(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

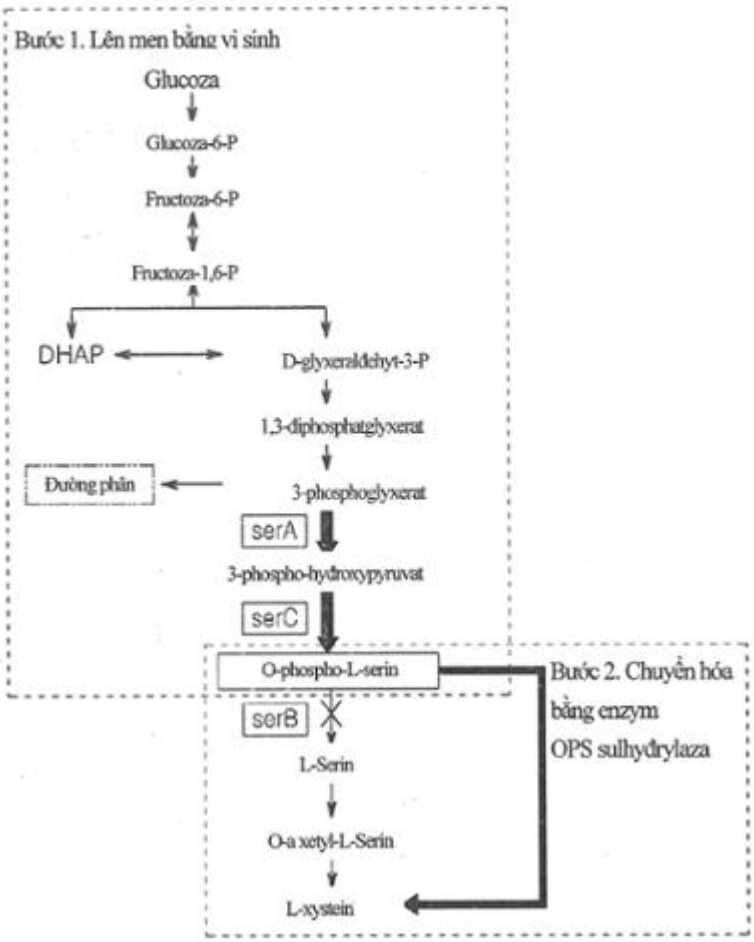
(11) **1-0036375**

(51)[7] **C12P 13/12**; C12N 15/52; C12N 15/54 (13) **B**

(21) 1-2013-01501 (22) 18/10/2011
(86) PCT/KR2011/007732 18/10/2011 (87) WO2012/053794 26/04/2012
(30) 10-2010-0102664 20/10/2010 KR; 10-2011-0086081 26/08/2011 KR
(45) 25/07/2023 424 (43) 25/07/2013 304A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu Seoul 100-400, Republic of Korea
(72) SHIN Soo An (KR); UM Hye Won (KR); CHANG Jin Sook (KR); BAE Hyun Ae (KR); JHON Sung Hoo (KR); JO Jae Hyun (KR); SONG Byeong Cheol (KR); LEE Kyoung Min (KR); YANG Eun Bin (KR); SHIN Yong Uk (KR); KIM Hye Won (KR); KIM Sol (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT XYSTEIN HOẶC DẪN XUẤT CỦA NÓ VÀ VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của nó bằng cách sử dụng O-phosphoserin làm chất trung gian vi sinh vật tái tổ hợp để dùng trong sản xuất O-phosphoserin.


Bước 1. Lên men bằng vi sinh
Glucoza
Glucoza-6-P
Fructoza-6-P
Fructoza-1,6-P
DHAP
D-glyxeraldehyt-3-P
1,3-diphosphatglyxerat
Đường phân
3-phosphoglyxerat
serA
3-phospho-hydroxypyruvat
serC
O-phospho-L-serin
serB
L-Serin
O-a xetyl-L-Serin
L-xystein
Bước 2. Chuyển hóa
bằng enzym
OPS sulhydrylaza

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất xystein hoặc các dẫn xuất của nó bằng cách sử dụng O-phosphoserin làm chất trung gian và vi sinh vật tái tổ hợp để dùng trong sản xuất O-phosphoserin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-xystein là axit amin đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa lưu huỳnh của tất cả các sinh vật sống. Nó được sử dụng trong sinh tổng hợp các protein, như keratin của tóc, glutathion, biotin, metionin và các sản phẩm chuyển hóa chứa lưu huỳnh khác cũng như dùng làm tiền chất của coenzym A. Ngoài ra, đã biết sinh tổng hợp xystein có liên quan mật thiết với quá trình sinh tổng hợp các axit amin khác bao gồm L-serin, L-glyxin, và L-metionin. Trong công nghiệp, L-xystein và dẫn xuất của nó có ứng dụng trong nhiều lĩnh vực bao gồm dược phẩm (để điều trị các bệnh về phế quản), mỹ phẩm (trong dầu gội đầu, chế phẩm giữ sóng tóc lâu), và thực phẩm (chất chống oxy hóa, chất tăng hương vị, chất trợ nhào trộn, v. v.).

Trước đây L-xystein được điều chế công nghiệp bằng cách dùng axit thủy phân tóc người hoặc lông động vật (Biotechnology of the Amino Acids Production edited by Ko Aida, p 217-223, 1986). Tuy nhiên, việc sản xuất xystein từ tóc hoặc lông không những có hiệu suất thấp chỉ khoảng 7~8%, mà việc sử dụng axit clohyđric hoặc axit sulfuric còn tạo ra rất nhiều chất thải gây ô nhiễm môi trường. Ngoài ra, chất chiết từ tóc hoặc lông có thể còn gây khó chịu cho người sử dụng. Các vấn đề này đã thúc đẩy phát triển quy trình sản xuất L-xystein thân thiện với môi trường. Con đường chủ yếu hiện nay là lên men bằng cách sử dụng vi sinh vật.

Phương pháp đại diện trong số các phương pháp sản xuất vi sinh L-xystein là chuyển hóa sinh học D, L-ATC bằng cách sử dụng vi sinh vật (Ryu OH, Ju JY and Shin CS, Process Biochem., 32:201-209, 1997). Tuy nhiên, quá trình chuyển hóa này khó áp dụng trong công

nghiệp do độ tan thấp của tiền chất D, L-ATC. Một phương pháp sản xuất L-xystein khác là lên men trực tiếp bằng cách sử dụng *E.coli* (patent số EP0885962B; Wada M và Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). Sự tích tụ dư thừa của L-xystein trong vi sinh vật gây ra độc tính nội tế bào, làm hạn chế việc sản xuất L-xystein ở nồng độ cao. Để khắc phục hạn chế này, các protein tạo ra L-xystein được sử dụng, nhưng vẫn không có cải thiện đáng kể về hiệu suất.

Liên quan đến con đường sinh tổng hợp của L-xystein ở vi sinh vật và thực vật, O-axetyl-serin (OAS) hoạt động như tiền chất trung gian tạo ra mạch chính cacbon của L-xystein (Kredich NM và Tomkins GM, J. Biol. Chem., 241: 4955-4965, 1966). Enzym O-axetylserin sulfhyđrylaza (OASS), sử dụng hyđro sulfua làm chất cho lưu huỳnh, xúc tác quá trình chuyển hoá của O-axetylserin thành xystein. Theo cách khác, SO_4 có thể được khử thành thiosulfat để dùng làm chất cho lưu huỳnh trong quá trình sản xuất xystein (Nakamura T, Kon Y, Iwahashi H và Eguchi Y, J. Bacteriol., 156: 656-662, 1983). Vì vậy, xystein có thể được tạo ra bằng cách sử dụng vi sinh vật tích tụ OAS và OASS sử dụng các chất cho lưu huỳnh khác nhau (US6,579,705). Con đường sinh tổng hợp xystein qua OAS sử dụng hai enzym là serin axetyltransferaza (CysE), xúc tác quá trình chuyển hoá từ serin thành OAS, và xystein syntaza (CysK), xúc tác quá trình chuyển hoá của OAS thành xystein. Trong số đó, serin axetyltransferaza (CysE) rất nhạy với sự ức chế phản hồi bởi xystein sản phẩm cuối (Wada M và Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Thông qua nghiên cứu sâu rộng, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra sự tồn tại của O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS) *trong Aeropyrum pernix, Mycobacterium tuberculosis,* và *Trichomonas vaginalis*, nó xúc tác con đường đặc hiệu O-phospho-L-serin (OPS), chứ không phải là con đường đặc hiệu OAS, để tổng hợp L-xystein (Mino K và Ishikawa K, FEBS letters,

551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW và Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC và Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006) và rằng OPSS của M. tuberculosis có thể sử dụng Na_2S làm chất cho lưu huỳnh để chuyển hóa OPS thành xystein ngay cả khi không có mặt của các enzym khác khi năm gốc axit amin ở đầu cacbon được loại bỏ khỏi đó (Argen D, Schnell R và Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336, 2009). Theo sáng chế, vi sinh vật được biến đổi để tích tụ OPS trong đó, tiếp theo được ủ để chuyển hóa OPS thành xystein với sự có mặt của enzym OPSS. Phương pháp này chưa từng được mô tả ở bất kỳ tài liệu nào trước đó.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất O-phosphoserin.

Phương pháp theo sáng chế trong đó O-phosphoserin được tạo ra với hiệu suất cao bằng vi sinh vật tái tổ hợp và được sử dụng để chuyển hóa thành xystein là phương pháp thân thiện hơn với môi trường và đảm bảo hiệu suất sản xuất xystein cao hơn so với các phương pháp tổng hợp hóa học. Xystein và dẫn xuất của nó được sản xuất bằng cách lên men và chuyển hóa sinh học theo sáng chế có thể được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thức ăn động vật và thực phẩm cho người và các chất phụ gia thực phẩm.

Mô tả vắt tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ thể hiện quá trình tích tụ O-phosphoserin bằng cách lên men vi sinh và chuyển hóa bằng enzym O-phosphoserin tích tụ thành L-xystein.

Fig.2 là đồ thị thể hiện hoạt tính của OPS Sulfhyđrylaza theo nhiệt độ.

Fig.3 là nhóm đồ thị thể hiện độ nhạy với pH của OPS Sulfhyđrylaza.

Fig.4 là ảnh thể hiện mức biểu hiện của Msm-T trong hệ pET và hệ pCL-Pcj1 khi được phân tích bằng SDS PAGE.

Fig.5 là đồ thị thể hiện hoạt tính enzym của OPS Sulfhyđrylaza trong quá trình chuyển hóa canh thịt lên men OPS tinh chế thành xystein.

Fig.6 là đồ thị thể hiện hoạt tính enzym của OPS Sulfhyđrylaza trong quá trình chuyển hóa canh thịt lên men OPS thành xystein.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "quá trình chuyển hoá xystein" được dùng để chỉ phản ứng được xúc tác bởi O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS), theo đó chuyển hóa cơ chất O-phosphoserin (OPS) thành xystein sản phẩm, nghĩa là nó dùng để chỉ phản ứng xúc tác chuyển hóa OPS thành xytein.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "mức độ chuyển hóa xystein" dùng để chỉ chỉ tỷ lệ phần trăm lượng xystein sản phẩm so với lượng nguyên liệu OPS ban đầu. Trong các điều kiện phản ứng tối ưu, 1 mol OPS được chuyển hóa thành 1 mol xystein. Ví dụ, nếu 100 mol OPS được chuyển hóa thành 100 mol xystein, thì mức độ chuyển hóa xystein là 100%.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm các bước:

1) nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến để có hoạt tính phosphorerin phosphataza (SerB) nội sinh giảm để tạo ra O-sphosphoserin (OPS); và

2) cho OPS thu được từ bước 1) phản ứng với sulfua với sự có mặt của O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện OPSS, để tạo ra xystein hoặc dẫn xuất của nó.

Theo phương pháp này, bước 1) liên quan đến việc nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp để làm giảm hoạt tính của phosphoserin phosphataza nội sinh (SerB).

SerB là protein có hoạt tính thủy phân OPS thành L-serin. Do vậy, vi sinh vật có hoạt tính SerB nội sinh giảm được đặc trưng bởi sự tích tụ của OPS trong đó. SerB không chỉ giới hạn ở, có thể chứa trình tự axit amin bất kỳ, có hoạt tính SerB, và tốt hơn là có trình tự axit amin là

SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Tuy nhiên, chừng nào mà nó có hoạt tính SerB, trình tự axit amin bất kỳ được sử dụng, tốt hơn là có tính tương đồng là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 96% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và tốt nhất là 99% hoặc cao hơn với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Hoạt tính SerB giảm nghĩa là giảm về hoạt tính SerB so với hoạt tính của chủng cải biến trong tình trạng kỹ thuật, và bao hàm SerB đứt gẫy. Kỹ thuật khác nhau để khử hoạt tính SerB là đã biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ minh họa bao gồm gây khuyết đoạn serB nhiễm sắc thể, đưa đột biến vào serB nhiễm sắc thể này để làm giảm hoạt tính SerB nội sinh, đưa đột biến vào vùng điều hòa cho SerB để làm giảm hoạt tính SerB nội sinh, việc thay thế serB nhiễm sắc thể này bằng gen được biến đổi để làm giảm hoạt tính SerB nội sinh và đưa vào oligonucleotit đối nghĩa bổ trợ với bản sao của SerB để ức chế quá trình dịch mã của mARN, nhưng các phương pháp làm giảm hoạt tính SerB không chỉ giới hạn ở đó. Các kỹ thuật này có thể được áp dụng để làm giảm hoạt tính của các enzym khác theo sáng chế.

Sự đứt gẫy của SerB nội sinh dẫn đến việc xuất hiện hiện tượng dinh dưỡng thụ động serin trong vi sinh vật tái tổ hợp làm cho môi trường phải được bổ sung glyxin hoặc serin. Glyxin có thể được tạo ra ở dạng glyxin tinh chế, dịch chiết nấm men chứa glyxin, hoặc trypton. Glyxin được chứa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 g/L, và tốt hơn là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3 g/L. Đối với serin, nó có thể được tạo ra ở dạng được tinh chế serin, dịch chiết nấm men chứa serin hoặc trypton. Nồng độ của nó trong môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5 g/L, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 g/L.

Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, khi được nuôi cấy trong môi trường chứa glyxin hoặc serin, đã phát hiện ra thể đột biến *Corynebacterium glutamicum* hoặc *E.coli* trong đó hoạt tính của SerB nội sinh bị phá vỡ tạo ra lượng OPS cao hơn so với kiểu dại (xem các Bảng 2, 3, 6 và 7).

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể có hoạt tính phosphoglyxerat đehyđrogenaza (SerA) hoặc phosphoserin aminotransferaza (SerC) tăng. SerA là protein có hoạt

tính chuyển hóa 3-phosphoglyxerat thành 3-phosphohyđroxypyruvat. SerA có thể có axit amin kiểu dại hoặc trình tự axit amin đột biến có tính kháng sự ức chế phản hồi bởi serin, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Tốt hơn là, SerA có thể có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin có trình tự từ SEQ ID NO: 3 đến 7. Miễn là nó có hoạt tính SerA kiểu dại hoặc hoạt tính SerA đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi serin, trình tự axit amin bất kỳ có thể được sử dụng, mặc dù tốt hơn là nó có tính tương đồng là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 96% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và tốt nhất là 99% hoặc cao hơn với axit amin có trình tự từ SEQ ID NO: 3 đến 7. "SerA đột biến kháng sự ức chế phản hồi" nghĩa là thể đột biến có hoạt tính SerA được duy trì hoặc tăng cường bất chấp sự ức chế phản hồi bởi serin hoặc glyxin. Thể đột biến kháng phản hồi là đã biết trong lĩnh vực này μgrant GA et al., J. Biol. Chem., 39: 5357-5361, 1999; Grant GA et al., Biochem., 39: 7316-7319, 2000; Grant GA et al., J. Biol. Chem., 276: 17844-17850, 2001; Peters-Wendisch P et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 437-441, 2002; EP0943687B). Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, khi serA kháng phản hồi được đưa tiếp vào đó, phát hiện ra rằng *Corynebacterium glutamicum* hoặc *E.coli* có serB bị phá vỡ tạo ra lượng OPS cao hơn so với kiểu dại (xem các Bảng 4 và 9).

SerC là protein có hoạt tính chuyển hóa 3-phosphohyđroxypyruvat thành O-phosphoserin. SerC không chỉ giới hạn ở, có thể chứa trình tự có hoạt tính SerC, và tốt hơn là có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8. Tuy nhiên, chừng nào mà nó có hoạt tính SerC, trình tự axit amin bất kỳ có thể được dùng, nhưng sẽ tốt hơn là nó có tính tương đồng là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 96% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và tốt nhất là 99% hoặc cao hơn với trình tự SEQ ID NO: 8. Hơn nữa, đột biến có thể được đưa vào SerC để hoạt tính enzym có thể tăng. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, khi serC được đưa tiếp vào đó, đã phát hiện ra rằng *Corynebacterium glutamicum* hoặc *E.coli* có serB bị phá vỡ và serA kháng phản hồi tạo ra lượng OPS cao hơn so với kiểu dại (xem Bảng 9).

Ngoài ra, khả năng của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế thực hiện hấp thu nội bào hoặc gây suy biến O-phosphoserin có thể được làm giảm. Cụ thể, vi sinh vật tái tổ hợp có thể được cải biến để làm giảm hoạt tính của chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat ABC (Operon PhnCDE, nghĩa là thành phần gắn kết ATP của phosphonat vận chuyển (PhnC; EG 10713)- thành phần protein gắn kết bào chất của chất chuyển vận Pn (PhnD; EG 10714)- thành phần màng đầy đủ của chất chuyển vận alkylphosphonat ABC (PhnE; EG 11283)), phosphataza kiềm (PhoA) hoặc axit phosphataza (AphA).

Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, đã quan sát được việc khuyết đoạn tiếp của operon PhnCDE từ thể đột biến tái tổ hợp dẫn đến việc tăng sản xuất OPS (Bảng 10). Ở vi sinh vật tái tổ hợp bị phá vỡ tiếp hoạt tính PhoA hoặc AphA, sự suy biến OPS bắt đầu giảm ở thời điểm khi nồng độ của axit phosphoric trong môi trường nuôi cấy giảm (Bảng 12). Ngoài ra, việc đưa vào serA kháng phản hồi hoặc serC làm tăng sản xuất OPS (các Bảng từ 14 đến 16).

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn được đặc trưng bởi việc tăng hoạt tính pyrimiđin nucleotit transhyđrogenaza (PntAB; EC 1,6,1,1). Như mô tả trước đó (Sauer U P et al., J Biol Chem. 20; 279(8):6613-9. Epub 2003), PntAB tham gia vào quá trình chuyển hóa NADPH để điều hòa sự cân bằng quá trình oxy hóa khử nội bào. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng vi sinh vật tái tổ hợp trong đó PntAB hoạt tính được làm tăng tiếp nhờ sự biểu hiện quá mức của pntAB làm tăng sản xuất OPS (Bảng 17).

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể được đặc trưng bởi việc tăng Permeaza vận chuyển ra O-axetylserin/xystein (YfiK), protein vận chuyển ra homoserin/homoserin lacton (RhtB; EG 11469) hoặc protein vận chuyển ra threonin/homoserin lacton (RhtC; EG11468). Đã biết YfiK là chất tạo ra để tạo ra xystein và OAS ngoại bào (Franke I et al., J. Bacteriology, 185: 1161-1166, 2003) và RhtB được báo cáo có tác dụng làm chất tạo ra ngoại bào homoserin/homoserin lacton, tiền chất threonin. Ngoài ra, đã biết RhtC là chất tạo ra

threonin và homoserin. Việc tăng hoạt tính của YfiK, RhtC và RhtB thể hiện việc tăng sinh trưởng và sản xuất OPS của chủng tích tụ OPS (Bảng 18).

Việc hoạt tính enzym tăng có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tăng số bản sao của gen ghi mã enzym đang quan tâm, đưa đột biến vào vùng điều hòa cho gen để làm tăng hoạt tính enzym, thay thế gen nhiễm sắc thể bằng gen được gây đột biến để làm tăng hoạt tính enzym, và đưa đột biến này vào gen nhiễm sắc thể để làm tăng hoạt tính enzym.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn được đặc trưng bởi hoạt tính của phosphoglyxerat mutaza giảm. Phosphoglyxerat mutaza tồn tại dưới dạng ba isozym: GpmI, GpmA và GpmB và đáp ứng cho quá trình chuyển hoá của 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglyxerat trong quá trình thủy phân glucoza. Để sử dụng 3-phosphoglyxerat as cơ chất, các enzym này cạnh tranh với SerA xúc tác quá trình tổng hợp 3-phosphohyđroxypyruvat. Vì vậy, đã quan sát được việc làm giảm hoạt tính của mỗi enzym tạo ra sự phong phú của 3-phosphoglyxerat, tiền chất của OPS, dẫn đến tăng mức sản xuất OPS (Bảng 19).

Ở vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, L-serin đehyđrataza I (SdaA; EC 4,3,1,17) hoặc 2-amino-3-ketobutyrat coenzym A ligaza (Kbl) có thể cũng bị giảm. Do vậy, vi sinh vật tái tổ hợp được đặc trưng bởi sự sản xuất OPS được duy trì hoặc thậm chí tăng khi nó được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ glyxin hoặc serin thấp (Bảng 20).

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn được đặc trưng bởi hoạt tính của IclR giảm. IclR là yếu tố phiên mã hoạt động chức năng để ức chế sự biểu hiện của aceBAK, operon nối tắt glyoxylat (L Gui et al., J. Bacteriol., Vol 178, No. 1, 321-324, 1996). Khi nó bị khuyết đoạn, quan sát được sự sản xuất OPS tăng (Bảng 21).

