KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (G561D), và KCCM11662P::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), mà được biến đổi với biến thể chứa vectơ biểu hiện quá mức của gen leuA trong chủng KCCM11662P, được tăng lên 2 đến 4,2 lần so với chuỗi gốc KCCM11662P.

Ví dụ 8: Phép đo hoạt tính synthaza isopropylmalat trong chủng biến đổi với vectơ biểu hiệu quá mức leuA.

Để đo hoạt tính synthaza isopropylmalat trong các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117_PCJ7-leuA (WT), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561D), và 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), được tạo ra trong ví dụ 6, các thử nghiệm đã được thực hiện theo cách dưới đây.

Vòng bạch kim của mỗi chủng trong số 4 chủng ở trên được ủ trong bình góc vách ngăn (250 ml) có trong môi trường sản xuất (25 ml). Sau đây, chất thu được ủ trong bể nước lắc ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 16 giờ. Sau khi hoàn thành việc ủ, môi trường nuôi cấy được ly tâm để loại bỏ chất nổi trên bề mặt, hạt được rửa và được trộn với chất đệm phân giải, và các tế bào được nghiền với chất đồng nhất hạt.

Các protein có trong các sản phẩm phân giải được định lượng theo xét nghiệm Bradford, hoạt tính của synthaza isopropylmalat được đo bằng cách đo CoA được sản xuất khi protein có trong sản phẩm phân giải (100 µg/mL) được sử dụng. Các kết quả đo hoạt tính synthaza isopropylmalat trong mỗi chủng được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Chủng	Hoạt động IPMS tương đối (%)
14067::p117_PCJ7-leuA (WT)	100
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H)	105
14067::p117_PCJ7-leuA (G561D)	130
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D)	328

Để xác nhận mức độ giải phóng của sự ức chế phản hồi bởi leuxin trong enzym, hoạt tính synthaza isopropylmalat được đo bằng cách đo CoA được tạo ra khi các protein có trong sản phẩm phân giải (100 µg/mL) được sử dụng dưới điều kiện nếu leuxin (3g/L) được thêm vào. Các kết quả đo hoạt tính synthaza isopropylmalat trong mỗi chủng được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Chủng	Leuxin 0 g/L	Leuxin 2 g/L
	Hoạt động IPMS tương đối (%)	
14067::p117_PCJ7-leuA (WT)	100	24
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H)	100	61
14067::p117_PCJ7-leuA (G561D)	100	70
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D)	100	89

Như được thể hiện trên Bảng 3 và Bảng 4 ở trên, được xác nhận là hoạt tính synthaza isopropylmalat của các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117_PCJ7-leuA (R558H), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561D), và14067::p117_PCJ7-leuA (R558H, G561D), mà được biến đổi với các vectơ biểu hiện biến thể IPMS được tăng lần lượt 1,5 lần, 1,3 lần và 3,2 lần so với nhóm đối chứng, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117_PCJ7-leuA (WT). Ngoài ra, các

chủng sản xuất L-leuxin được duy trì hoạt tính IPMS lần lượt ở 61%, 70%, và 89% ngay cả khi leuxin (2g/L) được thêm vào, việc xác nhận sự ức chế phản hồi bởi leuxin được giải phóng.

Ví dụ 9: Sản xuất vectơ để cải thiện biến thể synthaza isopropylmalat (IPMS)

Trong các ví dụ 4, 7 và 8 bởi vì các axit amin 558 và 561 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của synthaza isopropylmalat được xác định là các vị trí quan trọng cho hoạt tính của enzym biến thể IPMS, nỗ lực được thực hiện để xác nhận xem hoạt tính enzym được cải thiện hoặc xem sự ức chế phản hồi được giải phóng thêm khi được thế với axit amin ngoài các axit amin trong biến thể. Do đó, nỗ lực được thực hiện để tạo ra biến thể được thế với một axit amin của các nhóm axit amin khác có thể gây ra biến đổi cấu trúc.

