



(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)



1-0036974

(51)^{2019.01} C12P 13/06; C12R 1/15; C12P 13/12

(13) B

(21) 1-2020-00463

(22) 29/06/2018

(86) PCT/KR2018/007409 29/06/2018

(87) WO 2019/004780 03/01/2019

(30) 10-2017-0083439 30/06/2017 KR

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/06/2020 387ASC

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) KIM, Kyungrim (KR); SHIM, Jihyun (KR); KIM, Hyun Ah (KR); SHIN, Yong Uk (KR); LEE, Peter (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT BIẾN THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP CÓ HOẠT TÍNH O-SUCXINYL HOMOSERIN TRANSFERAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-SUCXINYL HOMOSERIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể đột biến O-suxinyl homoserin transferaza, polynucleotit mã hóa thể đột biến này, vi sinh vật chứa thể đột biến này, và phương pháp sản xuất O-suxinyl homoserin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể đột biến O-succinyl homoserin transferaza, polynucleotit mã hóa thể đột biến này, vi sinh vật chứa thể đột biến này, và phương pháp sản xuất O-succinyl homoserin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

O-succinyl homoserin đóng vai trò làm tiền chất của methionin, một trong các axit amin thiết yếu của cơ thể người. Methionin được sử dụng làm nguyên liệu tổng hợp cho các giải pháp y tế và vật tư y tế cũng như làm thức ăn chăn nuôi và phụ gia thực phẩm.

Methionin được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc sinh học. Trong khi đó, quy trình hai bước để sản xuất L-methionin bằng phản ứng chuyển hóa enzym từ tiền chất của L-methionin được sản xuất thông qua quá trình lên men đã được báo cáo (công bố đơn quốc tế số WO/2008/013432).

Trong quy trình hai bước, O-succinyl homoserin và O-acetyl homoserin được sử dụng làm tiền chất của methionin, và rất cần phải sản xuất O-succinyl homoserin có hiệu suất cao để sản xuất hàng loạt methionin trên quy mô kinh tế.

Gen *MetA* là gen mã hóa homoserin O-succinyl transferaza (MetA), dưới dạng enzym tham gia vào quá trình tổng hợp O-succinyl homoserin, bằng cách liên kết nhóm succinyl của succinyl-CoA với homoserin. Gen *MetA* là một trong những gen quan trọng nhất để phát triển các chủng sản xuất O-succinyl homoserin.

Các chủng trong đó O-succinyl homoserin được tích lũy có thể được tạo ra bằng cách xóa bỏ gen *metB* mã hóa xystathionin gama synthaza trong con đường sinh tổng hợp methionin. Tuy nhiên, các chủng sản xuất O-succinyl homoserin cần L-methionin. Vì lý do này, hoạt tính của homoserin O-succinyl transferaza bị suy yếu do sự ức chế phản hồi bởi methionin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, và cuối cùng là O-succinyl homoserin không thể thu được ở nồng độ cao.

Do đó, nhiều sáng chế trước đây đã tập trung vào nghiên cứu xem làm thế nào để giải phóng sự ức chế phản hồi của *metA* khỏi hệ thống điều hòa phản hồi của nó. Tuy nhiên, homoserin O-succinyl transferaza được mã hóa bằng gen *metA* có độ ổn định thấp thậm chí là protein kiểu đại, và độ ổn định của nó còn có thể giảm đi bằng cách đưa biến thể vào sự phản hồi tự do. Cần phải loại bỏ sự ức chế phản hồi của gen *metA* và cải thiện độ ổn định của enzym để phát triển các chủng có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin cao.

Hầu hết các vi sinh vật có trong tự nhiên sử dụng O-succinyl homoserin hoặc O-axetyl homoserin làm hợp chất trung gian để sinh tổng hợp methionin. Nói chung, MetA tạo ra O-succinyl homoserin, và homoserin O-axetyltransferaza (MetX) tạo ra O-axetyl homoserin. Ngoài ra, không giống MetA, MetX không bị ảnh hưởng bởi sự ức chế phản hồi và có độ ổn định enzym cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Nhờ các nỗ lực mạnh mẽ để làm tăng sự sản xuất O-succinyl homoserin, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng protein có hoạt tính tổng hợp O-succinyl homoserin, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza và bao gồm đoạn thay thế của arginin cho axit amin ở vị trí 313 và đoạn thay thế của axit amin khác với glutamin cho axit amin ở vị trí 176 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất O-succinyl homoserin và bao gồm polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất O-succinyl homoserin bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, và tách hoặc

thu hồi O-succinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy trong bước nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-methionin bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, và phản ứng của O-succinyl homoserin với sulfua.

Hiệu quả của sáng chế

Do protein O-succinyl homoserin transferaza đã được đột biến theo sáng chế có hoạt tính chuyển hóa O-succinyl homoserin tăng so với protein kiểu dại, nên nó có thể được sử dụng rộng rãi và hiệu quả trong quá trình sản xuất O-succinyl homoserin quy mô lớn dưới dạng giải pháp thay thế cho các con đường tổng hợp hóa học thông thường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng trong bản mô tả này để mô tả các phần mô tả và phương án khác. Nói cách khác, tất cả các tổ hợp của các thành phần khác nhau được bộc lộ trong bản mô tả này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở phần mô tả cụ thể được mô tả dưới đây.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan sẽ nhận biết hoặc có khả năng biết chắc rằng, chỉ cần sử dụng thử nghiệm thông thường, có nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế. Các phương án tương đương như vậy được bao gồm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

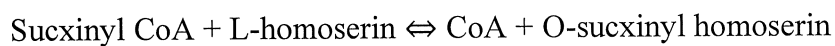
Theo một khía cạnh khác, để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza. Polypeptit biến thể mới có thể là polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza, trong đó axit amin ở vị trí 313 được thay thế bằng arginin và axit amin ở vị trí 176 được thay thế bằng axit amin khác với glutamin trong trình tự axit amin thu được từ *Corynebacterium glutamicum*, cụ thể, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, polypeptit

có thể có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza và bao gồm đoạn thay thế của arginin cho axit amin ở vị trí 313 và đoạn thay thế của axit amin khác với glutamin cho axit amin ở vị trí 176 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Cụ thể hơn, polypeptit có thể là polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza, trong đó axit amin ở vị trí 176 được thay thế bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, mà không bị giới hạn ở đó.

Polypeptit biến thể được mô tả trên đây có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza tăng cường so với hoạt tính của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1 có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza" dùng để chỉ hoạt tính mà chuyển hóa homoserin thành O-succinyl homoserin. O-succinyl homoserin transferaza là tên chung của các enzym có khả năng chuyển hóa succinyl CoA và L-homoserin, dưới dạng cơ chất, thành CoA và O-succinyl homoserin.

Sơ đồ phản ứng



Theo sáng chế, O-succinyl homoserin transferaza dùng để chỉ protein MetX đã cải biến mà là O-axetyl homoserin transferaza thông qua sự cải biến một phần trình tự axit amin của nó bằng các axit amin khác, từ đó có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza. Protein MetX có thể là MetX thu được từ chi *Corynebacterium*, cụ thể hơn là MetX có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 thu được từ *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Protein MetX có thể thu được từ cơ sở dữ liệu Ngân hàng Gen đã biết của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI).

Theo sáng chế, O-succinyl homoserin transferaza có thể thu được bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về phương pháp này bao gồm kỹ thuật tổng hợp gen bao gồm bước tối ưu hóa codon sao cho enzym thu được sẽ có hiệu suất cao ở vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* mà đã được sử dụng rộng rãi để biểu hiện enzym và phương pháp sàng lọc các nguồn enzym hữu ích bằng

cách sử dụng phương pháp tin sinh học dựa trên một lượng lớn thông tin hệ gen của vi sinh vật, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thể đột biến O-succinyl homoserin transferaza" có thể được sử dụng thay thế cho nhau với thuật ngữ "O-succinyl homoserin transferaza đã đột biến" hoặc "O-succinyl homoserin transferaza biến thể". Trong khi đó, thể đột biến này có thể là thể đột biến không có trong tự nhiên.

Cụ thể, O-succinyl homoserin transferaza đã đột biến theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin trong đó gốc axit amin thứ 313 từ đầu tận cùng N của MetX thu được từ *Corynebacterium sp.* có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng arginin và axit amin thứ 176 của trình tự này được thay thế bằng axit amin khác với glutamin. Cụ thể, gốc axit amin glutamin thứ 176 có thể được thay thế bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin, mà không bị giới hạn ở đó. O-succinyl homoserin transferaza đã đột biến theo sáng chế có thể bao gồm polypeptit có biến thể ở vị trí 313 và/hoặc vị trí 176 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó biến thể ở vị trí 313 bao gồm đoạn thay thế axit amin bằng arginin và/hoặc biến thể ở vị trí 176 bao gồm đoạn thay thế axit amin bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin, và polypeptit có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 85% so với SEQ ID NO: 1, mà không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza theo sáng chế có thể gồm có ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, 75, 95 và 97. Cụ thể, các trình tự axit amin này có thể là trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza đã đột biến, trong đó axit amin thứ 313 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng arginin, và axit amin thứ 176 của trình tự này được thay thế bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Polypeptit bất kỳ có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, hoặc 99% so với các trình tự được mô tả trên đây có thể được sử dụng mà không giới hạn miễn là polypeptit có biến thể và hoạt tính chuyển hóa O-succinyl homoserin tốt hơn so với kiểu đại.

Tương tự, MetX theo sáng chế có thể là protein MetX có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự này, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Cụ thể, protein MetX theo sáng chế có thể bao gồm các protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất là 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, đặc biệt là 90% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn là 95% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn nữa là 99% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến thể" của polypeptit dùng để chỉ polypeptit có trình tự axit amin khác với trình tự được trích dẫn bằng cách thay thế và/hoặc cải biến bảo toàn sao cho vẫn giữ được chức năng và tính chất của polypeptit. Polypeptit biến thể khác với trình tự được nhận diện bởi đoạn thay thế, xóa bỏ, hoặc thêm vào một vài axit amin. Các biến thể này có thể thường được nhận diện bằng cách cải biến một trong các trình tự polypeptit trên đây và đánh giá các tính chất của polypeptit đã cải biến. Tức là, khả năng của biến thể này có thể được tăng cường, không bị thay đổi, hoặc được giảm bớt so với protein tự nhiên. Các biến thể này có thể thường được nhận diện bằng cách cải biến một trong các trình tự polypeptit trên đây và đánh giá tính phản ứng của polypeptit đã cải biến này. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể trong đó một hoặc nhiều phần, như trình tự dẫn hướng đầu tận cùng N hoặc miền xuyên màng, đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần đã được loại bỏ khỏi đầu tận cùng N và/hoặc C của protein trưởng thành. Thuật ngữ "biến thể" có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ như thể đột biến, cải biến, protein đã đột biến, polypeptit biến thể, protein đã cải biến, polypeptit đã cải biến, mutein, dạng phân hướng, và dạng tương tự, mà không giới hạn, miễn là các thuật ngữ được sử dụng để chỉ biến thể. Cụ thể, biến thể bao gồm các biến thể có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza được tăng cường hiệu quả so với kiểu đại bởi sự biến thể của axit amin của O-succinyl homoserin transferaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thay thế bảo toàn" dùng để chỉ một axit amin được thay thế bằng một axit amin khác có tính chất cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, biến thể này có thể có ít nhất một đoạn thay thế bảo toàn trong đó giữ được ít nhất một hoạt tính sinh học. Đoạn thay thế axit amin này có

thể thường xảy ra dựa trên sự tương tự về độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, độ kỵ nước, độ ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của gốc. Ví dụ, axit amin tích điện dương (bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin; axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan. Nói chung, đoạn thay thế bảo toàn có ít hoặc không có ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit được tạo ra.