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn được đặc trưng bởi việc hoạt tính enzym tăng được chọn từ nhóm bao gồm i) axetyl-CoA synthetaze (Acs), ii) axit axetic kinaza (AckA)-phosphotransaxetylaza (Pta), iii) malat syntaza G (glcB), iv) malat đehyđrogenaza

(MaeB), v) glutamat đehyđrogenaza (gdhA), vi) glyoxylat carboligaza (Glc), vii) tartronat semialđehyt ređuctaza 2 (glxR), viii) glyxerat kinaza II (glxK), và tổ hợp của chúng.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, khi i) Acs (EC No.6,2,1,1; J Bacteriol. 1995 May; 177(10):2878-86) hoặc pyruvat oxidaza monome (PoxB; EC 1,2,2,2) hoặc ii) AckA và Pta (EC 2,3,1,8), đều nhằm mục đích tái sử dụng một cách hiệu quả axetat tích tụ với việc tiêu thụ đồng thời NADH được tạo ra, được làm tăng tiếp, đã phát hiện ra rằng vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế làm tăng sản xuất OPS (Bảng 22). Hoạt động chức năng để xúc tác quá trình tổng hợp malat từ glyoxylat và quá trình chuyển hoá của malat thành pyruvat, iii) GlcB (EC No.2,3,3,9) và iv) MaeB (EC 1,1,137) có thể làm suy yếu chu trình TCA và do đó được sử dụng để làm tăng sự tiêu thụ glucoza và sự sản xuất O-phosphoserin (Bảng 23). Theo một phương án theo sáng chế, việc tăng cường v) GdhA; (EC 1,4,1,2), xúc tác quá trình tổng hợp glutamat, cơ chất của SerC, từ 2-oxoglutarat và NADPH, mang lại tiềm năng sản xuất OPS cao hơn nhiều trên vi sinh vật (Bảng 17). Đã biết tất cả vi) Glc(EC 4,1,1,47), vii) GlxR(EC 1,1,1,60) và viii) GlxK(EC 2,7,1,31) đều chuyển hóa glycoxylat thành 3-phosphoglyxerat, nghĩa là làm tăng mức cơ chất của phosphoglyxerat đehyđrogenaza (Kim HJ et al., J. Bacteriol., 186(11), 3453-3460, 2004; Eva Cusa et al., J. Bacteriol., 181(24), 7479-7484, 1999; Chnag YY et al., J. Biol. Chem. 268(6): 3911-3919, 1993). Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, khi được làm tăng tiếp hoạt tính của Glc, GlxR và GlxK, được cải thiện về mức tiêu thụ đường và sinh trưởng (Bảng 24).

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế dùng để chỉ vi sinh vật bất kỳ trong đó có sự giảm hoạt tính SerB, do đó tạo ra OPS ở mức tăng. Nếu điều kiện này được thỏa mãn, vi sinh vật bất kỳ, nhân sơ hoặc nhân thật, nằm trong phạm vi của sáng chế. Vi sinh vật đại diện trong số đó là vi khuẩn đường ruột hoặc vi khuẩn coryneform. Ví dụ về vi sinh vật hữu ích theo sáng chế bao gồm *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., và *Brevibacterium* sp. Tốt hơn là *Escherichia* sp. và *Corynebacterium* sp, tốt hơn nếu là *Escherichia* sp. và tốt nhất nếu là *E.coli*.

Theo phương án, chủng tái tổ hợp có khả năng sản xuất OPS có tên là *E.coli* CA07-0012, và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc, đặt tại 361-221, Hongje 1, Seodaemun, Seoul, Korea, ngày 12/10/2011 với số truy cập là KCCM11212P.

Ngoài ra, theo một phương án, chủng tái tổ hợp có khả năng sản xuất OPS có tên là *E.coli* CA07-0022/pCL-prmf-serA*(G336V)-serC, và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc, đặt tại 361-221, Hongje 1, Seodaemun, Seoul, Korea, on September. 28, 2010 với số truy cập là KCCM11103P. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "CA07-0022/pCL-prmf-serA*(G336V)-serC" được sử dụng thay thế lẫn nhau với CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-prmf-serA*(G336V)-serC.

Sau khi chủng này được nuôi cấy trong 80 giờ trong 1 lít dịch lên men, O-phosphoserin được tạo ra ở nồng độ là 19,5 g/L (Ví dụ 35).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "việc nuôi cấy" được dùng để chỉ việc sinh trưởng của vi sinh vật trong điều kiện có kiểm soát bắt buộc. Quy trình nuôi cấy có thể được tiến hành bằng cách sử dụng môi trường thích hợp và các điều kiện nuôi cấy là đã biết trong lĩnh vực này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng kiểm soát quy trình nuôi cấy để tương ứng với chủng được sử dụng. Ví dụ, có thể thực hiện theo quy trình dạng mẻ, theo quy trình dạng liên tục, hoặc theo quy trình dạng mẻ có cung cấp chất dinh dưỡng, nhưng không chỉ giới hạn ở những quy trình đó.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy còn chứa nguồn cacbon. Ví dụ về nguồn cacbon bao gồm sacarit và hyđrat cacbon như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột và xenluloza, các dầu và chất béo như dầu đậu tương, dầu hướng dương, thầu dầu dầu và dầu dừa, axit béo như axit palmitic, axit stearic và axit linoleic, các rượu như glyxerol và etanol, và axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn cacbon này có thể có mặt riêng rẽ hoặc kết hợp trong môi trường nuôi cấy. Đối với nguồn nitơ, chất hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, nước ép thịt, dịch chiết mạch nha, dịch ngâm ngô, đậu tương, và protein lúa mỳ, hoặc hợp chất nitơ vô cơ như ure, amoni sulfat,

clorua amoni, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat có thể được chứa trong môi trường nuôi cấy. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Môi trường có thể chứa kali đihyđro phosphat, kali phosphat, hoặc các muối natri tương ứng làm nguồn phospho. Môi trường có thể chứa các muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat. Môi trường nuôi cấy có thể còn chứa axit amin, vitamin và các tiền chất thích hợp. Chất dinh dưỡng có thể được bổ sung theo mẻ hoặc liên tục vào môi trường.

Hợp chất như amoni hyđroxit, kali hyđroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric có thể được bổ sung theo cách thích hợp vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo axit được sử dụng để ức chế sự tạo thành bọt. Ngoài ra, để duy trì môi trường nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được phun vào môi trường nuôi cấy. Đối với điều kiện kị khí hoặc vi hiếu khí, nitơ, hyđro, hoặc cacbon đioxit được cung cấp mà không cần xục khí. Môi trường nuôi cấy có thể thường được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 27°C đến 37°C và tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C. Đối với thời gian nuôi cấy, nó có thể được duy trì thu được sản phẩm đang quan tâm với lượng mong muốn, và tốt hơn là nó nằm trong khoảng từ 10 đến 100 giờ.

Để thu gom và thu hồi tiếp OPS tạo ra trong bước nuôi cấy từ môi trường nuôi cấy, phương pháp thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này có thể được chọn tùy thuộc vào loại môi trường nuôi cấy, là môi trường dạng mẻ, dạng liên tục hoặc dạng mẻ được bổ sung chất dinh dưỡng.

Theo phương pháp theo sáng chế, bước 2) bao gồm phản ứng của OPS của bước 1) với sulfua với sự có mặt của O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện OPSS, để gây ra quá trình chuyển hoá của O-phosphoserin thành xystein hoặc dẫn xuất của nó.

Sulfua có thể được tạo ra ở dạng lỏng hoặc dạng khí cũng như ở dạng rắn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, do bởi sự khác nhau về pH, áp suất và/hoặc độ tan. Miễn là

nó có thể được chuyển hóa thành nhóm thiol (SH), hợp chất lưu huỳnh bất kỳ như sulfua (S_2^-) hoặc thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) có thể được sử dụng theo sáng chế. Tốt hơn là, Na_2S, NaSH, H_2S, $(NH_4)_2S$, NaSH và $Na_2S_2O_3$, đều có thể cung cấp nhóm thiol cho OPS, có thể được sử dụng. Trong phản ứng này, một nhóm thiol được cung cấp cho một phân tử OPS để tạo thành một phân tử xystein hoặc dẫn xuất của nó. Trong quá trình chuyển hoá enzym này, tốt hơn là sulfua có thể được bổ sung ở nồng độ mol cao hơn từ 0,1 đến 3 lần và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 2 lần nồng độ mol của OPS được sử dụng. Xét về mặt kinh tế, sulfua cung cấp nhóm thiol và OPS tốt nhất là được sử dụng ở tỷ lệ mol 1:1. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, Na_2S được sử dụng làm nguồn lưu huỳnh. Na_2S được bổ sung vào ở nồng độ mol cao hơn từ 1 đến 3 lần so với nồng độ mol của OPS được sử dụng trong phản ứng chuyển hoá. Tốt hơn là, nó được nạp ở nồng độ mol cao hơn hai lần so với nồng độ mol của OPS để chuyển hóa một cách hiệu quả OPS thành xystein (Bảng 34).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS)" dùng để chỉ enzym xúc tác sự dịch chuyển của nhóm thiol (SH) vào OPS (O-phosphoserin) để chuyển hóa OPS thành xystein. Enzym được phát hiện thấy trước tiên trong Aeropyrum pernix, Mycobacterium tuberculosis, và Trichomonas vaginalis (Mino K và Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE et al., J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" dùng để chỉ môi trường nuôi cấy hoặc cá thể có sự biến đổi phenotip di truyền được hoặc không di truyền được. Khi được sử dụng kết hợp với OPSS, thuật ngữ "thể đột biến" được dùng để chỉ enzym OPSS được biến đổi về mặt di truyền để hoạt tính của nó có thể tăng một cách hiệu quả so với kiểu dại.

Theo sáng chế, thể đột biến OPSS có thể được cấu trúc bằng cách làm khuyết đoạn, thay thế hoặc thêm phần trình tự nucleotit ghi mã OPSS. Theo một phương án theo sáng chế, enzym OPSS với hoạt tính tăng được điều chế bằng cách làm khuyết đoạn 5 gốc axit amin ở đầu cacbon của enzym OPSS của *Mycobacterium smegmatis*.

Thể đột biến OPSS có thể thu được ở *E.coli*, được sử dụng rộng rãi để biểu hiện enzym, sử dụng kỹ thuật tổng hợp gen dựa trên cơ sở sự tối ưu hóa codon mà nhờ đó enzym đang quan tâm có thể thu được với hiệu suất cao. Theo cách khác, các phương pháp sàng lọc các nguồn enzym hữu ích dựa trên cơ sở tin sinh học lượng lớn của thông tin di truyền của vi sinh vật có thể được sử dụng để thu được thể đột biến OPSS. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, enzym OPSS sử dụng OPS làm cơ chất để tổng hợp xystein được chọn từ nhiều vi khuẩn khác nhau bằng cách sàng lọc tính tương đồng của trình tự axit amin. Về mặt này, các viên tròn tế bào thu được bằng cách sử dụng môi trường và các điều kiện nuôi cấy là thích hợp trong lĩnh vực kỹ thuật này được phân giải, tiếp đó là tinh chế dịch nổi bề mặt chứa enzym để tạo thành enzym OPSS (Bảng 26).

Ngoài ra, hệ biểu hiện hiệu suất cao được phát triển để thu được enzym OPSS về mặt kinh tế. Vectơ pET dùng chất trợ xúc tác T7 là đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế được phát triển hệ biểu hiện enzym, có tên gọi là hệ CJ1 (Patent Hàn quốc số 10-0620092 B1), thay vì dùng hệ thông thường. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, mức biểu hiện của OPSS giữa hệ pET bao gồm chất trợ xúc tác T7 và hệ CJ1 bao gồm chất trợ xúc tác CJ1 được so sánh trong cùng điều kiện. Do đó, hệ CJ1 có mức biểu hiện của OPSS cao hơn so với hệ pET. Ngoài ra, sự biểu hiện quá mức của OPSS đòi hỏi nhiệt độ thấp (18oC) và khoảng thời gian dài trong hệ pET, nhưng ở nhiệt độ cao (37°C) và khoảng thời gian ngắn trong hệ pCL-pCJ1. Tốt hơn là, hệ pCL-pCJ1 được sử dụng để thu được OPSS (Ví dụ 46).

Việc hoạt tính enzym tăng có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau. Ví dụ, nó có thể được thực hiện bằng cách tăng số lượng bản sao của gen ghi mã OPSS, sử dụng chất trợ xúc tác mạnh, hoặc đưa vào đột biến gen.

Việc tối ưu hóa quá trình chuyển hoá enzym của OPSS có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, tối ưu hóa có thể dựa trên cơ sở hiểu biết đầy đủ về đặc điểm đặc trưng của OPSS, như nhiệt độ và pH tối ưu, ức chế cơ chất,

nồng độ cơ chất, độ ổn định nhiệt độ, v. v.. Ngoài ra, tối ưu hóa có thể được xác định bằng các điều kiện tối ưu cho quá trình chuyển hoá enzym, như nồng độ OPSS tối ưu, cân bằng cơ chất tối ưu được sử dụng với nồng độ, tốt hơn là đối với các hợp chất lưu huỳnh tạo ra SH cho quá trình chuyển hoá enzym, tốt hơn là đối với một số dung dịch đệm, sự ảnh hưởng của ion được tạo ra, và đồng yếu tố và nồng độ tối ưu của chúng.

Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, enzym OPSS thu được bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên được đặc trưng và trên cơ sở của các đặc điểm xác định được, quá trình chuyển hoá enzym có lợi về mặt kinh tế có mức độ chuyển hóa cao xystein từ OPS, với độ ổn định enzym được đảm bảo, được phát triển. Trong quy trình chuyển hoá enzym, nhiệt độ phản ứng có thể được đặt nằm trong khoảng từ 37°C đến 80°C. Cụ thể, Ape-OPSS (SEQ ID NO: 12), thuộc Archea, có hoạt tính enzym tăng ở 60°C so với 37°C, và bản thân enzym ổn định cao với nhiệt, với khả năng phản ứng tối ưu ở 60°C. Mặt khác, Msm-T (SEQ ID NO: 10) có hoạt tính tối ưu ở 37°C và hoạt tính giảm với xử lý nhiệt ở 60°C. Quan sát được enzym OPSS có hoạt tính enzym ở pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 10,0. Ape-OPSS thể hiện hoạt tính tối ưu ở độ pH 7,4. Với việc thể hiện hoạt tính tối ưu ở pH nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,0, Msm-T thể hiện độ ổn định trong khoảng pH rộng hơn so với Ape-OPSS (các Bảng 28 và 31, và các Fig.2 và 3).

Đối với đồng yếu tố, 0,001-2mM PLP (pyriđoxal-5'-phosphat) hoặc 0,001-100mM DTT có thể được sử dụng trong quá trình chuyển hoá enzym. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, mức độ chuyển hóa xystein tăng từ 2 đến 3 lần với sự có mặt của 25mM DTT hoặc 0,2mM PLP. Như vậy, xử lý bằng DTT hoặc PLP tạo ra sự cải thiện về mức độ chuyển hóa xystein của bước 2). Việc bổ sung đồng yếu tố được đặt ở mức hợp lý có tính đến việc tăng chi phí sản xuất và tăng mức độ chuyển hóa (Bảng 30).

Các điều kiện phản ứng đối với OPSS có thể thay đổi tùy thuộc vào loại và nồng độ của OPS được sử dụng. Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, OPS tinh khiết (đang có trên thị trường), OPS được tinh chế từ môi trường nuôi cấy được điều chế ở bước 1), và môi trường

nuôi cấy chứa OPS của bước 1) được sử dụng trong các điều kiện khác nhau để tạo ra mức độ chuyển hóa tối ưu. Do đó, mức độ chuyển hóa xystein thay đổi tùy thuộc vào loại và nồng độ của OPSS và nhiệt độ phản ứng và loại và nồng độ của OPS (các Fig.5 và 6, và Bảng 35).

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước tách và tinh chế xystein được tạo ra ở bước 2). Sau khi chuyển hoá enzym, xystein có thể được tách và được tinh chế từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tổng hợp hóa học dẫn xuất xystein từ xystein bằng cách sử dụng phương pháp đã biết. Xystein có thể được phản ứng một cách dễ dàng với chất axetyl hóa để tạo ra NAC (N-axetylxystein) và với axit haloaxetic trong các điều kiện bazơ để tạo ra SCMC (S-carboxymetylxystein). Các dẫn xuất xystein này được sử dụng làm nguyên liệu trong thuốc điều trị chứng ho, viêm phế quản, bệnh hen phế quản, và viêm họng.

Theo sáng chế, canh thịt OPS thu được thông qua lên men vi sinh được dùng làm cơ chất để tổng hợp xystein. Canh thịt OPS thu được bằng cách lên men vi sinh có lợi ích về mặt kinh tế so với OPS tinh khiết đang có trên thị trường ở chỗ canh thịt OPS có thể được sử dụng mà không cần phải tinh chế thêm và đồng yếu tố PLP cần thiết cho quá trình chuyển hoá có thể thu được từ môi trường lên men.

Theo một phương án thực hiện theo sáng chế, quy trình chuyển hoá được phát triển đảm bảo mức độ chuyển hóa xystein cao bằng 80% khi 50µg/ml Msm-T được sử dụng trong các điều kiện phản ứng là canh thịt OPS 50mM hoặc 60mM canh thịt OPS tinh chế, 100mM Na_2S hoặc 120mM Na_2S, và 0,2mM PLP. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng quá trình chuyển hoá enzym bằng cách sử dụng enzym có hoạt tính cao có thể được tối ưu hóa và tăng lên một cách dễ dàng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có hoạt tính của SerB giảm để sản xuất OPS. Theo một phương án thực hiện, vi sinh vật tái tổ hợp có serA hoặc serC kháng

phản hồi serin tăng hoặc khuyết đoạn ít nhất một chất được chọn trong số chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat ABC (operon PhnCDE), phosphataza kiềm (phoA) và axit phosphataza (aphA). Tốt hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất OPS là vi sinh vật được lưu giữ với số truy cập là KCCM11103P hoặc KCCM11212P. Tốt hơn nữa là, vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất OPS là vi sinh vật được lưu giữ với số truy cập là KCCM11103P.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ sau, các ví dụ này nhằm minh họa sáng chế chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Tạo ra *Corynebacterium* sản xuất O-phosphoserin và sản xuất O-phosphoserin bằng cách sử dụng chúng

Ví dụ 1: Tạo ra chủng *Corynebacterium* thiếu hụt phosphoserin Phosphataza (serB)

Corynebacterium glutamicum 13032 được cải biến bằng cách làm khuyết đoạn gen SerB (SEQ ID NO: 13, EC 3.1.3.3) ghi mã phosphoserin phosphataza, xúc tác quá trình tổng hợp L-serin từ O-phosphoserin, từ đó. Nhằm mục đích này, mảnh để làm bất hoạt serB được cấu trúc. Về mặt này, đoạn mồi được thiết kế để tạo ra chủng tái tổ hợp 13032-ÄserB theo sáng chế. Trước tiên, trình tự SerB của *Corynebacterium glutamicum* 13032 thu được có tham khảo dữ liệu của Ngân hàng gen NIH GenBank, và đoạn mồi từ SEQ ID NO: 22 đến 27 được tổng hợp trên cơ sở của trình tự SerB. Để phá vỡ gen đặc hiệu vị trí, vectơ pDC không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được sử dụng. Plasmit pDC-ÄserB trong đó khung đọc mở của serB bị phá vỡ bên trong được cấu trúc và được chọn để tạo ra khuyết đoạn gen serB đặc hiệu vị trí ở chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum*. Việc phá vỡ gen bên trong của pDC-ÄserB được tạo ra bằng PCR bắt chéo bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi SEQ ID NO: 22 và 23 và SEQ ID NO: 24 và 25, với ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 dùng làm khuôn, và đưa sản phẩm PCR vào vectơ pDC. Plasmit tái tổ hợp thu được được biến nạp vào kiểu

dại *Corynebacterium glutamicum* bằng xung điện (van der Rest et al. 1999). Plasmit được đưa vào nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp nguyên phát (trao đổi chéo), tiếp đó là tái tổ hợp thứ phát (trao đổi chéo) để cắt bỏ serB ban đầu từ nhiễm sắc thể.

Sau khi hoàn thành tái tổ hợp thứ phát, thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* chứa đột biến khuyết đoạn của serB được phân tích bằng PCR chẩn đoán bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi đặc hiệu gen SEQ ID NO: 26 và 27. Chủng tái tổ hợp có tên là CB01-0047.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin ở chủng *Corynebacterium t*hiếu hụt phosphoserin Phosphataza

Chủng đột biến CB01-0047, thu được từ khuyết đoạn của serB từ *Corynebacterium glutamicum* 13032, được tham gia để tích tụ O-phosphoserin, được dàn trải lên các đĩa BHIS và được ủ qua đêm trong tủ ấm 30°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa BHIS được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ được thể hiện trong Bảng 1 bằng cách sử dụng vòng platin và sau đó được ủ ở 30°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1

Thành phần của môi trường chính	
Thành phần	Lượng (trong mỗi lít)
Glucoza	100 g
KH_2PO_4	1,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	45 g
$MgSO_4.7H_2O$	1,2 g
HSM	20 g
Các nguyên tố vi lượng	20 ml
Canxi cacbonat	30 g
pH	7,2
Các nguyên tố vi lượng	
Thành phần	Lượng (trong mỗi lít)
Biotin	0,09 g
Thiamin	0,45 g
Ca-Panthenat	0,45 g
NCA	3 g
$FeSO_4.7H_2O$	9 g
$MnSO_4.4H_2O$	9 g

$ZnSO_4.7H_2O$	0,045 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,045 g

Bảng 2

Chủng	OD 562 nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
C.glutamicum 13032	25	100	0,02
CB01-0047	6,5	23	0,07

Quan sát được chủng CB01-0047 sinh trưởng rất chậm trong môi trường chuẩn độ. Việc sinh trưởng chậm này không được cải thiện ngay cả khi bổ sung chất phụ gia L-glyxin. Tuy nhiên, sự sinh trưởng này tăng với sự có mặt của L-serin, nhưng quan sát được chỉ tăng nhẹ về sản xuất O-phosphoserin so với kiểu dại. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Chủng	A.A. (axit amin) được bổ sung	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CB01-0047	-	6,3	21	0,09
	L-Glyxin	6,9	22	0,09
	L-Serin	24,5	100	0,05

Ví dụ 3: Cấu trúc của gen phosphoglyxerat đehyđrogenaza (SerA*) đột biến có nguồn gốc từ *Corynebacterium*

Gen có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* serA*(E235K) (SEQ ID NO: 14) và serA*(197Δ) (SEQ ID NO: 15) được cấu trúc, ghi mã lần lượt các thể đột biến của 3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza, enzym xúc tác quá trình tổng hợp 3-phosphohyđroxypyruvat từ 3-phosphoglyxerat. Các thể đột biến được báo cáo có tính kháng phản hồi (FBR) với serin (Peters-Wendisch P et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 437-441, 2002; EP0943687B). SerA*(E235K) thu được bằng cách ghép PCR lên ADN bộ gen của ATCC13032 bằng cách sử dụng đoạn mồi có trình tự từ SEQ ID NO: 28 đến 31 trong khi serA*(197Δ) được cấu trúc bằng PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự từ SEQ ID NO: 28 đến 32. Sản phẩm PCR thu được như vậy được lồng vào vectơ T tương ứng để cấu trúc vectơ tái tổ hợp được gọi là Tblunt-serA*(E235K) và Tblunt-serA*(197Δ). Sau đó, hai vectơ được xử lý bằng các enzym giới hạn

EcoRV và XbaI để tạo ra hai mảnh ADN serA*(E235K) và serA*(197Δ). Các mảnh này được lồng vào vectơ đầu tận pECCG117-Pcj7-GFP tương ứng đã được phân cắt bằng cùng enzym giới hạn. Do đó, thu được hai vectơ tái tổ hợp pECCG117-Pcj7-serA*(E235K), và pECCG117-Pcj7-serA*(197Δ).

