



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

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



1-0036368

(51)⁷ C12N 15/77; C12P 19/40; C07K 14/34; (13) B
C12N 15/67

(21) 1-2019-02560

(22) 21/06/2018

(86) PCT/KR2018/007027 21/06/2018

(87) WO2019/235680 12/12/2019

(30) 10-2018-0065681 07/06/2018 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/03/2021 396

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BAEK, MIN JI (KR); LEE, Ji Hye (KR); LIM, Boram (KR); YOON, Byoung Hoon (KR); LEE, Jeong Eun (KR); LIM, Su-bin (KR); JEONG, Jaeho (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM SẢN SINH 5'-XANTHOSIN
MONOPHOSPHAT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 5'-XANTHOSIN
MONOPHOSPHAT BẰNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat và phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat bằng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat và phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat bằng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

5'-xanthosin monophosphat là hợp chất trung gian quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp axit nucleic và hệ chuyển hóa ở động vật và thực vật, và sử dụng trong nhiều lĩnh vực, như thực phẩm, y tế, và dược học. Cụ thể, khi được sử dụng kết hợp với mononatri glutamat, có tác dụng hiệp đồng trong việc tăng cường hương vị. Theo đó, 5'-xanthosin monophosphat là một trong số các chất tăng cường hương vị trên cơ sở axit nucleic đang được nghiên cứu nhiều để làm gia vị.

Hơn nữa, 5'-xanthosin monophosphat là hợp chất trung gian trong quá trình chuyển hóa sinh tổng hợp nucleotit purin, và là nguyên liệu quan trọng để sản xuất 5'-guanosin monophosphat (GMP). Phương pháp đã biết để sản xuất guanosin monophosphat có giá trị thương mại cao và tăng cường độ hương vị là phương pháp lên men vi sinh vật, bao gồm bước sản sinh 5'-xanthosin monophosphat và biến đổi bằng enzym 5'-xanthosin monophosphat thành 5'-guanosin monophosphat. Do phương pháp này có giá trị kinh tế cao nhất, nên nhu cầu về 5'-xanthosin monophosphat là tương đương như 5'-guanosin monophosphat.

Ví dụ về phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat, bao gồm (1) phương pháp tổng hợp hóa học, (2) phương pháp khử amin hóa 5'-xanthosin monophosphat đã được tổng hợp, (3) phương pháp lên men bằng cách bổ sung tiền chất xanthin vào môi trường nuôi cấy, (4) phương pháp lên men trực tiếp bằng chủng vi sinh vật đột biến sản sinh 5'-xanthosin monophosphat, v.v.. Trong số các phương pháp này, phương pháp lên men trực tiếp 5'-xanthosin monophosphat bằng chủng vi sinh vật đột biến có giá trị kinh tế cao nhất. Tuy nhiên, vẫn cần có các phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat ở hiệu suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để phát triển các vi sinh vật có khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat ở hiệu suất cao, và phát hiện thấy rằng hiệu suất của 5'-xanthosin monophosphat được gia tăng khi hoạt tính của protein đặc hiệu được tăng cường, và hoàn thành sáng chế này.

Theo một mục đích, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat, trong đó protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 có hoạt tính được tăng cường.

Theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat bằng vi sinh vật này.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế chứa protein bài tiết 5'-xanthosin monophosphat có hoạt tính được tăng cường, nhờ đó có mức độ sản sinh 5'-xanthosin monophosphat được gia tăng, và điều này có thể góp phần làm giảm đáng kể chi phí sản xuất 5'-xanthosin monophosphat.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây. Đồng thời, mỗi phần mô tả và phương án cụ thể được bộc lộ theo sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án cụ thể khác. Tức là, toàn bộ các tổ hợp của các phương án khác nhau được bộc lộ theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở phần mô tả chi tiết dưới đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat, trong đó protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 có hoạt tính được tăng cường.

Thuật ngữ “5'-xanthosin monophosphat” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất axit 5'-xanthylic, xanthosin, v.v.. Theo sáng chế, thuật ngữ “5'-xanthosin monophosphat” và “XMP” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein nội sinh trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, được mã hóa bởi phân họ gen tăng cường vận chuyển các chất hòa tan phân tử nhỏ qua màng tế bào (gen vận chuyển MFS) bài tiết 5'-xanthosin monophosphat từ vi sinh vật. Cụ thể là, protein này có thể là protein vận chuyển MFS chứa trình tự axit amin như nêu

trong SEQ ID NO.2, là protein nội sinh trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Hơn nữa, protein này có thể là protein cấu thành từ hoặc bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này. Protein vận chuyển MFS theo sáng chế có thể được gọi là “xmpE” hoặc “protein xmpE”.

Thuật ngữ “protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. cụ thể”, miễn là có hoạt tính tương đương với protein chứa cùng trình tự SEQ ID NO., có thể bao gồm đoạn trình tự bổ sung không làm biến đổi chức năng của protein ở phía trước đầu tận cùng của trình tự axit amin; độ biến có trong tự nhiên; hoặc đột biến gen lặn của chúng. Các protein có đoạn trình tự bổ sung hoặc đột biến như vậy cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hơn nữa, protein theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, nhưng protein theo sáng chế cũng có thể chứa trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 60% so với trình tự SEQ ID NO.2. Protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 60% so với trình tự SEQ ID NO.2 có thể là protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 60%, tốt hơn nếu bằng 70%, tốt hơn nữa nếu bằng 80%, thậm chí tốt hơn nữa nếu bằng 83%, 84%, 85%, 88%, 90%, 93%, 95%, hoặc 97% so với trình tự SEQ ID NO.2. Trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ tương tự có thể không bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 100% từ khoảng trị số nêu trên hoặc là trình tự axit amin có độ tương đồng nhỏ hơn 100%. Do đó, miễn là trình tự axit amin nhất định có độ tương đồng hoặc độ tương tự trình tự, gần như có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của trình tự SEQ ID NO.2, thì trình tự axit amin này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế ngay cả khi một phần của trình tự này có đột biến loại bỏ, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung trình tự axit amin.

Ngoài ra, trình tự nucleotit của gen mã hóa protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết, như Ngân hàng gen NCBI, nhưng không chỉ giới hạn ở cơ sở dữ liệu này. Cụ thể là, protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể được mã hóa bởi gen chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1, cũng như gen cấu thành từ hoặc bao gồm trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này.

Hơn nữa, trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể không chỉ bao gồm

trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1 mà còn bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 80% so với trình tự SEQ ID NO.1.

Cụ thể là, trình tự nucleotit bất kỳ có khả năng mã hóa trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 80% so với trình tự SEQ ID NO.2 nằm trong phạm vi của sáng chế, nhưng protein có thể được mã hóa bởi gen chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 83%, 84%, 85%, 88%, 90%, 93%, 95%, hoặc 97% so với trình tự SEQ ID NO.1. Tuy nhiên, rõ ràng là trình tự nucleotit nằm trong phạm vi của sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là trình tự nucleotit này mã hóa protein có hoạt tính tương đương với hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.