Biến thể cũng có thể bao gồm các cải biến khác bao gồm xóa bỏ hoặc thêm vào axit amin có ảnh hưởng không đáng kể đến các tính chất và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn hướng) ở đầu tận cùng N của protein mà định hướng sự di chuyển của protein theo cách đồng dịch mã hoặc sau dịch mã. Polypeptit cũng có thể được liên hợp với một trình tự hoặc tác nhân liên kết khác để nhận diện, tinh chế, hoặc tổng hợp polypeptit. Nói cách khác, mặc dù được bộc lộ là 'protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: cho trước', sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan rằng protein bất kỳ có trình tự axit amin bao gồm xóa bỏ, cải biến, thay thế, thay thế bảo toàn, hoặc bổ sung một hoặc một vài axit amin cũng có thể được sử dụng theo sáng chế miễn là protein này có hoạt tính tương đồng hoặc giống hệt với hoạt tính của polypeptit có cùng SEQ ID NO:. Ví dụ, rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan rằng protein bất kỳ có đoạn bổ sung trình tự không làm thay đổi chức năng của protein đó, đột biến có trong tự nhiên hoặc đột biến cam của nó, hoặc thay thế bảo toàn theo chiều xuôi hoặc ngược không bị loại trừ miễn là protein này có hoạt tính tương đồng hoặc giống hệt với hoạt tính của polypeptit biến thể, và protein bất kỳ có đoạn bổ sung trình tự hoặc đột biến như vậy cũng có thể nằm trong phạm vi của sáng chế.

Tương tự, rõ ràng là polynucleotit được dịch mã thành protein chứa ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, 75, 95 và 97 hoặc protein có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất với các trình tự này bởi độ thoái hóa codon cũng có thể được sử dụng. Hoặc, đoạn dò bất kỳ được tạo ra từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự được lai, trong các điều kiện nghiêm ngặt, với trình tự bổ sung toàn bộ hoặc một phần với trình tự polynucleotit và mã hóa protein có

hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza cũng có thể được sử dụng, mà không giới hạn. Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến các điều kiện cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được bộc lộ chi tiết trong các tài liệu đã biết (ví dụ, J. Sambrook et al., nêu trên, 9.50-9.51, 11.7-11.8). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm bước tiến hành lai giữa các gen có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao, độ tương đồng hoặc độ đồng nhất là 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, đặc biệt là 90% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn là 95% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, và đặc biệt nhất là 99% hoặc cao hơn, mà không tiến hành lai giữa các gen có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất thấp hơn độ tương đồng hoặc độ đồng nhất nêu trên, hoặc tiến hành rửa một lần, đặc biệt là hai lần hoặc ba lần, trong các điều kiện rửa thông thường đối với phương pháp lai Southern là 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, đặc biệt là ở nồng độ muối và nhiệt độ bằng 60°C, 0,1×SSC và 0,1% SDS, và đặc biệt hơn là 68°C, 0,1×SSC và 0,1% SDS.

Quy trình lai yêu cầu hai axit nucleic có trình tự bổ sung, mặc dù có thể có sự không khớp giữa các bazơ theo độ nghiêm ngặt của quá trình lai. Thuật ngữ "bổ trợ" được sử dụng để mô tả mối liên hệ giữa các bazơ nucleotit có khả năng lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin là bổ trợ cho thymin, và xytosin là bổ trợ cho guanin. Vì thế, sáng chế không những có thể bao gồm trình tự axit nucleic gần như tương tự mà còn có thể bao gồm mảnh axit nucleic được phân lập nhưng bổ trợ cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai được mô tả trên đây bao gồm quy trình lai ở giá trị T_m bằng 55°C. Tương tự, giá trị T_m có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, 60°C, 63°C, hoặc 65°C và có thể được điều chỉnh một cách thích hợp theo mục đích bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Độ nghiêm ngặt thích hợp để lai các polynucleotit có thể phụ thuộc vào độ dài của polynucleotit và độ bổ trợ và các thông số của chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (Sambrook et al., nêu trên, 9,50-9,51, 11,7-11,8).

Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất dùng để chỉ độ tương đương giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit và có thể được biểu diễn dưới dạng phần trăm.

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

Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit bảo toàn có thể được xác định bằng thuật toán sắp hàng tiêu chuẩn và các điểm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bằng chương trình được sử dụng có thể được sử dụng cùng với nó. Về cơ bản, trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai với nhau dọc theo ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% toàn bộ trình tự hoặc toàn bộ chiều dài trong các điều kiện nghiêm ngặt ở mức vừa phải hoặc mức cao. Trong các polynucleotit được lai, polynucleotit bao gồm codon đã thoái biến thay cho codon cũng có thể được xem xét.

Việc hai trình tự polynucleotit hoặc trình tự polypeptit bất kỳ có độ tương đồng, độ tương tự, hoặc độ đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, chương trình "FASTA" sử dụng các thông số mặc định được giới thiệu bởi Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444. Theo cách khác, thuật toán Needleman-Wunsch (1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Needleman của gói phần mềm ứng dụng tích hợp mở về sinh học phân tử của Châu Âu (European Molecular Biology Open Software Suite - EMBOSS) (Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản mới hơn) có thể được sử dụng để xác định độ tương đồng, độ tương tự, hoặc độ đồng nhất (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, độ tương đồng, độ tương tự, hoặc độ đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST, từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia, hoặc ClustalW.

Độ tương đồng, độ tương tự, hoặc độ đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin về trình tự bằng cách sử dụng chương trình máy tính GAP, như chương trình được giới thiệu bởi Needleman et al., (1970), J Mol Biol. 48: 443 như được bộc lộ trong tài liệu Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP xác định độ tương đồng,

độ tương tự, hoặc độ đồng nhất ở dạng số lượng ký tự được sắp xếp hàng (tức là, nucleotit hoặc axit amin) mà tương tự với nhau, chia cho tổng số lượng ký tự trong trình tự ngắn hơn giữa hai trình tự. Các thông số mặc định đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh đơn phân (chứa giá trị 1 đối với sự đồng nhất và 0 đối với sự không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov, et al., (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745 như được mô tả trong tài liệu Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) điểm phạt bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống và điểm phạt 0,10 bổ sung đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống (hoặc điểm phạt mở khoảng trống bằng 10 và điểm phạt mở rộng khoảng trống bằng 0,5); và (3) không có điểm phạt đối với các khoảng trống ở đầu. Vì thế, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "độ tương đồng" hoặc "độ đồng nhất" đề cập đến sự tương quan giữa các trình tự.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ polyme của nucleotit, trong đó monome của nucleotit được nối theo cách giống như mạch dài bằng các liên kết cộng hóa trị, thường chỉ chuỗi ADN hoặc ARN có độ dài tối thiểu nhất định, cụ thể hơn là mảnh polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể.

Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của O-succinyl homoserin transferaza là gen O-succinyl homoserin transferaza biến thể, đặc biệt là thu được từ *Corynebacterium glutamicum*. Dựa trên độ thoái biến mã di truyền, trình tự nucleotit mã hóa cùng một trình tự axit amin và các thể đột biến của nó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, và các ví dụ về chúng có thể được nêu trong SEQ ID NO: 64, 76, 96, hoặc 98, mà không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, trong trường hợp polynucleotit biến thể, trình tự nucleotit mã hóa cùng một trình tự axit amin và các thể đột biến của nó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế dựa trên độ thoái biến mã di truyền.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể và vi sinh vật được biến nạp bởi vector bao

gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể. Cụ thể, quy trình đưa vào này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật biến nạp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Cụ thể, do vi sinh vật bao gồm polypeptit O-succinyl homoserin transferaza biến thể có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin được tăng cường mà không ức chế sự phát triển của tế bào chủ so với vi sinh vật bao gồm polypeptit O-succinyl homoserin transferaza kiểu dại, O-succinyl homoserin có thể thu được từ các vi sinh vật này với hiệu suất cao.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "vector" dùng để chỉ cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein đích được liên kết theo cách có điều khiển với trình tự điều hòa thích hợp sao cho có thể biểu hiện protein đích trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm gen khởi đầu có khả năng khởi đầu sự phiên mã, trình tự gen điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã, trình tự mã hóa vị trí gắn kết ribosom của ARN thông tin thích hợp, và trình tự để điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Mỗi khi được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, vector này có thể sao chép hoặc có chức năng độc lập với hệ gen vật chủ, hoặc có thể kết hợp vào hệ gen của vật chủ.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó có thể sao chép trong vật chủ và có thể là vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virus, và thực khuẩn thể. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A và Charon21A có thể được sử dụng làm vector thực khuẩn hoặc vector cosmit, và vector gốc pBR, gốc pUC, gốc pBluescriptII, gốc pGEM, gốc pTZ, gốc pCL, và gốc pET có thể được sử dụng dưới dạng vector plasmid. Cụ thể, vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 và pCC1BAC có thể được sử dụng, mà không giới hạn ở đó.

Vector sẵn có theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể và vector biểu hiện đã biết bất kỳ có thể được sử dụng. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được cài xen vào nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng vector để cài xen nhiễm sắc thể vào tế bào. Việc cài xen polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp tái tổ hợp tương đồng,

mà không giới hạn ở đó. Polynucleotit còn có thể bao gồm chỉ thị chọn lọc để xác nhận sự xen nhiễm sắc thể vào. Chỉ thị chọn lọc được sử dụng để chọn lọc các tế bào được biến nạp bởi vectơ này, tức là, xác nhận sự xen vào của phân tử axit nucleic mong muốn, và chỉ thị chọn lọc có thể bao gồm các chỉ thị tạo ra các kiểu hình có thể chọn lọc, như tính kháng thuốc, nhu cầu dưỡng chất, tính kháng chất gây độc tế bào, hoặc sự biểu hiện protein trên bề mặt. Chỉ các tế bào biểu hiện chỉ thị chọn lọc có thể sống sót hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, và vì thế các tế bào đã biến nạp có thể được chọn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "biến nạp" dùng để chỉ việc đưa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ theo cách sao cho protein được mã hóa bằng polynucleotit này được biểu hiện trong tế bào chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, nó có thể được cài xen vào và nằm trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc tồn tại ngoài nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ, miễn là nó có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện trong tế bào này. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng cát-xét biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các thành phần cần phải có cho sự biểu hiện tự chủ của nó. Thông thường, cát-xét biểu hiện bao gồm gen khởi đầu được liên kết theo cách có điều khiển với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Cát-xét biểu hiện có thể ở dưới dạng vectơ biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ và được liên kết theo cách có điều khiển với trình tự cần phải có cho sự biểu hiện trong tế bào chủ, mà không giới hạn ở đó. Phương pháp biến nạp bao gồm phương pháp bất kỳ để đưa axit nucleic vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp biến nạp có thể bao gồm phương pháp điện di, kết tủa canxi phosphat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , hoặc $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, và phương pháp lithi axetat dihydrat-DMSO, mà không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được liên kết theo kiểu hoạt động được" có nghĩa là sự liên kết về chức năng giữa trình tự gen khởi đầu

mà bắt đầu và điều tiết sự phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích theo sáng chế và trình tự polynucleotit. Liên kết theo kiểu hoạt động được có thể được thực hiện bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và bước phân cắt và nối ADN đặc hiệu điểm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng enzym giới hạn, ligaza, và dạng tương tự, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, mà không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "vi sinh vật sản xuất O-succinyl homoserin" dùng để chỉ vi sinh vật về bản chất có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin hoặc vi sinh vật được tạo ra bằng cách mang lại khả năng sản xuất O-succinyl homoserin cho chủng ban đầu mà không có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin.