Ví dụ 4: Điều chế chủng *Corynebacterium* biểu hiện quá mức serA* và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Hai plasmit FBR-serA* có nguồn gốc *Corynebacterium* được cấu trúc trong Ví dụ 3 được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* CB01-0047. Để đánh giá khả năng sản xuất O-phosphoserin, thể biến nạp được dàn trải lên các đĩa BHIS và được ủ qua đêm ở 30°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa BHIS được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ được thể hiện trong Bảng 1 chứa thêm 2 g/L L-serin bằng cách sử dụng vòng platin và sau đó được ủ ở 30oC trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CB01-0047/pECCG117	24,5	100	0,03
CB01-0047/pECCG117-Pcj7-serA*(E235K)	25,3	100	0,3
CB01-0047/pECCG117-Pcj7-serA*(197Δ)	24,3	100	0,28

Ở chủng *Corynebacterium glutamicum* được biến nạp bằng FBR-serA* có nguồn gốc *Corynebacterium*, như được thể hiện trong Bảng 4, quan sát được sự tích tụ của O-phosphoserin ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,3 g/L.

Tạo ra *E.coli* sản xuất O-phosphoserin và sản xuất O-phosphoserin bằng cách sử dụng chúng

Ví dụ 5: Tạo ra chủng E.coli có hoạt tính phosphoserin Phosphataza giảm (SerB)

E.coli được cải biến bằng cách làm khuyết đoạn gen SerB (SEQ ID NO: 16) ghi mã phosphoserin phosphataza, xúc tác quá trình tổng hợp L-serin từ O-phosphoserin, từ đó. Khuyết

đoạn thể đột biến *E.coli* K12 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp làm bất hoạt một bước (Datsenko KA và Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000) để làm khuyết đoạn gen đánh dấu kháng chất kháng sinh. Để tạo ra chủng làm khuyết đoạn SerB, trước tiên, PCR được thực hiện trên plasmit pKD3 (Datsenko KA và Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000; Số truy cập GenBank. AY048742) bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 33 và 34. Sản phẩm PCR được đưa vào các tế bào khả biến của pKD46 chứa *E.coli* K12 (Datsenko KA và Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000; Số truy cập GenBank. AY048746) bằng xung điện. Sau đó, chủng thể hiện tính kháng với chloramphenicol được tiến hành PCR để khẳng định sự khuyết đoạn của serB, và tiếp theo được biến nạp bằng pCP20 (Datsenko KA và Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000) để loại bỏ gen đánh dấu kháng chất kháng sinh. Chủng đột biến thu được có tên là CA07-0012.

Ngoài ra, codon ban đầu của serB được cải biến để làm giảm hoạt tính phosphoserin phosphataza như sau. Gen serB kiểu dại với ATG làm codon khởi đầu thu được bằng PCR với ADN bộ gen của *E.coli* W3110 dùng làm khuôn. Thể đột biến serB với CTG làm codon khởi đầu được cấu trúc by sewing PCR. Cặp đoạn mồi SEQ ID NO: 35 và 36 được sử dụng trong PCR để khuếch đại serB kiểu dại trong khi cặp đoạn mồi có trình tự từ SEQ ID NO: 37 đến 38 được sử dụng để khuếch đại PCR thể đột biến serB. Sản phẩm PCR được xử lý bằng HindIII và được tách dòng vào pccBAC1 (Epicentre) ở vị trí giới hạn HindIII để cấu trúc lần lượt pccBAC1-Pself-ATG-serB, và pccBAC1-Pself-CTG-serB. Vectơ serB kiểu dại và đột biến được đưa vào CA07-0012 để so sánh hoạt tính phosphoserin phosphataza.

Ví dụ 6: Thử nghiệm về chủng có hoạt tính của SerB giảm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng đột biến thiếu hụt phosphoserin phosphataza CA07-0012 được tham gia để tích tụ O-phosphoserin, được dàn trải lên các đĩa LB và được ủ qua đêm trong tủ ấm 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ được

thể hiện trong Bảng 5 bằng cách sử dụng vòng platin và sau đó được ủ ở nhiệt độ 33°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 5

Thành phần	Lượng (trong mỗi lít)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	2 g
$(NH_4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4.7H_2O$	1 g
$FeSO_4.7H_2O$	10 mg
$MnSO_4.4H_2O$	10 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	10 mg
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
pH	6,8

Bảng 6

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
E.coli W3110	16	40	0,03
CA07-0012	9,8	16	0,5
CA07-0012/pccBAC1-Pself-ATG-serB	20	40	0
CA07-0012/pccBAC-Pself-CTG-serB	15	40	0,7

Để làm tăng sự sinh trưởng và khả năng sản xuất O-phosphoserin của chúng, CA07-0012 được nuôi cấy trong 48 giờ trong môi trường chuẩn độ Bảng 5 chứa thêm 1 g/L L-glyxin. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
E.coli W3110	16	40	0,03
CA07-0012	18	40	1,5

Như được thể hiện trong Bảng 7, việc bổ sung L-glyxin vào môi trường nuôi cấy cho phép chủng này tăng tốc độ sinh trưởng và khả năng sản xuất O-phosphoserin.

Ví dụ 7: Cấu trúc của vectơ mang gen phosphoglyxerat đehyđrogenaza (SerA*) đột biến có nguồn gốc từ *E.coli*

Các gen có nguồn gốc *E.coli* serA*(G336V) (SEQ ID NO: 18), serA*(G336V, G337V) (SEQ ID NO: 19), và serA*(G336V, R338G) (SEQ ID NO: 20) ghi mã lần lượt các thể đột biến của 3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza, enzym xúc tác quá trình tổng hợp 3-phosphohyđroxypyruvat từ 3-phosphoglyxerat được cấu trúc. Các thể đột biến được báo cáo kháng phản hồi (FBR) với serin µgrant GA, Xu XL và Hu Z, Biochem., 39: 7316-7319, 2000; Grant GA, Hu Z và Xu XL, J. Biol. Chem., 276: 17844-17850, 2001). Đưa gen đột biến vào nhiễm sắc thể của *E.coli* được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ghép PCR. Mảnh ADN chứa đột biến được điều chế bằng cách sử dụng đoạn mồi sau.

Đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 39 và 41 được sử dụng thường trong gen SerA*. Để đưa đột biến vào gen SerA, PCR được thực hiện với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 42 và 43 cho serA*(G336V), với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 44 và 45 cho serA*(G336V, G337V), và với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 46 và 47 cho serA*(G336V, R338G). Đoạn mồi được tổng hợp trên cơ sở của thông tin về gen K12 W3110 (Số truy cập GenBank AP 003471) và trình tự nucleotit gần nó, đăng ký trong Ngân hàng gen NIH GenBank.

Ví dụ 8: Tách dòng gen có nguồn gốc *E.coli* SerA, gen serA*, và gen 3-phosphoserin Aminotransferaza (serC)

serA(SEQ ID NO: 17, EC 1,1,1,95), serC(SEQ ID NO: 21, EC 2,6,1,52), serA*(G336V), serA*(G336V, G337V) và serA*(G336V, R338G) được tách dòng như sau. SerA và serC thu được bằng cách thực hiện PCR trên ADN bộ gen của *E.coli* W3110 trong khi serA*(G336V), serA*(G336V, G337V), và serA*(G336V, R338G) được cấu trúc bằng PCR với mảnh ADN của Ví dụ 7 dùng làm khuôn. Đoạn mồi PCR là SEQ ID NO: 48 và 49 đối với serA và SEQ ID NO: 50 và 51 đối với serC. Sau khi xử lý với EcoRV và HindII, sản phẩm PCR được tách dòng vào vec-tơ tái tổ hợp pCL-Prmf, được cấu trúc bằng cách lồng chất trợ xúc tác *E.coli*

rmf vào vectơ pCL1920 (Số truy cập GenBank AB236930) để tạo ra lần lượt vectơ tái tổ hợp có tên gọi lần lượt là pCL-Prmf-serA, pCL-Prmf-serC, pCL-Prmf-serA*(G336V), pCL-Prmf-serA*(G336V, G337V), và pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V).

Ngoài ra, các plasmit trong đó serA, một trong ba thể đột biến serA, và/hoặc serC tạo ra operon, nghĩa là pCL-Prmf-serA-(RBS)serC, pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC, pCL-Prmf-serA*(G336V, G337V)-(RBS)serC, và pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V)-(RBS)serC được cấu trúc. Về mặt này, mảnh (RBS)serC thu được bằng cách sử dụng đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 51 và 52 và được tách dòng ở vị trí HindIII vào pCL-Prmf-serA, pCL-Prmf-serA*(G336V), pCL-Prmf-serA*(G336V, G337V), và pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V).

Ví dụ 9: Tạo ra chủng được làm tăng cường serA, serA* và serC có nguồn gốc từ *E.coli* và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

8 plasmit được cấu trúc trong Ví dụ 8 được biến nạp vào CA07-0012 và chủng tái tổ hợp thu được được thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin. Mỗi chủng được dàn trải lên các đĩa LB và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 8

Thành phần	Lượng (trong mỗi lít)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	4 g
$(NH_4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4.7H_2O$	1 g
$FeSO_4.7H_2O$	10 mg
$MnSO_4.4H_2O$	10 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	10 mg
L-Glyxin	2,5 g
Trypton	2 g
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g

pH	6,8

Bảng 9

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0012	23	40	1,7
CA07-0012 / pCL-Prmf-serA	25	40	1,8
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)	23	37	2,2
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V,G337V)	21	36	2,1
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V)	22	37	2,2
CA07-0012/pCL-Prmf-serA-(RBS)serC	20	35	2,1
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	18	31	2,5
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V,G337V) -(RBS)serC	17	32	2,5
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V)-(RBS)serC	16	30	2,6

Từ dữ liệu của Bảng 9 có thể thấy rõ rằng chủng *E.coli* CA07-0012 tăng khả năng sản xuất O-phosphoserin khi nó được biến nạp bằng serA, và khả năng sản xuất O-phosphoserin tăng ở mức độ lớn hơn khi đưa vào một trong số ba thể đột biến serA*. Chủng trong đó serA, hoặc một trong ba thể đột biến serA* và serC được hoạt hóa một cách đồng thời có khả năng sản xuất O-phosphoserin cao hơn so với chủng trong đó chỉ hoạt hóa serA hoặc serA*. Khả năng sản xuất O-phosphoserin cao nhất được phát hiện ở chủng trong đó đột biến SerA* và serC được hoạt hóa một cách đồng thời.

Ví dụ 10: Tạo ra chủng *E.coli* thiếu hụt chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat ABC (operon PhnCDE)

Ở *E.coli*, đã có báo cáo chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat ABC chuyển chỗ O-phosphoserin vào bào chất (Wanner BL và Metcalf WW. FEMS Microbiol. Lett., 15:133-139, 1992). Operon PhnCDE ghi mã chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat

ABC protein được gây khuyết đoạn ra khỏi chủng khuyết đoạn serB để tạo ra chủng CA07-0016. Để gây khuyết đoạn phnCDE, cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 53 và 54 được sử dụng. Khuyết đoạn được thực hiện theo cách tương tự với cách được nêu trong Ví dụ 5.

Ngoài ra, pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC, được cấu trúc trong Ví dụ 8, được đưa vào CA07-0016.

Ví dụ 11: Thử nghiệm về chủng *E.coli* thiếu hụt operon PhnCDE về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng CA07-0016 và CA07-0016/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC, được tạo ra trong Ví dụ 10, được đánh giá về khả năng sản xuất O-phosphoserin. Mỗi chủng được dàn trải lên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 bằng cách sử dụng vòng platin và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây.

Bảng 10

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0012	22	40	1,8
CA07-0016	23	38	2,0
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	21	35	2,1
CA07-0016/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	20	40	2,4

Như được thể hiện trong Bảng 10, chủng khuyết đoạn operon PhnCDE chỉ tăng nhẹ khả năng sản xuất O-phosphoserin.

Ví dụ 12: Tạo ra chủng *E.coli* thiếu hụt phosphataza kiềm (phoA), axit phosphataza (aphA)

Chủng *E.coli* khuyết đoạn phosphoserin phosphataza được gây khuyết đoạn tiếp gen phoA mã hoá phosphataza kiềm và gen aphA mã hoá axit phosphataza. Mảnh ADN sử dụng để gây khuyết

đoạn phoA thu được bằng cách thực hiện PCR trên plasmit pKD3 với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 55 và 56. Mặt khác, mảnh ADN sử dụng để gây khuyết đoạn aphA thu được bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 57 và 58 theo cùng cách. Mỗi chủng khuyết đoạn được tạo ra theo cách giống như trong Ví dụ 5. Chủng bị khuyết đoạn cả phoA và aphA được tạo ra bằng cách gây xung điện mảnh ADN để gây khuyết đoạn aphA vào tế bào khả biến của chủng khuyết đoạn phoA đã được biến nạp lại bằng pKD46. Sau đó, thể biến nạp kháng chloramphenicol được tiến hành PCR để khẳng định sự khuyết đoạn aphA, và tiếp theo được biến nạp bằng pCP20 để loại bỏ gen đánh dấu kháng chất kháng sinh. Chủng đột biến thu được và genotyp của chúng được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây.

Bảng 11

Chủng	Genotyp
CA07-0013	W3110 ΔserB ΔphoA
CA07-0015	W3110 ΔserB ΔaphA
CA07-0018	W3110 ΔserB ΔphoA ΔaphA

pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC, được cấu trúc trong Ví dụ 8, được đưa vào mỗi chủng khuyết đoạn theo cách giống như trong Ví dụ 10.

Ví dụ 13: Thử nghiệm về chủng *E.coli* thiếu hụt phosphataza kiềm (phoA), axit phosphataza (aphA) về khả năng gây suy thoái O-phosphoserin

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 12 được thử nghiệm về khả năng sản xuất OPS và việc không đủ khả năng gây suy thoái OPS. Mỗi chủng được dàn trải lên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 bằng cách sử dụng vòng platin và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C trong 72 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 12 dưới đây. Việc không đủ khả năng gây suy thoái OPS được đánh giá bằng sự thay đổi mức ion phosphat được xác định bằng phân tích ion phosphat.

Bảng 12

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)	PO_4 (ppm)
CA07-0012	23	40	0,3	692
CA07-0013	22	40	1,6	459
CA07-0015	7,4	25	0	1098
CA07-0018	19	40	1,7	487
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	20	40	0,1	714
CA07-0013/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	16	40	1,8	385
CA07-0018/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	17	40	1,6	593

Như được thể hiện trong Bảng 12, chủng khuyết đoạn aphA có hiện tượng sinh trưởng không bình thường trong khi chủng thiếu hụt phoA hoặc thiếu hụt cả phoA và một chút aphA tăng khả năng sản xuất O-phosphoserin và giảm khả năng làm suy thoái O-phosphoserin. Mặt khác, chủng khuyết đoạn cả cả phoA lẫn aphA gây suy thoái O-phosphoserin đã tích tụ trong 72 giờ, với tăng đồng thời mức PO_4.

Ví dụ 14: Tạo ra chủng thiếu hụt operon PhnCDE, phoA và aphA

Chủng thiếu hụt SerB (CA07-0012) được cải biến để gây khuyết đoạn tiếp phnCDE ghi mã chất chuyển vận PhnC/PhnD/PhnE alkylphosphonat ABC, phoA ghi mã phosphataza kiềm, và aphA ghi mã axit phosphataza. Chủng được tạo ra như vậy được thể hiện trong Bảng 13 dưới đây. Phương pháp làm bất hoạt một bước đã được mô tả trong Ví dụ 5 được sử dụng để tạo ra các thể đột biến khuyết đoạn.

Bảng 13

Chủng	Genotyp
CA07-0020	W3110 ΔserB ΔphoA ΔphnCDE
CA07-0022	W3110 ΔserB ΔphoA ΔaphA ΔphnCDE

pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC, được cấu trúc trong Ví dụ 8, được đưa vào mỗi chủng khuyết đoạn theo cách giống như trong Ví dụ 10.

Ví dụ 15: Thử nghiệm về chủng *E.coli* thiếu hụt operon PhnCDE, phoA và aphA về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 14 được thử nghiệm về khả năng sản xuất OPS. Mỗi chủng được dàn trải lên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 bằng cách sử dụng vòng platin và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C trong 72 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 14 dưới đây.

Bảng 14

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)	PO_4(ppm)
CA07-0012	23	40	0,3	692
CA07-0020	18,3	40	1,9	262
CA07-0022	19,1	40	2	263
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	20	40	0,1	714
CA07-0020/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	17,6	40	2,5	174
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	17	40	2,6	218

Đã phát hiện ra CA07-0020 và CA07-0022 tăng khả năng sản xuất OPS và giảm khả năng gây suy thoái O-phosphoserinso với CA07-0012. Đặc điểm này cũng được phát hiện ở chủng được biến nạp tiếp bằng pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC.

Ví dụ 16: Tạo ra các thể đột biến *E.coli* thiếu hụt gen operon PhnCDE, phoA, và aphA và có sự thay thế phosphoglyxerat đehyđrogenaza (serA*)

Trong CA07-0022, serA ghi mã3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza được thay thế bằng serA*(G336V), serA*(G336V, G337V), hoặc serA*(G336V, R338G), đều có báo cáo có tính kháng phản hồi với serin, trên nhiễm sắc thể, như sau.

Để đưa đột biến vào gen SerA trên nhiễm sắc thể, vectơ được cấu trúc như sau. PCR được thực hiện với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 40 và 41 trên serA*(G336V), serA*(G336V, G337V), và serA*(G336V, R338G), được tạo ra trong Ví dụ 7. Sau khi xử lý với cả SacI và BamHI, sản phẩm PCR thu được như vậy được tách dòng vào pSG76C ở vị trí SacI và

BamHI. Vectơ tái tổ hợp thu được được biến nạp vào *E.coli* BW mà tiếp theo là được dàn trải trên các đĩa LB. Các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa được sắp xếp trình tự bazơ, và thể biến nạp mà các đột biến được đưa vào được chọn. Từ chúng, các plasmit được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp miniprep thông thường. Theo các đột biến được đưa vào, các plasmit có tên gọi là pSG76C-serA*(G336V), pSG76C-serA*(G336V, G337V) và pSG76C-serA*(G336V, R338G).

Mỗi thể đột biến *E.coli* được tạo ra như mô tả trước đó (Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z và Blattner FR, Nucleic Acids Res. 27: 4409-4415, 1999), và gen đánh dấu kháng chất kháng sinh được loại ra khỏi chúng. Để tạo ra thể đột biến SerA*(G336V), pSG76C-serA*(G336V) được đưa vào tế bào khả biến của CA07-0022 bằng xung điện. Chủng kháng chlorampenicol được tiến hành PCR để khẳng định việc đưa vào serA*(G336V). Chủng này được biến nạp bằng pST76-ASceP (Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z và Blattner FR, Nucleic Acids Res. 27: 4409-4415, 1999) để loại bỏ gen đánh dấu kháng chất kháng sinh. Chủng thu được có tên là CA07-0022 serA*(G336V). Chủng CA07-0022 serA*(G336V) được biến nạp bằng pSG76C-serA*(G336V, G337V) và pSG76C-serA*(G336V, R338G) theo cách tương tự để tạo ra các thể đột biến serA*(G336V, G337V) và serA*(G336V, R338G), có tên gọi lần lượt là CA07-0022 serA*(G336V, G337V) và serA*(G336V, R338G).

Ví dụ 17: Thử nghiệm về các thể đột biến *E.coli* thiếu hụt gen operon PhnCDE, aphA, và aphA và có sự thay thế phosphoglyxerat đehydrogenaza (serA*) về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 16 được thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin. Mỗi chủng được dàn trải lên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa LB hoặc các đĩa LB (spectinomyxin) được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 bằng cách sử dụng vòng platin và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 15 dưới đây.

Bảng 15

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0022	22	40	2,2
CA07-0022 serA*(G336V)	21	35	2,7
CA07-0022 serA*(G336V, G337V)	20	36	2,8
CA07-0022 serA*(G336V, R338G)	20	38	2,7

Chủng trong đó serA đã được biến đổi về gen kháng phản hồi serin có giảm một chút tốc độ sinh trưởng, nhưng lại tăng khả năng sản xuất O-phosphoserin.

Ví dụ 18: Tạo ra chủng đột biến *E.coli* thiếu hụt operon PhnCDE, phoA và aphA và có phohosphoglyxerat đehyđrogenaza (serA*) được thay thế và 3-Phosphoserin Aminotransferaza tăng và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 16, nghĩa là CA07-0022 serA*(G336V), CA07-0022 serA*(G336V, G337V), và CA07-0022 serA*(G336V, R338G) được đưa vào trong plasmit được tạo ra trong Ví dụ 8, nghĩa là pCL-Prmf-serC. Các thể đột biến thu được được đánh giá về khả năng sản xuất O-phosphoserin theo cách giống như trong Ví dụ 9. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây.

Bảng 16

Chủng	OD562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0022/pCL-Prmf-serC	20	38	2,9
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-serC	19,5	34	3,45
CA07-0022 serA*(G336V, G337V) /pCL-Prmf-serC	20	33	3,55
CA07-0022 serA*(G336V, R338G) /pCL-Prmf-serC	19	35	3,6

Như được thể hiện trong Bảng 16, phát hiện ra rằng chủng được hoạt hóa SerC tăng về khả năng sản xuất O-phosphoserin. Hiện tượng này cho thấy rõ ràng hơn về chủng có serA được cải biến vào gen kháng phản hồi serin.

Ví dụ 19: Chủng tăng cường pyrimiđin nucleotit transhyđrogenaza (PntAB) và cấu trúc của vectơ chứa glutamat đehyđrogenaza (gdhA)

Để tạo ra chủng trong đó pntAB ghi mã cho pyrimiđin nucleotit transhyđrogenaza được điều hòa trên, chất trợ xúc tác pntAB được thay đổi bằng chất trợ xúc tác trc bằng cách sử dụng hệ đột biến loxP (Arakawa H et al.,BMC Biotechnol. 1: 7, 2001). Về mặt này, PCR được thực hiện trên plasmit pmlox-trc(ref) bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 59 và 60, và sản phẩm PCR thu được như vậy được đưa vào tế bào khả biến của CA07-0022 serA*(G336V) giữ chặt pKD46 bằng xung điện. Thể biến nạp thể hiện tính kháng với chloramphenicol được tiến hành PCR để khẳng định sự thay thế của chất trợ xúc tác, tiếp đó là biến nạp với pJW168(Le Borgne S et al., các phương pháp Mol Biol. 267: 135-43, 2004) để loại bỏ gen đánh dấu kháng chất kháng sinh. Chủng thu được có tên là CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB. Đoạn mồi được sử dụng cho PCR được thiết kế trên cơ sở thông tin về gen K12 W3110 (Số truy cập GenBank AP002223, AP002224) và trình tự nucleotit gần nó, đăng ký trong NHI GenBank.