Biến thể trong đó axit amin 558, arginin được thế với alanin (Ala) hoặc glutamin (Gln) được tạo ra. Vectơ p117 PCJ7-leuA (R558A), trong đó axit amin 558 được thế với alanin (Ala), và vectơ p117 PCJ7-leuA (R558Q), trong đó axit amin 558 được thế với glutamin (Gln) được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đột biến vị trí trực tiếp và bằng cách sử dụng vectơ p117 PCJ7-leuA (R558H) làm khuôn, mồi của các SEQ ID NO: 13 và 14, và cặp mồi của các SEQ ID NO: 15 và 16.

Biến thể trong đó axit amin 561, glyxin được thế với arginin (Arg) hoặc tyrosin (Tyr) được tạo ra. Vectơ p117 PCJ7-leuA (G561R), trong đó axit amin 561 được thế với arginin (Arg), và vectơ p117 PCJ7-leuA (G561Y), trong đó axit amin 561 được thế với tyrosin (Tyr), thu được bằng cách sử dụng phương pháp đột biến vị trí trực tiếp bằng cách sử dụng p117 PCJ7-leuA (G561D) làm khuôn, mồi của các SEQ ID NO: 17 và 18, cặp mồi của SEQ ID NO: 19 và 20.

Ví dụ 10: Sản xuất chủng trong đó biến thể được biến đổi isopropylmalat được đưa vào

Để tạo ra chủng được biến đổi với vectơ biểu hiện chứa trình tự nucleotit được biến đổi leuA được tạo ra trong ví dụ 9, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại được sử dụng làm chủng gốc.

Mỗi vectơ, p117_PCJ7-leuA (R558A), p117_PCJ7-leuA (R558Q),

p117_PCJ7-leuA (G561R), và p117_PCJ7-leuA (G561Y), mà đã được tạo ra trong Ví dụ 9, đã được biến đổi trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 bởi kỹ thuật điện phân để tạo ra 14067::p117_PCJ7-leuA (R558A), 14067::p117_PCJ7-leuA (R558Q), 14067::p117_PCJ7-leuA (G561R), và 14067::p117_PCJ7-leuA (G561Y).

Ví dụ 11: Sản xuất L-leuxin trong đó biến thể được biến đổi isopropylmalat được đưa vào

Để sản xuất L-leuxin từ các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117 PCJ7-leuA (R558A), 14067::p117 PCJ7-leuA (R558Q), 14067::p117 PCJ7-leuA (G561R), và 14067::p117 PCJ7-leuA (G561Y), được tạo ra trong ví dụ 10, việc nuôi cấy đã được thực hiện theo cách dưới đây.

Vòng bạch kim của mỗi chủng gốc *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, và 4 chủng ở trên được ủ trong bình góc vách ngăn (250 mL) chứa môi trường sản xuất (25 mL). Sau đây, L-leuxin được sản xuất bằng cách ủ trong bể nước lắc ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 60 giờ.

Sau khi hoàn thành việc ủ, lượng sản xuất L-leuxin được đo bằng sắc kỷ lỏng cao áp. Nồng độ của L-leuxin trong môi trường nuôi cấy cho mỗi chủng thử nghiệm được thể hiện trong bảng 5 bên dưới.

Bảng 5: Việc sản xuất L-leuxin trong chủng biểu hiện quá mức biến thể IPMS.

Chủng	Nồng độ L-leuxin (g/L)
ATCC14067	0,1
14067::p117_PCJ7-leuA (WT)	0,3
14067::p117_PCJ7-leuA (R558H) (Ví dụ 7)	4,5
14067::p117_PCJ7-leuA (R558A)	3,8
14067::p117_PCJ7-leuA (R558Q)	3,2
14067::p117_PCJ7-leuA (G561D) (Ví dụ 7)	5,1
14067::p117_PCJ7-leuA (G561R)	4,0

14067::p117_PCJ7-leuA (G561Y)	3,6

Như được thể hiện trên Bảng 5 ở trên, xác nhận hiệu suất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117 PCJ7-leuA (R558A), và 14067::p117 PCJ7-leuA (R558Q) được tăng từ 32 đến 38 lần so với các chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067.

Ngoài ra, xác nhận hiệu suất L-leuxin của các chủng sản xuất L-leuxin, *Corynebacterium glutamicum* 14067::p117 PCJ7-leuA (G561R), và 14067::p117 PCJ7-leuA (G561Y) được tăng từ 36 đến 40 lần so với các chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067.

