



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

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



1-0037461

(51)^{2020.01} C07K 14/195; C12P 13/22; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/70; C12P 13/04

(21) 1-2020-01110

(22) 25/07/2019

(86) PCT/KR2019/009291 25/07/2019

(87) WO2020/111436 A1 04/06/2020

(30) 10-2018-0150875 29/11/2018 KR

(45) 27/11/2023 428

(43) 25/10/2021 403

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) Ki Yong CHEONG (KR); Hyeryun YOO (KR); Chang IL SEO (KR); Jaemin LEE (KR); Seung Hyun CHO (KR).

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

(54) BIẾN THỂ PROTEIN THỤ THỂ CAMP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP, vi sinh vật bao gồm biến thể này, và phương pháp sản xuất L-axit amin sử dụng biến thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể protein thụ thể cAMP, vi sinh vật bao gồm biến thể này, và phương pháp sản xuất L-axit amin sử dụng biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CRP (protein thụ thể AMP vòng), còn được gọi là CAP (protein hoạt hóa quá trình dị hóa), là gen điều hòa phiên mã đã biết rõ nhất ở *E. coli*. CRP đặc trưng bởi có cơ chế điều tiết phụ thuộc vào nguồn cacbon, được biểu diễn bởi ‘ức chế quá trình dị hóa’. Hoạt động này được kích hoạt bằng nồng độ nội bào của AMP vòng (sau đây, được gọi là ‘cAMP’). Khi có mặt nguồn cacbon được ưu tiên như glucoza, hoạt tính của adenylat xyclaza được ức chế để làm giảm cAMP, và tín hiệu này ức chế biểu hiện của gen dị hóa. Trong trường hợp ngược lại, hoạt tính của adenylat xyclaza tăng, và kết quả là, gen ức chế bị ức chế và biểu hiện của gen dị hóa được bắt đầu. Ngoài ra, CRP đã biết là đóng các vai trò khác nhau như tải nạp tín hiệu nội bào qua cAMP, điều hòa thẩm thấu, đáp ứng với tình huống khẩn cấp của tế bào, tạo ra màng sinh học, cố định nitơ, vận chuyển sắt, v.v.

Theo báo cáo, 418 gen *E. coli* đã biết là được điều hòa bằng CRP, nhưng cơ chế tương ứng chưa được bộc lộ rõ ràng (J Biol Eng. (2009) 24;3:13). Với phạm vi khả năng điều hòa rộng như vậy, CRP có tiềm năng thể hiện nhiều kiểu hình bằng cách đột biến. Vì ưu điểm của nó, CRP đã được nghiên cứu làm đích phù hợp để thiết kế lại chủng ở mức độ mạng tế bào, có thể được áp dụng cho các môi trường khác nhau. Gần đây, các thử nghiệm khác nhau đã được thực hiện, như phương pháp thay đổi biểu hiện của gen cần được điều hòa bằng cách thay đổi mức độ liên kết ADN bằng sự biến đổi axit amin

của CRP được chọn bằng tin sinh học (Nucleic Acids Research, (2009) 37: 2493-2503), phương pháp chọn *E. coli* kháng nhiệt, thẩm thấu, và nhiệt độ thấp sử dụng yếu tố phiên mã nhân tạo (ATF) được tạo ra bằng cách dung hợp vị trí liên kết ADN dạng ngón tay liên kết kẽm và CRP ((Nucleic Acids Research, (2008) 36: e102), v.v. Nói cách khác, vì các thay đổi biểu hiện CRP tăng cường khoảng thay đổi rộng về biểu hiện của gen xuôi dòng, CRP có thể là công cụ tốt để tạo ra vi sinh vật có đặc điểm hữu ích.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát triển biến thể protein mới bao gồm một hoặc nhiều phân tử thể axit amin ở trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và họ đã phát hiện rằng biến thể protein này có thể tăng năng suất L-axit amin, nhờ đó tạo ra sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể protein thụ thể cAMP.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vector bao gồm polynucleotit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật của giống *Escherichia* bao gồm biến thể.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật của giống *Escherichia* ở môi trường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sử dụng biến thể hoặc vi sinh vật của giống *Escherichia* bao gồm biến thể trong việc sản xuất L-axit amin.