Ngoài ra, rõ ràng là hiện tượng thoái hóa mã di truyền, polynucleotit có thể được dịch mã thành protein chứa cùng trình tự axit amin hoặc protein có độ tương đồng hoặc độ tương tự cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, mẫu dò có thể được tổng hợp từ trình tự gen đã biết, ví dụ trình tự bất kỳ mã hóa protein có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 bằng cách lai hóa toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit với trình tự bổ sung của nó trong các điều kiện nghiêm ngặt có thể không bị giới hạn cụ thể. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các điều kiện cho phép lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện này được mô tả chi tiết trong các tài liệu tham khảo (J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); ví dụ điều kiện trong đó các gen có độ tương đồng hoặc độ tương tự cao ít nhất bằng 40%, tốt hơn nếu 85%, tốt hơn nếu 90%, tốt hơn nữa nếu 95%, tốt hơn nữa nếu 97%, và tốt nhất nếu 99% được lai hóa và các gen có độ tương đồng hoặc độ tương tự thấp không được lai hóa; hoặc điều kiện của phương pháp thẩm tách Southern, tức là rửa một lần, tốt hơn nếu hai đến ba lần ở nhiệt độ và nồng độ muối tương ứng là 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn nếu 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn nữa nếu 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS. Mặc dù quá trình lai hóa có thể cho phép bắt cặp sai lệch giữa các bazơ phụ thuộc vào mức độ nghiêm ngặt, nhưng hai axit nucleic cần có trình tự bổ sung với nhau. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mối tương quan giữa các bazơ nucleotit có khả năng lai hóa với nhau. Liên quan đến ADN, ví dụ adenosin bổ sung với thymin, và xytosin bổ sung với guanin. Theo đó, sáng chế có thể

cũng bao gồm mảnh axit nucleic được phân lập bổ sung không chỉ với trình tự axit nucleic gần như tương tự mà cũng bổ sung với trình tự có chiều dài đầy đủ.

Cụ thể là, polynucleotit có độ tương đồng hoặc độ tương tự có thể được phát hiện bằng cách sử dụng điều kiện lai hóa bao gồm bước lai hóa ở nhiệt độ T_m bằng 55°C và các điều kiện mô tả nêu trên. Hơn nữa, nhiệt độ T_m có thể bằng 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng không chỉ giới hạn ở các nhiệt độ này và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Mức độ nghiêm ngặt thích hợp của phản ứng lai hóa giữa các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các tham số đã biết trong lĩnh vực này 9xem Sambrook *et al.*, supra, 9.50-9.51, 11,7-11,8).

Thuật ngữ “độ tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ tương tự giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit cụ thể và có thể được tính theo tỷ lệ phần trăm. Theo sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit cụ thể có thể được thể hiện dưới dạng “% độ tương đồng”.

Thuật ngữ “độ tương tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ liên quan trình tự giữa các trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, và trong một số trường hợp, độ tương tự có thể được xác định bằng cách so sánh giữa các chuỗi của các trình tự này.

Thuật ngữ “độ tương đồng” và “độ tương tự” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả.

Độ tương đồng hoặc độ tương tự trình tự của các polynucleotit hoặc polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng các thuật toán sắp thẳng hàng chuẩn và sử dụng với điểm số khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình đang được sử dụng. Về cơ bản, các polynucleotit hoặc polypeptit tương đồng hoặc tương tự thường được mong muốn lai hóa trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao hoặc vừa phải, dọc theo ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% toàn bộ chiều dài của toàn bộ hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit đích. Các polynucleotit chứa các bộ ba mã hóa thoái biến thay cho các bộ ba mã hóa trong các polypeptit lai hóa cũng được xem xét.

Hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ có độ tương đồng hoặc độ tương tự ít nhất bằng 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,

hoặc 99% có thể được xác định bằng cách chương trình thuật toán máy vi tính đã biết, như chương trình “FASTA” (ví dụ Pearson *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444) bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Ngoài ra, độ tương đồng có thể được xác định bằng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453), được thực hiện trên chương trình Needleman của gói phần mềm EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277) (tốt hơn nữa, phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản tiếp theo). (bao gồm gói chương trình phần mềm GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [*ET AL.*, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.] (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073). Ví dụ độ tương đồng hoặc độ tương tự có thể được xác định bằng phần mềm BLAST hoặc ClustalW do National Center for Biotechnology Information cung cấp.

Độ tương đồng hoặc độ tương tự của polynucleotit hoặc polypeptide có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự như đã được công bố (ví dụ Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482), ví dụ bằng cách sử dụng chương trình máy vi tính GAP như được bộc lộ trong Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol.* 48 : 443. Cụ thể, chương trình GAP xác định độ tương đồng hoặc độ tương tự là trị số thu được bằng cách chia số lượng các ký tự được sắp thẳng hàng giống nhau (tức là các nucleotit hoặc axit amin) cho tổng số lượng các ký tự trên đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các thông số mặc định của chương trình GAP có thể bao gồm (1) ma trận so sánh đơn phương (chứa trị số bằng 1 đối với các ký tự giống hệt nhau và 0 đối với các ký tự không giống hệt nhau) và ma trận so sánh được gán trọng số được mô tả trong Gribskov *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745, như được bộc lộ trong Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) điểm số bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống và điểm số bổ sung bằng 0,10 đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống (điểm số mở khoảng trống bằng 10 và điểm số mở rộng khoảng trống bằng 0,5); và (3) không có điểm số đối với các khoảng trống kết thúc. Theo đó, thuật ngữ “độ tương đồng” hoặc “độ tương tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mối tương quan giữa các polypeptit hoặc polynucleotit.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat theo

sáng chế có thể có hoạt tính được tăng cường của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.

Thuật ngữ “hoạt tính được tăng cường của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2” và “hoạt tính được tăng cường của protein xmpE hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “hoạt tính được tăng cường của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ biểu hiện được tăng cường của protein so với chủng gốc của nó hoặc mức độ biểu hiện của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 so với chủng không được cải biến; hoạt tính được tăng cường của nó với mức độ biểu hiện tương đương; hoặc hoạt tính và mức độ biểu hiện được tăng cường của nó. Thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính được tăng cường của protein so với hoạt tính nội sinh của nó, và mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính được tăng cường của protein xmpE so với chủng gốc hoặc chủng không được cải biến của nó.

Theo sáng chế, hoạt tính được tăng cường của protein có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ hoạt tính được tăng cường của protein có thể đạt được bằng cách làm tăng số lượng bản sao của các polynucleotit mã hóa protein, tăng cường hoạt tính vùng khởi đầu, thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu, hoặc tổ hợp của chúng; cụ thể là, 1) làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein; 2) cải biến trình tự của đoạn điều hòa biểu hiện (vùng khởi đầu, vùng điều khiển, v.v.) để làm tăng mức độ biểu hiện của polynucleotit; 3) cải biến trình tự của gen (bộ ba mã hóa khởi đầu, v.v.) trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính protein, hoặc tổ hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Cụ thể là, liên quan đến hoạt tính được tăng cường của protein, phương pháp để cải biến trình tự của đoạn điều hòa biểu hiện có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ phương pháp cải biến có thể được thực hiện để tăng cường hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện bằng cách tạo cải biến bằng gốc loại bỏ, chèn thêm, hoặc gốc thay thế không bảo thủ hoặc gốc thay thế bảo thủ, hoặc tổ hợp của chúng trên trình tự điều hòa; hoặc thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit có hoạt tính được tăng cường hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện bao

gồm vùng khởi đầu, vùng tăng cường, vùng điều khiển, vị trí gắn kết ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, nhưng không chỉ giới hạn ở các trình tự này.