Dựa trên các kết quả ở trên, được xác nhận các axit amin 558 và 561 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của synthaza isopropylmalat ở các vị trí quan trọng đối với hoạt tính của enzym biến thể IPMS, và ngay cả khi mỗi axit amin 558 và 561 của protein IPMS kiểu dại được thế lần lượt với histidin và axit aspartic, hiệu suất L-leuxin được tăng lên đáng kể trong chủng có sự biến đổi này.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả với các phương án minh họa cụ thể, sẽ được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà sáng chế đề xuất, sáng chế có thể được thực hiện theo các dạng cụ thể khác mà không xa rời tinh thần kỹ thuật hoặc các dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả ở trên sẽ được minh họa với tất các khía cạnh và không bị giới hạn. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo hơn là phần mô tả chi tiết, và nên được hiểu là tất các các biến đổi hoặc biến thể từ ý nghĩa và phạm vi của sáng chế và tương đương của chúng được nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit được biến đổi có hoạt tính synthaza isopropylmalat, trong đó arginin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với gốc histidin, alanin, hoặc glutamin và/hoặc glyxin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với arginin hoặc tyrosin.

2. Polypeptit được biến đổi có hoạt tính synthaza isopropylmalat, trong đó arginin ở vị trí 558 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với histidin, alanin hoặc glutamin, và glyxin ở vị trí 561 từ đầu N của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế với axit aspartic, arginin hoặc tyrosin.

3. Polypeptit được biến đổi theo điểm 1, trong đó polypeptit được biến đổi bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 21 đến 23 và SEQ ID NO: 25 đến 35.

4. Polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Polynucleotit theo điểm 4, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 36 đến 38 và SEQ ID NO: 40 đến 50.

6. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin, bao gồm polypeptit được biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

7. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin, mà được biến nạp với vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

8. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

9. Phương pháp sản xuất L-leuxin bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-leuxin theo điểm 6

trong môi trường để sản xuất L-leuxin; và

(b) thu hồi L-leuxin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> POLYPEPTIT ĐƯỢC BIẾN ĐỔI CÓ HOẠT TÍNH SYNTHAZA ISOPROPYLMALAT VÀ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA POLYPEPTIT NÀY

<130> OPA17193

<150> KR 10-2016-0181343
<151> 2016-12-28

<160> 50

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA AA

<400> 1

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 2
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA NT

<400> 2

atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccgcacctcg 1680

ggcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tựleuA-1

<400> 3
agaaggacaa agcactcatc c 21

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự leuA-2

<400> 4
tcgccctagt attctggcgt 20

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA sub F

<400> 5
acgcgtcgac ttgaccctca gctggacttc 30

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA sub R

<400> 6
gctctagaaa ttccctgtcg gtgaagca 28

<210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA 588 mut P-2

<400> 7
atcgtcgccc gaggtgtggg cgtgctggtt gta 33

<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA 588 mut P-3

<400> 8
tacaaccagc acgcccacac ctcgggcgac gat 33

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

<220>
<223> leuA 561 mut P-2

<400> 9
tgcttctgca tcgtcatccg aggtgcgggc gtgct 35

<210> 10
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA 561 mut P-3

<400> 10
acgcccgcac ctcggatgac gatgcagaag ca 32

<210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA over F

<400> 11
ggaattttcc atatgtctcc taacgatgca ttc 33

<210> 12
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> leuA over R

<400> 12
gctctagatc gccctagtat tctggcgt 28

<210> 13
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A SD F

<400> 13
aggaatacaa ccagcacgcc gcaacctcgg gcgacgatgc aga 43

<210> 14
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A SD R

<400> 14
tctgcatcgt cgcccgaggt tgcggcgtgc tggttgtatt cct 43

<210> 15
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q SD F

<400> 15
aggaatacaa ccagcacgcc cagacctcgg gcgacgatgc aga 43

<210> 16
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q SD R

<400> 16
tctgcatcgt cgcccgaggt ctgggcgtgc tggttgtatt cct 43

<210> 17
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561R SD F

<400> 17

accagcacgc ccgcacctcg cgcgacgatg cagaagcagc cgc 43

<210> 18
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561R SD R

<400> 18
gcggctgctt ctgcatcgtc gcgcgaggtg cgggcgtgct ggt 43

<210> 19
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561Y SD F

<400> 19
accagcacgc ccgcacctcg tacgacgatg cagaagcagc cgc 43

<210> 20
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561Y SD R

<400> 20
gcggctgctt ctgcatcgtc gtacgaggtg cgggcgtgct ggt 43

<210> 21
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H AA

<400> 21

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala His Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 22
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A AA