Các hiệu quả có lợi

Khi vi sinh vật của giống *Escherichia* sản xuất L-axit amin, vi sinh vật này bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP theo sáng chế, được nuôi cấy, nó có thể sản xuất L-axit amin với lượng cao. Theo đó, theo khía cạnh công nghiệp, việc giảm chi phí sản xuất, cùng với tiện lợi cho sản xuất, có thể kỳ vọng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết như sau. Trong khi đó, mỗi mô tả và phương án được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được áp dụng với các mô tả và phương án khác. Nghĩa là, tất cả các hỗn hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong bản mô tả này nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể được mô tả dưới đây.

Để đạt được mục đích trên, một khía cạnh theo sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều phần tử thể axit amin ở trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Cụ thể là, sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều phần tử thể axit amin ở trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, trong đó phần tử thể axit amin bao gồm phần tử thể của lysin cho axit amin ở vị trí 33 từ đầu cùng N. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm phần tử thể của lysin cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “protein thụ thể cAMP (CRP)” là gen điều hòa phiên mã đã biết rõ nhất ở *E. coli*, và CRP còn được gọi là ‘gen điều hòa kép’, vì chính CRP có cả hai chức năng của chất hoạt hóa và chất ức chế. CRP thường liên kết với trình tự ADN đối xứng có 22 gốc ngược dòng của gen cấu trúc để cảm ứng sự uốn cong ADN, và CRP hoạt động như chất hoạt hóa bằng cách cho phép vị trí hoạt động thứ nhất ở đầu cùng C và vị trí hoạt động thứ hai ở đầu cùng N để tương tác với ARN polymeaza chịu trách nhiệm về phiên mã, và nó hoạt động dưới dạng chất ức chế

bằng cách chiếm trước vị trí để ngăn chặn protein hoạt tính liên kết với vị trí hoạt động hoặc bằng cách liên kết với protein hoạt tính để chuyển hóa cấu trúc này thành cấu trúc mà không liên kết với vị trí hoạt động. Protein thụ thể cAMP là protein thụ thể cAMP được mã hóa bằng gen *crp*.

“Protein thụ thể cAMP (protein thụ thể AMP vòng, CRP)” theo sáng chế có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với protein hoạt hóa quá trình dị hóa (CAP), protein CRP, protein CAP, v.v.

Theo sáng chế, trình tự của CRP có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết GenBank ở NCBI. Ví dụ, CRP có thể là CRP có nguồn gốc từ giống *Escherichia* (*Escherichia* sp.), và cụ thể hơn là, polypeptit/protein bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, trình tự có hoạt tính giống như trình tự axit amin trên có thể được bao gồm mà không bị giới hạn. Ngoài ra, trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất 80% hoặc nhiều hơn ở đó có thể được bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể là, axit amin có thể bao gồm axit amin SEQ ID NO: 1 và axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn với SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, một phần của nó được xóa, cải biến, thế, hoặc bổ sung, có thể trong phạm vi của sáng chế, miễn là trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trên và có hiệu quả tương ứng với protein trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến thể” dùng để chỉ polypeptit, trong đó một hoặc nhiều axit amin khác với trình tự được nêu ở phần tử thể và/hoặc cải biến bảo thủ, nhưng nó giữ được chức năng hoặc đặc tính của protein. Polypeptit biến thể khác với trình tự được xác định bởi phần tử thể, xóa, hoặc bổ sung một vài axit amin. Biến thể này thường có thể được xác định bằng cách cải biến một trong các trình tự polypeptit trên và đánh giá đặc tính của polypeptit cải biến này. Nói

cách khác, khả năng của biến thể có thể tăng, không thay đổi, hoặc giảm, khi so với khả năng của protein tự nhiên. Biến thể này thường có thể được xác định bằng cách cải biến một trong các trình tự polypeptit trên và đánh giá khả năng phản ứng của polypeptit cải biến này. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm trình tự trong đó một hoặc nhiều phần, như trình tự dẫn đầu đầu cùng N hoặc vùng xuyên màng, đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm biến thể trong đó một phần đã được loại bỏ khỏi đầu cùng N và/hoặc C của protein trưởng thành.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể bảo thủ” có nghĩa là việc thế của một axit amin bằng axit amin khác mà có đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự. Biến thể có thể có, ví dụ, một hoặc nhiều phần tử thể bảo thủ trong khi duy trì một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Phần tử thể axit amin này thường có thể được tạo trên cơ sở tương tự về độ phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của gốc. Ví dụ, axit amin (bazo) tích điện dương bao gồm arginin, lysin, và histidin; axit amin (axit) tích điện âm 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, prolin, glyxin, và tryptophan.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm xóa hoặc bổ sung axit amin mà có ảnh hưởng tối thiểu lên đặc tính và cấu trúc thứ cấp của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được tiếp hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu cùng N của protein, trực tiếp đồng dịch mã hoặc sau dịch mã vận chuyển protein. Polypeptit cũng có thể được tiếp hợp với trình tự khác hoặc cầu nối để nhận biết, tinh chế, hoặc tổng hợp polypeptit này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” là biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều phần tử thể axit amin ở trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính protein thụ thể cAMP, trong đó phần tử thể axit