Vi sinh vật sản xuất O-succinyl homoserin có thể là tế bào hoặc vi sinh vật bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể hoặc tế bào hoặc vi sinh vật được biến nạp bởi vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể để có khả năng biểu hiện polypeptit biến thể. Đối với mục đích của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là vi sinh vật bất kỳ có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin bằng cách bao gồm polypeptit MetX biến thể. Các ví dụ về vi sinh vật có thể bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Serratia*, chi *Erwinia*, chi *Enterobacteria*, chi *Salmonella*, chi *Streptomyces*, chi *Pseudomonas*, chi *Brevibacterium*, hoặc chi *Corynebacterium*, cụ thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là *Corynebacterium glutamicum*, mà không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất O-succinyl homoserin" dùng để chỉ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* về bản chất có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin hoặc có khả năng như vậy nhờ đột biến. Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa O-succinyl homoserin. Tuy nhiên, khả năng sản xuất O-succinyl homoserin là tương đối thấp và gen hoặc cơ chế ảnh hưởng đến cơ chế sản xuất của nó vẫn chưa được tìm ra. Vì thế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin theo sáng chế đề cập đến vi sinh vật kiểu đại thuộc chi *Corynebacterium*, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* mà gen bên ngoài liên quan đến cơ chế sản xuất O-succinyl

homoserin được xen vào hoặc vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được cải biến để có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin được tăng cường bằng cách tăng cường hoạt tính nội tại của gen đó hoặc bất hoạt nó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*" cụ thể đề cập đến *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, hoặc chi tương tự, mà không giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là *Corynebacterium glutamicum*, sự phát triển và sống sót của chi này ít bị ảnh hưởng hơn ngay cả khi tiếp xúc với O-succinyl homoserin ở nồng độ cao.

Trong vi sinh vật này, ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza có thể được bất hoạt. Tức là, một, hai, hoặc ba protein được chọn từ đó có thể được bất hoạt.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "sự bất hoạt" hoạt tính protein có nghĩa là hoạt tính của protein được làm yếu đi so với hoạt tính nội tại hoặc protein này không có hoạt tính.

Sự bất hoạt hoạt tính protein có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về các phương pháp này có thể bao gồm: phương pháp xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bao gồm bước loại bỏ hoạt tính của protein; phương pháp thay thế gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến để làm giảm hoạt tính enzym; phương pháp đưa biến thể vào trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein bằng trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế phần gen khởi đầu của gen bằng phần gen khởi đầu yếu hơn so với phần gen khởi đầu nội sinh); phương pháp xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa oligonucleotit đối nghĩa vào (ví dụ, ARN đối nghĩa), mà ức chế sự dịch mã từ ARN thông tin thành protein thông qua sự gắn kết bổ sung vào sản phẩm phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp tạo ra sự gắn ribosom không thể có bằng cách tạo ra cấu trúc bậc hai bằng cách bổ sung theo cách nhân tạo trình tự

bổ trợ vào trình tự Shine-Dalgarno (SD) ở đầu trước của trình tự SD của gen mã hóa protein; và phương pháp thiết kế phiên mã ngược (RTE), mà bổ sung gen khởi đầu cho quá trình phiên mã ngược vào đầu tận cùng 3' của khung đọc mở (open reading frame - ORF) của trình tự tương ứng, và tổ hợp của chúng, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó.

Cụ thể, phương pháp xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh bên trong nhiễm sắc thể bằng polynucleotit hoặc gen chỉ thị có trình tự axit nucleic được xóa bỏ một phần bằng cách sử dụng vectơ để xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật. Ví dụ, phương pháp xóa bỏ gen bằng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng, mà không giới hạn ở đó. Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "một phần" có thể đề cập cụ thể đến 1 nucleotit đến 300 nucleotit, cụ thể hơn là 1 nucleotit đến 100 nucleotit, và thậm chí cụ thể hơn nữa là 1 nucleotit đến 50 nucleotit mặc dù nó có thể thay đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, và người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan có thể quyết định việc này một cách thích hợp. Tuy nhiên, phần này không giới hạn cụ thể ở đó.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự điều hòa biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách cảm ứng biến thể của trình tự axit nucleic trong trình tự điều hòa biểu hiện thông qua sự xóa bỏ, xen vào, thay thế bảo toàn, thay thế không bảo toàn, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng để làm yếu hơn nữa hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện; hoặc bằng cách thay thế trình tự này bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính yếu hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm gen khởi đầu, trình tự gen điều khiển, trình tự mã hóa điểm gắn kết ribosom, và trình tự để điều hòa sự phiên mã và dịch mã, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự gen trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách cảm ứng biến thể trong trình tự gen thông qua sự xóa bỏ, xen vào, thay thế bảo toàn, thay thế không bảo toàn, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng để làm yếu hơn nữa hoạt tính của protein; hoặc bằng cách thay thế trình tự này bằng trình tự gen được biến đổi để có hoạt tính yếu hơn hoặc trình tự gen được biến đổi để không có chút hoạt tính nào, nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể, trong vi sinh vật, ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen *metB* mã hóa xystathionin gama synthaza, gen *metY* mã hóa O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza được sử dụng trong con đường phân giải của

O-succinyl homoserin, và gen *thrB* mã hóa homoserin kinaza còn có thể được xóa bỏ hoặc được làm yếu đi.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "xóa bỏ" dùng để chỉ kiểu loại bỏ, bên trong nhiễm sắc thể, của trình tự nucleotit tương ứng từ codon bắt đầu đến codon kết thúc của gen đích, hoặc một phần hoặc toàn bộ của trình tự nucleotit của vùng điều hòa của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "làm yếu đi" dùng để chỉ việc loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính nội bào của ít nhất một enzym được mã hóa bằng ADN tương ứng trong chủng vi sinh vật. Ví dụ, sự biểu hiện của protein có thể được làm yếu đi bằng cách cải biến vùng gen khởi đầu và trình tự nucleotit của vùng 5'-UTR, hoặc hoạt tính của protein có thể được làm yếu đi bằng cách đưa đột biến vào vùng ORF của gen tương ứng. Cụ thể, trong vi sinh vật, ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen *metB* mã hóa xystathionin gama synthaza, gen *metY* mã hóa O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza trong con đường phân giải O-succinyl homoserin, và gen *thrB* mã hóa homoserin kinaza còn có thể được xóa bỏ hoặc được làm yếu đi.

Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất O-succinyl homoserin có hoạt tính aspartokinaza được tăng cường so với vi sinh vật không được đột biến.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tăng cường" hoạt tính protein có nghĩa là hoạt tính của protein được đưa vào hoặc được tăng lên so với hoạt tính nội tại của nó. Việc "đưa" hoạt tính này vào có nghĩa là vi sinh vật có được hoạt tính của polypeptit cụ thể mà vi sinh vật này chưa có một cách tự nhiên hoặc nhân tạo.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "làm tăng" hoạt tính của protein so với hoạt tính nội tại có nghĩa là hoạt tính của protein có trong vi sinh vật được tăng cường so với hoạt tính nội tại của protein hoặc hoạt tính trước khi cải biến. Thuật ngữ "hoạt tính nội tại" đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể mà chủng ban đầu hoặc vi sinh vật không cải biến có từ ban đầu trước khi biến nạp khi vi sinh vật này được biến nạp bởi biến thể di truyền do yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo gây ra. Hoạt tính nội tại cũng có thể được sử dụng thay thế cho hoạt tính trước khi cải biến.

Cụ thể, sự gia tăng hoạt tính theo sáng chế có thể đạt được bằng một trong các phương pháp sau đây:

- (1) phương pháp gia tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein,
- (2) phương pháp cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit,
- (3) phương pháp cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của protein,
- (4) phương pháp đưa polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon của polynucleotit vào, hoặc
- (5) phương pháp tăng cường hoạt tính bởi tổ hợp bất kỳ của chúng, nhưng các phương pháp không chỉ giới hạn ở đó.

Sự gia tăng số lượng bản sao của polynucleotit được mô tả trong mục (1) trên đây không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể được thực hiện ở dạng được liên kết theo cách có điều khiển với vector hoặc ở dạng được kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Cụ thể, phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách đưa vector mà có thể sao chép và có chức năng bất kể vật chủ, được liên kết theo cách có điều khiển với polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế, vào tế bào chủ; hoặc bằng cách đưa vector mà có thể xen polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, được liên kết theo cách có điều khiển với polynucleotit vào tế bào chủ, từ đó làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ.

Tiếp theo, bước cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của polynucleotit được mô tả trong mục (2) trên đây có thể được thực hiện bằng cách cảm ứng biến thể trong trình tự axit nucleic bằng cách xóa bỏ, xen vào, thay thế bảo toàn, thay thế không bảo toàn, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính mạnh hơn, mà không bị giới hạn ở đó. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm gen khởi đầu, trình tự gen điều khiển, trình tự mã hóa điểm gắn kết ribosom, và trình tự để điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã, mà không giới hạn ở đó.

Gen khởi đầu mạnh khác loại thay cho gen khởi đầu ban đầu có thể được liên kết ở ngược dòng của đơn vị biểu hiện polynucleotit, và các ví dụ về gen khởi đầu mạnh có thể bao gồm gen khởi đầu CJ7 (patent Hàn Quốc số 0620092 và công bố đơn quốc tế số WO2006/065095), gen khởi đầu lysCP1 (công bố đơn quốc tế số WO2009/096689), gen khởi đầu EF-Tu, gen khởi đầu groEL, hoặc gen khởi đầu aceA, hoặc aceB, mà không giới hạn ở đó. Ngoài ra, bước cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể được mô tả trong mục (3) trên đây, có thể được thực hiện bằng cách cảm ứng biến thể trong trình tự điều hòa biểu hiện bằng cách xóa bỏ, xen vào, thay thế bảo toàn, thay thế không bảo toàn, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế bằng trình tự polynucleotit được cải biến để có hoạt tính mạnh hơn, mà không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, việc đưa trình tự polynucleotit ngoại lai được mô tả trong mục (4) trên đây vào có thể được thực hiện bằng cách đưa polynucleotit ngoại lai mã hóa protein có hoạt tính giống hệt/tương tự với hoạt tính của protein, hoặc polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon vào tế bào chủ. Polynucleotit ngoại lai có thể là polynucleotit bất kỳ có hoạt tính giống hệt/tương tự với hoạt tính của protein mà không giới hạn. Ngoài ra, codon được tối ưu hóa của nó có thể được đưa vào tế bào chủ để thực hiện sự phiên mã và dịch mã được tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai đã đưa vào trong tế bào chủ. Bước đưa vào này có thể được thực hiện bằng phương pháp biến nạp đã biết bất kỳ được chọn lọc một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan. Khi polynucleotit đã đưa vào được biểu hiện trong tế bào chủ, protein được tạo ra và hoạt tính của nó có thể được tăng lên.