Gen gdhA ghi mã glutamat đehyđrogenaza được khuếch đại bằng cách sử dụng PCR với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 61 và 62 để tạo ra một polynucleotit. Cả đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 61 và 62 có vị trí enzym giới hạn HindIII. Đoạn mồi này được thiết kế trên cơ sở thông tin về gen K12 W3110 (Số truy cập GenBank AP 002380) và trình tự nucleotit gần nó, đăng ký trong NHI GenBank.

PCR bắt đầu bằng việc gây biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 3 phút và tiếp diễn biến tính trong 25 chu trình ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, bắt cặp ở nhiệt độ 56°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 2 phút, tiếp đó là kéo dài chuỗi ở 72°C trong 7 phút. Do đó, thu được polynucleotit có chiều dài 1714 bp. Sau khi xử lý với HindIII, sản phẩm PCR được tách dòng vào pCC1BAC ở vị trí HindIII và được đưa vào *E.coli* DH5α, tiếp theo là được dàn trải trên các đĩa LB. Sắp xếp trình tự bazơ cho phép chọn lọc các khuẩn lạc phát triển không có đột biến trong gen

gdhA của chúng. Plasmit được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp miniprep thông thường và có tên gọi là pCC1BAC-P(native)-gdhA.

Ví dụ 20: Việc đưa pntAB và gdhA vào chủng sản xuất OPS và thử nghiệm về khả năng sản xuất OPS

Để tạo ra chủng sản xuất OPS trong đó pntAB và gdhA được điều hòa tăng, chủng CA07-0022 serA*(G336V) hoặc chủng CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB được biến nạp bằng pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC và pCC1BAC-P(native)-gdhA riêng biệt hoặc kết hợp, như được thể hiện trong Bảng dưới đây. Mỗi thể biến nạp được ủ qua đêm ở 33°C trên các đĩa LB. Các khuẩn lạc được cấy chuyển vào 25mL môi trường chuẩn độ của Bảng 8 bằng cách sử dụng vòng platin và được nuôi cấy ở 33°C trong 48 giờ kết hợp lắc ở tốc độ 200 vòng/phút.

Bảng 17

Chủng	OD562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	20	37	3,1
CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB/pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	19	35	3,4
CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB/pCC1BAC-P(native)-gdhA	7,2	11	0,2
CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB/pCC1BAC-P(native)-gdhA/pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	27,0	40	3,95

Như được thể hiện trong Bảng 17, chủng được cải thiện về khả năng sản xuất O-phosphoserin khi pntAB được điều hòa tăng trong đó. Quá trình điều hòa tăng của cả pntAB và gdhA mang lại mức gia tăng lớn hơn về khả năng sản xuất O-phosphoserin so với mẫu đối chứng. Do đó, pntAB và gdhA được hiểu là đóng vai trò quan trọng trong sản xuất OPS.

Ví dụ 21: Cấu trúc của vectơ mang gen ghi mã protein vận chuyển ra O-Axetylserin/Xystein (ydeD), permeaza vận chuyển ra O-Axetylserin/Xystein (yfiK), protein vận chuyển ra homoserin/homoserin lacton (rhtB), protein vận chuyển ra Threonin/Homoserin (rhtC), chất

chuyển vận Arsenit/Antimonit (asrB), và cấu trúc siêu phân tử vận chuyển Leuxin/Isoleuxin/Valin (livHM) của *E.coli*

Việc giải phóng O-phosphoserin đã được sản xuất ra khỏi tế bào đòi hỏi yếu tố xuất ra thích hợp, tuy nhiên không có yếu tố nào được báo cáo trước đó. Trong bản mô tả này, sáu gen, nghĩa là protein vận chuyển ra O-axetylserin/xystein ghi mã ydeD, permeaza vận chuyển ra O-axetylserin/xystein ghi mã yfiK (Franke I, Resch A, Dassler T, Maier T và Bock A, J. Bacteriology, 185: 1161-166, 2003), protein vận chuyển ra homoserin/homoserin lacton-ghi mã rhtB, protein vận chuyển ra threonin/homoserin-ghi mã RhtC, chất chuyển vận arsenit/antimonit ghi mã asrB, và cấu trúc siêu phân tử vận chuyển leuxin/isoleuxin/valin ghi mã livHM được chọn trong số các loại gen vận chuyển đã được báo cáo trước đó, và được tách dòng và đánh giá.

Mỗi gen thu được bằng cách thực hiện PCR trên ADN bộ gen của *E.coli* W3110, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 63 và 64 đối với ydeD, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 65 và 66 đối với yfiK, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 67 và 68 đối với rhtB, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 69 và 70 đối với rhtC, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 71 và 72 đối với asrB, và với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 73 và 74 đối với livHM. Sau khi xử lý với EcoRV và HindIII, mỗi sản phẩm PCR thu được như vậy được tách dòng vô tính ở vị trí EcoRV và HindIII vào pCL-Prmf-GFP, để tạo ra vectơ tái tổ hợp, có tên gọi là pCL-Prmf-ydeD, pCL-Prmf-yfiK, pCL-Prmf-rhtB, pCL-Prmf-rhtC, pCL-Prmf-arsB, và pCL-Prmf-livHM.

Ví dụ 22: Đưa vectơ mang gen ghi mã *E.coli* YdeD, YfiK, RhtB, RhtC, AsrB, livHM vào chủng sản xuất O-phosphoserin và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng CA07-0022 serA*(G336V) được biến nạp bằng sáu plasmit được cấu trúc trong Ví dụ 21 và được đánh giá về khả năng sản xuất O-phosphoserin theo cách giống như trong Ví dụ 9. Các kết quả được nêu trong Bảng 18 dưới đây.

Bảng 18

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)	22,1	37,7	2,5
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-ydeD	7,4	22,3	0,69
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-yfiK	21	40	2,55
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-rhtB	23	40	2,8
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-rhtC	22,5	40	2,75
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-arsB	21	38	2,4
CA07-0022 serA*(G336V) /pCL-Prmf-livHM	8	23	0,8

Như được thể hiện trong Bảng 18, chủng được biến nạp bằng ydeD, mdtG hoặc livHM có tốc độ sinh trưởng giảm và khả năng sản xuất OPS giảm trong khi biến nạp với yfiK, rhtB hoặc rhtC làm tăng tốc độ sinh trưởng và khả năng sản xuất OPS (Bảng 18).

Ví dụ 23: Tạo ra chủng thiếu hụt phosphoglyxerat mutaza µgpmI, gpmA và gpmB)

Mỗi gen gpmI, gpmA, và gpmB, ghi mã phosphoglyxerat mutaza, được gây khuyết đoạn riêng rẽ hoặc kết hợp từ CA07-0022 serA*(G336V) để tạo ra thể đột biến chủng có tên gọi là CA07-0022 serA*(G336V)ΔgpmI, CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmA, CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmB, CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmIΔgpmA, CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmAΔgpmB, và CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmIΔgpmAΔgpmB tương ứng. Chủng đã khuyết đoạn gpmA và gpmB được tạo ra theo cách tương tự với Ví dụ 5, sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 75 và 76 đối với gpmA và cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 81 và 82 đối với gpmB. Đối với cấu trúc của chủng khuyết đoạn gpmI, như được mô tả trong Ví dụ 16, đột biến gpmI chứa codon kết thúc được đưa vào bằng cách sử dụng pSG76C. Thể đột biến gpmI chứa codon kết thúc được khuếch đại bằng cách vá PCR sử dụng đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 77 đến 81, với ADN bộ gen của K12 W3110 dùng làm khuôn, và được tách dòng vào pSG76 ở vị trí SacI/BamHI.

Ví dụ 24: Thử nghiệm về chủng thiếu hụt gpmI, gpmA và gpmB về khả năng sản xuất OPS

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 23 được đánh giá về khả năng sản xuất OPS theo cách giống như trong Ví dụ 9. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 19 dưới đây.

Bảng 19

Chủng	OD562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)	23	40	2,4
CA07-0022 serA*(G336V)ΔgpmI	22	38	2,5
CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmA	20	34	2,8
CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmB	20	34	2,7
CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmIΔgpmA	19	32	2,6
CA07-0022 serA*(G336V) ΔgpmAÄgpmB	21	35	3,3

Có thể thấy trong Bảng 19, khi mỗi gpmI, gpmA và gpmB được gây khuyết đoạn và các gen khác không được gây khuyết đoạn, mức tiêu thụ đường của chủng đột biến giảm, nhưng khả năng sản xuất OPS của chúng tăng so với chủng bố mẹ. Đặc biệt là, chủng không có cả gpmA lẫn gpmB có mức tiêu thụ đường tương tự, nhưng có khả năng sản xuất OPS tăng so với chủng không có hoặc gpmA hoặc gpmB. Vì vậy, việc gây khuyết đoạn gpmI, gpmA và gpmB được hiểu là nhằm tạo ra lượng 3-phosphoglyxerat, tiền chất của OPS tăng, do đó dẫn đến việc làm tăng khả năng sản xuất OPS.

Ví dụ 25: Tạo ra chủng thiếu hụt 2-Amino-3-ketobutyrat CoA Ligaza (kbl), L-Serin Deaminaza I (sdaA)

Gen kbl mã hoá 2-amino-3-ketobutyrat CoA ligaza và gen sdaA mã hoá L-serin đeaminaza I được gây khuyết đoạn từ CA07-0022 serA*(G336V) để tạo ra CA07-0022 serA*(G336V) Δkbl, và CA07-0022 serA*(G336V) ΔsdaA tương ứng. Chủng khuyết đoạn kbl

và sdaA được tạo ra theo cách tương tự với Ví dụ 5, sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 83 và 84 đối với kbl và cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 85 và 86 đối với sdaA.

Ví dụ 26: Thử nghiệm về OD và mức tiêu thụ đường của chủng thiếu hụt kbl/sdaA theo nồng độ glyxin

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 25 được đánh giá về OD, mức tiêu thụ đường, và khả năng sản xuất O-phosphoserin khi chúng được ủ trong cùng điều kiện môi trường như được mô tả trong Bảng 8 của Ví dụ 9, chỉ khác là glyxin được sử dụng với lượng từ 0 đến 2,5 g/L.

Bảng 20

Nồng độ glyxin (g/L)	Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
0	CA07-0022 serA*(G336V)	8	10	0,7
	CA07-0022 serA*(G336V)Δkbl	7	8	0,7
	CA07-0022 serA*(G336V)ΔsdaA	9	10	0,7
1	CA07-0022 serA*(G336V)	15	30	1,5
	CA07-0022 serA*(G336V)Δkbl	14	28	1,2
	CA07-0022 serA*(G336V)ΔsdaA	22	39	2,4
2	CA07-0022 serA*(G336V)	19	35	2,1
	CA07-0022 serA*(G336V)Δkbl	17	32	1,7
	CA07-0022 serA*(G336V)ΔsdaA	23	40	2,5
2,5	CA07-0022 serA*(G336V)	22	38	2,5
	CA07-0022 serA*(G336V)Δkbl	23	39	2,7
	CA07-0022 serA*(G336V)ΔsdaA	24	40	2,3

Như có thể nhìn thấy trong Bảng 20, OD và tốc độ tiêu thụ đường trong tất cả ba chủng tăng khi mức glyxin trong môi trường tăng. Đặc biệt là, chủng khuyết đoạn sdaA có mức tăng đáng kể về OD và tốc độ tiêu thụ đường ở nồng độ glyxin là 1 g/L. Khả năng sản xuất OPS của chủng khuyết đoạn kbl cải thiện mạnh với sự có mặt của 2,5 g/L glyxin.

Ví dụ 27: Tạo ra chủng thiếu hụt iclR

Yếu tố phiên mã iclR được gây khuyết đoạn từ CA07-0022 serA*(G336V) để tạo ra CA07-0022 serA*(G336V) ÄiclR. Chủng đột biến khuyết đoạn được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp làm bất hoạt một bước như trong Ví dụ 5 và gen đánh dấu kháng chất kháng sinh được loại ra. Để tạo ra chủng khuyết đoạn iclR, PCR được thực hiện với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 87 và 88.

Ví dụ 28: Thử nghiệm về chủng thiếu hụt iclR về khả năng sản xuất OPS

Chủng được tạo ra trong Ví dụ 27 được đánh giá về khả năng sản xuất OPS theo cách giống như trong Ví dụ 9.

Bảng 21

Chủng	OD562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)	22	38	2,5
CA07-0022 serA*(G336V)ΔiclR	22	40	2,7

Hiểu nhiên từ dữ liệu của Bảng 21, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất OPS của chủng khuyết đoạn iclR tăng.

Ví dụ 29: Cấu trúc của vectơ mang *E.coli* Axetyl CoA Synthetaze (acs), Pyruvat Oxidaza Monome (poxB), Axetat Kinaza (ackA) và Phosphat Axetyltransferaza (pta)

Để làm tăng mức sản xuất và việc sử dụng lại axetat trong chủng sản xuất O-phosphoserin, các plasmit biểu hiện mang axetyl CoA synthetaze ghi mã acs, poxB ghi mã pyruvat oxidaza monome, ackA ghi mã axetat kinaza và pts ghi mã phosphat axetyltransferaza tương ứng, được cấu trúc.

Mỗi gen thu được bằng cách thực hiện pfu PCR trên ADN bộ gen của *E.coli* W3110 với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 89 và 90 đối với acs, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 91 và 92 đối với poxB, và với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 93 và 94 đối với ackA và pta. Sau khi xử lý với HindIII, mỗi sản phẩm PCR thu được như vậy được tách dòng vô tính ở vị trí EcoRV và HindIII vào vectơ pCL-Prmf-GFP được cấu trúc bằng cách lồng chất trợ xúc tác *E.coli* rmf vào pCL1920, để tạo ra pCL-Prmf-acs, pCL-Prmf-poxB, và pCL-Prmf-ackA-pta. Sau đó, các plasmit này được xử lý bằng EcoRI để thu được đoạn cài xen ADN, nghĩa là Prmf-acs, Prmf-poxB, và Prmf-ackA-pta, mà sau đó được đưa vào pCC1BAC (EcoRI) (CopyControlTM pcc1BACTM Vectơ, Epicentre. Cat. Nos. CBAC311) để cấu trúc pCC1BAC-Prmf-acs, pCC1BAC-Prmf-poxB, và pCC1BAC-Prmf-ackA-pta tương ứng.

Ví dụ 30: Tạo ra chủng sản xuất OPS tăng cường acs, poxB, ackA, pta *E.coli* và thử nghiệm về khả năng sản xuất OPS

Chủng CA07-0022 serA*(G336V) được biến nạp bằng ba vectơ được tạo ra trong Ví dụ 29 và được thử nghiệm về khả năng sản xuất OPS theo cách giống như trong Ví dụ 9.

Bảng 22

Chủng	OD562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)	21,9	35,5	2,45
CA07-0022 serA*(G336V) / pCC1BAC-Prmf-acs	23,6	40	2,65
CA07-0022 serA*(G336V) / pCC1BAC-Prmf-poxB	18,3	36,8	1,86
CA07-0022 serA*(G336V) / pCC1BAC-Prmf-ackA-pta	21,8	40	2,65

Có thể thấy trong Bảng 22, tốc độ sinh trưởng của chủng được biến nạp bằng poxB giảm trong khi đưa vào acs hoặc ackA-pta thì tốc độ sinh trưởng và khả năng sản xuất OPS tăng.

Ví dụ 31: Cấu trúc của vectơ mang *E.coli* malat syntaza A (aceB), Isoxitrat Lyase Monome (aceA), Phosphoenolpyruvat Carboxykinaza (pckA), Malat Synthase G (glcB), và Malat đehydrogenaza (maeB)

Plasmit cho phép biểu hiện cả aceB ghi mã malat syntaza A và aceA ghi mã isoxitrat lyaza monome, pckA ghi mã phosphoenolpyruvat carboxykinaza, glcB ghi mã malat syntaza G, và maeB ghi mã malat đehyđrogenaza ở *E.coli* tương ứng, được cấu trúc.

Các gen được điều chế bằng cách thực hiện pfu PCR trên ADN bộ gen của *E.coli* W3110 với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 95 và 96 đối với aceBA, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 97 và 98 đối với pckA, với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 99 và 100 đối với glcB, và với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 101 và 102 đối với maeB. Sau khi xử lý với HindIII, mỗi sản phẩm PCR thu được như vậy được tách dòng vô tính ở vị trí EcoRV và HindIII vào vectơ pCL-Prmf-GFP được cấu trúc bằng cách lồng chất trợ xúc tác rmf *E.coli* vào pCL1920, để tạo ra pCL-Prmf-aceBA, pCL-Prmf-pckA, pCL-Prmf-glcB, và pCL-Prmf-maeB.

Ví dụ 32: Tạo ra chủng sản xuất OPS được tăng cường bằng aceB, aceA, pckA, glcB và maeB *E.coli* và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Chủng CA07-0022 serA*(G336V) được biến nạp bằng bốn vectơ được tạo ra trong Ví dụ 31 và được thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin theo cách giống như trong Ví dụ 9.

Bảng 23

Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	OPS (g/L)
CA07-0022 serA*(G336V)	23	40	2,4
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-aceBA	20	36	1,9
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-pckA	10	11	0
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-glcB	21	40	2,8
CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-maeB	21	40	2,9

Có thể thấy trong Bảng 23, tốc độ tiêu thụ đường và khả năng sản xuất OPS của chủng hơi giảm khi được biến nạp bằng aceBA và tốc độ sinh trưởng giảm đáng kể khi được biến nạp bằng pckA trong khi đưa vào glcB hoặc maeB tăng khả năng sản xuất OPS.

Ví dụ 33: Cấu trúc của vectơ mang Glyoxylat Carboligaza (Glc), Tartronat Semialđehyt Ređuctaza 2 (glxR), và Glyxerat Kinaza II (glxK)

gcl ghi mã glyoxylat carboligaza, glxR ghi mã tartronat semialđehyt ređuctaza 2, và glxK ghi mã glyxerat kinaza II, tất cả đều có liên quan trong quá trình chuyển hoá của glyoxylat vào 3-phosphoglyxerat, được tách dòng như sau. Các gen thu được bằng cách thực hiện PCR trên ADN bộ gen của *E.coli* W3110 với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 103 và 104 đối với gcl, và với cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 105 đến 108 đối với glxR-glxK. Sau khi phân hủy bằng EcoRV và HindIII, mỗi sản phẩm PCR được tách dòng vô tính ở vị trí EcoRV và HindIII vào vectơ pCL-Prmf-GFP được cấu trúc bằng cách lồng chất trợ xúc tác rmf *E.coli* vào pCL1920 để tạo thành các plasmit tái tổ hợp, có tên gọi là pCL-Prmf-gcl, pCL-Prmf-glxR-glxK, và pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl tương ứng.

Ví dụ 34: Đưa vectơ mang glc, glxR, glxK vào chủng sản xuất O-phosphoserin và thử nghiệm về khả năng sản xuất O-phosphoserin

Ba plasmit được cấu trúc trong Ví dụ 33 được đưa vào CA07-0022 serA*(G336V) mà sau đó được đánh giá về khả năng sản xuất O-phosphoserin theo cách giống như trong Ví dụ 9. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 24 dưới đây.

Bảng 24

Thời gian	Chủng	OD 562nm	Đường đã tiêu thụ (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
24 giờ	CA07-0022 serA*(G336V)	15,6	24	1,25
	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-gcl	19,6	29,7	1,2
	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-glxR-glxK	21	33	1,3
	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl	18,4	29,7	1,03
48 giờ	CA07-0022 serA*(G336V)	23	40	2,4
	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-gcl	31,5	40	1,67
	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-glxR-glxK	26,2	40	1,5

	CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl	22	40	1,61

Có thể thấy trong Bảng 24, khả năng sản xuất O-phosphoserin cuối của chủng biến nạp lần lượt với gcl, glxR-glxK và glxR-glxK-gcl giảm, nhưng tốc độ sinh trưởng và tốc độ tiêu thụ đường tăng so với bản thân chủng CA07-0022 serA*(G336V). Đặc biệt là, đã phát hiện ra rằng việc đưa vào glxR-glxK làm gia tăng lớn hơn về tốc độ sinh trưởng và tốc độ tiêu thụ đường.

Ví dụ 35: Đánh giá chủng sản xuất O-phosphoserin trong thiết bị bên men

Chủng CA07-0022 serA*(G336V)/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC được ủ ở nhiệt độ 33°C trong 24 giờ trên các đĩa aga MMYE (2 g/L glucoza, 2mM magie sulfat, 0,1mM canxi clorua, 6 g/L natri pyrophosphat, 0,5 g/L natri clorua, 3 g/L kali đihyđro phosphat, 10 g/L dịch chiết nấm men, 18 g/L aga) chứa 50μg/mL spectinomyxin. Các khuẩn lạc thu được được cạo từ 1/10 diện tích mỗi đĩa aga, được cấy vào 50 ug/mL môi trường hạt chứa spectinomyxin, 10 g/L glucoza, 0,5 g/L magie sulfat, 3 g/L kali đihyđro phosphat, 10 g/L dịch chiết nấm men, 0,5 g/L natri clorua, 1,5 g/L clorua amoni, 12,8 g/L natri pyrophosphat, 1 g/L glyxin) trong bình cầu lắp van đổi hướng, và được ủ ở 30°C trong sáu giờ trong khi lắc ở 200 vòng/phút. 300mL môi trường chính trong thiết bị bên men1 L, môi trường nuôi cấy hạt thu được với lượng lớn đến 16% thể tích của môi trường chính được bổ sung vào, tiếp đó là ủ ở nhiệt độ 33°C và pH 7,0. Môi trường chính có thành phần được nêu trong Bảng 25 dưới đây.

Bảng 25

Thành phần của môi trường chính	
Glucoza	20 g/L
Magie sulfat	0,3 g/L
Kali đihyđrogen phosphat	1,5 g/L
Dịch chiết nấm men	5 g/L
Amoni sulfat	5 g/L
Trypton	10 g/L
Glyxin	2 g/L
Natri clorua	0,5 g/L
Natri xitrat	1 g/L
Iron sulfua	75 mg/L

Canxi clorua	15 mg/L
Các nguyên tố vi lượng	1 ml/L
Các nguyên tố vi lượng	
Coban clorua	0,7 g/L
Kẽm sulfat	0,3 g/L
Molybđat	0,15 g/L
Axit boric	1,2 g/L
Mangan sulfat	1,6 g/L
Đồng sulfat	0,25 g/L

Trong quá trình ủ, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến 7,0 bằng dung dịch nước amoniac. Khi rút kiệt glucoza từ môi trường nuôi cấy, quá trình lên men dạng nạp liệu theo mẻ được thực hiện bằng cách bổ sung 520 g/L glucoza dung dịch. Sau khi lên men trong 80 giờ, O-phosphoserin được tạo ra ở nồng độ là 19,5 g/L như được đo bằng HPLC.