amin bao gồm phần tử thể của axit amin khác cho axit amin ở vị trí 33 từ đầu cùng N. Cụ thể là, biến thể có thể bao gồm biến thể protein, trong đó axit amin khác được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính protein thụ thể AMP. Ví dụ, biến thể protein có thể bao gồm biến thể protein trong đó sự biến đổi xảy ra ở vị trí 33 từ đầu cùng N của trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Cụ thể hơn là, biến thể protein có thể là protein trong đó axit amin khác được thế cho axit amin ở vị trí 33 của trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. ‘Axit amin khác’ không bị giới hạn, miễn nó là axit amin khác với L-glutamin mà là axit amin ở vị trí 33. Cụ thể là, biến thể có thể là protein trong đó axit amin bazơ được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Axit amin bazơ có thể là một trong số L-lysin, L-arginin, và L-histidin. Cụ thể hơn là, biến thể có thể là protein trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, biến thể có nghĩa là biến thể có sự biến đổi của axit amin ở vị trí 33 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được mô tả trên đây và/hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn với SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với protein CRP biến thể, biến thể CRP, protein thụ thể cAMP biến thể, protein CAP biến thể, biến thể CAP, protein hoạt hóa quá trình dị hóa biến thể, biến thể protein hoạt hóa quá trình dị hóa, v.v.

Với mục đích theo sáng chế, vi sinh vật bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP được đặc trưng bởi có năng suất L-axit amin cao, so với vi sinh vật không bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP. Biến thể CRP được đặc trưng bởi có hoạt tính điều hòa gen để tăng năng suất L-axit amin, so với protein thụ thể cAMP kiểu dại tự nhiên hoặc không có biến thể. Điều này có ý nghĩa là năng suất L-axit amin có thể được làm tăng bởi vì

sinh vật được đưa vào biến thể CRP theo sáng chế. Cụ thể là, L-axit amin có thể là L-threonin hoặc L-tryptophan. Tuy nhiên, L-axit amin bất kỳ có thể được bao gồm mà không bị giới hạn, miễn là nó có thể được tạo ra bằng cách đưa vào hoặc bao gồm protein thụ thể cAMP biến thể.

Biến thể protein thụ thể cAMP có thể là, ví dụ, biến thể bao gồm trình tự axit amin trong đó axit amin khác được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, biến thể bao gồm SEQ ID NO: 3. Biến thể trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1 có thể bao gồm SEQ ID NO: 3, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, biến thể CRP có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể là, biến thể CRP theo sáng chế có thể bao gồm protein có SEQ ID NO: 3 và protein có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn ở đó. Ngoài ra, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, một phần bị xóa, cải biến, thế, hoặc bổ sung, ngoài trình tự axit amin ở vị trí 33, có thể trong phạm vi của sáng chế, miễn là trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trên đây và có hiệu quả tương ứng với protein trên đây.

Nói cách khác, mặc dù 'protein có trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể' được mô tả trong bản mô tả này, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, một phần bị xóa, cải biến, thế, thế bảo toàn, hoặc bổ sung, có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là nó có mức tương đồng hoạt tính hoặc tương ứng với trình tự của protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn là protein có mức tương đồng hoạt tính hoặc tương ứng với trình tự của protein biến thể, việc bổ sung trình tự mà không biến đổi chức năng của protein trước và sau trình tự axit amin, đột biến tự nhiên, đột biến câm hoặc phần tử thế bảo thủ của chúng không bị loại trừ. Rõ ràng là mặc dù

protein có bổ sung hoặc đột biến trình tự này, nó nằm trong phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘độ tương đồng’ hoặc ‘độ đồng nhất’ có nghĩa là mức độ thích hợp giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã nêu, và có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm.