Cuối cùng, phương pháp tăng cường hoạt tính bằng tổ hợp bất kỳ của các phương pháp (1) đến (4) được mô tả trong mục (5) trên đây có thể được thực hiện bằng cách kết hợp ít nhất một trong các phương pháp làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein, cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của nó, cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể, và cải biến polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon của nó.

Theo sáng chế, trình tự của gen hoặc polynucleotit trên đây có thể thu được từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI), và cơ

quan tương tự.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất O-succinyl homoserin, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật được mô tả trên đây, và thu hồi O-succinyl homoserin từ vi sinh vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-methionin, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật được mô tả trên đây, và cho vi sinh vật đã nuôi cấy hoặc O-succinyl homoserin phản ứng với sulfua.

Cụ thể, phản ứng với sulfua dùng để chỉ quy trình tạo ra L-methionin từ O-succinyl homoserin bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ. Ví dụ, L-methionin có thể được tạo ra bằng cách cho O-succinyl homoserin phản ứng với methyl mercaptan, dưới dạng sulfua, hoặc bằng phản ứng kiểu bậc sau khi tạo ra xystathionin thông qua phản ứng với xystein, dưới dạng sulfua. Ngoài ra, chất xúc tác hoặc enzym có thể được bổ sung hoặc phản ứng có thể được thực hiện trong vi sinh vật bao gồm enzym để cải thiện tốc độ và hiệu suất phản ứng.

‘O-succinyl homoserin’ có thể là dịch lên men hoặc dạng được tinh chế chứa O-succinyl homoserin được sản xuất bằng vi sinh vật theo sáng chế. Ngoài ra, ‘sulfua’ có thể là, ví dụ, methyl mercaptan, và methyl mercaptan có thể có nghĩa là dẫn xuất của methyl mercaptan bất kỳ có khả năng tạo ra nguyên tử lưu huỳnh như dimethylsulfua (DMS) được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2010/098629 cũng như natri methyl mercaptan ($\text{CH}_3\text{S-Na}$) trong pha lỏng và methyl mercaptan (CH_3SH) ở trạng thái khí hoặc lỏng.

Phương pháp sản xuất L-methionin có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan dựa trên các điều kiện nuôi cấy được tối ưu hóa và điều kiện về hoạt tính enzym đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phần mô tả chi tiết về phương pháp nuôi cấy và môi trường nuôi cấy được nêu trên đây.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất L-methionin có thể còn bao gồm bước tách hoặc thu hồi O-succinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy trong quy trình nuôi cấy hoặc môi trường.

Rõ ràng là "O-succinyl homoserin" theo sáng chế có thể bao gồm các dạng muối của O-succinyl homoserin cũng như chính O-succinyl homoserin.

Trong phương pháp này, bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng kỹ thuật, nhưng không chỉ giới hạn ở, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy cung cấp dinh dưỡng theo mẻ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Về mặt này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH tối ưu (ví dụ, độ pH bằng 5 đến 9, tốt hơn là độ pH bằng 6 đến 8, và tốt nhất là độ pH bằng 6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric). Ngoài ra, điều kiện ưa khí có thể được duy trì bằng cách bổ sung oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy tế bào. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ 20°C đến 45°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, và bước nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, mà không chỉ giới hạn ở đó. O-succinyl homoserin tạo ra trong khi nuôi cấy có thể được xuất vào môi trường hoặc vẫn còn trong tế bào.

Các ví dụ về nguồn cacbon được chứa trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm sacarit và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, molasza, tinh bột và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu lạc và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic). Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Các ví dụ về nguồn nitơ có thể bao gồm hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, dịch ngô ngâm, bột đậu và ure), và hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat). Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Là nguồn phospho, kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, và muối chứa natri tương ứng với nó có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp mà không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các nguyên liệu thúc đẩy sinh trưởng thiết yếu như muối kim loại (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin và vitamin.

O-succinyl homoserin hoặc L-methionin được tạo ra trong bước nuôi cấy theo sáng chế có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp

đã biết bất kỳ để thu gom các axit amin mong muốn được chọn lọc một cách thích hợp theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, và HPLC có thể được sử dụng, và O-succinyl homoserin hoặc L-methionin mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật nhờ sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra plasmit *metX* có hoạt tính O-axetyl Homoserin Transferaza

Để khuếch đại gen mã hóa O-axetyl homoserin transferaza (*MetX*), vị trí của enzym giới hạn BamHI được xen vào cả hai đầu của mỗi đoạn môi (SEQ ID NO: 5 và 6) để khuếch đại từ vùng gen khởi đầu (nằm ở khoảng 300 bp ngược chiều từ codon bắt đầu) đến vùng gen kết thúc (nằm ở khoảng 100 bp xuôi chiều từ codon kết thúc) dựa trên trình tự được báo cáo thu được từ kiểu dại (WT).

Bảng 1

SEQ ID NO:	Đoạn môi	Trình tự (5'-3')
5	Đoạn môi 1	GGATCCCCTCGTTGTTCAACCAGCAACC
6	Đoạn môi 2	GGATCCCAAAGTCACAACACTTATGTTAG

PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN dài 1546 bp thu được ở dạng vùng mã hóa của gen *metX*. Vector pECCG117 (patent Hàn Quốc số 10-0057684) và mảnh ADN của *metX* được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI, được nối bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng để thu được plasmit được đặt tên là pECCG117-*metX* WT.

Ví dụ 2: Tạo ra plasmit *metX* biến thể có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza

Các vị trí đột biến mới của *metX* được chọn lọc, và các axit amin ở vị trí 176 và

313 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng một axit amin khác, một cách tương ứng.

Cụ thể hơn, đột biến Q176N và L313R được thực hiện. Cặp đoạn mồi đối với đột biến ở vị trí 176 (SEQ ID NO: 7 và 8) và cặp đoạn mồi đối với đột biến ở vị trí 313 (SEQ ID NO: 9 và 10) được thiết kế để tạo ra vector đột biến để thay thế axit amin thứ 176 của O-acetyl homoserin transferaza bằng một axit amin khác và thay thế axit amin thứ 313 của nó bằng arginin bằng cách sử dụng plasmit pECCG117-*metX* WT được tạo ra trong Ví dụ 1 làm khuôn.

Bảng 2

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
7	Đoạn mồi 3	ACGCGCCAGCGCCTGGAACATCGGCATTCAATCCG
8	Đoạn mồi 4	CGGATTGAATGCCGATGTTCCAGGCGCTGGCGCGT
9	Đoạn mồi 5	GTAGATACCGATATTCGGTACCCCTACCACCAG
10	Đoạn mồi 6	CTGGTGGTAGGGGTACCGAATATCGGTATCTAC

Gen *metX* đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi và bộ kit tạo đột biến định hướng điểm (Stratagene, USA). Plasmit đột biến L313R dựa trên plasmit kiểu dại (WT) hiện có tên là WT_L313R, và plasmit đột biến Q176N và L313R có tên là WT_Q176N_L313R.

Ví dụ 3: Thử nghiệm so sánh độ đặc hiệu cơ chất và hoạt tính của *metX* biến thể có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza

Để so sánh các hoạt tính của *metX* đột biến mà tạo ra lượng dư O-succinyl homoserin, tạo ra các chủng trong đó homoserin được tích lũy và việc sử dụng O-succinyl homoserin đã tạo ra được loại bỏ. Các chủng trong đó gen *metB* mã hóa xystathionin gama synthaza trong con đường phân giải O-succinyl homoserin được xóa bỏ và gen *metY* mã hóa O-acetyl homoserin (thiol)-lyaza trong con đường phân giải O-succinyl homoserin được xóa bỏ. Trước tiên, để xóa bỏ gen *metB*, cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 11 và 12) để khuếch đại vùng ngược 5' của gen *metB* và cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 13 và 14) để khuếch đại vùng xuôi 3' của gen *metB* được thiết kế dựa trên thông tin về trình tự nucleotit của gen *metB* thu được từ kiểu dại. Vị trí của enzym

giới hạn XbaI (được gạch chân) được cài xen vào các đầu của mỗi đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 11 và 14.

Bảng 3

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
11	Đoạn mồi 7	<u>TCTAGAT</u> GCCTGATTATCTCACC
12	Đoạn mồi 8	ACTGGTGGGTCATGGTTGCATATGAGATCAA CTCCTGTAA
13	Đoạn mồi 9	TTACAGGAGTTGATCTCATATGCAACCATGA CCCACCAGT
14	Đoạn mồi 10	<u>TCTAGAC</u> CTTGAAGTTCTTGACTG

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể kiểu dại làm khuôn và sử dụng các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12 và SEQ ID NO: 13 và 14. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN dài 450 bp của vùng ngược dòng 5' của gen *metB* và mảnh ADN dài 467 bp của vùng xuôi dòng 3' của gen *metB*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai mảnh ADN đã khuếch đại làm khuôn và các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 11 và 14. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN dài 917 bp chỉ bao gồm đầu ngược và xuôi của gen *metB* với vùng trung tâm đã bị xóa bỏ của nó được khuếch đại.

Vectơ pDZ và mảnh ADN dài 917 bp được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, được nối bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng để thu được plasmit được đặt tên là pDZ- $\Delta metB$.

Vectơ pDZ- $\Delta metB$ được đưa vào các chủng kiểu dại bằng phương pháp xung

điện và các chủng đã biến nạp thu được từ môi trường nuôi cấy để chọn lọc bao gồm kanamycin 25 mg/L. Các chủng đã chọn được đưa vào quy trình trao đổi chéo tái tổ hợp thứ cấp để thu được chủng WT $\Delta metB$ trong đó gen *metB* được xóa bỏ do mảnh ADN được xen vào nhiễm sắc thể.

Để xóa bỏ gen *metY* trong một con đường phân giải O-succinyl homoserin khác, cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 15 và 16) để khuếch đại vùng ngược dòng 5' của gen *metY* và cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 17 và 18) để khuếch đại vùng xuôi dòng 3' của gen *metY* được thiết kế dựa trên thông tin về trình tự nucleotit của gen *metY* thu được từ kiểu đại. Vị trí của enzyme giới hạn XbaI (được gạch chân) được cài xen vào các đầu của mỗi đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và 18.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
15	Đoạn mồi 11	<u>TCTAGA</u> AGTAGCGTTGCTGTACAC
16	Đoạn mồi 12	ATCAATGGTCTCGATGCCCATATGGCATTGG AGGTCCTTAAG
17	Đoạn mồi 13	CTTAAGGACCTCCAAATGCCATATGGGCATC GAGACCATTGAT
18	Đoạn mồi 14	<u>TCTAGAT</u> GGGAACCGTTGCAACCAC

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể kiểu đại làm khuôn và sử dụng các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16 và SEQ ID NO: 17 và 18. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN dài 512 bp của vùng ngược dòng 5' của gen *metY* và mảnh ADN dài 520 bp của vùng xuôi chiều 3' của gen *metY*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai mảnh ADN đã khuếch đại làm khuôn và các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và 18. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được

thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN dài 1032 bp chỉ bao gồm đầu ngược và xuôi của gen *metY* với vùng trung tâm đã bị xóa bỏ của nó được khuếch đại.

Vectơ pDZ và mảnh ADN dài 1032 bp được xử lý bằng enzym giới hạn *XbaI*, được nối bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng để thu được plasmid được đặt tên là pDZ- $\Delta metY$.