Ngoài ra, phương pháp để cải biến trình tự của gen có thể được thực hiện để tăng cường hoạt tính protein bằng cách tạo cải biến bằng gốc loại bỏ, chèn thêm, hoặc gốc thay thế không bảo thủ hoặc gốc thay thế bảo thủ, hoặc tổ hợp của chúng trên trình tự; hoặc thay thế trình tự gen bằng trình tự gen được cải biến có hoạt tính được tăng cường hơn, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo phương án cụ thể, hoạt tính được tăng cường của protein có thể đạt được bằng cách làm tăng số lượng bản sao của protein xmpE; thay thế vùng khởi đầu của protein xmpE bằng một vùng khởi đầu khác có hoạt tính được tăng cường; thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của protein xmpE; hoặc tổ hợp của chúng.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ADN cấu trúc chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein đích được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa thích hợp để biểu hiện protein đích trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm vùng khởi đầu có thể hoạt hóa phiên mã, trình tự vùng điều khiển bất kỳ để điều khiển phiên mã, trình tự mã hóa vị trí gắn kết ribosom mã hóa ARN thông tin thích hợp, và trình tự để điều khiển kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector này có thể được chuyển vào vật chủ thích hợp, sau đó có thể được tái bản hoặc có hoạt tính không phụ thuộc vào bộ gen của vật chủ, và có thể được tích hợp vào bộ gen của vật chủ.

Thuật ngữ “chuyển gen” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp chuyển vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Miễn là protein này có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, polynucleotit đã được chuyển gen có thể được tích hợp vào và nằm ở nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể. Hơn nữa, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được chuyển vào ở dạng bất kỳ miễn là polynucleotit này có thể được chuyển vào tế bào vật chủ và biểu hiện trong tế bào vật chủ. Ví dụ polynucleotit có thể được chuyển vào tế bào vật chủ ở dạng cat-xet biểu hiện, là polynucleotit cấu trúc chứa toàn bộ các đoạn cần thiết cho quá trình biểu hiện tự điều khiển của nó. Cat-xet biểu hiện có thể bao gồm vùng được liên kết điều khiển với gen, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Cat-xet biểu hiện có thể ở dạng

vecto biểu hiện tự tái bản. Ngoài ra, polynucleotit có thể được chuyển nguyên vẹn vào tế bào vật chủ và liên kết điều khiển với trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào vật chủ.

Thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh 5’-xanthosin monophosphat” hoặc “vi sinh vật có khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật một cách tự nhiên có khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat hoặc vi sinh vật trong đó khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat được tạo ra cho chủng gốc không có khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat. Cụ thể là, vi sinh vật sản sinh 5’-xanthosin monophosphat có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat, trong đó hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc protein xmpE được tăng cường.

Hơn nữa, xem xét mục đích theo sáng chế, khả năng sản sinh 5’-xanthosin monophosphat của vi sinh vật có thể được cải thiện/tăng cường do khả năng bài tiết 5’-xanthosin monophosphat được tăng cường.

Cụ thể là, thuật ngữ “khả năng sản sinh” và “khả năng bài tiết” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả. Hơn nữa, thuật ngữ “vi sinh vật”, “vi sinh vật bài tiết 5’-xanthosin monophosphat” hoặc “vi sinh vật có khả năng bài tiết 5’-xanthosin monophosphat” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả. Thuật ngữ này có thể được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật một cách tự nhiên có khả năng bài tiết 5’-xanthosin monophosphat hoặc vi sinh vật trong đó khả năng bài tiết 5’-xanthosin monophosphat được tạo ra cho chủng gốc không có khả năng bài tiết 5’-xanthosin monophosphat.

Cụ thể là, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5’-xanthosin monophosphat theo sáng chế có thể là chủng *Corynebacterium stationis* hoặc chủng *Corynebacterium glutamicum*, hoặc chủng *Corynebacterium amoniacgenes*; và tốt hơn nữa nếu vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5’-xanthosin monophosphat theo sáng chế có thể là chủng *Corynebacterium stationis*, nhưng không chỉ giới hạn ở các chủng này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 5’-xanthosin monophosphat, bao gồm các bước sau nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường nuôi cấy; và thu nhận 5’-xanthosin monophosphat từ vi sinh vật này

hoặc môi trường nuôi cấy.

Vi sinh vật và 5'-xanthosin monophosphat theo sáng chế là tương tự như được mô tả nêu trên.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là chủng *Corynebacterium stationis*, nhưng không chỉ giới hạn ở chủng này.

Liên quan đến phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể được nuôi cấy bằng các điều kiện nuôi cấy và phương pháp nuôi cấy bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “nuôi cấy” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trong các điều kiện môi trường nhân tạo được kiểm soát vừa phải. Phương pháp nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Hơn nữa, phương pháp nuôi cấy bao gồm phương pháp nuôi cấy theo mẻ, phương pháp nuôi cấy liên tục, và phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng; cụ thể là phương pháp nuôi cấy theo mẻ hoặc phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng hoặc phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng được lặp lại có thể được nuôi cấy liên tục, nhưng các phương pháp nuôi cấy không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy cần đáp ứng các yêu cầu của các chủng cụ thể một cách thích hợp. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981).

Cụ thể là, các nguồn đường có thể được sử dụng trong môi trường bao gồm sacarit và carbohydrat, như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, xenluloza, v.v.; dầu và chất béo, như dầu đậu tương, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, dầu dừa, v.v.; axit béo, như axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, v.v.; glyxerol; rượu, như etanol; và axit hữu cơ, như axit axetic. Các chất này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Các nguồn cacbon có thể được sử dụng bao gồm sucroza hoặc glucoza thô, hoặc rỉ đường chứa lượng lớn sucroza; và tốt hơn nếu có thể là glucoza tinh khiết, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng.

Các nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm pepton, chiết xuất nấm men, chiết xuất thịt bò, chiết xuất mạch nha, dịch ngô, bột đậu tương, và ure hoặc hợp chất vô cơ, ví dụ amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni carbonat, và amoni nitrat. Các nguồn nitơ cũng có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Các nguồn phosphat có thể được sử dụng bao gồm kali dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy có thể chứa các muối kim loại, như magie sulfat hoặc sắt sulfat. Ngoài các nguyên liệu nêu trên, các chất tăng trưởng thiết yếu, như axit amin và vitamin có thể được sử dụng. Các tiền chất thích hợp cũng có thể được sử dụng cho môi trường nuôi cấy. Các nguyên liệu thô nêu trên có thể được bổ sung theo mẻ hoặc liên tục vào thiết bị nuôi cấy theo cách thức thích hợp.