Các thuật ngữ ‘độ tương đồng’ và ‘độ đồng nhất’ có thể thường được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit được bảo tồn có thể được xác định bằng thuật toán sắp xếp thẳng hàng chuẩn, và có thể được sử dụng với hình phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng. Về cơ bản, trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai trong các điều kiện vừa phải hoặc rất nghiêm ngặt sao cho tổng chiều dài của trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc lớn hơn của tổng chiều dài có thể lai. Ngoài ra, dự tính là polynucleotit mà chứa codon thoái hóa ở chỗ codon trong quá trình lai.

Hai polynucleotit hoặc trình tự polypeptit bất kỳ có độ tương đồng, tương tự, hoặc độ đồng nhất hay không có thể được xác định sử dụng thuật toán máy tính đã biết như chương trình “FASTA”, sử dụng, ví dụ, thông số mặc định như ở Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85] : 2444, hoặc được xác định sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc mới hơn) (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, BLAST của Trung tâm quốc gia về cơ sở dữ liệu thông

tin công nghệ sinh học, hoặc ClustalW có thể được sử dụng để xác định độ tương đồng, tương tự, hoặc độ đồng nhất.

Độ tương đồng, tương tự, hoặc độ đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP như Needleman et al. (1970), *J Mol Biol.* 48: 443, như được bộc lộ ở Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Một cách ngắn gọn, chương trình GAP định nghĩa sự tương tự là số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là các nucleotit hoặc axit amin), các ký hiệu này tương tự nhau, chia cho tổng số các ký hiệu trong đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh một bậc (chứa giá trị 1 cho danh tính và 0 cho không nhận dạng) và ma trận so sánh có trọng số của Gribskov et al (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, như được tiết lộ trong Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4) ma trận thay thế); (2) hình phạt 3,0 cho mỗi khoảng cách và hình phạt thêm 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng cách (hoặc hình phạt mở khoảng cách là 10, hình phạt mở rộng khoảng cách là 0,5); và (3) không bị phạt cho những khoảng trống cuối trận. Do đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” thể hiện mức độ liên quan giữa các trình tự.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể CRP hoặc vector bao gồm polynucleotit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polynucleotit” dùng để chỉ sợi ADN hoặc ARN có chiều dài định trước hoặc lớn hơn, là polyme chuỗi dài của nucleotit được tạo ra bằng cách liên kết các monome nucleotit thông qua liên kết cộng hóa trị. Cụ thể hơn, polynucleotit đề cập đến mảnh polynucleotit mã hóa protein biến thể.

Polynucleotit mã hóa biến thể CRP theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit nào mà không có giới hạn, miễn là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein thụ thể cAMP theo sáng chế. Polynucleotit mã hóa biến thể CRP có thể bao gồm bất kỳ trình tự nào mà không có giới hạn, miễn là nó là trình tự mã hóa protein biến thể trong đó axit amin khác được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Cụ thể, polynucleotit có thể là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Ví dụ, polynucleotit mã hóa biến thể CRP theo sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3, nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, polynucleotit có thể bao gồm trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 4, nhưng không giới hạn ở đó. Trong polynucleotit, các biến đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa với điều kiện là chúng không làm thay đổi trình tự axit amin của protein, do sự thoái hóa codon hoặc do các codon được sinh vật ưa thích trong đó protein được biểu hiện. Do đó, rõ ràng là do sự thoái hóa codon, polynucleotit có thể được dịch mã thành polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 hoặc polypeptit có tương đồng hoặc đồng nhất với chúng cũng có thể được bao gồm.

Ngoài ra, đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự nucleotit đã biết, ví dụ, trình tự lai với trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa biến thể CRP trong đó axit amin khác được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 cũng có thể được bao gồm mà không có giới hạn.

Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện cho phép phép lai đặc biệt giữa các polynucleotit. Các điều kiện này được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al., supra). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm, ví dụ, các điều kiện mà các gen có tính tương đồng hoặc tính đồng nhất cao, 80% trở lên,

85% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 97%. hoặc cao hơn, cụ thể là 99% hoặc đặc điểm nhận dạng tương đồng hoặc cao hơn được lai với nhau và các gen có mức độ tương đồng hoặc nhận dạng thấp hơn mức tương đồng hoặc nhận dạng ở trên không được lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa thông thường của phép lai Southern, tức là rửa một lần, cụ thể, hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Mặc dù sự không phù hợp giữa các nucleotit có thể xảy ra do quá trình lai hóa nghiêm ngặt, nhưng đòi hỏi hai axit nucleic phải có trình tự bổ sung. Thuật ngữ "bổ sung" được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các gốc nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin bổ sung cho thymin và xytosin bổ sung cho guanin. Do đó, sáng chế có thể không chỉ bao gồm các trình tự axit nucleic về cơ bản giống nhau mà còn bao gồm các đoạn axit nucleic riêng biệt bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit có tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm lai ở giá trị T_m là 55°C và các điều kiện được mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C, nhưng không giới hạn ở đó, và có thể được kiểm soát thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy theo mục đích.

Tính nghiêm ngặt thích hợp để lai các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các thay đổi đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vector" dùng để chỉ cấu trúc ADN mà bao gồm trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein biến thể đích liên kết linh hoạt với trình tự điều hòa thích hợp để cho phép biểu hiện protein biến thể đích trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm trình tự khởi đầu có khả

năng bắt đầu phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa phiên mã đó, trình tự mã hóa miền liên kết ribosom mRNA thích hợp và trình tự quy định kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vectơ được biến đổi thành tế bào chủ thích hợp, nó có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen của vật chủ và có thể được tích hợp vào chính bộ gen.

Vectơ được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó có thể tái tạo trong tế bào chủ và có thể sử dụng bất kỳ vectơ nào đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về các vectơ thường được sử dụng có thể bao gồm plasmit tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virut và thực khuẩn. Ví dụ: pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng làm vectơ phage hoặc vectơ cosmit. Làm vectơ plasmit, loại pBR, loại pUC, loại pBluescriptII, loại pGEM, loại pTZ, loại pCL và loại pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể sử dụng vectơ pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v..

Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein biến thể đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit đột biến sử dụng vectơ để chèn nhiễm sắc thể nội bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, nhưng không giới hạn ở đó. Đoạn đánh dấu lựa chọn để xác nhận sự chèn nhiễm sắc thể có thể được thêm vào. Đoạn đánh dấu lựa chọn là chọn các tế bào được biến đổi với vectơ, nghĩa là, để xác nhận việc chèn polynucleotit mong muốn và đoạn đánh dấu lựa chọn có thể bao gồm các đoạn đánh dấu cung cấp các kiểu hình có thể lựa chọn, như kháng thuốc, hỗ trợ, kháng các tác nhân gây độc tế bào hoặc biểu hiện của các protein biến đổi bề mặt. Vì chỉ các tế bào biểu hiện đoạn lựa chọn mới có thể sống sót hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng tác nhân chọn lọc, các tế bào đã biến nạp mới có thể được chọn lọc. Là khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất vi sinh vật sản xuất L-axit

amin, vi sinh vật bao gồm cả protein biến thể hoặc polynucleotit mã hóa protein biến thể. Cụ thể, vi sinh vật bao gồm protein biến thể và/hoặc polynucleotide mã hóa protein biến thể có thể là vi sinh vật được tạo ra bằng cách biến nạp với vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein biến thể, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là sự đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ theo cách mà protein được mã hóa bởi 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 tích hợp và đặt trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, hoặc nó có thể tồn tại ngoài nhiễm sắc thể, hoặc không phân biệt chúng. Hơn nữa, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới bất kỳ hình thức nào, miễn là nó có thể được đưa vào tế bào chủ và biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho biểu hiện tự trị của nó. Thông thường, catxet biểu hiện có thể bao gồm đoạn khởi đầu được liên kết linh hoạt với polynucleotit, các tín hiệu kết thúc phiên mã, các vị trí liên kết ribosom và các tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ và liên kết linh hoạt với các trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết linh hoạt” có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự polynucleotit mã hóa protein biến thể mong muốn theo sáng chế và trình tự đoạn khởi đầu mà khởi đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã của trình tự polynucleotit.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật của giống *Escherichia* (*Escherichia* sp.) bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật bao gồm biến thể CRP” có thể dùng để chỉ vi sinh vật tái tổ hợp để biểu hiện biến thể CRP theo sáng chế. Ví dụ, vi sinh vật dùng để chỉ tế bào chủ hoặc vi sinh vật mà có thể biểu hiện biến thể bằng cách bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể CRP hoặc bằng cách biến đổi với vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể CRP. Đối với các đối tượng theo sáng chế, vi sinh vật là vi sinh vật biểu hiện biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và vi sinh vật đó có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể protein có hoạt tính protein thụ thể cAMP, trong đó sự thay thế axit amin là sự thay thế lysin cho axit amin ở vị trí 33 từ đầu cuối N, nhưng không giới hạn ở đó.