Vectơ pDZ- $\Delta metY$ được đưa vào chủng WT $\Delta metB$ đã tạo ra bằng phương pháp xung điện và các chủng đã biến nạp thu được từ môi trường nuôi cấy để chọn lọc bao gồm kanamycin 25 mg/L. Các chủng đã chọn được đưa vào quy trình trao đổi chéo tái tổ hợp thứ cấp để thu được chủng WT $\Delta metB\Delta metY$ trong đó gen *metY* được xóa bỏ do mảnh ADN được xen vào nhiễm sắc thể.

Để tạo ra vectơ để đưa đột biến vào gen *lysC* (SEQ ID NO: 20) mã hóa aspartokinaza thu được từ kiểu dại (SEQ ID NO: 19) để tối đa hóa sự tạo ra O-succinyl homoserin, cặp đoạn môi (SEQ ID NO: 21 và 22) để khuếch đại vùng ngược dòng 5' của vị trí đột biến và cặp đoạn môi (SEQ ID NO: 23 và 24) để khuếch đại vùng xuôi dòng 3' của vị trí đột biến được thiết kế. Vị trí của enzym giới hạn *XbaI* (được gạch chân) được xen vào các đầu của mỗi đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 21 và 24, và các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 22 và 23 được bố trí để đặt đoạn thay thế nucleotit (được gạch chân) ở các vị trí được thiết kế để trao đổi chéo với nhau.

Bảng 5

SEQ ID NO:	Đoạn môi	Trình tự (5'-3')
21	Đoạn môi 15	tcctctagaGCTGCGCAGTGTGAATACG
22	Đoạn môi 16	CACCGACATCATCTTCACCTGCC
23	Đoạn môi 17	GGCAGGTGAAGATGATGTCGGTG
24	Đoạn môi 18	gactctagaGTTACCTCAGAGACGATTA

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể kiểu dại làm khuôn và sử dụng các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 21 và 22 và SEQ ID NO: 23 và 24. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn môi ở nhiệt độ 55°C

trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN dài 509 bp của vùng ngược chiều 5' của đột biến của gen *lysC* và mảnh ADN dài 520 bp của vùng xuôi chiều 3' của đột biến của gen *lysC*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai mảnh ADN đã khuếch đại làm khuôn và các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 21 và 24. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau. Sau khi làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, các chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây được lặp lại 30 lần, và sau đó bước polyme hóa được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN dài 1011 bp bao gồm gen *lysC* đột biến (SEQ ID NO: 26) mã hóa thể đột biến aspartokinaza (SEQ ID NO: 25) trong đó threonin ở vị trí 311 được thay thế bằng isoleuxin được khuếch đại.

Vector pDZ (patent Hàn Quốc số 0924065) không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* và mảnh ADN dài 1011 bp được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, được nối bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng để thu được plasmit được đặt tên là pDZ-*lysC*(T311I).

Vector pDZ-*lysC*(T311I) được đưa vào WT Δ *metB* Δ *metY* bằng phương pháp xung điện (Appl. Microbiol. Biothcnol. (1999) 52:541-545) và các chủng đã biến nạp thu được từ môi trường nuôi cấy để chọn lọc bao gồm kanamycin 25 mg/L. Các chủng đã chọn được đưa vào quy trình trao đổi chéo tái tổ hợp thứ cấp để thu được chủng WT Δ *metB* Δ *metY*, *lysC*(T311I) trong đó đột biến nucleotit được đưa vào gen *lysC* do mảnh ADN được cài xen vào nhiễm sắc thể, và chủng này được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* WT Δ *metB* Δ *metY*, *lysC*(T311I).

Vector pECCG117-*metX* WT, pECCG117-*metX* WT_L313R, và pECCG117-*metX* WT_Q176N_L313R được tạo ra trong Ví dụ 1 và 2 được đưa vào WT Δ *metB* Δ *metY* đã tạo ra bằng phương pháp xung điện và được phết vào môi trường để chọn lọc bao gồm kanamycin 25 mg/L để thu được các chủng đã biến nạp.

Để so sánh khả năng sản xuất O-axetyl homoserin (O-AH) và khả năng sản xuất O-sucxynyl homoserin (O-SH) của các chủng đã tạo ra, các chủng này được nuôi cấy theo phương pháp sau và nồng độ của O-axetyl homoserin và O-sucxynyl

homoserin trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Một que cấy platin chứa mỗi chủng được cấy truyền lên trên bình ngăn góc dung tích 250 ml chứa 25 ml môi trường nuôi cấy như sau và được nuôi cấy trong khi lắc ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Nồng độ của O-axetyl homoserin và O-succinyl homoserin được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), và các nồng độ được phân tích được thể hiện trong Bảng 6.

Thành phần của môi trường nuôi cấy (độ pH = 7,0)

100g glucoza, 40g (NH₄)₂SO₄, 2,5g protein đậu nành, 5g chất rắn ngô ngâm, 3g ure, 1g KH₂PO₄, 0,5g MgSO₄·7H₂O, 100µg biotin, 1000µg thiamin HCl, 2000µg canxi-axit pantothenic, 3000µg nicotinamit, 30g CaCO₃, và 0,3g L-methionin (tính theo 1L nước cất).

Bảng 6

Chủng	O-axetyl homoserin (g/L)			O-succinyl homoserin (g/L)		
	Mề 1	Mề 2	Mề 3	Mề 1	Mề 2	Mề 3
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT	2,0	2,2	2,1	0,01	0,03	0,01
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT_L313R	0,05	0,06	0,04	1,2	1,1	1,0
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT_Q176N_L313R	0,03	0,01	0,02	1,4	1,6	1,7

Dựa vào Bảng 6 trên đây, xác nhận được rằng trong khi O-axetyl homoserin được sản xuất bởi chủng mà plasmit metX WT đối chứng được đưa vào, thì O-succinyl homoserin được sản xuất bởi cả hai chủng mà plasmit metX đột biến được đưa vào. Cụ thể, xác nhận được rằng việc sản xuất O-succinyl homoserin tăng lên đáng kể trong trường hợp metX WT_Q176N_L313R. Tức là, chủng mà đột biến được đưa vào có độ đặc hiệu cơ chất của transferaza thay đổi, từ đó sản xuất O-succinyl homoserin.

Ví dụ 4: Tạo ra đột biến MetX bằng kỹ thuật gây đột biến bão hòa và đánh giá khả năng sản xuất O-axetyl homoserin

Để tạo ra thể đột biến của MetX, mà có khả năng sản xuất O-succinyl homoserin cao, được đột biến bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 176 bằng một axit amin khác,

kỹ thuật gây đột biến bão hòa được sử dụng. 18 kiểu thể đột biến trong đó axit amin ở vị trí 313 được thay thế bằng arginin và axit amin ở vị trí 176 được thay thế bằng một axit amin khác được tạo ra bằng cách sử dụng plasmid được tạo ra trong Ví dụ 1 làm khuôn. Biến thể, axit amin được thay thế, và số trình tự của đoạn mỗi được sử dụng trong các biến thể tương ứng được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Plasmid đột biến	Thay thế axit amin	SEQ ID NO: của đoạn mỗi
Đột biến 313	L313R	SEQ ID NO: 9,10
Đột biến L313R & 176	Q176N,L313R	SEQ ID NO: 7,8
	Q176F,L313R	SEQ ID NO: 27,28
	Q176S,L313R	SEQ ID NO: 29,30
	Q176Y,L313R	SEQ ID NO: 31,32
	Q176C,L313R	SEQ ID NO: 33,34
	Q176P,L313R	SEQ ID NO: 35,36
	Q176H,L313R	SEQ ID NO: 37,38
	Q176L,L313R	SEQ ID NO: 39,40
	Q176I,L313R	SEQ ID NO: 41,42
	Q176T,L313R	SEQ ID NO: 43,44
	Q176R,L313R	SEQ ID NO: 45,46
	Q176K,L313R	SEQ ID NO: 47,48
	Q176V,L313R	SEQ ID NO: 49,50
	Q176A,L313R	SEQ ID NO: 51,52
	Q176D,L313R	SEQ ID NO: 53,54
	Q176E,L313R	SEQ ID NO: 55,56
	Q176G,L313R	SEQ ID NO: 57,58
	Q176W,L313R	SEQ ID NO: 59,60

Cụ thể, gen biến thể *metX* được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mỗi được thể hiện trong Bảng 2 và bộ kit gây đột biến định hướng điểm (Stratagene, USA). Plasmid đột biến đã tạo ra được đưa vào chủng $WT\Delta metB\Delta metY$, *lysC*(T311I), và sau đó bước đánh giá trong bình được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ 4. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

Chủng	Vị trí đột biến	O-acetyl homoserin (g/L)			O-succinyl homoserin (g/L)		
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
$WT\Delta metB\Delta metY$, <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT		2,0	2,2	2,1	0,01	0,03	0,01
$WT\Delta metB\Delta metY$, <i>lysC</i> (T311I)/	L313R	0,05	0,06	0,04	1,2	1,1	1,0

pECCG117- <i>metX</i> WT_L313R SEQ ID NO: 61							
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176N_L313R SEQ ID NO: 63	Q176N, L313R	0,03	0,01	0,02	1,4	1,6	1,7
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176F_L313R SEQ ID NO: 65	Q176F, L313R	2,1	2,1	2,2	0,01	0,02	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176S_L313R SEQ ID NO: 67	Q176S, L313R	2,0	2,0	2,2	0,02	0,03	0,02
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176Y_L313R SEQ ID NO: 69	Q176Y, L313R	2,1	2,2	2,2	0,01	0,01	0,02
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176C_L313R SEQ ID NO: 71	Q176C, L313R	2,0	2,1	1,9	0,04	0,01	0,03
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176P_L313R SEQ ID NO: 73	Q176P, L313R	2,1	1,9	2,1	0,01	0,03	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176H_L313R SEQ ID NO: 75	Q176H, L313R	1,6	1,3	1,6	0,1	0,3	0,1
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176L_L313R SEQ ID NO: 77	Q176L, L313R	2,2	2,1	1,9	0,01	0,02	0,05
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176I_L313R SEQ ID NO: 79	Q176I, L313R	2,0	2,3	2,1	0,01	0,02	0,02

WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176T_L313R SEQ ID NO: 81	Q176T, L313R	2,2	1,7	2,1	0,01	0,04	0,01
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176R_L313R SEQ ID NO: 83	Q176R, L313R	2,0	2,0	1,9	0,05	0,03	0,06
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176K_L313R SEQ ID NO: 85	Q176K, L313R	2,2	2,2	2,1	0,01	0,00	0,01
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176V_L313R SEQ ID NO: 87	Q176V, L313R	2,0	2,2	1,9	0,05	0,01	0,02
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176A_L313R SEQ ID NO: 89	Q176A, L313R	2,1	1,9	1,9	0,01	0,03	0,03
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176D_L313R SEQ ID NO: 91	Q176D, L313R	2,0	1,8	2,1	0,04	0,06	0,08
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176E_L313R SEQ ID NO: 93	Q176E, L313R	1,9	1,9	2,0	0,07	0,02	0,05
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176G_L313R SEQ ID NO: 95	Q176G, L313R	1,4	1,2	1,4	0,2	0,4	0,1
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_Q176W_L313R SEQ ID NO: 97	Q176W, L313R	0,1	0,08	0,07	1,0	1,1	1,3

Dựa vào Bảng 8, xác nhận được rằng trong khi hầu hết các thể đột biến không

thể sản sinh O-succinyl homoserin, thì *metX* đột biến (L313R, Q176N), (L313R, Q176W), (L313R, Q176H), hoặc (L313R, Q176G) lại sản sinh ra O-succinyl homoserin ở mức độ cao so với kiểu dại, một cách tương ứng. Tức là, xác nhận được rằng khi axit amin ở vị trí 313 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng arginin, và axit amin ở vị trí 176 của nó được thay thế bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin, độ đặc hiệu cơ chất đối với succinyl CoA được tạo ra đối với transferaza, từ đó sản xuất O-succinyl homoserin.