<400> 22
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Ala Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 23
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q AA

<400> 23

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg

260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu

530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Gln Thr Ser
545 550 555 560

Gly Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 24
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561D AA

<400> 24
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Asp Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 25
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561R AA

<400> 25

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Arg Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 26
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561Y AA

<400> 26
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met

115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp

385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Arg Thr Ser
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 27
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> R558H, G561D AA

<400> 27

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala His Thr Ser
545 550 555 560

Asp Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 28
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H, G561R AA

<400> 28
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

```
Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
                405                 410                 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
            420                 425                 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
        435                 440                 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
    450                 455                 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465                 470                 475                 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
                485                 490                 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
            500                 505                 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
        515                 520                 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
    530                 535                 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala His Thr Ser
545                 550                 555                 560

Arg Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
                565                 570                 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
            580                 585                 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
        595                 600                 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
    610                 615
```

<210> 29
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H, G561Y AA

<400> 29

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn

245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly

515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala His Thr Ser
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 30
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561D AA

<400> 30
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Ala Thr Ser
545 550 555 560

Asp Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 31
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561R AA

<400> 31

```
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
 1               5                  10                  15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
            20                  25                  30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
        35                  40                  45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
    50                  55                  60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65                  70                  75                  80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
                85                  90                  95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
        115                 120                 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
    130                 135                 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145                 150                 155                 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
                165                 170                 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
            180                 185                 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
        195                 200                 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
    210                 215                 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225                 230                 235                 240
```

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Ala Thr Ser
545 550 555 560

Arg Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 32
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561Y AA

<400> 32
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

Leu Val Gln Met Gly Phe Lys Glu Ile Glu Val Gly Phe Pro Ser Ala

100 105 110

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala

370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Ala Thr Ser
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 33
<211> 616
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561D AA

<400> 33

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Gln Thr Ser
545 550 555 560

Asp Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 34
<211> 616
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561R AA

<400> 34
Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

```
Leu Val Gln Met Gly Phe Lys Glu Ile Glu Val Gly Phe Pro Ser Ala
            100                 105                 110

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
        115                 120                 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
    130                 135                 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145                 150                 155                 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
                165                 170                 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
            180                 185                 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
        195                 200                 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
    210                 215                 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn
225                 230                 235                 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
                245                 250                 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
            260                 265                 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
        275                 280                 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
    290                 295                 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305                 310                 315                 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
            340                 345                 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
        355                 360                 365
```

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser
500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Gln Thr Ser
545 550 555 560

Arg Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 35
<211> 616

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561Y AA

<400> 35

Met Ser Pro Asn Asp Ala Phe Ile Ser Ala Pro Ala Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Arg Asn Glu Gly Gln Pro Ala Trp Asn Lys Gln Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Met Pro Val Asn Arg Tyr Met Pro Phe Glu Val Glu Val
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Leu Pro Asp Arg Thr Trp Pro Asp Lys Lys Ile Thr
50 55 60

Val Ala Pro Gln Trp Cys Ala Val Asp Leu Arg Asp Gly Asn Gln Ala
65 70 75 80

Leu Ile Asp Pro Met Ser Pro Glu Arg Lys Arg Arg Met Phe Glu Leu
85 90 95

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

Ser Gln Thr Asp Phe Asp Phe Val Arg Glu Ile Ile Glu Lys Asp Met
115 120 125

Ile Pro Asp Asp Val Thr Ile Gln Val Leu Val Gln Ala Arg Glu His
130 135 140

Leu Ile Arg Arg Thr Phe Glu Ala Cys Glu Gly Ala Lys Asn Val Ile
145 150 155 160

Val His Phe Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Leu Gln Arg Asn Val Val Phe
165 170 175