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ, như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac; hoặc hợp chất axit, như axit phosphoric và axit sulfuric theo cách thức thích hợp. Ngoài ra, bọt có thể được ngăn ngừa hình thành bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt, như este polyglycol của axit béo. Oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ không khí) có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì điều kiện hiếu khí.

Cụ thể là, nhiệt độ nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 32°C đến 33°C. Bước nuôi cấy có thể được thực hiện liên tục cho đến khi thu được lượng mong muốn của 5'-xanthosin monophosphat, nhưng tốt hơn nếu bước nuôi cấy có thể được thực hiện trong thời gian từ 40 giờ đến 120 giờ.

Công đoạn phân tách 5'-xanthosin monophosphat ra khỏi môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này; ví dụ phương pháp ly tâm, phương pháp lọc, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp kết tinh, v.v.. Ví dụ môi trường nuôi cấy có thể được ly tâm ở tốc độ thấp để loại bỏ sinh khối, sau đó dịch nổi thu được có thể được phân tách bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion. Tuy nhiên, phương pháp thực hiện công đoạn phân tách không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Bước thu nhận có thể còn bao gồm công đoạn tinh chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Xác định protein bài tiết 5'-xanthosin monophosphat

Để xác định protein màng của *Corynebacterium* tham gia vào quá trình bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, thư viện ADN bộ gen của *Corynebacterium stationis* (ATCC6872) được tổng hợp. ADN bộ gen của chủng ATCC6872 (tức là chủng *Corynebacterium stationis* thể đại) được chiết tách bằng cách sử dụng kit chiết tách ADN tổng số mini G-spin do Intron cung cấp (mã sản phẩm số 17045) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thư viện protein màng được tổng hợp bằng cách sử dụng khuôn là ADN bộ gen được chiết tách.

Để xác định protein có hoạt tính bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, thư viện ADN bộ gen được tổng hợp được chuyển vào chủng *Corynebacterium* KCCM-10530 được sử dụng làm chủng gốc trong Patent Hàn Quốc số 10-2011-0105662.

Sau đó, 5'-xanthosin monophosphat được bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy tối thiểu chứa 1,7% aga để thiết lập điều kiện sàng lọc trong đó chủng KCCM-10530 bị ức chế sinh trưởng. Chủng KCCM-10530 được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với thư viện plasmit bộ gen của protein màng của chủng ATCC6872, và các khuẩn lạc được chọn thường sinh trưởng trong điều kiện ở đó lượng dư của 5'-xanthosin monophosphat được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Plasmit được thu nhận từ khuẩn lạc được chọn và trình tự nucleotit của nó được phân tích bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit. Một loại protein màng tham gia vào việc loại bỏ sự ức chế sinh trưởng trong điều kiện lượng dư của 5'-xanthosin monophosphat được bổ sung vào được xác định từ thử nghiệm nêu trên.

Protein màng của chủng *Corynebacterium* được kiểm chứng là có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1 và trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 (Ngân hàng gen NCBI: NZ_CP014279.1, WP_066795121, protein vận chuyển MFS). Protein màng này được biết đến là protein vận chuyển MFS, nhưng chức năng của nó vẫn chưa được xác định đầy đủ. Ngoài ra, hoạt tính bài tiết 5'-xanthosin monophosphat. của protein màng này cũng chưa được biết rõ. Theo sáng chế, protein màng này được gọi là

“protein xmpE”.

Ví dụ 2: Xác định protein xmpE

Ví dụ 2-1: Tổng hợp vector thiếu hụt protein xmpE

Vector thiếu hụt protein xmpE được tổng hợp để kiểm chứng xem khả năng bài tiết 5'-xanthosin monophosphat có giảm hay không khi xmpE, là protein tham gia vào việc loại bỏ sự ức chế sinh trưởng do 5'-xanthosin monophosphat được xác định trong ví dụ 1, được loại bỏ ra khỏi chủng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat.

Mảnh gen để tổng hợp vector được tổng hợp bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng gốc là chủng ATCC6872. Cụ thể là, phương pháp PCR được thực hiện đối với protein xmpE bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4. Các đoạn mồi được sử dụng được tổng hợp dựa trên thông tin về các gen của chủng *Corynebacterium stationis* (ATCC6872) được đăng ký trên Ngân hàng gen National Institutes of Health (NIH) (Ngân hàng gen NCBI: NZ_CP014279.1) và trình tự nucleotit liền kề của nó.

Phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 52°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút. Sau đó, bước polyme hóa cuối cùng được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Khi mảnh gen xmpE được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4, thì thu được khuôn polynucleotit có chiều dài khoảng 1,0 kbp. Mảnh gen thu được được tách dòng bằng cách sử dụng vector T (Solgent) để thu được vector TOPO-ΔxmpE.

Ví dụ 2-2: Sản xuất chủng thiếu hụt protein xmpE

Chủng KCCM-10530 được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với vector được tổng hợp theo ví dụ 2-1 (bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen theo Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545), và chủng có vector được chèn trên nhiễm sắc thể do tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn lọc từ môi trường nuôi cấy chứa kanamycin (25mg/L). Chủng thiếu hụt protein xmpE được chọn lọc được gọi là “chủng KCCM-10530_ΔxmpE”, và khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó được đánh giá.

Chủng gốc *Corynebacterium stationis* KCCM-10530 và chủng KCCM-10530_ΔxmpE được cấy vào ống có dung tích 14mL chứa môi trường nuôi cấy hạt có thành phần được thể hiện dưới đây (3mL) và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ kết hợp lắc ở tốc độ bằng 170 vòng/phút. Sau đó, các môi trường nuôi cấy hạt (0,7mL) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sản sinh sau (32mL) (môi trường nuôi cấy chính (24mL) + môi trường nuôi cấy vô trùng bổ sung (8mL)) trong các bình vách ngăn có dung tích 250mL tương ứng, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ kết hợp lắc ở tốc độ bằng 170 vòng/phút. Phân tích HPLC được thực hiện để xác định nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh sau khi kết thúc nuôi cấy. Thành phần của môi trường nuôi cấy và các kết quả đo nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 1.