Các kết quả mô tả trên đây cho thấy rằng thể đột biến theo sáng chế có thể làm tăng sự sản xuất O-succinyl homoserin.

Ngoài ra, chủng *WTΔmetBΔmetY, lysC(T311I)/pECCG117-metX* WT_Q176N_L313R và chủng *WTΔmetBΔmetY, lysC(T311I)/pECCG117-metX* WT_Q176W_L313R đã tạo ra được ký hiệu là CA05-5136 và CA05-5137, một cách tương ứng và được nộp lưu theo hiệp ước Budapest vào Trung tâm giống Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 11/05/2017, với số gia nhập KCCM12024P và KCCM12025P.

Phần mô tả trên đây của sáng chế được nêu nhằm mục đích minh họa, và người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được thực hiện mà không làm thay đổi khái niệm kỹ thuật và các dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Vì thế, rõ ràng là các phương án được mô tả trên đây là để minh họa theo tất cả các khía cạnh và không làm giới hạn sáng chế. Các phương án khác nhau được bộc lộ trong bản mô tả này không nhằm làm giới hạn, với phạm vi chính xác được nêu ở các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây. Sáng chế chỉ giới hạn ở các thuật ngữ nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, cùng với toàn bộ phạm vi của các thuật ngữ tương đương mà các điểm yêu cầu bảo hộ này được hưởng.

Số nộp lưu

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm giống Vi sinh vật Hàn quốc (KCCM)

Số gia nhập: KCCM12024P

Ngày nộp lưu: 11/05/2017

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm giống Vi sinh vật Hàn quốc (KCCM)

Số gia nhập: KCCM12025P

Ngày nộp lưu: 11/05/2017

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit biến thể được phân lập có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza, bao gồm đoạn thay thế của axit amin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng arginin và đoạn thay thế của axit amin ở vị trí 176 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác với glutamin và trong đó biến thể này có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 1.
2. Polypeptit được phân lập theo điểm 1, trong đó axit amin ở vị trí 176 được thay thế bằng asparagin, tryptophan, histidin, hoặc glyxin.
3. Polypeptit được phân lập theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, 75, 95 và 97.
4. Polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza theo điểm 1.
5. Polynucleotit được phân lập theo điểm 4, trong đó polynucleotit này chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 64, 76, 96 và 98.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh O-succinyl homoserin, trong đó vi sinh vật này chứa polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza theo điểm 1 hoặc polypeptit đột biến của nó hoặc trong đó, trong vi sinh vật này, polypeptit có hoạt tính O-succinyl homoserin transferaza theo điểm 1 hoặc polypeptit đột biến của nó được biểu hiện quá mức.
7. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có hoạt tính aspartokinaza được tăng cường hơn nữa so với vi sinh vật không đột biến.
8. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

9. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza được bất hoạt trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

10. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có hoạt tính aspartokinaza được tăng cường hơn nữa so với vi sinh vật không đột biến và hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza được bất hoạt.

11. Phương pháp sản xuất O-succinyl homoserin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất O-succinyl homoserin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 trong môi trường nuôi cấy; và

tách hoặc thu hồi O-succinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy trong bước nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

12. Phương pháp sản xuất L-methionin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất O-succinyl homoserin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 trong môi trường nuôi cấy; và

(b) cho O-succinyl homoserin phản ứng với sulfua.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách hoặc thu hồi O-succinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy trong bước (a).

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách hoặc thu hồi L-methionin được sản xuất bằng phản ứng giữa O-succinyl homoserin và sulfua trong bước (b).



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA05-5136	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12024P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May. 11. 2017. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: May. 11. 2017.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To, CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA05-5137	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12025P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May. 11. 2017. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : Date: May. 11. 2017.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국미생물보존센터

03841 서울특별시 서대문구 홍제내2가길 45 유원빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

Room Bldg., 45 Hongjena-e-2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03841, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> POLYPEPTIT BIẾN THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP CÓ HOẠT TÍNH O-SUCXINYL
 HOMOSERIN TRANSFERAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-SUCXINYL HOMOSERIN NÀY
 <130> OPA18186
 <150> KR 10-2017-0083439
 <151> 2017-06-30
 <160> 98
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(377)
 <223> metX
 <400> 1
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Leu Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 2
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> gen

<222> (1)..(1134)
 <223> metX

<400> 2
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgctga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacat ccacggtcgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt
 480
 ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt cggcattcaa
 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcccc cctcacctac
 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
 840
 aaccgccagc acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca ccagcaagaa
 960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 3
<211> 379
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3
Met Pro Thr Val Phe Pro Asp Asp Ser Val Gly Leu Val Ser Pro Gln
1 5 10 15

Thr Leu His Phe Asn Glu Pro Leu Glu Leu Thr Ser Gly Lys Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Tyr Asp Leu Val Ile Glu Thr Tyr Gly Glu Leu Asn Ala Thr
35 40 45

Gln Ser Asn Ala Val Leu Ile Cys His Ala Leu Ser Gly His His His
50 55 60

Ala Ala Gly Tyr His Ser Val Asp Glu Arg Lys Pro Gly Trp Trp Asp
65 70 75 80

Ser Cys Ile Gly Pro Gly Lys Pro Ile Asp Thr Arg Lys Phe Phe Val
85 90 95

Val Ala Leu Asn Asn Leu Gly Gly Cys Asn Gly Ser Ser Gly Pro Ala
100 105 110

Ser Ile Asn Pro Ala Thr Gly Lys Val Tyr Gly Ala Asp Phe Pro Met
115 120 125

Val Thr Val Glu Asp Trp Val His Ser Gln Ala Arg Leu Ala Asp Arg
130 135 140

Leu Gly Ile Arg Gln Trp Ala Ala Val Val Gly Gly Ser Leu Gly Gly
145 150 155 160

Met Gln Ala Leu Gln Trp Thr Ile Ser Tyr Pro Glu Arg Val Arg His
165 170 175

Cys Leu Cys Ile Ala Ser Ala Pro Lys Leu Ser Ala Gln Asn Ile Ala
180 185 190

Phe Asn Glu Val Ala Arg Gln Ala Ile Leu Ser Asp Pro Glu Phe Leu
195 200 205

Gly Gly Tyr Phe Gln Glu Gln Gly Val Ile Pro Lys Arg Gly Leu Lys
 210 215 220

Leu Ala Arg Met Val Gly His Ile Thr Tyr Leu Ser Asp Asp Ala Met
 225 230 235 240

Gly Ala Lys Phe Gly Arg Val Leu Lys Thr Glu Lys Leu Asn Tyr Asp
 245 250 255

Leu His Ser Val Glu Phe Gln Val Glu Ser Tyr Leu Arg Tyr Gln Gly
 260 265 270

Glu Glu Phe Ser Thr Arg Phe Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Leu Met Thr
 275 280 285

Lys Ala Leu Asp Tyr Phe Asp Pro Ala Ala Ala His Gly Asp Asp Leu
 290 295 300

Val Arg Thr Leu Glu Gly Val Glu Ala Asp Phe Cys Leu Met Ser Phe
 305 310 315 320

Thr Thr Asp Trp Arg Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Glu Ile Val Asp
 325 330 335

Ala Leu Ile Ala Ala Lys Lys Asn Val Ser Tyr Leu Glu Ile Asp Ala
 340 345 350

Pro Gln Gly His Asp Ala Phe Leu Met Pro Ile Pro Arg Tyr Leu Gln
 355 360 365

Ala Phe Ser Gly Tyr Met Asn Arg Ile Ser Val
 370 375

<210> 4
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4
 atgccacag tcttccccga cgactccgtc ggtctggtct cccccagac gctgcacttc
 60

aacgaaccgc tcgagctgac cagcggcaag tccctggccg agtacgacct ggtgatcgaa
 120

acctacggcg agctgaatgc cacgcagagc aacgcggtgc tgatctgcca cgccctctcc
 180

ggccaccacc acgccgccgg ctaccacagc gtcgacgagc gcaagccggg ctggtgggac
 240

agctgcatcg gtccgggcaa gccgatcgac acccgcaagt tcttcgtcgt cgccctcaac
300

aacctcggcg gttgcaacgg atccagcggc cccgccagca tcaatccggc gaccggcaag
360

gtctacggcg cggacttccc gatggttacg gtggaagact ggggtgcatag ccaggcgcgc
420

ctggcagacc gcctcggcat ccgccagtgg gccgcggtgg tcggcggcag cctcggcggc
480

atgcaggcgc tgcaatggac catcagctat cccgagcgcg tccgtcactg cctgtgcatc
540

gccagcgcgc cgaagctgtc ggcgcagaac atgccttca acgaagtcgc ccggcaggcg
600

attctttccg accctgagtt cctcggcggc tacttccagg agcagggcgt gattcccaag
660

cgcggcctca agctggcgcg gatggtcggc catatcacct acctgtccga cgacgccatg
720

ggcgccaagt tcggccgtgt actgaagacc gagaagctca actacgacct gcacagcgtc
780

gagttccagg tcgagagtta cctgcgctac cagggcgagg agttctccac ccgcttcgac
840

gccaatacct acctgctgat gaccaaggcg ctggactact tcgaccccg cgcggccac
900

ggcgacgacc tgggtgcgcac cctggagggc gtcgaggcgg acttctgcct gatgtccttc
960

accaccgact ggcgtttctc gccggcccgc tcgcgggaaa tcgtcgacgc cctgatcgcg
1020

gcgaaaaaga acgtcagcta cctggagatc gacgccccgc aaggccacga cgccttcctc
1080

atgccgatcc cccggtacct gcaagccttc agcggttaca tgaaccgcat cagcgtgtga
1140

1140

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 1

<400> 5

ggatccccctc gttgttcacc cagcaacc
28

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 2

<400> 6

ggatccccaaa gtcacaacta cttatgttag
30

<210> 7

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 3

<400> 7

acgcgccagc gcctggaaca tcggcattca atccg
35

<210> 8

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 4

<400> 8

cggattgaat gccgatgttc caggcgctgg cgcgt
35

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 5

<400> 9

gtagataccg atattcggta cccctaccac cag
33

<210> 10

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 6

<400> 10

ctggtggttag gggtagcgaa tatcggtatc tac
33

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 7

<400> 11

tctagatgcg ctgattatct cacc
24

<210> 12

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 8

<400> 12

actggtgggt catggttgca tatgagatca actcctgtaa
40

<210> 13

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 9

<400> 13
 ttacaggagt tgatctcata tgcaaccatg acccaccagt
 40

<210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 10

<400> 14
 tctagacctt gaagttcttg actg
 24

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 11

<400> 15
 tctagaagta gcgttgctgt acac
 24

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 12

<400> 16
 atcaatgggc tcgatgccca tatggcattt ggaggtcctt aag
 43

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 13

<400> 17
 ctttaaggacc tccaaatgcc atatgggcat cgagaccatt gat
 43

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 14

<400> 18
 tctagatgga accgttgcaa ccac
 24

<210> 19
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(421)
 <223> lysC

<400> 19
 Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu

65					70						75				80
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
				85					90					95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
			100					105					110		
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly
		115					120					125			
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
	130					135					140				
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145					150					155					160
Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val
				165					170					175	
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
			180					185					190		
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
		195					200					205			
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
	210					215					220				
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
225					230					235					240
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr
				245					250					255	
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
			260					265					270		
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp
		275					280					285			
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu
	290					295					300				
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg
305					310					315					320
Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr
				325					330					335	
Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala
			340					345					350		
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu

355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 20
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1266)
 <223> lysC

<400> 20
 atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga
 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgctctgc
 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt
 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc
 240
 gtgcgcatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct
 300
 ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg
 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat
 420
 aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg
 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat
 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa
600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgt
660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg
720

attgccggct ctatggagga tttcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc
780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg
840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc
900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc
960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac
1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt
1080

accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc
1140

tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca
1200

ttgcatgagc agttccagct gggcgggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga
1260

cgctaa
1266

<210> 21
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 15

<400> 21
tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg
29

<210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 16

<400> 22
 caccgacatc atcttcacct gcc
 23

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 17

<400> 23
 ggcaggtgaa gatgatgtcg gtg
 23

<210> 24
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 18

<400> 24
 gactctagag ttcacctcag agacgatta
 29

<210> 25
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(421)
 <223> biến thể lysC (T311I)

<400> 25

Met	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	1	5	10	15
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	20	25	30	
Gly	Asn	Asp	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp	35	40	45	
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg	50	55	60	
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	65	70	75	80
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	85	90	95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg	100	105	110	
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	115	120	125	
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	130	135	140	
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	145	150	155	160
Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val	165	170	175	
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys	180	185	190	
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly	195	200	205	
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn	210	215	220	
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu	225	230	235	240
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	245	250	255	
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	260	265	270	
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	275	280	285	

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Ile Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 26
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1266)
 <223> biến thể lysC (T311I)

<400> 26
 atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga
 60

aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc
 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt
 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc
 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttgggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct
 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt
360

gtgcgtagaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat
420

aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg
480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat
540

accgctgacc cgcgcacgtt tcctaattgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa
600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgt
660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg
720

attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc
780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg
840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc
900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgttc cgacggccgc
960

cgcgcatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac
1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtggt
1080

accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc
1140

tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca
1200

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga
1260

cgctaa
1266

<210> 27

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

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176F,L313R

<400> 27
 acgcgccagc gcctggttta tcggcattca atccg
 35

<210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176F,L313R

<400> 28
 cggattgaat gccgataaac caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176S,L313R

<400> 29
 acgcgccagc gcctggtcta tcggcattca atccg
 35

<210> 30
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi ngược cho Q176S,L313R

<400> 30
 cggattgaat gccgatagac caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 31
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176Y,L313R

<400> 31
 acgcgccagc gcctggtata tcggcattca atccg
 35

<210> 32
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176Y,L313R

<400> 32
 cggattgaat gccgatatac caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 33
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176C,L313R

<400> 33
 acgcgccagc gcctggtgca tcggcattca atccg
 35

<210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176C,L313R

<400> 34

cggattgaat gccgatgcac caggcgctgg cgcgt
35

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

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176P,L313R

<400> 35
acgcgccagc gcctggccaa tcggcattca atccg
35

<210> 36
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho Q176P,L313R

<400> 36
cggattgaat gccgattggc caggcgctgg cgcgt
35

<210> 37
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176H,L313R

<400> 37
acgcgccagc gcctggcaca tcggcattca atccg
35

<210> 38
<211> 35
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho Q176H,L313R

<400> 38
 cggattgaat gccgatgtgc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 39
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176L,L313R

<400> 39
 acgcgccagc gcctggctca tcggcattca atccg
 35

<210> 40
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176L,L313R

<400> 40
 cggattgaat gccgatgagc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176I,L313R

<400> 41
 acgcgccagc gcctggatta tcggcattca atccg
 35

<210> 42
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược cho Q176I,L313R

<400> 42
cggattgaat gccgataatc caggcgctgg cgcgt
35

<210> 43
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176T,L313R

<400> 43
acgcgccagc gcctggacta tcggcattca atccg
35

<210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho Q176T,L313R

<400> 44
cggattgaat gccgatagtc caggcgctgg cgcgt
35

<210> 45
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176R,L313R

<400> 45
acgcgccagc gcctggcgca tcggcattca atccg
35

<210> 46
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176R,L313R

<400> 46
 cggattgaat gccgatgcgc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 47
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176K,L313R

<400> 47
 acgcgccagc gcctggaaaa tcggcattca atccg
 35

<210> 48
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176K,L313R

<400> 48
 cggattgaat gccgattttc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 49
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176V,L313R

<400> 49
 acgcgccagc gcctgggtta tcggcattca atccg
 35

<210> 50
 <211> 35

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176V,L313R

 <400> 50
 cggattgaat gccgataacc caggcgctgg cgcgt
 35

 <210> 51
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176A,L313R

 <400> 51
 acgcgccagc gcctgggcaa tcggcattca atccg
 35

 <210> 52
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176A,L313R

 <400> 52
 cggattgaat gccgattgcc caggcgctgg cgcgt
 35

 <210> 53
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176D,L313R

 <400> 53
 acgcgccagc gcctgggaca tcggcattca atccg
 35

<210> 54
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176D,L313R

<400> 54
 cggattgaat gccgatgtcc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 55
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176E,L313R

<400> 55
 acgcgccagc gcctgggaga tcggcattca atccg
 35

<210> 56
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176E,L313R

<400> 56
 cggattgaat gccgatctcc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 57
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176G,L313R

<400> 57
 acgcgccagc gcctggggca tcggcattca atccg
 35

<210> 58
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176G,L313R

<400> 58
 cggattgaat gccgatgcc caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 59
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho Q176W,L313R

<400> 59
 acgcgccagc gcctggtgga tcggcattca atccg
 35

<210> 60
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho Q176W,L313R

<400> 60
 cggattgaat gccgatccac caggcgctgg cgcgt
 35

<210> 61
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metX L313R

<400> 61

Met	Pro	Thr	Leu	Ala	Pro	Ser	Gly	Gln	Leu	Glu	Ile	Gln	Ala	Ile	Gly	1	5	10	15
Asp	Val	Ser	Thr	Glu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile	Thr	Asn	Ala	Glu	Ile	Ala	20	25	30	
Tyr	His	Arg	Trp	Gly	Glu	Tyr	Arg	Val	Asp	Lys	Glu	Gly	Arg	Ser	Asn	35	40	45	
Val	Val	Leu	Ile	Glu	His	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Ser	Asn	Ala	Ala	Asp	50	55	60	
Trp	Trp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Asn	Thr	Asp	Ile	65	70	75	80
Tyr	Cys	Val	Ile	Cys	Thr	Asn	Val	Ile	Gly	Gly	Cys	Asn	Gly	Ser	Thr	85	90	95	
Gly	Pro	Gly	Ser	Met	His	Pro	Asp	Gly	Asn	Phe	Trp	Gly	Asn	Arg	Phe	100	105	110	
Pro	Ala	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Lys	Gln	Phe	Leu	115	120	125	
Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Met	130	135	140	
Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val	145	150	155	160
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Gln	165	170	175	
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His	180	185	190	
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly	195	200	205	
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	210	215	220	
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro	225	230	235	240
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr	245	250	255	
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser	260	265	270	
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp	275	280	285	

Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 62
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metX L313R

<400> 62
 atgccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaagccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactggt
 480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa
540

tccgccccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgccca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 63
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> metX Q176N_L313R

<400> 63
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp

50		55		60															
Trp	Trp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Asn	Thr	Asp	Ile				
65					70					75					80				
Tyr	Cys	Val	Ile	Cys	Thr	Asn	Val	Ile	Gly	Gly	Cys	Asn	Gly	Ser	Thr				
				85					90					95					
Gly	Pro	Gly	Ser	Met	His	Pro	Asp	Gly	Asn	Phe	Trp	Gly	Asn	Arg	Phe				
			100					105					110						
Pro	Ala	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Lys	Gln	Phe	Leu				
		115					120					125							
Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Met				
	130					135					140								
Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val				
145					150					155					160				
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Asn				
				165				170						175					
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His				
			180					185					190						
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly				
		195					200					205							
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu				
	210					215					220								
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro				
225					230					235					240				
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr				
				245				250						255					
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser				
			260					265					270						
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp				
		275					280					285							
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu				
	290					295					300								
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu				
305					310					315					320				
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val				
				325				330						335					
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp				

	340		345		350
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe
		355			
			Ser	Leu	Ile
				360	
			Pro	Asp	Glu
				365	
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu
				375	

<210> 64
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> metX Q176N_L313R

 <400> 64
 atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
 60

 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
 120

 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180

 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240

 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300

 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360

 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcgcatca ccacggctgc cgagtgactt
 420

 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt
 480

 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggaacat cggcattcaa
 540

 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600

 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgccgac gcatcgcca cctcacctac
 660

 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
 720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattgggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 65
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176F,L313R

<400> 65
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110

Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Phe
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 66
 <211> 1134

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Q176F,L313R

<400> 66

atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaac gttccaccgg acctggctcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata ccacggtcgc cgagtgactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt
480

ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggtttat cggcattcaa
540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgccgac gcatcgcca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggt acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc cctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 67

<211> 377

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Q176S,L313R

<400> 67

Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45

Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60

Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110

Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125

Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Ser

165																170								175			
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His												
			180				185						190														
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly												
		195					200					205															
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu												
		210				215						220															
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro												
225				230						235				240													
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr												
				245			250								255												
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser												
		260						265					270														
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp												
		275						280					285														
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu												
		290				295					300																
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu												
305				310					315						320												
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val												
				325			330							335													
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp												
		340						345					350														
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu	Asp	Asn												
		355						360					365														
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile																			
		370				375																					

<210>	68
<211>	1134
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176S, L313R

```
<400>      68
atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60
```

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccgga aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gaggggccg caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggtctat cggcattcaa
540

tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgccca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgctt gccaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggctcct accgcaagcc cgaccagcgc ttcccgctgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccagc acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcaactga atccatcaaa
900

gttcagtc tttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 69
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176Y,L313R

<400> 69
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Tyr
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220

Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
225 230 235 240

Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
245 250 255

Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
260 265 270

Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
275 280 285

Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
290 295 300

Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
305 310 315 320

His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
325 330 335

Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
340 345 350

Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
355 360 365

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
370 375

<210> 70
<211> 1134
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176Y,L313R