Vi sinh vật bao gồm cả biến thể CRP có thể là bất kỳ vi sinh vật nào, miễn là nó bao gồm biến thể CRP để biểu hiện axit amin L, ví dụ, L-threonin hoặc L-tryptophan, nhưng không giới hạn ở đó. Ví dụ, vi sinh vật bao gồm cả biến thể CRP có thể là vi sinh vật tái tổ hợp có năng suất axit amin L tăng lên, được tạo ra bằng cách biểu hiện biến thể CRP trong vi sinh vật kiểu hoang dã tự nhiên hoặc trong vi sinh vật sản xuất L-axit amin. Vi sinh vật tái tổ hợp có năng suất L-axit amin tăng có thể là vi sinh vật có năng suất L-axit amin tăng lên, so với vi sinh vật kiểu đại tự nhiên hoặc vi sinh vật không biến đổi, trong đó L-axit amin có thể là L-threonin hoặc L-tryptophan, nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất L-axit amin” bao gồm vi sinh vật kiểu đại hoặc vi sinh vật trong đó cải biến di truyền tự nhiên hoặc nhân tạo xảy ra, và nó có thể là vi sinh vật có cơ chế suy yếu hoặc tăng cường cụ thể do chèn gen ngoại lai hoặc do tăng cường hoặc bất hoạt hoạt động của gen nội sinh, trong đó biến thể di truyền xảy ra hoặc hoạt động được tăng cường để tạo ra L-axit amin mong muốn. Đối với các đối tượng theo sáng chế, vi sinh vật sản xuất L-axit amin có

thể bao gồm protein biến thể để tăng năng suất của L-axit amin mong muốn. Cụ thể, vi sinh vật sản xuất L-axit amin hoặc vi sinh vật có năng suất L-axit amin theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó một phần của gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-axit amin được tăng cường hoặc làm suy yếu, hoặc một phần của các gen liên quan đến con đường phân giải L-axit amin được tăng cường hoặc suy yếu.

“Vi sinh vật không biến đổi” đề cập đến chủng tự nhiên như nó vốn có, hoặc vi sinh vật không có biến thể CRP hoặc vi sinh vật không được biến đổi với vector bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể CRP. “Vi sinh vật” có thể bao gồm bất kỳ một trong số các vi sinh vật nhân sơ và vi sinh vật nhân thực, miễn là nó có thể tạo ra L-axit amin. Ví dụ, vi sinh vật có thể bao gồm vi sinh vật thuộc giống *Escherichia*, giống *Erwinia*, giống *Serratia*, giống *Providencia*, giống *Corynebacterium* và giống *Brevibacterium*. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc giống *Escherichia*, và cụ thể hơn là *E. coli*, nhưng không giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật của giống *Escherichia* trong môi trường, vi sinh vật sản xuất L-axit amin và bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP.

Thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” và “L-axit amin” giống như được mô tả ở trên.

Theo phương pháp này, nuôi cấy vi sinh vật có thể, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, được thực hiện bằng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ cho ăn, v.v..đã biết. Về vấn đề này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH tối ưu (ví dụ, độ pH từ 5 đến 9, cụ thể là độ pH từ 6 đến 8, và cụ thể nhất là độ pH 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc amoniac) hoặc hợp chất có tính axit (ví dụ, axit photphoric hoặc axit sulfuric). Ngoài ra, các điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách đưa oxy hoặc

hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy tế bào. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở 20°C đến 45°C, và cụ thể là ở 25°C đến 40°C. Quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, nhưng không giới hạn ở đó. L-axit amin được tạo ra bởi quá trình nuôi cấy trên có thể được bài tiết ra môi trường nuôi cấy hoặc có thể vẫn còn bên trong tế bào.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy được sử dụng có thể bao gồm, như nguồn cacbon, đường 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 hạt hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic) riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng không giới hạn ở đó. Là nguồn nitơ, các hợp chất hữu cơ có chứa nitơ (ví dụ: peptone, chiết xuất nấm men, nước luộc thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và urê) hoặc các hợp chất vô cơ (ví dụ: amoni sulfat, amoni clorua, amoni photphat, amoni cacbonat và amoni nitrat) có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng không giới hạn ở đó. Là nguồn phot pho, kali hydro photphat, kali dihydro photphat, và các muối natri tương ứng của chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng không giới hạn ở đó. Hơn nữa, môi trường có thể bao gồm các chất kích thích tăng trưởng thiết yếu bao gồm các muối kim loại khác (ví dụ, magie sunfat hoặc sắt sunfat), axit amin và vitamin.