Môi trường nuôi cấy tối thiểu XMP

glucoza 2%, natri sulfat 0,3%, monokali phosphat 0,1%, đikali phosphat 0,3%, magie sulfat 0,3%, canxi clorua 10mg/L, sắt sulfat 10mg/L, kẽm sulfat 1mg/L, mangan clorua 3,6mg/L, L-xystein 20mg/L, canxi pantothenat 10mg/L, thiamin hydroclorua 5mg/L, biotin 30 µg/L, adenin 20mg/L, guanin 20mg/L, độ pH bằng 7,3

Môi trường nuôi cấy dinh dưỡng XMP

pepton 1%, chiết xuất thịt bò 0,5%, natri clorua 0,25%, chiết xuất nấm men 1%, ure 0,3%, adenin 50mg/L, guanin 50mg/L, aga 2%, độ pH bằng 7,2

Môi trường nuôi cấy hạt XMP trong bình

glucoza 20g/L, pepton 10g/L, chiết xuất nấm men 10g/L, natri clorua 2,5g/L, ure 3g/L, adenin 150mg/L, guanin 150mg/L, độ pH bằng 7,0

Môi trường nuôi cấy sản sinh XMP trong bình (môi trường nuôi cấy chính)

glucoza 50g/L, magie sulfat 10g/L, canxi clorua 100mg/L, sắt sulfat 20mg/L, mangan sulfat 10mg/L, kẽm sulfat 10mg/L, đồng sulfat 0,8mg/L, histidin 20mg/L, xystein 15mg/L, beta-alanin 15mg/L, biotin 100 µg/L, thiamin 5mg/L, adenin 50mg/L, guanin 25mg/L, niacin 5mg/L, độ pH bằng 7,0

Môi trường nuôi cấy sản sinh XMP trong bình (môi trường nuôi cấy vô trùng bổ sung)

monokali phosphat 18g/L, đikali phosphat 42g/L, ure 7g/L, amoni sulfat 5g/L

Bảng 1

Chủng	5'-xanthosin monophosphat (g/L)	Hiệu suất (%)
KCCM-10530	11,8	23,6
KCCM-10530-ΔxmpE	1,6	3,2

Các nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong các môi trường nuôi cấy của chủng gốc KCCM-10530 và chủng thiếu hụt protein xmpE KCCM-10530-ΔxmpE được so sánh; và kết quả được thể hiện trên Bảng 1 cho thấy nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy của chủng KCCM-10530-ΔxmpE đã giảm ít nhất khoảng 10g/L so với chủng gốc trong cùng các điều kiện.

Theo đó, protein xmpE được kiểm chứng là protein tham gia bài tiết 5'-xanthosin monophosphat.

Ví dụ 3: Hoạt tính của protein xmpE được tăng cường

Hoạt tính của protein xmpE trong chủng được tăng cường theo các ví dụ sau, và chủng có hoạt tính của protein xmpE được tăng cường được kiểm chứng xem khả năng sản sinh/bài tiết 5'-xanthosin monophosphat của nó được gia tăng hay không.

Ví dụ 3-1: Tăng số lượng bản sao của protein xmpE

Ví dụ 3-1-1: Tổng hợp vector để làm tăng số lượng bản sao của protein xmpE

Để kiểm chứng xem khả năng bài tiết 5'-xanthosin monophosphat được gia tăng hay không khi hoạt tính của protein xmpE, được cho là tham gia vào việc tạo ra khả năng bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, được tăng cường, vector được tổng hợp để tăng cường biểu hiện gen xmpE. Bằng cách sử dụng phương pháp để làm tăng số lượng bản sao làm phương pháp tăng cường, thử nghiệm sau được thực hiện.

Mảnh gen để tổng hợp vector này được tổng hợp bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng ATCC6872. Cụ thể là, gen xmpE được khuếch đại để chứa đoạn nằm trước có chiều dài bằng 484bp của gen xmpE bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6. Mảnh gen xmpE được khuếch đại được phân cắt bằng các enzym giới hạn XbaI và SpeI. Phản ứng tách dòng được thực hiện trên vị trí XbaI của vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và đơn công bố quốc tế số 2008-033001) để thu được vector pDZ-xmpE. Sau đó,

phản ứng PCR được thực hiện trên gen xmpE bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6 và SEQ ID NO.7 để thu được vector chứa hai bản sao. Sau đó, mỗi mảnh ADN thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn SpeI, và tách dòng vào vector pDZ-xmpE được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI để thu được vector. Vector này chứa hai bản sao của gen xmpE được gọi là vector “pDZ-xmpEX2”.

Ví dụ 3-1-2: Đánh giá khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của chủng có số lượng bản sao của protein xmpE được gia tăng

Chủng KCCM-10530 được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với vector pDZ-xmpEX2 được tổng hợp theo ví dụ 3-1-1(bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen theo Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545), và chủng có vector được chèn trên nhiễm sắc thể do tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn lọc từ môi trường nuôi cấy chứa kanamycin (25mg/L). Chủng chứa gen đích được chèn vào được chọn lọc bằng cách lai chéo thứ cấp chủng sơ cấp được chọn lọc. Quá trình chèn thành công gen của chủng được chuyển gen cuối cùng được kiểm chứng bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8 và SEQ ID NO.9. Chủng được chọn có số lượng bản sao của protein xmpE được gia tăng được gọi là chủng “KCCM-10530-xmpEX2”, và khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó được đánh giá.

Để đánh giá khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của chủng, phương pháp tương tự như trong ví dụ 2-2 được sử dụng. Phân tích HPLC được thực hiện để xác định nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh sau khi kết thúc nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Chủng	5'-xanthosin monophosphat (g/L)	Hiệu suất (%)
KCCM-10530	11,8	23,6
KCCM-10530-xmpEX2	13,1	26,1

Các nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong các môi trường nuôi cấy của chủng gốc *Corynebacterium stationis* KCCM-10530 và chủng KCCM-10530-xmpEX2 có số lượng bản sao của protein xmpE được gia tăng được so sánh; và kết quả được thể hiện trên Bảng 2 cho thấy nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy của chủng KCCM-10530-xmpEX2 bằng 1,3g/L, cho thấy mức độ gia tăng nồng

độ của 5'-xanthosin monophosphat khoảng 11% so với chủng gốc trong cùng các điều kiện.

Kết quả nêu trên được hiểu là rất có ý nghĩa thống kê nhờ đó mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh được kiểm chứng là do hoạt tính của protein xmpE được tăng cường.

Ví dụ 3-2: Tăng cường biểu hiện protein xmpE bằng cách thay thế vùng khởi đầu

Ví dụ 3-2-1: Tổng hợp vector để thay thế vùng khởi đầu xmpE

Để kiểm chứng xem khả năng bài tiết 5'-xanthosin monophosphat tăng khi hoạt tính của protein xmpE, được cho là tham gia vào việc tạo ra khả năng bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, được tăng cường, vector được tổng hợp trong đó vùng khởi đầu của gen xmpE được thay thế bằng vùng khởi đầu có khả năng biểu hiện mạnh. Mảnh gen để tổng hợp vector này được tổng hợp bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng ATCC6872.

Mảnh gen Pcj7, được ghi nhận là được biểu hiện mạnh trong chủng *Corynebacterium stationis* như được thể hiện trong Patent Hàn Quốc số 10-0620092, được sử dụng làm vùng khởi đầu.

Để khuếch đại mảnh gen Pcj7, cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 được sử dụng bằng cách sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng ATCC6872. Mỗi gen xmpE được khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13; và SEQ ID NO.14 và SEQ ID NO.15. Phản ứng PCR được thực hiện trong các điều kiện sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 52°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút. Sau đó, bước polyme hóa cuối cùng được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Khuôn polynucleotit có chiều dài bằng 2,4kbp thu được bằng phản ứng PCR bằng cách sử dụng khuôn là ba mảnh gen được khuếch đại bao gồm mảnh gen Pcj7, mảnh gen xmpE-1, và mảnh gen xmpE-2. Mảnh gen thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI, và tách dòng vào vector mạch thẳng pDZ được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI bằng cách sử dụng T4 ligaza để thu được vector “pDZ-Pcj7/xmpE”.