<400> 70
atgccacccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacat ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt
480

ggcgcagctg ctggttcttg agtttctgca cgcgccagcg cctggtatat cggcattcaa
540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccttc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 71
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176C,L313R

```

<400>      71
Met  Pro  Thr  Leu  Ala  Pro  Ser  Gly  Gln  Leu  Glu  Ile  Gln  Ala  Ile  Gly
   1                                10                                15

Asp  Val  Ser  Thr  Glu  Ala  Gly  Ala  Ile  Ile  Thr  Asn  Ala  Glu  Ile  Ala
          20                                25                                30

Tyr  His  Arg  Trp  Gly  Glu  Tyr  Arg  Val  Asp  Lys  Glu  Gly  Arg  Ser  Asn
          35                                40                                45

Val  Val  Leu  Ile  Glu  His  Ala  Leu  Thr  Gly  Asp  Ser  Asn  Ala  Ala  Asp
   50                                55                                60

Trp  Trp  Ala  Asp  Leu  Leu  Gly  Pro  Gly  Lys  Ala  Ile  Asn  Thr  Asp  Ile
   65                                70                                75                                80

Tyr  Cys  Val  Ile  Cys  Thr  Asn  Val  Ile  Gly  Gly  Cys  Asn  Gly  Ser  Thr
          85                                90                                95

Gly  Pro  Gly  Ser  Met  His  Pro  Asp  Gly  Asn  Phe  Trp  Gly  Asn  Arg  Phe
          100                                105                                110

Pro  Ala  Thr  Ser  Ile  Arg  Asp  Gln  Val  Asn  Ala  Glu  Lys  Gln  Phe  Leu
          115                                120                                125

Asp  Ala  Leu  Gly  Ile  Thr  Thr  Val  Ala  Ala  Val  Leu  Gly  Gly  Ser  Met
   130                                135                                140

Gly  Gly  Ala  Arg  Thr  Leu  Glu  Trp  Ala  Ala  Met  Tyr  Pro  Glu  Thr  Val
   145                                150                                155                                160

Gly  Ala  Ala  Ala  Val  Leu  Ala  Val  Ser  Ala  Arg  Ala  Ser  Ala  Trp  Cys
          165                                170                                175

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

Trp  His  Glu  Gly  Asn  Tyr  Tyr  Glu  Ser  Gly  Cys  Asn  Pro  Ala  Thr  Gly
          195                                200                                205

Leu  Gly  Ala  Ala  Arg  Arg  Ile  Ala  His  Leu  Thr  Tyr  Arg  Gly  Glu  Leu
   210                                215                                220

Glu  Ile  Asp  Glu  Arg  Phe  Gly  Thr  Lys  Ala  Gln  Lys  Asn  Glu  Asn  Pro
   225                                230                                235                                240

Leu  Gly  Pro  Tyr  Arg  Lys  Pro  Asp  Gln  Arg  Phe  Ala  Val  Glu  Ser  Tyr
          245                                250                                255

Leu  Asp  Tyr  Gln  Ala  Asp  Lys  Leu  Val  Gln  Arg  Phe  Asp  Ala  Gly  Ser
          260                                265                                270

Tyr  Val  Leu  Leu  Thr  Asp  Ala  Leu  Asn  Arg  His  Asp  Ile  Gly  Arg  Asp

```

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

<210> 72
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176C,L313R

<400> 72
 atgccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaagccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactggt
 480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggtgtat cggcattcaa
540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttgcgcgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggc acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 73
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176P,L313R

<400> 73
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45

Val	Val	Leu	Ile	Glu	His	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Ser	Asn	Ala	Ala	Asp
50						55					60				
Trp	Trp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Asn	Thr	Asp	Ile
65					70					75					80
Tyr	Cys	Val	Ile	Cys	Thr	Asn	Val	Ile	Gly	Gly	Cys	Asn	Gly	Ser	Thr
				85					90					95	
Gly	Pro	Gly	Ser	Met	His	Pro	Asp	Gly	Asn	Phe	Trp	Gly	Asn	Arg	Phe
			100					105					110		
Pro	Ala	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Lys	Gln	Phe	Leu
		115					120					125			
Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Met
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val
145					150					155					160
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Pro
				165					170					175	
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His
			180					185					190		
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly
		195					200					205			
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu
	210					215					220				
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro
225					230					235					240
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr
				245					250					255	
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser
			260					265					270		
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp
		275					280					285			
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu
	290					295					300				
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu
305					310					315					320
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val
				325					330					335	

Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350

Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 74

<211> 1134

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Q176P, L313R

<400> 74

atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc
 120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360

gtaaagccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt
 480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggccaat cggcattcaa
 540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600

tccggtgca acccagccac cggactcggc gccgccgac gcatcgcca cctcacctac
 660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattgggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc cctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 75
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176H,L313R

<400> 75
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe

	100					105					110				
Pro	Ala	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Lys	Gln	Phe	Leu
	115						120					125			
Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Met
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val
145					150					155					160
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	His
				165					170					175	
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His
			180					185					190		
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly
		195					200					205			
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu
	210					215					220				
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro
225					230					235					240
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr
				245					250					255	
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser
			260					265					270		
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp
		275					280					285			
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu
	290					295					300				
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu
305					310					315					320
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val
				325					330					335	
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp
			340					345					350		
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu	Asp	Asn
		355					360					365			
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile							
	370					375									

<210> 76
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176H, L313R

<400> 76
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgctga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata ccacggctgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt
 480
 ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcacat cggcattcaa
 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcccc cctcacctac
 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgctt ggacacaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgcctc
 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcaactga atccatcaaa
 900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 77
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176L,L313R

<400> 77
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Leu
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 78
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176L,L313R

<400> 78

atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300

atgcatccag atggaaatct ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc cgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggctcat cggcattcaa
540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgccgac gcatcgcca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgcctc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 79
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176I,L313R

<400> 79
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160
Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Ile
165 170 175
Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
180 185 190
Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
195 200 205
Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu

210					215					220						
Glu 225	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe 230	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln 235	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro 240	
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg 245	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg 250	Phe	Ala	Val	Glu	Ser 255	Tyr	
Leu	Asp	Tyr	Gln 260	Ala	Asp	Lys	Leu	Val 265	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala 270	Gly	Ser	
Tyr	Val	Leu 275	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu 280	Asn	Arg	His	Asp	Ile 285	Gly	Arg	Asp	
Arg	Gly 290	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala 295	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys 300	Val	Pro	Val	Leu	
Val 305	Ala	Gly	Val	Asp	Thr 310	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro 315	Tyr	His	Gln	Gln	Glu 320	
His	Leu	Ser	Arg	Asn 325	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu 330	Ala	Met	Ala	Lys	Ile 335	Val	
Ser	Pro	Val	Gly 340	His	Asp	Ala	Phe	Leu 345	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln 350	Met	Asp	
Arg	Ile	Val 355	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser 360	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp 365	Glu	Asp	Asn	
Pro	Ser 370	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe 375	Tyr	Ile								

<210>	80
<211>	1134
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176I, L313R

```
<400>      80
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
60
```

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcgggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtgggtcca tgggtgggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggattat cggcattcaa
540

tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcgcca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 81
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176T,L313R

```

<400>      81
Met  Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
  1              5              10              15

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
      20              25              30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
      35              40              45

Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
      50              55              60

Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
      65              70              75              80

Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
      85              90              95

Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
      100              105              110

Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
      115              120              125

Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
      130              135              140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
      145              150              155              160

Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Thr
      165              170              175

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

Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
      195              200              205

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
      210              215              220

Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
      225              230              235              240

Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
      245              250              255

Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
      260              265              270

```

Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
275 280 285

Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
290 295 300

Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
305 310 315 320

His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
325 330 335

Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
340 345 350

Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
355 360 365

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
370 375

<210> 82
<211> 1134
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176T,L313R

<400> 82
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataaccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagggggccc caatgtaccc agaaactggt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggactat cggcattcaa
540

tccgccccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcgcca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttccgctgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggc acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 83
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176R,L313R

<400> 83
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn

[illegible]

[illegible]

<210>	84
<211>	1134
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176R, L313R

```
<400>      84
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataaccgc
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
300

atgcatccag atggaaatth ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcgcat cggcattcaa
540

tccgcccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcacgcacca cctcacctac
660
```

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

c̣tcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggc acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 85
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176K,L313R

<400> 85
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95

Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Lys
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 86
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176K, L313R

<400> 86
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt
 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggaaaat cggcattcaa
 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600
 tccggtgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcca cctcacctac
 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcg ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
 780
 gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgaogccctc
 840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcaactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 87
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176V,L313R

<400> 87
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val

145		150		155		160									
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Val
				165					170					175	
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His
			180					185					190		
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly
		195					200					205			
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu
	210					215					220				
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro
225					230					235					240
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr
				245				250						255	
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser
			260					265					270		
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp
		275					280					285			
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu
	290					295					300				
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu
305					310					315					320
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val
				325				330						335	
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp
			340					345					350		
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu	Asp	Asn
		355					360					365			
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile							
		370				375									

<210> 88
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176V,L313R

<400> 88
atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
60
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc
120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatogaac acgccctcac tggagattcc
180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240
tactgcgtga tctgtacca cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300
atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360
gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata ccacggtcgc cgcagtactt
420
ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt
480
ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctgggttat cggcattcaa
540
tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600
tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcccc cctcacctac
660
cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgctt ggacacaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720
ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780
gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840
aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcaactga atccatcaaa
900
gttccagtcc ttgtcgagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 89
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176A,L313R

<400> 89
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160
Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Ala
165 170 175
Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
180 185 190
Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
195 200 205

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 90
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176A,L313R

<400> 90
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcttatc accgctgggg tgaataaccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtag tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
300

atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacatca ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactggt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctgggcaat cggcattcaa
540

tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccagc gcacgcacca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccttc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtag ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcacgga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 91
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Q176D,L313R

<400> 91

Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45

Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60

Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80

Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95

Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110

Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125

Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Asp
 165 170 175

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

Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220

Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240

Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255

Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser

260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 92
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176D,L313R

<400> 92
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataaccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctgggacat cggcattcaa
540

tccgccccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcatcgccca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttccgctgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccttc
840

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggc acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 93
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176E,L313R

<400> 93
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Glu
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320

His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val
				325					330					335	
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp
			340					345					350		
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu	Asp	Asn
		355					360					365			
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile							
	370					375									

<210>	94
<211>	1134
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176E, L313R

```

<400>          94
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60

gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataaccg
120

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
180

aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240

tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300

atgcatccag atggaaatth ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacat ccacggtcgc cgcagtactt
420

ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactgtt
480

ggcgcagctg ctgtttcttg agtttctgca cgcgccagcg cctggggagat cggcattcaa
540

tcgcccacaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600

```

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac
660

cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900

gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggc acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 95
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176G,L313R

<400> 95
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45

Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60

Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr

				85					90					95			
Gly	Pro	Gly	Ser	Met	His	Pro	Asp	Gly	Asn	Phe	Trp	Gly	Asn	Arg	Phe		
			100					105					110				
Pro	Ala	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Glu	Lys	Gln	Phe	Leu		
		115					120					125					
Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Met		
	130					135					140						
Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val		
145					150					155					160		
Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Gly		
				165					170					175			
Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp	His	His		
			180					185					190				
Trp	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly		
		195					200					205					
Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Thr	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu		
	210					215					220						
Glu	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro		
225					230					235					240		
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Ser	Tyr		
				245					250					255			
Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser		
			260					265					270				
Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp		
		275					280					285					
Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Leu		
	290					295					300						
Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Arg	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln	Gln	Glu		
305					310					315					320		
His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys	Ile	Val		
				325					330					335			
Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Met	Asp		
			340					345					350				
Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu	Asp	Asn		
		355					360					365					
Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile									

370

375

<210> 96
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176G,L313R

<400> 96
 atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc
 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc
 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc
 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt
 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt
 480
 ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggggcat cggcattcaa
 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcca cctcacctac
 660
 cgtggcgaa tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcg ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
 840

aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcaactcg atccatcaaa
900

gttcaggtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc cctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134

<210> 97
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Q176W,L313R

<400> 97
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Trp
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Arg Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 98
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Q176W,L313R

<400> 98
atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc
60
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataaccg
120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc
180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt
240
tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc
300
atgcatccag atggaaatct ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag
360
gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcgccatca ccacggtcgc cgcagtactt
420
ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt
480
ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggtggat cggcattcaa
540
tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa
600
tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcatcgccca cctcacctac
660
cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca
720
ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa
780
gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc
840
aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa
900
gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggg acccctacca ccagcaagaa
960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc cctgtcggc
1020

cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc
1080

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa
1134