Arg Met Asp Lys Val Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Asp Ala Ala Glu
180 185 190

Leu Ile Lys Thr Val Ala Gln Asp Tyr Pro Asp Thr Asn Trp Arg Trp
195 200 205

Gln Tyr Ser Pro Glu Ser Phe Thr Gly Thr Glu Val Glu Tyr Ala Lys
210 215 220

Glu Val Val Asp Ala Val Val Glu Val Met Asp Pro Thr Pro Glu Asn

225 230 235 240

Pro Met Ile Ile Asn Leu Pro Ser Thr Val Glu Met Ile Thr Pro Asn
245 250 255

Val Tyr Ala Asp Ser Ile Glu Trp Met His Arg Asn Leu Asn Arg Arg
260 265 270

Asp Ser Ile Ile Leu Ser Leu His Pro His Asn Asp Arg Gly Thr Gly
275 280 285

Val Gly Ala Ala Glu Leu Gly Tyr Met Ala Gly Ala Asp Arg Ile Glu
290 295 300

Gly Cys Leu Phe Gly Asn Gly Glu Arg Thr Gly Asn Val Cys Leu Val
305 310 315 320

Thr Leu Ala Leu Asn Met Leu Thr Gln Gly Val Asp Pro Gln Leu Asp
325 330 335

Phe Thr Asp Ile Arg Gln Ile Arg Ser Thr Val Glu Tyr Cys Asn Gln
340 345 350

Leu Arg Val Pro Glu Arg His Pro Tyr Gly Gly Asp Leu Val Phe Thr
355 360 365

Ala Phe Ser Gly Ser His Gln Asp Ala Val Asn Lys Gly Leu Asp Ala
370 375 380

Met Ala Ala Lys Val Gln Pro Gly Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Trp
385 390 395 400

Glu Gln Leu Arg Asp Thr Glu Trp Glu Val Pro Tyr Leu Pro Ile Asp
405 410 415

Pro Lys Asp Val Gly Arg Asp Tyr Glu Ala Val Ile Arg Val Asn Ser
420 425 430

Gln Ser Gly Lys Gly Gly Val Ala Tyr Ile Met Lys Thr Asp His Gly
435 440 445

Leu Gln Ile Pro Arg Ser Met Gln Val Glu Phe Ser Thr Val Val Gln
450 455 460

Asn Val Thr Asp Ala Glu Gly Gly Glu Val Asn Ser Lys Ala Met Trp
465 470 475 480

Asp Ile Phe Ala Thr Glu Tyr Leu Glu Arg Thr Ala Pro Val Glu Gln
485 490 495

Ile Ala Leu Arg Val Glu Asn Ala Gln Thr Glu Asn Glu Asp Ala Ser

500 505 510

Ile Thr Ala Glu Leu Ile His Asn Gly Lys Asp Val Thr Val Asp Gly
515 520 525

His Gly Asn Gly Pro Leu Ala Ala Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Leu
530 535 540

Gly Ile Asp Val Glu Ile Gln Glu Tyr Asn Gln His Ala Gln Thr Ser
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Val Leu Ala Glu Val Asn Gly
565 570 575

Arg Lys Val Trp Gly Val Gly Ile Ala Gly Ser Ile Thr Tyr Ala Ser
580 585 590

Leu Lys Ala Val Thr Ser Ala Val Asn Arg Ala Leu Asp Val Asn His
595 600 605

Glu Ala Val Leu Ala Gly Gly Val
610 615

<210> 36
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H NT

<400> 36
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccacacctcg 1680

ggcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 37
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A NT

<400> 37
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc cgcaacctcg 1680

ggcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 38
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q NT

<400> 38
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccagacctcg 1680

ggcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 39
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561D NT

<400> 39
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccgcacctcg 1680

gatgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 40
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561R NT

<400> 40
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccgcacctcg 1680

cgcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 41
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G561Y NT

<400> 41
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccgcacctcg 1680

tacgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 42
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H, G561D NT

<400> 42
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccacacctcg 1680

gatgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 43
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H, G561R NT