Phát triển và xác định đặc điểm của O-phosphoserin (OPS) Sulfhyđrylaza (OPSS)

Ví dụ 36: Phát triển OPS Sulfhyđrylaza (OPSS)

Aeropyrum pernix, Mycobacterium tuberculosis, và Trichomonas vaginalis được báo cáo để thu được O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS), enzym dùng O-phospho-L-serin (OPS), thay vì O-axetyl serin (OAS) ở *E.coli*, dưới dạng cơ chất cho quá trình tổng hợp xystein (Mino K và Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW và Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC và Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). dựa trên cơ sở báo cáo này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra hai loại OPS Sulfhyđrylaza, mà chuyển hóa OPS thành xystein, từ *Aeropyrum pernix* và *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Trong số chúng, enzym OPSS có nguồn gốc từ H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* được sử dụng để sàng lọc axit amin tính tương đồng. Do đó, ba dạng OPSS được bảo vệ từ chủng *Mycobacterium smegmatis* MC2 155, *Rhodococcus jostii* RHA1, và Nocardia farcinica IFM 10152.

Để thu được OPSS từ mỗi chủng, hệ vectơ pET28a (Novagen), thường được sử dụng để biểu hiện enzym, được cấu trúc. Mỗi khuôn và đoạn mồi để sử dụng để tách dòng năm gen OPS Sulfhyđrylaza khác nhau và các plasmit tái tổ hợp thu được được thể hiện trong Bảng 26 dưới

đây. Các tổ hợp thích hợp của khuôn và đoạn mồi, như được nêu trong Bảng 26, được sử dụng cho PCR để khuếch đại lần lượt các gen OPSS. Sản phẩm PCR và vectơ pET28a được phân cắt bằng NdeI và HindIII (37°C trong 3 giờ). Mỗi đoạn gen được nối với vectơ pET28a đã được phân cắt (Novagen). Việc sắp xếp trình tự bazơ đã xác nhận cấu trúc của vectơ biểu hiện mang mỗi gen OPSS. Vectơ biểu hiện enzym được đưa vào *E.coli* (DE3) để tạo ra chủng có khả năng biểu hiện năm enzym OPSS. Tên gọi các enzym được nêu trong Bảng 26 dưới đây.

Bảng 26

Enzym	Vectơ	Khuôn mẫu	Đoạn mồi
Ape-OPSS	pET28a-Ape-OPSS	ADN tổng hợp	SEQ ID NO: 109 và 110
Mtb-OPSS	pET28a-Mtb-OPSS	ADN bộ gen Mtb	SEQ ID NO: 111 và 112
Msm-OPSS	pET28a-Msm-OPSS	ADN bộ gen Msm	SEQ ID NO: 113 và 114
Rjo-OPSS	pET28a-Rjo-OPSS	ADN bộ gen Rjo	SEQ ID NO: 115 và 116
Nfa-OPSS	pET28a-Nfa-OPSS	ADN bộ gen Nfa	SEQ ID NO: 117 và 118

Sự biểu hiện của các enzym được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ pET (Novagen). Các khuẩn lạc riêng biệt của mỗi chủng từ các đĩa LB được cấy chuyển vào 5mL canh thịt LB và được ủ ở 37°C trong 16 giờ trong khi lắc ở 200 vòng/phút. Môi trường nuôi cấy được chuyển vào 25mL canh thịt LB mới (trong bình cầu 250 ml) và được ủ đến OD600 là 0,5 - 0,6 (trong 2 - 3 giờ) trong cùng điều kiện, ngay sau đó, 1mM IPTG được bổ sung vào môi trường để chiết các enzym trong quá trình ủ ở 18°C trong 18 giờ trong khi lắc ở 120 vòng/phút. Các enzym được tinh chế bằng cách sử dụng cột Ni-NTA đối với His-tag, với sự trợ giúp của His SpinTrap μgE Healthcare). Trong số năm enzym OPSS được phân lập như vậy, bốn enzym được phát hiện là dạng dễ hòa tan, với một enzym (Rjo-OPSS) là thể vùi, được phân tích bằng 14% điện di SDS-PAGE.

Ví dụ 37: Thử nghiệm về OPS Sulfhyđrylaza (OPSS) đối với hoạt tính tổng hợp xystein

OPS Sulfhyđrylaza các enzym thu được từ bốn vi sinh vật chủng được thử nghiệm về khả năng để xúc tác quá trình chuyển hoá của O-phosphoserin (OPS) thành xystein. đối với các điều kiện và các phương pháp thử nghiệm (thử nghiệm enzym cysM), tham khảo các báo cáo trước đây (Mino K và Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW và Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC và Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). Lượng cơ chất được sử dụng được đại diện bằng đơn vị mL. Các điều kiện thử nghiệm đối với hoạt tính enzym được thể hiện trong Bảng 27 dưới đây.

Bảng 27

Dung dịch gốc	Nồng độ cuối	Mẫu trắng	OPS Sulfhyđrylaza
6x his-enzym		-	40 (50mg)
1 M HEPES(pH7,4)	100mM HEPES	100	100
0,5 M Na_2S	10mM Na_2S	20	20
10mM PLP	0,2mM PLP	20	20
100mM OPS	5mM OPS	0	50
DW		790	750
Tổng		1000	1000

Dung dịch phản ứng ngoại trừ các enzym được ủ ở 37°C trong 5 phút, sau đó 50 mg được tinh chế OPS Sulfhyđrylaza được bổ sung vào dung dịch phản ứng. Trong thời gian đã xác định trước trong quá trình ủ ở 37°C, 100mL enzym phản ứng được lấy ra và trộn với 100mL TCA 33,2% để ngừng phản ứng enzym. Nồng độ xystein của enzym phản ứng được phân tích định lượng bằng cách đo độ hấp phụ ở OD560 theo phương pháp Gaitonde. Hoạt tính xystein tổng hợp của bốn enzym OPS Sulfhyđrylaza khác nhau được thể hiện trong Bảng 28 dưới đây. Các hàm lượng xystein của các enzym OPSS được thể hiện theo mức độ chuyển hóa xystein và thời gian phản ứng.

Bảng 28

	Mức độ chuyển hóa xystein (%)

	10 phút	30 phút	60 phút
Ape-OPSS	63,4	89,7	97,4
Mtb-OPSS	1,7	4,8	10,1
Msm-OPSS	12,8	25	43,7
Nfa-OPSS	0,1	0,1	0,2

OPS Sulfhyđrylaza các enzym có nguồn gốc từ Aeropyrum pernix và Mycobacterium tuberculosisH37Rv, mà đã được công bố (Mino K và Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC and Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006), đã được xác nhận là có hoạt tính bằng cách sử dụng OPS làm cơ chất để tổng hợp xystein. Hoạt tính tổng hợp xystein của derived OPS Sulfhyđrylaza có nguồn gốc từ chủng *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 mới thu được bằng cách sàng lọc tương đồng axit amin với enzym Mtb-OPSS, đã được chỉ ra đầu tiên. Như thấy được từ dữ liệu trong Bảng 28, mức độ chuyển hóa từ OPS thành xystein của Ape-OPSS đạt gần mức 100% trong một giờ. Mức độ chuyển hóa cuối 43,7% của enzym Msm-OPSS, mới được chọn thông qua việc sàng lọc enzym trên cơ sở OPSS có nguồn gốc từ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv đã được công bố trước đây, là cao hơn 4,3 lần so với mức độ chuyển hóa của Mtb-OPSS. Mặt khác, OPS Sulfhyđrylaza có nguồn gốc từ *Nocardia farcinica* IFM 10152 mới, thu được bằng cách sàng lọc tương đồng, có hoạt tính chuyển hóa O-phosphoserin thành xystein không đủ.

Ví dụ 38: Điều chế Mtb-T và Msm-T m0061 mã hóa Mtb-OPSS và Msm-OPSS đã làm cùn 5 gốc axit amin đầu tận C

OPSS có nguồn gốc từ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb-OPSS), xúc tác quá trình chuyển hoá OPS thành xystein với sự trợ giúp của các enzym bổ sung mec+ và cysO, đã được công bố là có thể sử dụng được làm nguồn lưu huỳnh chứa S2- để chuyển hóa OPS thành xystein ngay cả khi không có mặt của các enzym khác khi năm gốc axit amin ở đầu cacbon được loại bỏ khỏi đó (Agren D, Schnell R and Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336, 2009). Trên cơ sở của công bố đó, tạo ra được Mtb-T (SEQ ID NO: 11), mà có thể chuyển hóa một cách nhanh chóng OPS với sự có mặt của S2- làm nguồn lưu huỳnh. Msm-T còn được tạo ra từ Msm-

OPSS (SEQ ID NO: 9) có chung tính tương đồng axit amin với Mtb-OPSS. Vectơ biểu hiện mang hai thể đột biến enzym được cấu trúc. Về mặt này, pfu PCR được thực hiện trên ADN bộ gen của Mycobacterium tuberculosis H37Rv hoặc Mycobacterium smegmatis với sự có mặt của cặp đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 119, 120, 121 và 122. Các đoạn gen OPSS thu được như vậy được xử lý bằng NdeI và HindIII và được tách dòng vào vectơ pET28a được phân cắt bằng cùng enzym giới hạn để cấu trúc vectơ biểu hiện tái tổ hợp có tên gọi là pET28a-Mtb-T và pET28a-Msm-T, một cách tương ứng. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp này được đưa vào *E.coli* (DE3). Sự biểu hiện của hai thể đột biến enzym OPSS được xác nhận bằng 14% SDS PAGE. Hai thể đột biến enzym OPSS được tinh chế và được biểu hiện trong các điều kiện giống như ở Ví dụ 36. Nhờ đó, thu được Mtb-T (SEQ ID NO: 11) và Msm-T (SEQ ID NO: 10).

Ví dụ 39: Thử nghiệm Mtb-T và Msm-T về hoạt tính chuyển hóa xystein

Trên cơ sở của công bố rằng các thể đột biến OPSS có nguồn gốc từ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv không có 5 gốc axit amin ở đầu cacbon có ái lực cao đối với nguồn lưu huỳnh chứa nhóm S2- ngay cả khi không có mặt của các enzym con (Agren D, Schnell R and Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336, 2009), Mtb-T và Msm-T đã được tạo ra. Chúng được đánh giá về hoạt tính enzym bằng cách đo mức độ chuyển hóa xystein cuối. Hoạt tính enzym được thử nghiệm trong điều kiện và với cách thức giống như ở Ví dụ 37. Xystein đã tạo ra được phân tích định lượng bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde.

Bảng 29

	Mức độ chuyển hóa xystein (%)		
	10 phút	30 phút	60 phút
Mtb-T	9,5	18,6	37,1
Msm-T	20,3	54,6	100

Như thấy được từ Bảng 29, Msm-T, không có 5 gốc axit amin ở đầu cacbon của OPSS có nguồn gốc từ chủng Mycobacterium smegmatis MC2 155 cho phép chuyển hoá zystein từ cơ chất với mức 100% trong một giờ.

Khi trình tự axit amin của nó được cải biến, O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS) có thể xúc tác một cách hiệu quả quá trình sinh tổng hợp L-xystein.

Ví dụ 40: Yêu cầu của đồng yếu tố đối với hoạt tính OPS Sulfhyđrylaza

Để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của đồng yếu tố tới quá trình chuyển hoá xystein của OPSS, mức độ chuyển hóa xystein của Msm-T được xác định khi có mặt hoặc không có mặt PLP (pyriđoxal-5'-phosphat) và DTT (đithiotreitol). Liên quan đến điều đó, cơ chất gồm canh thịt OPS 50mM và 100mM Na_2S được phản ứng ở 37°C trong 30 phút với sự có mặt của 25mM DTT hoặc 0,2mM PLP. Xystein đã được tạo ra như vậy được phân tích về mặt định lượng bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Như được thể hiện trong Bảng 30, mức độ chuyển hóa xystein với sự có mặt của cả PLP và DTT cao hơn 2,3 lần so với trường hợp không có mặt của cả PLP lẫn DTT. Do vậy, cả PLP lẫn DTT đều được nhận thấy là có sự ảnh hưởng dương tính tới quá trình chuyển hoá.

Bảng 30

Msm-T	Mức độ chuyển hóa xystein (%)
(-) PLP, (-) DTT	23,62
(+) PLP, (-) DTT	33,21
(-) PLP, (+) DTT	40,08
(+) PLP, (+) DTT	54,65

Ví dụ 41: ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của OPS Sulfhyđrylaza

Mức độ chuyển hóa xystein của Ape-OPSS và Msm-T theo nhiệt độ được kiểm tra. Hoạt tính enzym ở 37°C và 60oC được đo tại thời điểm 2, 5, 10, 30, và 60 phút sau khi phản ứng. Phản ứng được tiến hành trong điều kiện 100mM HEPES (độ pH 7,4), 5mM OPS, 10mM Na_2S, 0,2mM PLP, và CysM 50 ỡg/mL. Lượng xystein đã trạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Trong điều kiện của chất đệm, như được thể hiện trên Fig.2, Ape-OPSS thể hiện tốc độ phản ứng ban đầu nhanh hơn ở 37°C cũng như có hoạt tính cao hơn ở 60oC khi so với Msm-T.

Ví dụ 42: Độ ổn định nhiệt độ của OPS Sulfhyđrylaza

Ape-OPSS và Msm-T được phân tích về độ ổn định nhiệt độ . Mỗi enzym được pha loãng tới nồng độ 2mg/mL trong nước cạnh OPS và được xử lý nhiệt ở 37°C và 60oC trong 10, 30, 60, 120, và 240 phút, tiếp đó là phản ứng ở 37°C trong 30 phút trong điều kiện 5mM OPS, 10mM Na_2S, 0,2mM PLP, và 100mM HEPES (pH 7,4). Dùng cho phản ứng này, 10µg/mL Ape-OPSS và 50µg/mL Msm-T được sử dụng. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Ape-OPSS cho thấy vẫn giữ nguyên hoạt tính không đổi của nó cho dù xử lý nhiệt ở 60oC trong 4 giờ trong khi hoạt tính của Msm-T được duy trì ở 37°C, nhưng giảm khoảng 50% sau khi xử lý nhiệt ở 60oC trong 30 phút. Các kết quả được đưa ra trong Bảng 31 dưới đây.

Bảng 31

	Hoạt tính tương đối (%)					
Thời gian gia nhiệt (phút)	(-)	10 phút	30 phút	60 phút	120 phút	240 phút
Ape-OPSS	100	102	107	100	107	101
Msm-T	100	82	50	32	19	8

Việc kiểm tra được thực hiện về khả năng lưu giữ hoạt tính enzym ở 37°C khi Msm-T được sử dụng với lượng 50ỡg/mL, là nồng độ thực tế trong canh thịt OPS. Khi không có mặt Na_2S, 50µg/mL Msm-T được xử lý, cùng với canh thịt OPS 50mM và 0,2mM PLP, ở 37°C trong 0,5, 1, 2, 4, và 6 giờ, sau đó, Na_2S được bổ sung vào để gây ra phản ứng enzym. Sau khi phản ứng trong 30 phút, hoạt tính của Msm-T được đo. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Theo đó, hoạt tính của Msm-T giảm dưới 50% sau 2 giờ phản ứng ở 37°C trong canh thịt OPS (Bảng 32).

Bảng 32

Thời gian	0	30 phút	60 phút	120 phút	240 phút	360 phút
Mức chuyển hoá xystein (%)	100	88	73	47	11	3

Ví dụ 43: ảnh của độ pH tới OPS Sulfhyđrylaza

Mức độ chuyển hóa xystein của Ape-OPSS và Msm-T theo độ pH được xác định. Trong 100mM chất đệm, Ape-OPSS và Msm-T, mỗi loại nồng độ 50μg/mL, được cho phản ứng ở 37°C trong 10 phút. Liên quan đến điều đó, chất đệm K-phosphat có độ pH 6,4/7,0/7,4/8,0, chất đệm Tris-HCl có độ pH 7,0/7,4/8,0/8,5/8,8, và chất đệm Na-cacbonat có độ pH 8,0/8,5/9,0/10,0 được sử dụng. Việc phân tích định lượng xystein đã tạo ra được tiến hành bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Như thấy được trên Fig.3, Msm-T có hoạt tính cao nhất ở độ pH nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,0 không phụ thuộc vào chất đệm. Đối với Ape-OPSS, hoạt tính cao nhất có được hiện trong K-phosphat (độ pH 7,4), có độ pH tối ưu khác nhau giữa các chất đệm.

Ví dụ 44: ảnh hưởng của các ion tới hoạt tính của OPS Sulfhyđrylaza

Ảnh hưởng của các ion tới hoạt tính của các enzym OPSS được kiểm tra như sau. Trong hỗn hợp phản ứng chứa 5mM OPS, 10mM Na_2S, 0,2mM PLP, và 100mM HEPES (pH 7,4), các enzym được cho phản ứng ở 37°C trong 30 phút với sự có mặt của $(NH_4)_2SO_4$ (1, 3, 5, 10, 20 g/L), KH_2PO_4 (0,5, 1, 2, 4, 8 g/L), hoặc NH_4Cl (0,2, 0,5, 1, 2 g/L). Ape-OPSS và Msm-T lần lượt được sử dụng với nồng độ 10μg/mL và 50μg/mL. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde.

Không phát hiện được mức độ chuyển hóa xystein khi $(NH_4)_2SO_4$ hoặc KH_2PO_4 được bổ sung vào vào hỗn hợp phản ứng này. Mặt khác, như được thể hiện trong Bảng 33, mức độ chuyển hóa xystein giảm khi nồng độ NH_4Cl tăng. Đặc biệt là, hoạt tính enzym tối đa giảm trên 70% khi 2g/L NH_4Cl được bổ sung vào. Vì vậy, NH_4Cl được nhận thấy là có hiệu quả âm tính tới quá trình chuyển hoá hoạt tính của OPS Sulfhyđrylaza.

Bảng 33

	Hoạt tính tương đối (%)	
NH_4Cl	Ape-OPSS	Msm-T
0	100,00	100,00
0,2	86,26	91,49
0,5	73,35	91,30

1	49,11	67,11
2	27,72	47,12

Ví dụ 45: ảnh hưởng của nguồn lưu huỳnh tới hoạt tính tổng hợp xystein của OPS Sulfhyđrylaza

Thử nghiệm được tiến hành để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của các nguồn lưu huỳnh tới hoạt tính tổng hợp xystein của mỗi enzym. Trong hỗn hợp phản ứng chứa 5mM OPS, 0,2mM PLP, và 100mM HEPES, mỗi enzym (50 ỡg/mL Ape-OPSS, 50µg/mL Msm-T) được cho phản ứng ở 37°C trong 1 giờ với sự có mặt của 10mM Na_2S, NaSH, hoặc $Na_2S_2O_3$. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Ape-OPSS được nhận thấy là thích hợp với nguồn lưu huỳnh là $Na_2S_2O_3$, trong khi Msm-T thích hợp với Na_2S. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 34 dưới đây.

Bảng 34

	Hoạt tính tương đối (%)		
Enzym	Na_2S	NaSH	$Na_2S_2O_3$
Ape-OPSS	100,0	95,2	142,3
Msm-T	106,7	98,3	66,2

Ví dụ 46: Cấu trúc vectơ biểu hiện mang OPS Sulfhyđrylaza (hệ pCL-Pcj1) và sự biểu hiện ở *E.coli*

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 123 và 124, cùng với vectơ pET28a-Msm-T dùng làm khuôn. Sản phẩm PCR thu được như vậy được xử lý bằng EcoRV và HindIII và được tách dòng vào pCL-P(CJ1) để cấu trúc vec-tơ tái tổ hợp có tên gọi là pCL-P(CJ1)-Msm-T. Để kiểm tra sự khác nhau về mức biểu hiện của Msm-T giữa hệ pET và hệ pCL-pCJ1, các chủng dùng để biểu hiện enzym được điều chế. Hệ pET được đưa vào Rosetta (DE3) trong khi hệ pCL-pCJ1 sử dụng chủng K12G. Các khuẩn lạc đơn được lấy từ từ các đĩa LB được cấy chuyển vào 5mL canh thịt LB và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ trong khi lắc ở 200 vòng/phút. Các dịch nuôi cấy này được chuyển vào 25mL nước canh thịt LB mới chứa kanamyxin hoặc spectinomyxin và 0,2% glucoza (trong các bình cầu 250 ml) và được ủ tới mức OD600 bằng 0,5 - 0,6, ngay lập tức sau đó, 1mM IPTG được bổ sung vào môi trường để

gây ra các enzym cần được chiết tách. Trong quá trình ủ ở 37°C trong khi lắc ở 200 vòng/phút, mức biểu hiện của enzym được đo ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau (8, 16, 24 giờ). Mức biểu hiện enzym của hai hệ này được phân tích trên 14% SDS PAGE (Fig.4).

Ví dụ 47: Tổng hợp xystein bằng OPS Sulfhyđrylaza cùng với canh thịt lên men OPS tinh chế

Mức độ chuyển hóa từ OPS tinh khiết thành xystein của Msm-T và Ape-OPSS được xác định. Với sự có mặt của 75µg/mL của mỗi enzym và 0,2mM PLP, 60mM OPS được tinh chế từ canh thịt lên men OPS được phản ứng với 120mM Na_2S ở 37°C hoặc 70°C trong 30, 60, 90, và 120 phút. Phản ứng này chỉ được tiến hành ở 37°C đối với Msm-T, nhưng ở cả 37°C và 70°C đối với Ape-OPSS. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Như được thể hiện trên Fig.5, canh thịt lên men OPS tinh chế cũng có tác dụng làm cơ chất cho quá trình chuyển hoá enzym thành xystein. Đặc biệt là, mức độ chuyển hóa của Ape-OPSS tăng ở 70°C ngay sau khi sử dụng canh thịt lên men OPS tinh chế.

Ví dụ 48: Tổng hợp xystein bằng OPS Sulfhyđrylaza cùng với canh thịt lên men OPS

Khi canh thịt lên men OPS được sử dụng làm cơ chất, các mức độ chuyển hóa xystein của Msm-T và Ape-OPSS được xác định theo nồng độ enzym. Với sự có mặt của 100mM Na_2S và 0,2mM PLP, 50mM canh thịt lên men OPS được phản ứng với 5µg/mL hoặc 50µg/mL của mỗi Msm-T và Ape-OPSS ở 37°C. Lượng xystein đã tạo ra được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Như được thể hiện trên Fig.6, mức độ chuyển hóa cao nhất là ở 50µg/mL Msm-T. Ngoài ra, khi sử dụng canh thịt lên men OPS làm cơ chất, hoạt tính của Msm-T was là cao hơn so với hoạt tính của Ape-OPSS.