Phương pháp có thể còn bao gồm thu gom L-axit amin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

Phương pháp thu gom L-axit amin được tạo ra ở quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể thu gom L-axit amin mong muốn từ canh nuôi cấy sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, có thể sử dụng ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., và L-axit amin mong muốn có thể

được thu thập từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này.

Hơn nữa, việc thu thập có thể bao gồm quá trình tinh chế, và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Do đó, L-axit amin cần thu thập có thể là dạng tinh khiết hoặc môi trường lên men của vi sinh vật bao gồm L-axit amin (Đưa vào to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng biến thể protein thụ thể cAMP trong sản xuất L-axit amin, biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Escherichia* để sản xuất L-axit amin, vi sinh vật thuộc giống *Escherichia* bao gồm cả biến thể protein thụ thể cAMP.

Thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” và “L-axit amin” giống như được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không được dự định sẽ bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1. Tạo ra vectơ tái tổ hợp pCC1BAC-crp

1-1. Tạo ra mảnh gen *crp*

Để thu được khoảng 0,96 kb mảnh ADN của SEQ ID NO: 5 bao gồm gen *crp* và vùng điều hòa biểu hiện, ADN bộ gen (gADN) của *E. coli* W3110 kiểu đại được chiết xuất bằng cách sử dụng hệ thống Genomic-tip của Qiagen (công ty) và PCR (phản ứng

chuỗi polymeraza) được thực hiện bằng cách sử dụng gADN làm khuôn mẫu và bộ trộn PCR HL (sản xuất bởi BIONEER Co., áp dụng tương tự sau đây). PCR để khuếch đại mảnh gen *crp* được thực hiện bằng cách sử dụng mỗi SEQ ID NO: 6 và 7 trong 27 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 56°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút.

Sản phẩm PCR được tiêu hóa với *EcoR* I, và điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được mảnh ADN của 0,96 Kb (sau đây, được gọi là “mảnh *crp*”).

Bảng 1

SEQ ID NO.	Tên đoạn môi	Trình tự (5'-3')
6	<i>crp</i> -F	CACGAATTCTTTGCTACTCCACTGCGTCA
7	<i>crp</i> -R	ACACGAATTCTTAACGAGTGCCGTAAACG

1-2. Tạo ra vector tái tổ hợp pCC1BAC-*crp*

Vector pCC1BAC điều khiển sao chép (EPICENTRE, Mỹ) được xử lý bằng *EcoR* I, và điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được sản phẩm, sau đó được nối với mảnh *crp* thu được trong ví dụ 1-1, do đó tạo ra pCC1BAC-*crp* plasmit.

Ví dụ 2. Tạo ra thư viện biến thể vector tái tổ hợp pCC1BAC-*crp*

2-1. Tạo ra mảnh *crp* đột biến bằng PCR có lỗi

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của vi khuẩn *E. coli* W3110 kiểu dại làm khuôn mẫu và kit gây đột biến ngẫu nhiên PCR đa dạng (danh mục #: K1830-1, Bảng III, các phản ứng gây đột biến 4) của clonotech. Cụ thể, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi SEQ ID NO: 6 và 7 như được sử dụng trong ví dụ 1-1 trong 27 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây và kéo dài ở 68°C trong 1

phút.

Sản phẩm PCR được tiêu hóa bằng EcoR I, và điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được mảnh *crp* đột biến 0,96 Kb (sau đây gọi là “mảnh *crp^m”*).