<400> 43
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccacacctcg 1680

cgcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 44
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558H, G561Y NT

<400> 44
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccacacctcg 1680

tacgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 45
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561D NT

<400> 45
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc cgcaacctcg 1680

gatgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 46
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561R NT

<400> 46
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccagacctcg 1680

cgcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 47
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558A, G561Y NT

<400> 47
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc cgcaacctcg 1680

tacgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 48
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561D NT

<400> 48
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccagacctcg 1680

gatgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 49
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561R NT

<400> 49
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccagacctcg 1680

cgcgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851

<210> 50
<211> 1851
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R558Q, G561Y NT

<400> 50
atgtctccta acgatgcatt catctccgca cctgccaaga tcgaaacccc agttgggcct 60

cgcaatgaag gccagccagc atggaataag cagcgtggct cctcaatgcc agttaaccgc 120

tacatgcctt tcgaggttga ggtagaagat atttctctgc cggaccgcac ttggccagat 180

aaaaaaatca ccgttgcacc tcagtggtgt gctgttgacc tgcgtgacgg caaccaggct 240

ctgattgatc cgatgtctcc tgagcgtaag cgccgcatgt ttgagctgct ggttcagatg 300

ggattcaagg aaatcgaggt cggtttccct tcagcttccc agactgattt tgatttcgtt 360

cgtgagatca tcgaaaagga catgatccct gacgatgtca ccattcaggt tctggttcag 420

gctcgtgagc acctgattcg ccgtactttt gaagcttgcg aaggcgcaaa aaacgttatc 480

gtgcacttct acaactcaac ctccatcctg cagcgcaacg tggtgttccg catggacaag 540

gtgcaggtga agaagctggc taccgatgcc gctgaactga tcaagaccgt cgctcaggat 600

tacccagaca ccaactggcg ctggcagtac tcccctgagt ccttcaccgg cactgaggtt 660

gagtacgcca aggaagttgt ggacgcagtt gttgaggtca tggatccaac tcctgagaac 720

ccaatgatca tcaacctgcc ttccaccgtt gagatgatca cccctaacgt ttacgcagac 780

tccattgaat ggatgcaccg caatctaaac cgtcgtgatt ccattatcct gtccctgcac 840

ccgcacaatg accgtggcac cggcgttggc gcagctgagc tgggctacat ggctggcgct 900

gaccgcatcg aaggctgcct gttcggcaac ggcgagcgca ccggcaacgt ctgcctggtc 960

accctggcac tgaacatgct gacccagggc gttgaccctc agctggactt caccgatata 1020

cgccagatcc gcagcaccgt tgaatactgc aaccagctgc gcgttcctga gcgccaccca 1080

tacggcggcg acctggtctt caccgctttc tccggttccc accaggacgc tgtgaacaag 1140

ggtctggacg ccatggctgc caaggttcag ccaggtgcta gctccactga agtttcttgg 1200

gagcagctgc gcgacaccga atgggaggtt ccttacctgc ctatcgatcc aaaggatgtc 1260

ggtcgcgact acgaggctgt tatccgcgtg aactcccagt ccggcaaggg cggcgttgct 1320

tacatcatga agaccgatca cggtctgcag atccctcgct ccatgcaggt tgagttctcc 1380

accgttgtcc agaacgtcac cgacgctgag ggcggcgagg tcaactccaa ggcaatgtgg 1440

gatatcttcg ccaccgagta cctggagcgc accgcaccag ttgagcagat cgcgctgcgc 1500

gtcgagaacg ctcagaccga aaacgaggat gcatccatca ccgccgagct catccacaac 1560

ggcaaggacg tcaccgtcga tggccacggc aacggcccac tggctgctta cgccaacgcg 1620

ctggagaagc tgggcatcga cgttgagatc caggaataca accagcacgc ccagacctcg 1680

tacgacgatg cagaagcagc cgcctacgtg ctggctgagg tcaacggccg caaggtctgg 1740

ggcgtcggca tcgctggctc catcacctac gcttcgctga aggcagtgac ctccgccgta 1800

aaccgcgcgc tggacgtcaa ccacgaggca gtcctggctg gcggcgttta a 1851