Ví dụ 49: mức độ chuyển hóa xystein nồng độ OPS

Để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của nồng độ OPS tới mức độ chuyển hóa Msm-T, lượng đã định trước của OPS tinh khiết được bổ sung vào canh thịt lên men OPS để gây ra phản ứng chuyển hoá. Enzym được sử dụng với lượng 50µg. Lượng xystein trong dung dịch phản ứng

được xác định bằng cách áp dụng phương pháp Gaitonde. Msm-T có mức độ chuyển hóa cao tới 100% khi nồng độ OPS khoảng 30g/L.

Khi nồng độ OPS vượt quá mức 50g/L, cả mức độ chuyển hóa lẫn lẫn tỷ lệ chuyển hoá đều giảm. Từ các kết quả này, cần hiểu rằng khi canh thịt lên men OPS được dùng làm cơ chất, có tỷ lệ nồng độ tối ưu giữa OPS và enzym.

Bảng 35

Mức độ chuyển hóa xystein (Msm-T 50 ug)

Thời gian		0 phút	10 phút	30 phút	60 phút	120 phút	180 phút
OPS được đo	10,65g/l	0	23,03	65,38	65,70	61,95	55,35
OPS được đo	36,09g/l	0	1,15	10,23	28,07	97,84	100,34
OPS được đo	55,6g/l	0	0	2,36	7,41	42,69	66,67

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm:

1) nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp, trong đó hoạt tính của phosphoserin phosphataza (SerB) được làm giảm so với hoạt tính nội sinh để tạo ra O-sphosphoserin (OPS); và

2) cho OPS thu được từ bước 1) phản ứng với sulfua với sự có mặt của O-phosphoserin sulfhyđrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện OPSS, để tạo ra xystein hoặc dẫn xuất của nó.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phosphoserin phosphataza có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mức hoạt tính enzym được làm giảm bằng cách sử dụng kỹ thuật được chọn từ nhóm bao gồm thay thế gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym bằng gen được gây đột biến để làm giảm hoạt tính enzym, đưa đột biến vào vùng điều hòa đối với gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym, thay thế vùng điều hòa đối với gen mã hóa enzym bằng vùng có hoạt tính giảm so với vùng này, gây khuyết đoạn gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym, và đưa vào oligonucleotit đối nghĩa bổ trợ với sản phẩm phiên mã của gen nhiễm sắc thể để ức chế quá trình dịch mã của mARN.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của SerB được làm giảm so với hoạt tính nội sinh được nuôi cấy trong môi trường chứa glyxin hoặc serin.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó môi trường chứa glyxin với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 g/L.

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó môi trường chứa serin với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5 g/L.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm tăng hoạt tính của phosphoglyxerat đehyđrogenaza (SerA) hoặc phosphoserin aminotransferaza (SerC).

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó SerA là kiểu dại hoặc thể đột biến kháng sự ức chế phản hồi bởi serin.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó:

i) SerA được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 đến 7; và

ii) SerC có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm giảm hoạt tính của PhnCDE (phnC (thành phần gắn kết ATP của phosphonat vận chuyển, EG 10713)-phnD (thành phần protein gắn kết bào chất của chất chuyển vận Pn, EG 10714)-phnE (thành phần màng đầy đủ của chất chuyển vận alkylphosphonat ABC, EG 11283)) so với hoạt tính nội sinh.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm giảm hoạt tính của kiềm phosphataza (PhoA); hoặc PhoA và axit phosphataza (AphA) so với hoạt tính nội sinh.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm tăng hoạt tính của nucleotit transhyđrogenaza (PntAB).

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm tăng hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm permeaza chảy O-axetylserin/xystein (YfiK), protein chảy homoserin/homoserin lacton (RhtB), và protein chảy threonin/homoserin (RhtC).

14. Phương pháp theo điểm 7, 12 hoặc 13, trong đó mức hoạt tính enzym được làm tăng bằng cách sử dụng kỹ thuật được chọn từ nhóm bao gồm làm tăng số lượng bản sao của gen mã hóa enzym, đưa đột biến vào vùng điều hòa đối với gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym, thay thế vùng điều hòa đối với gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym bằng vùng có hoạt tính tăng so với vùng này, thay thế gen nhiễm sắc thể bằng gen được gây đột biến để làm tăng enzym, và đưa đột biến vào gen nhiễm sắc thể mã hóa enzym để làm tăng hoạt tính enzym.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm giảm hoạt tính của ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm phosphoglyxerat mutaza isozym μgpmA, GpmI hoặc GpmB) so với hoạt tính nội sinh.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm giảm hoạt tính của L-serin đehyđrataza I (SdaA) so với hoạt tính nội sinh.

17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm giảm hoạt tính của 2-amino-3-ketobutyrat coenzym A ligaza (Kbl) hoặc yếu tố phiên mã (IclR) so với hoạt tính nội sinh.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải biến tiếp để làm tăng hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm axetyl-CoA synthetaze (Acs), axit axetic kinaza (AckA)-phosphotransaxetylaza (Pta), malat syntaza G (glcB), malat đehyđrogenaza (MaeB), glutamat đehyđrogenaza (gdhA), glyoxylat carboligaza (Glc), tartronat semialđehyt ređuctaza 2 (GlxR) và glyxerat kinaza II (GlxK).

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp được cải thiện về mức tiêu thụ đường và sinh trưởng bằng cách làm tăng hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm Glc, GlxR, và GlxK.

20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp là *Escherichia* sp. hoặc *Coryneform bacteria*.

21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 2) sulfua được chọn từ nhóm bao gồm Na_2S, NaSH, $(NH_4)_2S$, H_2S, $Na_2S_2O_3$ và tổ hợp của chúng.

22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 2) sulfua được sử dụng ở nồng độ mol cao hơn từ 0,1 đến 3 lần so với nồng độ của OPS được sử dụng trong quá trình chuyển hoá enzym.

23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước 2) OPSS có nguồn gốc từ ít nhất một loài được chọn từ nhóm bao gồm *Aeropyrum pernix, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium smegmatis* và *Trichomonas vaginalis*.

24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó OPSS đã được gây khuyết đoạn 3 đến 7 gốc axit amin từ đầu tận cùng C của nó.

25. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình chuyển hoá của bước 2) được thực hiện với sự có mặt của đồng yếu tố được chọn từ 0,001 ~ 2mM PLP (pyriđoxal-5-phosphat), 0,001 ~ 100mM DTT (đithiotreitol), và tổ hợp của chúng.

26. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách và tinh chế xystein hoặc dẫn xuất của nó.

27. Vi sinh vật tái tổ hợp để tạo ra OPS, trong đó hoạt tính của SerB được làm giảm so với hoạt tính nội sinh, và hoạt tính của SerA hoặc SerC được tăng cường, trong đó SerA kháng sự ức chế phản hồi bởi serin.

28. Vi sinh vật tái tổ hợp để tạo ra OPS, trong đó hoạt tính của SerB được làm giảm so với hoạt tính nội sinh, và hoạt tính này được chọn từ PhnCDE, PhoA, và AphA được làm giảm so với hoạt tính nội sinh.

29. Vi sinh vật tái tổ hợp để tạo ra OPS được lưu giữ với số nộp lưu là KCCM11103P.

Danh mục trình tự

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của nó và vi sinh vật tái tổ hợp

<130> OPA11045

<150> KR10-2010-0102664
<151> 2010-10-20

<150> KR10-2011-0086081
<151> 2011-08-26

<160> 124

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 446
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum* 13032

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(446)
<223> phosphoserin phosphataza, SerB

<400> 1

Met Ser Cys Ser Ala Leu Arg His Glu Thr Ile Val Ala Val Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ile Gln Asn Glu Ser Gln Glu Ile Ala Glu Leu Glu Ala Gly Gln
20 25 30

Gln Val Ala Leu Arg Glu Gly Tyr Leu Pro Ala Val Ile Thr Val Ser
35 40 45

Gly Lys Asp Arg Pro Gly Val Thr Ala Ala Phe Phe Arg Val Leu Ser
50 55 60

Ala Asn Gln Val Gln Val Leu Asp Val Glu Gln Ser Met Phe Arg Gly
65 70 75 80

Phe Leu Asn Leu Ala Ala Phe Val Gly Ile Ala Pro Glu Arg Val Glu
85 90 95

Thr Val Thr Thr Gly Leu Thr Asp Thr Leu Lys Val His Gly Gln Ser
100 105 110

Val Val Val Glu Leu Gln Glu Thr Val Gln Ser Ser Arg Pro Arg Ser
115 120 125

Ser His Val Val Val Val Leu Gly Asp Pro Val Asp Ala Leu Asp Ile
130 135 140

Ser Arg Ile Gly Gln Thr Leu Ala Asp Tyr Asp Ala Asn Ile Asp Thr
145 150 155 160

Ile Arg Gly Ile Ser Asp Tyr Pro Val Thr Gly Leu Glu Leu Lys Val
165 170 175

Thr Val Pro Asp Val Ser Pro Gly Gly Gly Glu Ala Met Arg Lys Ala
180 185 190

Leu Ala Ala Leu Thr Ser Glu Leu Asn Val Asp Ile Ala Ile Glu Arg
195 200 205

Ser Gly Leu Leu Arg Arg Ser Lys Arg Leu Val Cys Phe Asp Cys Asp
210 215 220

Ser Thr Leu Ile Thr Gly Glu Val Ile Glu Met Leu Ala Ala His Ala
225 230 235 240

Gly Lys Glu Ala Glu Val Ala Ala Val Thr Glu Arg Ala Met Arg Gly
245 250 255

Glu Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu Arg Glu Arg Val Lys Ala Leu Ala
260 265 270

Gly Leu Asp Ala Ser Val Ile Asp Glu Val Ala Ala Ala Ile Glu Leu
275 280 285

Thr Pro Gly Ala Arg Thr Thr Ile Arg Thr Leu Asn Arg Met Gly Tyr
290 295 300

Gln Thr Ala Val Val Ser Gly Gly Phe Ile Gln Val Leu Glu Gly Leu
305 310 315 320

Ala Glu Glu Leu Glu Leu Asp Tyr Val Arg Ala Asn Thr Leu Glu Ile
325 330 335

Val Asp Gly Lys Leu Thr Gly Asn Val Thr Gly Lys Ile Val Asp Arg
340 345 350

Ala Ala Lys Ala Glu Phe Leu Arg Glu Phe Ala Ala Asp Ser Gly Leu
355 360 365

Lys Met Tyr Gln Thr Val Ala Val Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ile Asp
370 375 380

Met Leu Ser Ala Ala Gly Leu Gly Val Ala Phe Asn Ala Lys Pro Ala
385 390 395 400

Leu Lys Glu Ile Ala Asp Thr Ser Val Asn His Pro Phe Leu Asp Glu

405 410 415

Val Leu His Ile Met Gly Ile Ser Arg Asp Glu Ile Asp Leu Ala Asp
420 425 430

Gln Glu Asp Gly Thr Phe His Arg Val Pro Leu Thr Asn Ala
435 440 445

<210> 2
<211> 322
<212> PRT
<213> Escherichia coli K12 W3110

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(322)
<223> phosphoserin phosphataza, SerB

<400> 2
Met Pro Asn Ile Thr Trp Cys Asp Leu Pro Glu Asp Val Ser Leu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Leu Pro Leu Ser Leu Ser Gly Asp Glu Val Met Pro Leu Asp
20 25 30

Tyr His Ala Gly Arg Ser Gly Trp Leu Leu Tyr Gly Arg Gly Leu Asp
35 40 45

Lys Gln Arg Leu Thr Gln Tyr Gln Ser Lys Leu Gly Ala Ala Met Val
50 55 60

Ile Val Ala Ala Trp Cys Val Glu Asp Tyr Gln Val Ile Arg Leu Ala
65 70 75 80

Gly Ser Leu Thr Ala Arg Ala Thr Arg Leu Ala His Glu Ala Gln Leu
85 90 95

Asp Val Ala Pro Leu Gly Lys Ile Pro His Leu Arg Thr Pro Gly Leu
100 105 110

Leu Val Met Asp Met Asp Ser Thr Ala Ile Gln Ile Glu Cys Ile Asp
115 120 125

Glu Ile Ala Lys Leu Ala Gly Thr Gly Glu Met Val Ala Glu Val Thr
130 135 140

Glu Arg Ala Met Arg Gly Glu Leu Asp Phe Thr Ala Ser Leu Arg Ser
145 150 155 160

Arg Val Ala Thr Leu Lys Gly Ala Asp Ala Asn Ile Leu Gln Gln Val
165 170 175

Arg Glu Asn Leu Pro Leu Met Pro Gly Leu Thr Gln Leu Val Leu Lys
180 185 190

Leu Glu Thr Leu Gly Trp Lys Val Ala Ile Ala Ser Gly Gly Phe Thr
195 200 205

Phe Phe Ala Glu Tyr Leu Arg Asp Lys Leu Arg Leu Thr Ala Val Val
210 215 220

Ala Asn Glu Leu Glu Ile Met Asp Gly Lys Phe Thr Gly Asn Val Ile
225 230 235 240

Gly Asp Ile Val Asp Ala Gln Tyr Lys Ala Lys Thr Leu Thr Arg Leu
245 250 255

Ala Gln Glu Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Gln Thr Val Ala Ile Gly Asp

260 265 270

Gly Ala Asn Asp Leu Pro Met Ile Lys Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ala
275 280 285

Tyr His Ala Lys Pro Lys Val Asn Glu Lys Ala Glu Val Thr Ile Arg
290 295 300

His Ala Asp Leu Met Gly Val Phe Cys Ile Leu Ser Gly Ser Leu Asn
305 310 315 320

Gln Lys

<210> 3
<211> 530
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> D-3-phosphoglyxerat dehydrogenaza(E235K), SerA(E235K)

<400> 3
Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp

65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Lys Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350

Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380

Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400

Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415

Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr
450 455 460

Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala
465 470 475 480

Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp
485 490 495

Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu
500 505 510

Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp
515 520 525

Leu Asp
530

<210> 4
<211> 333
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza(197 delta), SerA(197 delta)

<400> 4
Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp

35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala
325 330

<210> 5
<211> 410
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza(G336V), SerA(G336V)

<400> 5
Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
1 5 10 15

Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
20 25 30

Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
85 90 95

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
100 105 110

Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
115 120 125

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145 150 155 160

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
165 170 175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
180 185 190

Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
195 200 205

Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys

210 215 220

Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
225 230 235 240

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
245 250 255

His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
260 265 270

Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
275 280 285

Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
290 295 300

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305 310 315 320

Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val
325 330 335

Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
340 345 350

Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
355 360 365

Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
370 375 380

Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
385 390 395 400

Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
405 410

<210> 6
<211> 410
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza(G336V, G337V), SerA(G336V, G337V)

<400> 6
Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
1 5 10 15

Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
20 25 30

Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
85 90 95

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
100 105 110

Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro

115 120 125

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145 150 155 160

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
165 170 175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
180 185 190

Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
195 200 205

Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
210 215 220

Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
225 230 235 240

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
245 250 255

His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
260 265 270

Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
275 280 285

Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
290 295 300

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305 310 315 320

Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val
325 330 335

Val Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
340 345 350

Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
355 360 365

Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
370 375 380

Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
385 390 395 400

Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
405 410

<210> 7
<211> 410
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza(G336V, R338G), SerA(G336V, R338G)

<400> 7
Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
1 5 10 15

Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr

20 25 30

Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
85 90 95

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
100 105 110

Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
115 120 125

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145 150 155 160

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
165 170 175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
180 185 190

Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
195 200 205

Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
210 215 220

Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
225 230 235 240

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
245 250 255

His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
260 265 270

Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
275 280 285

Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
290 295 300

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305 310 315 320

Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val
325 330 335

Gly Gly Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
340 345 350

Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
355 360 365

Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
370 375 380

Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
385 390 395 400

Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
405 410

<210> 8
<211> 362
<212> PRT
<213> Escherichia coli K12 W3110

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(362)
<223> 3-phosphoserin/phosphohydroxythreonin aminotransferaza, SerC

<400> 8
Met Ala Gln Ile Phe Asn Phe Ser Ser Gly Pro Ala Met Leu Pro Ala
1 5 10 15

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

Gly Thr Ser Val Met Glu Val Ser His Arg Gly Lys Glu Phe Ile Gln
35 40 45

Val Ala Glu Glu Ala Glu Lys Asp Phe Arg Asp Leu Leu Asn Val Pro
50 55 60

Ser Asn Tyr Lys Val Leu Phe Cys His Gly Gly Gly Arg Gly Gln Phe
65 70 75 80

Ala Ala Val Pro Leu Asn Ile Leu Gly Asp Lys Thr Thr Ala Asp Tyr
85 90 95

Val Asp Ala Gly Tyr Trp Ala Ala Ser Ala Ile Lys Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Tyr Cys Thr Pro Asn Val Phe Asp Ala Lys Val Thr Val Asp Gly Leu
115 120 125

Arg Ala Val Lys Pro Met Arg Glu Trp Gln Leu Ser Asp Asn Ala Ala
130 135 140

Tyr Met His Tyr Cys Pro Asn Glu Thr Ile Asp Gly Ile Ala Ile Asp
145 150 155 160

Glu Thr Pro Asp Phe Gly Ala Asp Val Val Val Ala Ala Asp Phe Ser
165 170 175

Ser Thr Ile Leu Ser Arg Pro Ile Asp Val Ser Arg Tyr Gly Val Ile
180 185 190

Tyr Ala Gly Ala Gln Lys Asn Ile Gly Pro Ala Gly Leu Thr Ile Val
195 200 205

Ile Val Arg Glu Asp Leu Leu Gly Lys Ala Asn Ile Ala Cys Pro Ser
210 215 220

Ile Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Asn Asp Asn Gly Ser Met Phe Asn Thr
225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Ala Trp Tyr Leu Ser Gly Leu Val Phe Lys Trp Leu
245 250 255

Lys Ala Asn Gly Gly Val Ala Glu Met Asp Lys Ile Asn Gln Gln Lys
260 265 270

Ala Glu Leu Leu Tyr Gly Val Ile Asp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg Asn
275 280 285

Asp Val Ala Lys Ala Asn Arg Ser Arg Met Asn Val Pro Phe Gln Leu

290 295 300

Ala Asp Ser Ala Leu Asp Lys Leu Phe Leu Glu Glu Ser Phe Ala Ala
305 310 315 320

Gly Leu His Ala Leu Lys Gly His Arg Val Val Gly Gly Met Arg Ala
325 330 335

Ser Ile Tyr Asn Ala Met Pro Leu Glu Gly Val Lys Ala Leu Thr Asp
340 345 350

Phe Met Val Glu Phe Glu Arg Arg His Gly
355 360

<210> 9
<211> 323
<212> PRT
<213> Chủng Mycobacterium smegmatics MC2 155

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(323)
<223> Msm-OPSS

<400> 9
Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
1 5 10 15

Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
20 25 30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
35 40 45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg

50 55 60

Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
85 90 95

Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
100 105 110

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
115 120 125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
145 150 155 160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
210 215 220

Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Thr Arg Phe
225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
245 250 255

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu Gly Gln
305 310 315 320

Leu Trp Ala

<210> 10
<211> 318
<212> PRT
<213> Chủng Mycobacterium smegmatics MC2 155

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(318)
<223> Msm-T

<400> 10
Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
1 5 10 15

Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
20 25 30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly

35 40 45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg
50 55 60

Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
85 90 95

Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
100 105 110

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
115 120 125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
145 150 155 160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
210 215 220

Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Thr Arg Phe
225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
245 250 255

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu
305 310 315

<210> 11
<211> 318
<212> PRT
<213> *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(318)
<223> Mtb-T

<400> 11
Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
1 5 10 15

Val Gly Leu Gln Arg Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Gly Arg Asp Gly
20 25 30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
35 40 45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Val Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Ala
50 55 60

Asp Gly Leu Leu Arg Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Arg Leu Lys Gly Tyr Arg
85 90 95

Leu Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Val Glu Arg Arg Gln Leu
100 105 110

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Gln Ile Ile Phe Ser Ala Ala Glu Gly Gly
115 120 125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Thr Asn Pro
130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Thr Asp Ser
145 150 155 160

His Tyr Cys Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Ala Asn Val Lys Ile Val Ala Ala
195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Met Asp Glu
210 215 220

Gly Phe Val Pro Glu Leu Tyr Asp Pro Glu Ile Leu Thr Ala Arg Tyr
225 230 235 240

Ser Val Gly Ala Val Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val His
245 250 255

Thr Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
260 265 270

Ala Leu Gly Val Gly Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Glu Arg Ala Asp
275 280 285

Ile Ala Leu Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Thr Ala Leu Glu
305 310 315

<210> 12
<211> 389
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Ape-OPSS

<400> 12
Met Ala Leu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Leu Asp Val Leu Asp Ser Val
1 5 10 15

Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Glu Asn Ala Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly
20 25 30

Glu Ala Arg Cys Leu Gly Asn Pro Arg Ser Glu Pro Glu Tyr Val Lys

35 40 45

Ala Leu Tyr Val Ile Gly Ala Ser Arg Ile Pro Val Gly Asp Gly Cys
50 55 60

Ser His Thr Leu Glu Glu Leu Gly Val Phe Asp Ile Ser Val Pro Gly
65 70 75 80

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

Thr Pro Leu Val Arg Ser Arg Leu Gln Leu Pro Asn Gly Val Arg Val
100 105 110

Trp Leu Lys Leu Glu Trp Tyr Asn Pro Phe Ser Leu Ser Val Lys Asp
115 120 125

Arg Pro Ala Val Glu Ile Ile Ser Arg Leu Ser Arg Arg Val Glu Lys
130 135 140

Gly Ser Leu Val Ala Asp Ala Thr Ser Ser Asn Phe Gly Val Ala Leu
145 150 155 160

Ser Ala Val Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Arg Ala Arg Val Tyr Leu Pro
165 170 175

Gly Ala Ala Glu Glu Phe Gly Lys Leu Leu Pro Arg Leu Leu Gly Ala
180 185 190

Gln Val Ile Val Asp Pro Glu Ala Pro Ser Thr Val His Leu Leu Pro
195 200 205

Arg Val Met Lys Asp Ser Lys Asn Glu Gly Phe Val His Val Asn Gln
210 215 220

Phe Tyr Asn Asp Ala Asn Phe Glu Ala His Met Arg Gly Thr Ala Arg
225 230 235 240

Glu Ile Phe Val Gln Ser Arg Arg Gly Gly Leu Ala Leu Arg Gly Val
245 250 255

Ala Gly Ser Leu Gly Thr Ser Gly His Met Ser Ala Ala Ala Phe Tyr
260 265 270

Leu Gln Ser Val Asp Pro Ser Ile Arg Ala Val Leu Val Gln Pro Ala
275 280 285

Gln Gly Asp Ser Ile Pro Gly Ile Arg Arg Val Glu Thr Gly Met Leu
290 295 300

Trp Ile Asn Met Leu Asp Ile Ser Tyr Thr Leu Ala Glu Val Thr Leu
305 310 315 320

Glu Glu Ala Met Glu Ala Val Val Glu Val Ala Arg Ser Asp Gly Leu
325 330 335

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

Ala Ala Glu Gly Asp Leu Glu Pro Gly Asp Tyr Val Val Val Val Pro
355 360 365

Asp Thr Gly Phe Lys Tyr Leu Ser Leu Val Gln Asn Ala Leu Glu Gly
370 375 380

Ala Gly Asp Ser Val
385

<210> 13
<211> 1341

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum* 13032

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1341)