Ví dụ 3-2-2: Sản xuất chủng có vùng khởi đầu xmpE được thay thế và đánh giá

khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó

Chủng KCCM10530 được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với vector pDZ-Pcj7/xmpE được tổng hợp theo ví dụ 3-2-1 (bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen theo Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545), và chủng có vector được chèn trên nhiễm sắc thể do tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn lọc từ môi trường nuôi cấy chứa kanamycin (25mg/L). Chủng chứa gen đích được tăng cường được chọn lọc bằng cách lai chéo thứ cấp chủng sơ cấp được chọn lọc. Quá trình chèn thành công gen vùng khởi đầu của chủng được chuyển gen cuối cùng được kiểm chứng bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 và SEQ ID NO.17. Chủng trong đó vùng khởi đầu được thay thế bằng vùng khởi đầu có hoạt tính mạnh hơn được gọi là chủng “KCCM-10530-Pcj7/xmpE”, và khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó được đánh giá.

Để đánh giá khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của chủng, phương pháp tương tự như trong ví dụ 2-2 được sử dụng. Phân tích HPLC được thực hiện để xác định nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh sau khi kết thúc nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Chủng	5'-xanthosin monophosphat (g/L)	Hiệu suất (%)
KCCM-10530	11,8	23,6
KCCM-10530-Pcj7/xmpE	12,5	25,0

Các nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong các môi trường nuôi cấy của chủng gốc *Corynebacterium stationis* KCCM-10530 và chủng KCCM-10530-Pcj7/xmpE có mức độ biểu hiện protein xmpE được tăng cường do vùng khởi đầu có hoạt tính mạnh hơn được so sánh; và kết quả được thể hiện trên Bảng 3 cho thấy nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy của chủng KCCM-10530-Pcj7/xmpE bằng 0,7g/L, cho thấy mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat khoảng 6% so với chủng gốc trong cùng các điều kiện.

Kết quả nêu trên được hiểu là rất có ý nghĩa thống kê nhờ đó mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh được kiểm chứng là do hoạt tính của protein xmpE được tăng cường.

Ví dụ 3-3: Thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của protein xmpE

Ví dụ 3-3-1: Tổng hợp vector để thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của protein xmpE

Để kiểm chứng xem hoạt tính bài tiết 5'-xanthosin monophosphat được gia tăng hay không khi biểu hiện protein xmpE, được cho là tham gia vào việc tạo ra hoạt tính bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, được tăng cường, vector được tổng hợp trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu gtg được thay thế bằng atg. Mảnh gen để tổng hợp vector này được tổng hợp bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng khuôn là ADN bộ gen của chủng ATCC6872. Để tổng hợp vector có bộ ba mã hóa khởi đầu gtg được thay thế bằng atg, hai mảnh gen A và gen B được tổng hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20 và SEQ ID NO.21. Phản ứng PCR được thực hiện trong các điều kiện sau: 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; gắn mồi ở nhiệt độ 52°C trong 30 giây; và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút. Sau đó, bước polyme hóa cuối cùng được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Kết quả là, polynucleotit có chiều dài khoảng 0,7kbp và polynucleotit có chiều dài khoảng 1kbp được tổng hợp tương ứng cho mảnh gen A và mảnh gen B. Bằng cách sử dụng hai mảnh này làm khuôn, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.21 để thu được sản phẩm PCR có chiều dài khoảng 1,7 kbp (sau đây được gọi tắt là “mảnh gen g1a”). Phản ứng polyme hóa được thực hiện trong các điều kiện sau: 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây; và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 120 giây. Sau đó, bước polyme hóa cuối cùng được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

Mảnh gen thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI, và tách dòng vào vector mạch thẳng pDZ được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI bằng cách sử dụng T4 ligaza để thu được vector “pDZ-xmpE (g1a)”.

Ví dụ 3-3-2: Sản xuất chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu xmpE được thay thế và đánh giá khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó

Chủng KCCM-10530 được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với vector pDZ-xmpE(g1a) được tổng hợp theo ví dụ 3-3-1 (bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen theo Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545), và chủng có vector được chèn trên nhiễm sắc thể do tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn lọc từ môi

trường nuôi cấy chứa kanamycin (25mg/L). Chủng chứa gen đích được tăng cường được chọn lọc bằng cách lai chéo thứ cấp chủng sơ cấp được chọn lọc. Quá trình chèn thành công gen vùng khởi đầu của chủng được chuyển gen cuối cùng được kiểm chứng bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.21, sau đó phân tích trình tự nucleotit được thay thế bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit. Chủng được chọn trong đó xmpE bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế bằng atg được gọi là chủng CJX1662, và khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó được đánh giá.

Để đánh giá khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của chủng này, phương pháp tương tự như trong ví dụ 2-2 được sử dụng. Phân tích HPLC được thực hiện để xác định nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh sau khi kết thúc nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Chủng	5'-xanthosin monophosphat (g/L)	Hiệu suất (%)
KCCM-10530	11,8	23,6
CJX1662	14,1	28,2

Các nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong các môi trường nuôi cấy của chủng gốc *Corynebacterium stationis* KCCM-10530 và chủng CJX1662 có bộ ba mã hóa khởi đầu của protein xmpE được thay thế được so sánh; và kết quả được thể hiện trên Bảng 4 cho thấy nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy của chủng CJX1662 bằng 2,3g/L, cho thấy mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat khoảng 20% so với chủng gốc trong cùng các điều kiện.

Kết quả nêu trên được hiểu là rất có ý nghĩa thống kê nhờ đó mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh được kiểm chứng là do hoạt tính của protein xmpE được tăng cường.

Hơn nữa, chủng CJX1662 được sản xuất nêu trên được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hàn Quốc vào ngày 11 tháng 04 năm 2018 với mã đăng ký KCCM12248P theo hiệp ước Budapest về đăng ký lưu trữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký cấp Patent.

Ví dụ 3-4 Sản xuất chủng có hoạt tính của protein xmpE được tăng cường trên cơ sở dòng tế bào sản sinh 5'-xanthosin monophosphat thể đại

Ví dụ 3-4-1: Sản xuất chủng có hoạt tính của protein xmpE được tăng cường trên cơ sở dòng tế bào sản sinh 5'-xanthosin monophosphat thể đại

Chủng có khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat được sản xuất bằng cách làm suy yếu hoạt tính của adenylsuccinat synthetaza và 5'-xanthosin monophosphat dehydroaza, tham gia vào các quá trình chuyển hóa 5'-xanthosin monophosphat, trong chủng ATCC6872 thể đại. Để làm giảm hoạt tính của hai enzym nêu trên, chủng được sản xuất trong đó “a”, nucleotit thứ nhất của trình tự nucleotit của purA và guaA, các gen mã hóa tương ứng hai enzym nêu trên, được thay thế bằng “t”. Tốt hơn nữa nếu, chủng được sản xuất bằng cách làm giảm biểu hiện của hai gen trong chủng ATCC6872 được gọi là chủng CJX1663.

Chủng CJX1663 được sản xuất được chuyển gen bằng phương pháp xung điện với vector pDZ-xmpE(g1a) được tổng hợp theo ví dụ 3-3-2, và chủng có vector được chèn trên nhiễm sắc thể do tái tổ hợp trình tự tương đồng được chọn lọc từ môi trường nuôi cấy chứa kanamycin (25mg/L). Chủng chứa gen đích được tăng cường được chọn lọc bằng cách lai chéo thứ cấp chủng sơ cấp được chọn lọc. Quá trình chèn thành công gen vùng khởi đầu của chủng được chuyển gen cuối cùng được kiểm chứng bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.21.

Chủng trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu xmpE được chọn được thay thế bằng atg được gọi là “chủng CJX1663_xmpE(g1a)”, và khả năng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat của nó được đánh giá.

Phân tích HPLC được thực hiện để xác định nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat được sản sinh sau khi kết thúc nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

Chủng	5'-xanthosin monophosphat (g/L)	Hiệu suất (%)
CJX1663	2,1	4,2
CJX1663_xmpE(g1a)	2,8	5,6

Các nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong các môi trường nuôi cấy của chủng gốc *Corynebacterium stationis* CJX1663 và chủng CJX1663_xmpE(g1a) có bộ ba mã hóa khởi đầu của protein xmpE được thay thế được so sánh; và kết quả được thể hiện

trên Bảng 5 cho thấy nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat trong môi trường nuôi cấy của chủng CJX1663_xmpE(g1a) bằng 2,8g/L, cho thấy mức độ gia tăng nồng độ của 5'-xanthosin monophosphat khoảng 33% so với chủng gốc trong cùng các điều kiện.

Kết quả này cho thấy rằng bằng cách tăng cường hoạt tính của protein (xmpE) theo sáng chế, bài tiết 5'-xanthosin monophosphat, thì hiệu suất sản sinh 5'-xanthosin monophosphat có thể được gia tăng.

Đồng thời, các trình tự đoạn môi được sử dụng theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

SEQ ID NO.	Sequence
3	GTCAAACCTCTTTACGCCGACG
4	CGACAACACCAACAGATACTGC
5	ATGCTCTAGACTAGATCTTCTCGACGGGCAG
6	ATGATACTAGTCCTTGGGGACTTCGCGTGTCTG
7	ATGATACTAGTCTAGATCTTCTCGACGGGCAG
8	TTCGGCTCAGCATTTTCCAC
9	CAATAGTGGTCGCGATGACG
10	GCAGTAAGGAGAATCAGAAACATCCCAGCGCTACTA
11	ACCTCTTCGGTTGTGTGCACGAGTGTTTCCTTTCGTTGGG
12	ATGCTCTAGATCCAGTGTGGTTAAGAAGTCG
13	CGCTGGGATGTTTCTGATTCTCCTTACTGCAGT
14	GTACCCAACGAAAGGAAACACTCGTGACACACAACCGAAGAGGT
15	ATGCTCTAGATTATTGAGCCAGAACCATGG
16	CTAGATCTTCTCGACGGGCAG
17	CAATAGTGGTCGCGATGACG
18	ATGCTCTAGATCCAGTGTGGTTAAGAAGTCG
19	GACCTCTTCGGTTGTGTGCATGATTCTCCTTACTGCAGTTA
20	TAAGTGCAGTAAGGAGAATCATGCACACAACCGAAGAGGTC
21	ATGCTCTAGACTCGCTCTTGTGACAAACAC

Thông tin lưu trữ vi sinh vật theo sáng chế

Vi sinh vật theo sáng chế được lưu trữ với các thông tin dưới đây:

Người đăng ký lưu trữ	CJ CHEILJEDANG CORPORATION, CJ CHEILJEDANG CENTER, 330, Dongho-ro, Jung- gu, Seoul 04560, Republic of Korea
Chủng vi sinh vật được đăng ký lưu trữ	Chủng <i>Corynebacterium stationis</i> CJX1662
Mã đăng ký lưu trữ	KCCM12248P
Ngày đăng ký lưu trữ	Ngày 11 tháng 04 năm 2018
Cơ quan lưu trữ	Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hàn Quốc, có địa chỉ tại Yurim B/D, 45 Hongjenseo-2ga-gil, Seodaemun- gu, Seoul 03641, Republic of Korea
Phương pháp lưu trữ vi sinh vật theo sáng chế được thực hiện theo hiệp ước Budapest về đăng ký lưu trữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký cấp Patent.	