<223> serB

<400> 13

atgtcgtgtt ccgcgctcag acatgagaca attgttgccg tgactgaact catccagaat 60

gaatcccaag aaatcgctga gctggaagcc ggccagcagg ttgcattgcg tgaaggttat 120

cttcctgcgg tgatcacagt gagcggtaaa gaccgcccag gtgtgactgc cgcgttcttt 180

agggtcttgt ccgctaatca ggttcaggtc ttggacgttg agcagtcaat gttccgtggc 240

tttttgaact tggcggcgtt tgtgggtatc gcacctgagc gtgtcgagac cgtcaccaca 300

ggcctgactg acaccctcaa ggtgcatgga cagtccgtgg tggtggagct gcaggaaact 360

gtgcagtcgt cccgtcctcg ttcttcccat gttgttgtgg tgttgggtga tccggttgat 420

gcgttggata tttcccgcat tggtcagacc ctggcggatt acgatgccaa cattgacacc 480

attcgtggta tttcggatta ccctgtgacc ggcctggagc tgaaggtgac tgtgccggat 540

gtcagccctg gtggtggtga agcgatgcgt aaggcgcttg ctgctcttac ctctgagctg 600

aatgtggata ttgcgattga gcgttctggt ttgctgcgtc gttctaagcg tctggtgtgc 660

ttcgattgtg attccacgtt gatcactggt gaggtcattg agatgctggc ggctcacgcg 720

ggcaaggaag ctgaagttgc ggcagttact gagcgtgcga tgcgcggtga gctcgatttc 780

gaggagtctc tgcgtgagcg tgtgaaggcg ttggctggtt tggatgcgtc ggtgatcgat 840

gaggtcgctg ccgctattga gctgaccccc ggtgcgcgca ccacgatccg tacgctgaac 900

cgcatgggtt accagaccgc tgttgtttcc ggtggtttca tccaggtgtt ggaaggtttg 960

gctgaggagt tggagttgga ttatgtccgc gccaacactt tggaaatcgt tgatggcaag 1020

ctgaccggca acgtcaccgg aaagatcgtt gaccgcgctg cgaaggctga gttcctccgt 1080

gagttcgctg cggattctgg cctgaagatg taccagactg tcgctgtcgg tgatggcgct 1140

aatgacatcg atatgctctc cgctgcgggt ctgggtgttg ctttcaacgc gaagcctgcg 1200

ctgaaggaga ttgcggatac ttccgtgaac cacccattcc tcgacgaggt tttgcacatc 1260

atgggcattt cccgcgacga gatcgatctg gcggatcagg aagacggcac tttccaccgc 1320

gttccattga ccaatgccta a 1341

<210> 14
<211> 1593
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> serA*(E235K)

<400> 14
atgagccaga atggccgtcc ggtagtcctc atcgccgata agcttgcgca gtccactgtt 60

gacgcgcttg gagatgcagt agaagtccgt tgggttgacg gacctaaccg cccagaactg 120

cttgatgcag ttaaggaagc ggacgcactg ctcgtgcgtt ctgctaccac tgtcgatgct 180

gaagtcatcg ccgctgcccc taacttgaag atcgtcggtc gtgccggcgt gggcttggac 240

aacgttgaca tccctgctgc cactgaagct ggcgtcatgg ttgctaacgc accgacctct 300

aatattcact ccgcttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc 360

cctgctgctg atgcgacgct gcgtgagggc gagtggaagc ggtcttcttt caacggtgtg 420

gaaattttcg gaaaaactgt cggtatcgtc ggttttggcc acattggtca gttgtttgct 480

cagcgtcttg ctgcgtttga gaccaccatt gttgcttacg atccttacgc taaccctgct 540

cgtgcggctc agctgaacgt tgagttggtt gagttggatg agctgatgag ccgttctgac 600

tttgtcacca ttcaccttcc taagaccaag gaaactgctg gcatgtttga tgcgcagctc 660

cttgctaagt ccaagaaggg ccagatcatc atcaacgctg ctcgtggtgg ccttgttgat 720

gagcaggctt tggctgatgc gattgagtcc ggtcacattc gtggcgctgg tttcgatgtg 780

tactccaccg agccttgcac tgattctcct ttgttcaagt tgcctcaggt tgttgtgact 840

cctcacttgg gtgcttctac tgaagaggct caggatcgtg cgggtactga cgttgctgat 900

tctgtgctca aggcgctggc tggcgagttc gtggcggatg ctgtgaacgt ttccggtggt 960

cgcgtgggcg aaaaggttgc tgtgtggatg gatctggctc gcaagcttgg tcttcttgct 1020

ggcaagcttg tcgacgccgc cccagtctcc attgaggttg aggctcgagg cgagctttct 1080

tccgagcagg tcgatgcact tggtttgtcc gctgttcgtg gtttgttctc cggaattatc 1140

gaagagtccg ttactttcgt caacgctcct cgcattgctg aagagcgtgg cctggacatc 1200

tccgtgaaga ccaactctga gtctgttact caccgttccg tcctgcaggt caaggtcatt 1260

actggcagcg gcgcgagcgc aactgttgtt ggtgccctga ctggtcttga gcgcgttgag 1320

aagatcaccc gcatcaatgg ccgtggcctg gatctgcgcg cagagggtct gaacctcttc 1380

ctgcagtaca ctgacgctcc tggtgcactg ggtaccgttg gtaccaagct gggtgctgct 1440

ggcatcaaca tcgaggctgc tgcgttgact caggctgaga agggtgacgg cgctgtcctg 1500

atcctgcgtg ttgagtccgc tgtctctgaa gagctggaag ctgaaatcaa cgctgagttg 1560

ggtgctactt ccttccaggt tgatcttgac taa 1593

<210> 15
<211> 1002
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> serA*(197 delta)

<400> 15
atgagccaga atggccgtcc ggtagtcctc atcgccgata agcttgcgca gtccactgtt 60

gacgcgcttg gagatgcagt agaagtccgt tgggttgacg gacctaaccg cccagaactg 120

cttgatgcag ttaaggaagc ggacgcactg ctcgtgcgtt ctgctaccac tgtcgatgct 180

gaagtcatcg ccgctgcccc taacttgaag atcgtcggtc gtgccggcgt gggcttggac 240

aacgttgaca tccctgctgc cactgaagct ggcgtcatgg ttgctaacgc accgacctct 300

aatattcact ccgcttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc 360

cctgctgctg atgcgacgct gcgtgagggc gagtggaagc ggtcttcttt caacggtgtg 420

gaaattttcg gaaaaactgt cggtatcgtc ggttttggcc acattggtca gttgtttgct 480

cagcgtcttg ctgcgtttga gaccaccatt gttgcttacg atccttacgc taaccctgct 540

cgtgcggctc agctgaacgt tgagttggtt gagttggatg agctgatgag ccgttctgac 600

tttgtcacca ttcaccttcc taagaccaag gaaactgctg gcatgtttga tgcgcagctc 660

cttgctaagt ccaagaaggg ccagatcatc atcaacgctg ctcgtggtgg ccttgttgat 720

gagcaggctt tggctgatgc gattgagtcc ggtcacattc gtggcgctgg tttcgatgtg 780

tactccaccg agccttgcac tgattctcct ttgttcaagt tgcctcaggt tgttgtgact 840

cctcacttgg gtgcttctac tgaagaggct caggatcgtg cgggtactga cgttgctgat 900

tctgtgctca aggcgctggc tggcgagttc gtggcggatg ctgtgaacgt ttccggtggt 960

cgcgtgggcg aagaggttgc tgtgtggatg gatctggctt aa 1002

<210> 16
<211> 969
<212> ADN
<213> Escherichia coli K12 W3110

<220>
<221> gen
<222> (1)..(969)
<223> serB

<400> 16
atgcctaaca ttacctggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc gggtctgcct 60

ctttcattaa gtggtgatga agtgatgcca ctggattacc acgcaggtcg tagcggctgg 120

ctgctgtatg gtcgtgggct ggataaacaa cgtctgaccc aataccagag caaactgggt 180

gcggcgatgg tgattgttgc cgcctggtgc gtggaagatt atcaggtgat tcgtctggca 240

ggttcactca ccgcacgggc tacacgcctg gcccacgaag cgcagctgga tgtcgccccg 300

ctggggaaaa tcccgcacct gcgcacgccg ggtttgctgg tgatggatat ggactccacc 360

gccatccaga ttgaatgtat tgatgaaatt gccaaactgg ccggaacggg cgagatggtg 420

gcggaagtaa ccgaacgggc gatgcgcggc gaactcgatt ttaccgccag cctgcgcagc 480

cgtgtggcga cgctgaaagg cgctgacgcc aatattctgc aacaggtgcg tgaaaatctg 540

ccgctgatgc caggcttaac gcaactggtg ctcaagctgg aaacgctggg ctggaaagtg 600

gcgattgcct ccggcggctt tactttcttt gctgaatacc tgcgcgacaa gctgcgcctg 660

accgccgtgg tagccaatga actggagatc atggacggta aatttaccgg caatgtgatc 720

ggcgacatcg tagacgcgca gtacaaagcg aaaactctga ctcgcctcgc gcaggagtat 780

gaaatcccgc tggcgcagac cgtggcgatt ggcgatggag ccaatgacct gccgatgatc 840

aaagcggcag ggctggggat tgcctaccat gccaagccaa aagtgaatga aaaggcggaa 900

gtcaccatcc gtcacgctga cctgatgggg gtattctgca tcctctcagg cagcctgaat 960

cagaagtaa 969

<210> 17
<211> 1233
<212> ADN
<213> Escherichia coli K12 W3110

<220>
<221> gen
<222> (1)..(1233)
<223> serA

<400> 17
atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc 240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg 300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg 360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc 720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg 780

gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960

acgctctctg cggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacggtgg gcgtcgtctg 1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag 1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt 1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa 1233

<210> 18
<211> 1233
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> serA*(G336V)

<400> 18
atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc 240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg 300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg 360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc 720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg 780

gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960

acgctctctg cggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gcgtcgtctg 1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag 1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt 1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa 1233

<210> 19
<211> 1233
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> serA*(G336V,G337V)

<400> 19

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc 240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg 300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg 360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc 720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg 780

gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960

acgctctctg cggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgt gcgtcgtctg 1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag 1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt 1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa 1233

<210> 20
<211> 1233
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> serA*(G336V,R338G)

<400> 20
atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc 240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg 300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg 360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc 720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg 780

gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960

acgctctctg cggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gggtcgtctg 1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag 1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt 1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa 1233

<210> 21
<211> 1089
<212> ADN
<213> Escherichia coli K12 W3110
<220>
<221> gen
<222> (1)..(1089)

<223> serC

<400> 21

atggctcaaa tcttcaattt tagttctggt ccggcaatgc taccggcaga ggtgcttaaa 60

caggctcaac aggaactgcg cgactggaac ggtcttggta cgtcggtgat ggaagtgagt 120

caccgtggca aagagttcat tcaggttgca gaggaagccg agaaggattt tcgcgatctt 180

cttaatgtcc cctccaacta caaggtatta ttctgccatg gcggtggtcg cggtcagttt 240

gctgcggtac cgctgaatat tctcggtgat aaaaccaccg cagattatgt tgatgccggt 300

tactgggcgg caagtgccat taaagaagcg aaaaaatact gcacgcctaa tgtctttgac 360

gccaaagtga ctgttgatgg tctgcgcgcg gttaagccaa tgcgtgaatg gcaactctct 420

gataatgctg cttatatgca ttattgcccg aatgaaacca tcgatggtat cgccatcgac 480

gaaacgccag acttcggcgc agatgtggtg gtcgccgctg acttctcttc aaccattctt 540

tcccgtccga ttgacgtcag ccgttatggt gtaatttacg ctggcgcgca gaaaaatatc 600

ggcccggctg gcctgacaat cgtcatcgtt cgtgaagatt tgctgggcaa agcgaatatc 660

gcgtgtccgt cgattctgga ttattccatc ctcaacgata acggctccat gtttaacacg 720

ccgccgacat ttgcctggta tctatctggt ctggtcttta aatggctgaa agcgaacggc 780

ggtgtagctg aaatggataa aatcaatcag caaaaagcag aactgctata tggggtgatt 840

gataacagcg atttctaccg caatgacgtg gcgaaagcta accgttcgcg gatgaacgtg 900

ccgttccagt tggcggacag tgcgcttgac aaattgttcc ttgaagagtc ttttgctgct 960

ggccttcatg cactgaaagg tcaccgtgtg gtcggcggaa tgcgcgcttc tatttataac 1020

gccatgccgc tggaaggcgt taaagcgctg acagacttca tggttgagtt cgaacgccgt 1080

cacggttaa 1089

<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 22
gcgatatcat gaccttagaa tggtgg 26

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

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 23
gctctagatc acgcatgcct cgc 23

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 24
gcgatatcat gtcacccctg tgaaaatgac 30

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 25
gctctagatc agttcgatac ctggggtat 29

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 26
atcatgttac tggcaggcgc tatc 24

<210> 27
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 27

gctctagatt acaaagtgaa agagagacg 29

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*

<400> 28
acgatatcat gagccagaat ggccgt 26

<210> 29
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*

<400> 29
cgtctagatt agtcaagatc aacctgga 28

<210> 30
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(E325K)

<400> 30
atccatccac acagcaacct tttcgcccac gcgaccaccg g 41

<210> 31
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(E325K)

<400> 31
ccggtggtcg cgtgggcgaa aaggttgctg tgtggatgga t 41

<210> 32
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA* (197 delta)

<400> 32
cgtctagatt aagccagatc catccacaca g 31

<210> 33
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 33
atgcctaaca ttacctggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 34
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của serB

<400> 34
ggatggcggg ccaccaatta cttctgattc aggctgcctg agaggatgca catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 35
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pself-serB để cấu trúc
pBAC-pself-serB

<400> 35
cccaagcttc ttccaccctt tgaaaat 27

<210> 36
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pself-serB để cấu trúc
pBAC-pself-serB

<400> 36
cccaagcttt tacttctgat tcaggct 27

<210> 37
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pself-CTG-serB để cấu trúc pBAC-pself-CTG-serB

<400> 37
ggagccttac tgcctaaca 19

<210> 38
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pself-CTG-serB để cấu trúc pBAC-pself-CTG-serB

<400> 38
tgttaggcag taaggctcc 19

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*

<400> 39
agggcgtggt gaccgataat 20

<210> 40
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*

<400> 40
cctagagctc cattctggct gaatcgct 28

<210> 41
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*

<400> 41
acggatcccc cctgagactg actgtt 26

<210> 42
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V)

<400> 42
tctcgctgcc actgcacgtt gggcgtcgtc tgatgca 37

<210> 43
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V)

<400> 43
tgcatcagac gacgcccaac gtgcagtggc agcgaga 37

<210> 44
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V, G337V)

<400> 44
cgctgccact gcacgttgtg cgtcgtctga tgcacat 37

<210> 45
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V, G337V)

<400> 45
atgtgcatca gacgacgcac aacgtgcagt ggcagcg 37

<210> 46

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

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V, R338G)

<400> 46
ctgccactgc acgttgtggg tcgtctgatg cacatcc 37

<210> 47
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc serA*(G336V, R338G)

<400> 47
ggatgtgcat cagacgaccc acaacgtgca gtggcag 37

<210> 48
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại serA để cấu trúc pCL-Prmf-serA

<400> 48
gatatcatgg caaaggtatc gctggaga 28

<210> 49
<211> 26
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại serA để cấu trúc pCL-Prmf-serA

<400> 49
aagcttttag tacagcagac gggcgc 26

<210> 50
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại serA để cấu trúc pCL-Prmf-serC

<400> 50
gatatcatgg ctcaaatctt caat 24

<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại serA để cấu trúc pCL-Prmf-serC

<400> 51
cccaagcttt taaccgtgac ggcgttc 27

<210> 52
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại serA để cấu trúc pCL-Prmf-serA-(RBS)serC

<400> 52
aagcttacgc aacgtggtga gggg 24

<210> 53
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của phnCDE

<400> 53
atgcaaacga ttatccgtgt cgagaagctc gccaaaacct tcaatcagca gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 54
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của phnCDE

<400> 54
tcagataaag tgcttacgca accgttgaga gaggaaatcc agcaggctga catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 55
<211> 70

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của phoA

<400> 55
gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 56
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của phoA

<400> 56
ttatttcagc cccagagcgg ctttcatggt gtagaagaga tcggtctggt catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 57
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của aphA

<400> 57
atgcgcaaga tcacacaggc aatcagtgcc gtttgcttat tgttcgctct gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 58
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của aphA

<400> 58
tcagtattct gaattgacga tcacctcttc accaaacgca cccgcttgtg catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 59
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet thay thế gen khởi đầu của pntAB

<400> 59
tatcacattc cttaagccaa ttttaatcct gctcaaatga ccgtctatgc aggtgacact 60

atagaacgcg 70

<210> 60
<211> 67
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet thay thế gen khởi đầu của pntAB

<400> 60
gcaacacggg tttcattggt taaccgttct cttggtatgc caattcgcat ggtctgtttc 60

ctgtgtg 67

<210> 61
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gdhA để cấu trúc
pcc1BAC-P(native)-gdhA

<400> 61
cgaagcttgt ctctgctact gataacgg 28

<210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gdhA để cấu trúc
pcc1BAC-P(native)-gdhA

<400> 62
cgaagcttgg gagcatcatc cgttaa 26

<210> 63
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại ydeD để cấu trúc pCL-Prmf-ydeD

<400> 63
aagatatcat gtcgcgaaaa gatggggt 28

<210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại ydeD để cấu trúc pCL-Prmf-ydeD

<400> 64
cccaagcttg tgccaatgtc gtggttgtt 29

<210> 65
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại yfiK để cấu trúc pCL-Prmf-yfiK

<400> 65
aagatatcgt gacaccgacc cttttaag 28

<210> 66
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại yfiK để cấu trúc pCL-Prmf-yfiK

<400> 66
cccaagctta ccatccgtgt atccggtta 29

<210> 67
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại rhtB để cấu trúc pCL-Prmf-rhtB

<400> 67
gcgatatcat gaccttagaa tggtgg 26

<210> 68
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại rhtB để cấu trúc pCL-Prmf-rhtB

<400> 68
gctctagatc acgcatgcct cgc 23

<210> 69
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại rhtC để cấu trúc pCL-Prmf-rhtC

<400> 69

gcgatatcat gttgatgtta tttctcaccg tc 32

<210> 70
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại rhtC để cấu trúc pCL-Prmf-rhtC

<400> 70
gctctagatc accgcgaaat aatcaaatga at 32

<210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại asrB để cấu trúc pCL-Prmf-asrB

<400> 71
atcatgttac tggcaggcgc tatc 24

<210> 72
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại asrB để cấu trúc pCL-Prmf-asrB

<400> 72
gctctagatt acaaagtgaa agagagacg 29

<210> 73
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại livHM để cấu trúc pCL-Prmf-livHM

<400> 73
gcgatatcat gtctgagcag tttttgtat 29

<210> 74
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại livHM để cấu trúc pCL-Prmf-livHM

<400> 74
gctctagatc atgcctgctc tcctttcgc 29

<210> 75
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của gpmA

<400> 75
gtgtaggctg gagctgcttc tataatgaga attattatca ttaaaagatg atttgaggag 60

taagtatatg 70

<210> 76
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của gpmA

<400> 76
catatgaata tcctccttag tcggctttct cattttaaac gaatgacgtt tacttcgctt 60

taccctggtt 70

<210> 77
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gpmI để cấu trúc pSG76C-gpmI

<400> 77
acggatcccg agcggtcgta tatttt 26

<210> 78
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gpmI để cấu trúc pSG76C-gpmI
liên quan đến codon dừng

<400> 78
cagcgcggca aatttttctt actatttttt cagcgaggat tca 43

<210> 79
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gpmI để cấu trúc pSG76C-gpmI liên quan đến codon dừng

<400> 79
tgaatcctcg ctgaaaaaat agtaagaaaa atttgccgcg ctg 43

<210> 80
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại gpmI để cấu trúc pSG76C-gpmI

<400> 80
cctagagctc aacgactctt ctacgcca 28

<210> 81
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của gpmB

<400> 81
gcatgttaca ggtataccta gtccgccacg gtgaaacgca gtggaacgcc gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 82
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của gpmB

<400> 82
tcccctgcgg tttcaacgac ccagccagac gccagccaca ggctttcctg catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 83
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của kbl

<400> 83
aagtttgggt aatatgtgct ggaatttgcc ctgtctggag aatcgcaatg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 84
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của kbl

<400> 84
agtttggata acgctttcat ctcacatcct caggcgataa cgcccagttg catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 85
<211> 73
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của sdaA

<400> 85
gtgtattagt tcgttactgg aagtccagtc accttgtcag gagtattatc gtggtgtagg 60

ctggagctgc ttc 73

<210> 86
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của sdaA

<400> 86
atccgttgca gatgggcgag taagaagtat tagtcacact ggactttgat catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 87
<211> 70
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của iclR

<400> 87
atggtcgcac ccattcccgc gaaacgcggc agaaaacccg ccgttgccac gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 88
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi cho catxet khuyết đoạn của iclR

<400> 88
tcagcgcatt ccaccgtacg ccagcgtcac ttccttcgcc gctttaatca catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 89
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại acs để cấu trúc pCL-Prmf-acs

<400> 89
actatgagcc aaattcacaa a 21

<210> 90

<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại acs để cấu trúc pCL-Prmf-acs

<400> 90
cccaagcttt tacgatggca tcgcgat 27

<210> 91
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại poxB để cấu trúc pCL-Prmf-poxB

<400> 91
actatgaaac aaacggttgc agct 24

<210> 92
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại poxB để cấu trúc pCL-Prmf-poxB

<400> 92
cccaagcttt taccttagcc agtttgtttt 30

<210> 93
<211> 21
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại ackA-pta để cấu trúc pCL-Prmf-ackA-pta

<400> 93
atcatgtcga gtaagttagt a 21

<210> 94
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại ackA-pta để cấu trúc pCL-Prmf-ackA-pta