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện theo các dạng cụ thể khác mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được xác định bằng bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải phần mô tả nêu trên. Toàn bộ các thay đổi đối với bộ yêu cầu bảo hộ cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat, trong đó protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 có hoạt tính được tăng cường.
2. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 1, trong đó protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 được mã hóa bởi gen chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO:1.
3. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 1, trong đó hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2 được tăng cường bằng cách làm tăng số lượng bản sao của các polynucleotit mã hóa protein, tăng cường hoạt tính vùng khởi đầu, thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu hoặc tổ hợp của chúng.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat là *Corynebacterium stationis*.
5. Phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat bao gồm các bước sau: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 trong môi trường nuôi cấy; và thu nhận 5'-xanthosin monophosphat từ vịnh sinh vật này hoặc môi trường nuôi cấy.
6. Phương pháp sản xuất 5'-xanthosin monophosphat theo điểm 5, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-xanthosin monophosphat là *Corynebacterium stationis*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION
 <120> VI SINH VẬT THUỘC CHI *CORYNEBACTERIUM* SẢN SINH 5'-XANTHOSIN MONOPHOSPHAT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 5'-XANTHOSIN MONOPHOSPHAT BẰNG VI SINH VẬT NÀY
 <130> OPA18214
 <150> KR 10-2018-0065681
 <151> 2018-06-07
 <160> 21
 <170> KoPatentIn 3,0
 <210> 1
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium* sp.
 <400> 1
 gtgcacacaa ccgaagaggt caaactcttt acgccgacgt ttatcatggg gtgggtcgcc 60
 aacttcctgc agttcttggg gttctacttc ctcatcacca cgatggcgct ctacgcaacc 120
 aaggaattca gcgcatcgga aaccgaagca ggctttgccg ccagtgcgat tgttatcggt 180
 gcggtctttt ccggtttggg ttccggatac attattgacc gcttcgggtcg ccgcaaaatt 240
 gtggtgggtc ccgtcatcgc gaccactatt gcgtgcgcgc tatatatccc gatcgattct 300
 ttggggcgtc tctacgctga ccgcttcttc cacggtgtag cttatgcctt tgcgtgcacc 360
 gcgattatgg cgatgggtcca ggaactcatt ccttctgcac gccgctccga aggcactggc 420
 tacctggctt tgggtaccac cgtttcgggt gctatcggac cagcgctagc gctatttttg 480
 ctgggttctt tcaactacga agtcctcttc gttgtcgtcc tcggcatttc gattgtctct 540
 ttgatcgctt cgctagtcac ctatttccgc acctccgacc cagagccaga gctggatgaa 600
 aacggcaatg ctgctgagcc cattaagtcc agcttcaagt ccatcattaa ccctaaagtc 660
 ttgccgattg gcctcttcat gctgctggta gcctttgcct actccggcgt gatcgcacat 720
 atcaacgctt ttgctgaaaa ccgcgacggt gttactggcg caggcctatt ctttatcgct 780
 tagcccatct ccatgttcgt gatgcgctcc taccttggtt aattgcaaga ccgccggggc 840
 gataacagcg ttatctactt tgggtctcga ttctttgtta tctcatttat cgtgctctcg 900
 ctttctaccg ccaactggca tgcggtgtgc gctggcgtgc tagcaggtct gggctacggc 960
 acctgatgc cagctgctca agcagtatct gttggtgttg tcgacaagag caggttcggc 1020
 tcagcatttt ccacctgtgt ccttttcggt gacctgggtc tcggcttcgg ccagtcac 1080
 cttggtgcag tggtttccgc gattggctac ggttcgatgt atgcagtgct cgtcggcgct 1140
 ggcggttatt ctggcatcta ctacctgttc acccacgcac gcaccgagcg cgcaaagcac 1200
 ggcgtagtca agcatgtaga aaccatgggt ctggctcaat aa 1242
 <210> 2
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium* sp.
 <400> 2
 Val His Thr Thr Glu Glu Val Lys Leu Phe Thr Pro Thr Phe Ile Met
 1 5 10 15
 Gly Trp Val Ala Asn Phe Leu Gln Phe Leu Val Phe Tyr Phe Leu Ile
 20 25 30
 Thr Thr Met Ala Leu Tyr Ala Thr Lys Glu Phe Ser Ala Ser Glu Thr
 35 40 45
 Glu Ala Gly Phe Ala Ala Ser Ala Ile Val Ile Gly Ala Val Phe Ser
 50 55 60
 Arg Leu Val Ser Gly Tyr Ile Ile Asp Arg Phe Gly Arg Arg Lys Ile
 65 70 75 80
 Val Val Val Ser Val Ile Ala Thr Thr Ile Ala Cys Ala Leu Tyr Ile
 85 90 95
 Pro Ile Asp Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Ala Asp Arg Phe Phe His Gly
 100 105 110
 Val Ala Tyr Ala Phe Ala Cys Thr Ala Ile Met Ala Met Val Gln Glu
 115 120 125
 Leu Ile Pro Ser Ala Arg Arg Ser Glu Gly Thr Gly Tyr Leu Ala Leu
 130 135 140
 Gly Thr Thr Val Ser Ala Ala Ile Gly Pro Ala Leu Ala Leu Phe Leu
 145 150 155 160
 Leu Gly Ser Phe Asn Tyr Glu Val Leu Phe Val Val Val Leu Gly Ile
 165 170 175
 Ser Ile Val Ser Leu Ile Ala Ser Leu Val Ile Tyr Phe Arg Thr Ser
 180 185 190
 Asp Pro Glu Pro Glu Leu Asp Glu Asn Gly Asn Ala Ala Glu Pro Ile
 195 200 205
 Lys Phe Ser Phe Lys Ser Ile Ile Asn Pro Lys Val Leu Pro Ile Gly
 210 215 220
 Leu Phe Met Leu Leu Val Ala Phe Ala Tyr Ser Gly Val Ile Ala His
 225 230 235 240
 Ile Asn Ala Phe Ala Glu Asn Arg Asp Val Val Thr Gly Ala Gly Leu
 245 250 255
 Phe Phe Ile Ala Tyr Ala Ile Ser Met Phe Val Met Arg Ser Tyr Leu
 260 265 270
 Gly Lys Leu Gln Asp Arg Arg Gly Asp Asn Ser Val Ile Tyr Phe Gly

275 280 285
 Leu Val Phe Phe Val Ile Ser Phe Ile Val Leu Ser Leu Ser Thr Ala
 290 295 300
 Asn Trp His Val Val Val Ala Gly Val Leu Ala Gly Leu Gly Tyr Gly
 305 310 315 320
 Thr Leu Met Pro Ala Ala Gln Ala Val Ser Val Gly Val Val Asp Lys
 325 330 335
 Ser Glu Phe Gly Ser Ala Phe Ser Thr Leu Phe Leu Phe Val Asp Leu
 340 345 350
 Gly Phe Gly Phe Gly Pro Val Ile Leu Gly Ala Val Val Ser Ala Ile
 355 360 365
 Gly Tyr Gly Ser Met Tyr Ala Val Leu Val Gly Val Gly Val Ile Ala
 370 375 380
 Gly Ile Tyr Tyr Leu Phe Thr His Ala Arg Thr Glu Arg Ala Lys His
 385 390 395 400
 Gly Val Val Lys His Val Glu Thr Met Val Leu Ala Gln
 405 410

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE del F
 <400> 3
 gtcaaaactct ttacgccgac g 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE del R
 <400> 4 22
 cgacaacacc aacagatact gc
 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE 2copy F (xbaI)
 <400> 5 31
 atgctctaga ctagatcttc tcgacgggca g
 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE 2copy R (speI)
 <400> 6 32
 atgatactag tccttgggga cttcgcggtgt cg
 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE 2copy F (speI)
 <400> 7 32
 atgatactag tctagatctt ctcgacgggc ag
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE 2copy CF
 <400> 8 20
 ttcggctcag cattttccac
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> xmpE 2copy CR
 <400> 9 20
 caatagtggt cgcgatgacg
 <210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Pcj7 F

```

<400>      10
gcagtaagga gaatcagaaa catcccagcg ctacta
<210>      11
<211>      40
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Pcj7 R
<400>      11
acctcttcgg ttgtgtgcac gagtgtttcc tttcgttggg
<210>      12
<211>      31
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE P 1
<400>      12
atgctctaga tccagtgtgg ttaagaagtc g
<210>      13
<211>      33
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE P 2
<400>      13
cgctgggatg tttctgattc tccttactgc agt
<210>      14
<211>      43
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE P 3
<400>      14
gtacccaacg aaaggaaaca ctcgtgcaca caaccgaaga ggt
<210>      15
<211>      30
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE P 4
<400>      15
atgctctaga ttattgagcc agaaccatgg
<210>      16
<211>      21
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Pcj7/xmpE CF
<400>      16
ctagatcttc tcgacgggca g
<210>      17
<211>      20
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Pcj7/xmpE CR
<400>      17
caatagtggc cgcatgacg
<210>      18
<211>      31
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE atg 1
<400>      18
atgctctaga tccagtgtgg ttaagaagtc g
<210>      19
<211>      41
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      xmpE atg 2
<400>      19
gacctcttcg gttgtgtgca tgattctcct tactgcagtt a
<210>      20
<211>      41
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>

```

36

40

31

33

43

30

21

20

31

41

<223> xmpE atg 3
<400> 20
taactgcagt aaggagaatc atgcacacaa ccgaagaggt c 41
<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> xmpE atg 4
<400> 21
atgctctaga ctcgctcttg tcgacaacac 30