<400> 94
cccaagcttt tactgctgct gtgcaga 27

<210> 95
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại aceBA để cấu trúc pCL-Prmf-aceBA

<400> 95
actatgactg aacaggcaac aaca 24

<210> 96
<211> 30

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại aceBA để cấu trúc pCL-Prmf-aceBA

<400> 96
cccaagcttc tacgttcggc aacggctgta 30

<210> 97
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pckA để cấu trúc pCL-Prmf-pckA

<400> 97
actatgcgcg ttaacaatgg tttg 24

<210> 98
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại pckA để cấu trúc pCL-Prmf-pckA

<400> 98
cccaagctta taaacgggag gcgaaggtgc 30

<210> 99
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại glcB để cấu trúc pCL-Prmf-glcB

<400> 99
atcatgagtc aaaccataac ccag 24

<210> 100
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại glcB để cấu trúc pCL-Prmf-glcB

<400> 100
cccaagcttt taatgacttt ctttttcgcg 30

<210> 101
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để khuếch đại maeB để cấu trúc pCL-Prmf-maeB

<400> 101
atcatggatg accagttaaa a 21

<210> 102
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi để khuếch đại maeB để cấu trúc pCL-Prmf-maeB

<400> 102
cccaagcttt tacagcggtt gggtttg 27

<210> 103
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc gcl

<400> 103
atcatggcaa aaatgagagc c 21

<210> 104
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạc

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc gcl

<400> 104
gcgcaagctt ttattcatag tgc 23

<210> 105
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc glxR-glxK

<400> 105
gcgcgatatc atgaaactgg ga 22

<210> 106
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc glxR-glxK

<400> 106
ataaactggc ctgatctaga tttgttgaaa aagg 34

<210> 107
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc glxR-glxK

<400> 107
cctttttcaa caaatctaga tcaggccagt ttat 34

<210> 108
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi để cấu trúc glxR-glxK

<400> 108
ggcaagctta ttgcggccgc ttagttttta at 32

<210> 109
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Ape-OPSS

<400> 109
gtcatatgat ggctctggct gacatctct 29

<210> 110
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Ape-OPSS

<400> 110
gtaagctttt aaacagagtc accagcacc 29

<210> 111
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Mtb-OPSS

<400> 111
gtcatatgat gacacgatac gactcgctg 29

<210> 112

<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Mtb-OPSS

<400> 112
gtaagctttc atgcccatag ttgcccttc 29

<210> 113
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Msm-OPSS

<400> 113
ataagctttc atgcccatag ctgcccttc 29

<210> 114
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Msm-OPSS

<400> 114
ataagctttc attccagcgc gtcctcggc 29

<210> 115
<211> 29
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Rjo-OPSS

<400> 115
gtcatatgat ggcgcggttc gattcgctg 29

<210> 116
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Rjo-OPSS

<400> 116
tagcggccgc tcatgcccac aactgccctt c 31

<210> 117
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Nfa-OPSS

<400> 117
gtcatatgat ggcacgctac gaatcgctg 29

<210> 118
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Nfa-OPSS

<400> 118
gtaagctttc aggcccagag ctggcctt 28

<210> 119
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi cho Mtb-T

<400> 119
gtcatatgat gacacgatac gactcgctg 29

<210> 120
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược cho Mtb-T

<400> 120
gtaagctttc attccagagc ggtctcggc 29

<210> 121
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi xuôi của Msm-T

<400> 121
gtcatatgat gacgcgctac gactccctg 29

<210> 122
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược của Msm-T

<400> 122
ataagctttc attccagcgc gtcctcggc 29

<210> 123
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi của pCL-P(CJ1)-Msm-T

<400> 123
gatatcgcag cagccatcat c 21

<210> 124
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược của pCL-P(CJ1)-Msm-T

<400> 124

cccaagcttt cattccagcg cgtcctcg 28

Fig.1

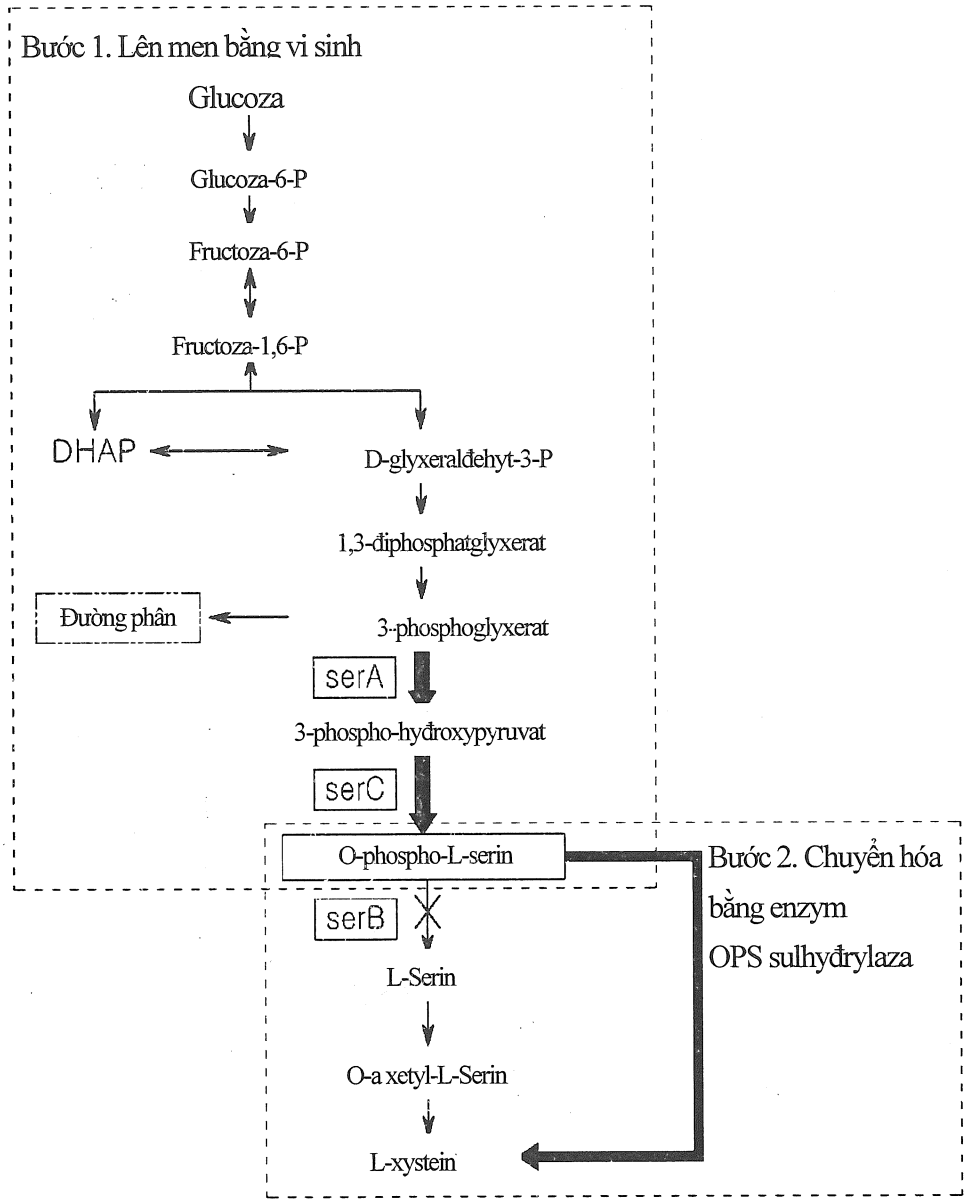

Bước 1. Lên men bằng vi sinh
Glucoza
Glucoza-6-P
Fructoza-6-P
Fructoza-1,6-P
DHAP
D-glyxeraldehyt-3-P
1,3-diphosphatglyxerat
Đường phân
3-phosphoglyxerat
serA
3-phospho-hyđroxypyruvat
serC
O-phospho-L-serin
serB
L-Serin
O-a xetyl-L-Serin
L-xystein
Bước 2. Chuyển hóa bằng enzym OPS sulhyđrylaza

Fig.2

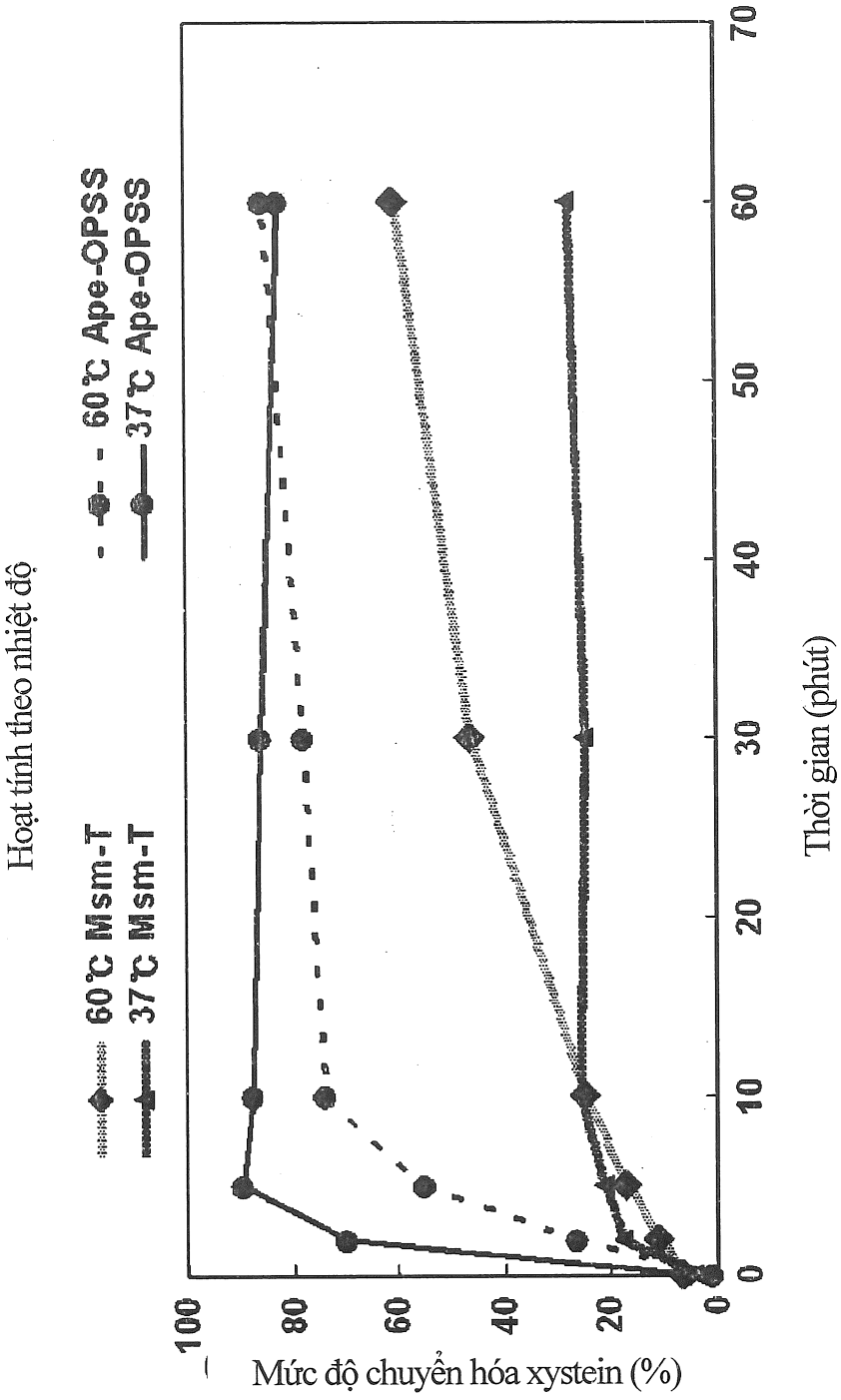

Hoạt tính theo nhiệt độ
60℃ Msm-T
37℃ Msm-T
60℃ Ape-OPSS
37℃ Ape-OPSS
Mức độ chuyển hóa xystein (%)
Thời gian (phút)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
60
70

Fig.3

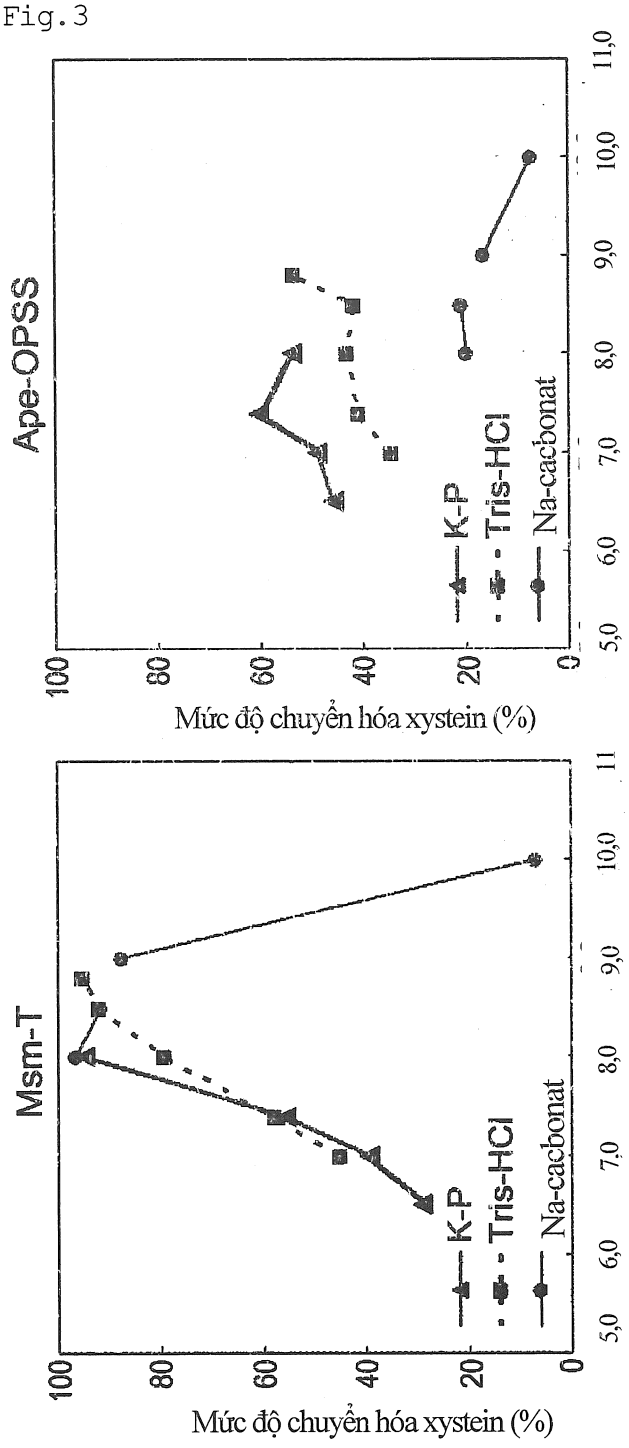

Ape-OPSS
Mức độ chuyển hóa xystein (%)
K-P
Tris-HCl
Na-cacbonat
Msm-T
Mức độ chuyển hóa xystein (%)
K-P
Tris-HCl
Na-cacbonat

Fig.4

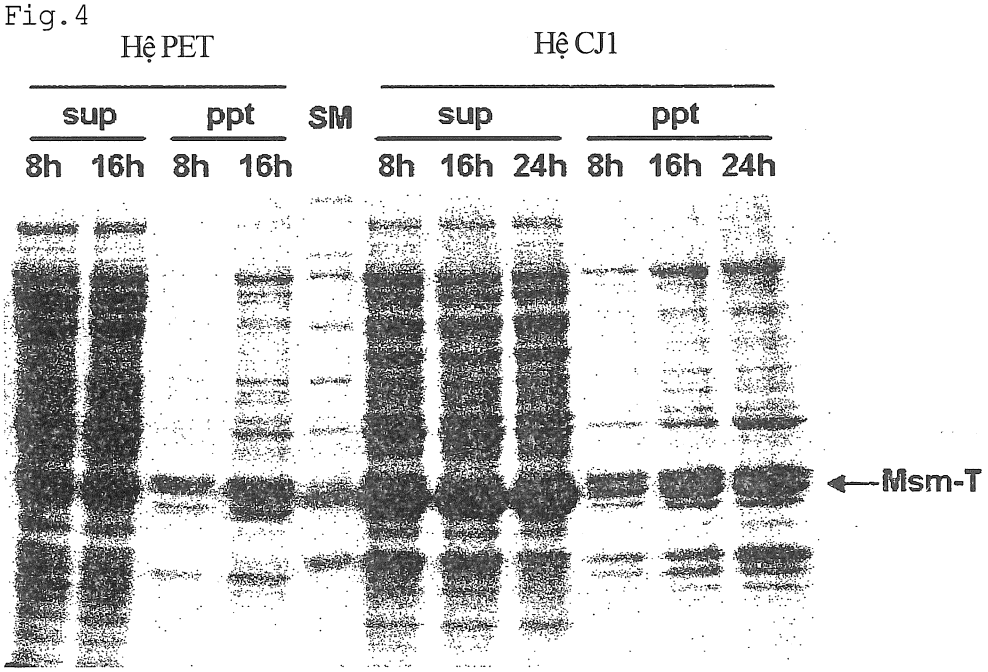

Hệ PET
Hệ CJ1
sup
ppt
SM
sup
ppt
8h
16h
8h
16h
8h
16h
24h
8h
16h
24h
Msm-T

Fig.5

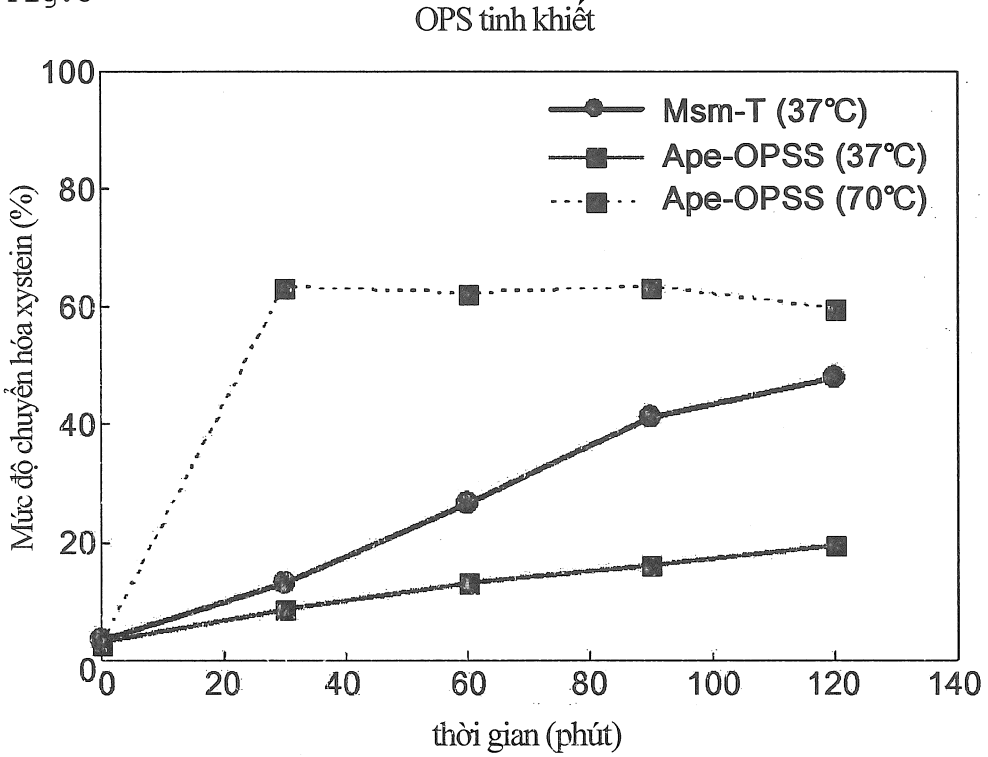
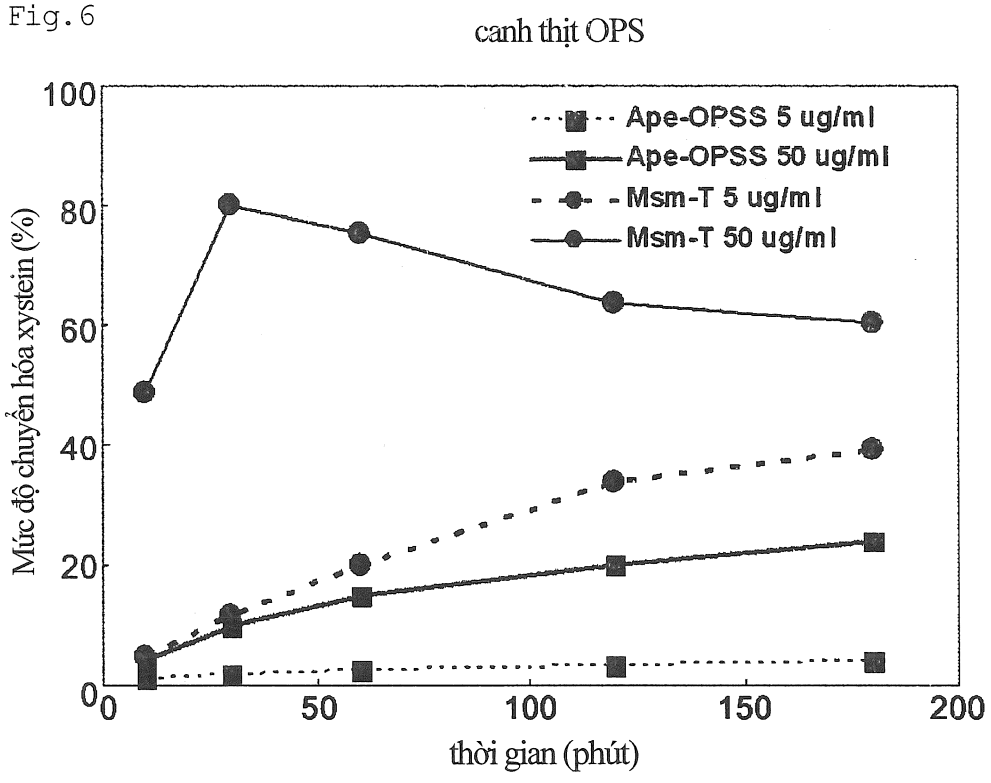

OPS tinh khiết
Msm-T (37℃)
Ape-OPSS (37℃)
Ape-OPSS (70℃)
Mức độ chuyển hóa xystein (%)
thời gian (phút)
0
20
40
60
80
100
120
140

Fig.6


canh thịt OPS
Ape-OPSS 5 ug/ml
Ape-OPSS 50 ug/ml
Msm-T 5 ug/ml
Msm-T 50 ug/ml
Mức độ chuyển hóa xystein (%)
thời gian (phút)
0
50
100
150
200