2-2. Tạo ra thư viện biến thể vector tái tổ hợp pCC1BAC-*crp*

Vector pCC1BAC được xử lý bằng enzym giới hạn EcoR I, và sau đó được xử lý bằng phosphatase kiềm (NEB). Vector đã tạo ra được nối với mảnh *crp^m* thu được trong ví dụ 2-1, và sản phẩm nối được biến đổi thành TransforMax EPI300 Electrocompetent *E. coli* (EPICENTRE, Mỹ) bằng phương pháp điện di. Chúng đã biến nạp được nuôi cấy trên môi trường rắn LB (15 ug/ml) chứa cloramphenicol để chọn khuẩn lạc. Do đó, các khuẩn lạc thu được đã được thu gom và được tạo ra plasmit, do đó tạo ra thư viện pCC1BAC-*crp^m*.

Ví dụ 3. Đưa thư viện biến thể *crp* vào vết nhuộm sản xuất threonin và chọn chủng cải thiện tăng trưởng

3-1. Đưa thư viện pCC1BAC-*crp^m* vào vết nhuộm sản xuất threonin

Thư viện pCC1BAC-*crp^m* thu được trong ví dụ 2 được biến nạp thành các tế bào khả biến điện của KCCM10541, là vi sinh vật sản xuất threonin bằng cách kết hợp điện. *E. coli* KCCM10541 (Patent Hàn Quốc số 10-0576342) được sử dụng trong ví dụ này là *E. coli* được tạo ra bằng cách bất hoạt gen *galR* trong *E. coli* sản xuất L-threonin KFCC10718 (Patent Hàn Quốc số 10-0058286).

Là nhóm đối chứng của vi sinh vật được đưa thư viện pCC1BAC-*crp^m* vào, pCC1BAC-*crp* được biến nạp thành KCCM10541 theo cách tương tự như ở trên để tạo ra KCCM10541/pCC1BAC-*crp*(WT).

3-2. So sánh tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật tái tổ hợp

Môi trường tối thiểu M9 chứa glucoza 1% và 0,2 g/L chiết xuất nấm men được phân phối trong vi tấm lỗ sâu, và sau đó chất biến nạp và chủng đối chứng được tạo ra trong ví dụ 3-1 được gieo mầm tương ứng vào đó. Các chủng được nuôi cấy sử dụng thiết bị lắc nhiệt độ không đổi kích thước nhỏ (TAITEC, Nhật Bản) trong điều kiện 37°C và 200 vòng/phút bằng phương pháp HTS (sàng lọc thông lượng cao) trong 20 giờ, và các chủng cải thiện tăng trưởng đã được chọn. Trong số đó, một loại chủng cuối cùng được chọn (bảng 2).

Chủng KCCM10541 được đưa vào có gen *crp* kiểu đại thể hiện giá trị OD tăng nhẹ do đưa thêm *crp*, trong khi biến nạp cải thiện tăng trưởng thể hiện giá trị OD cao sau thời gian nuôi cấy giống nhau, so với chủng được đưa vào *crp* kiểu đại. Hơn nữa, biến thể *crp* được chọn được tạo ra nhỏ plasmit, sau đó là phân tích trình tự. Kết quả được tóm tắt trong bảng 2.

Bảng 2

Thông tin về chất biến nạp cải thiện tăng trưởng sau khi đưa thư viện *crp^m* vào chủng sản xuất threonin

Chủng	OD600	Biến thể
KCCM10541/pCC1BAC	2,3	-
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	2,8	-
KCCM10541/pCC1BAC/ <i>crp</i> TM3	3,9	Q33K

3-3. So sánh hiệu giá threonin của vi sinh vật tái tổ hợp

Để đo hiệu giá threonin của vi sinh vật tái tổ hợp được chọn trong ví dụ 3-2, vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường chuẩn độ threonin được tạo ra như

trong thành phần của bảng 3 sau đây để kiểm tra sự cải thiện của năng suất L-threonin.

Bảng 3

Hợp phần của môi trường chuẩn độ threonin

Hợp phần	Nồng độ (với mỗi lit)
Glucosa	70 g
K ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
Chiết xuất nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Cụ thể là, mỗi một vòng platin của *E. coli* KCCM10541/pCC1BAC-*crp*(*WT*) và *E. coli* KCCM10541/pCC1BAC-*crpTM3* được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 33°C, được cấy lần lượt vào 25 mL môi trường chuẩn độ của bảng 3, sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 33°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ để so sánh tốc độ tiêu thụ đường và nồng độ threonin.

Kết quả là, như được mô tả trong bảng 4 sau đây, chủng KCCM10541/pCC1BAC-*crp* (*WT*) là nhóm đối chứng thể hiện mức tiêu thụ đường là 26,1 g/L trong 24 giờ, trong khi chủng đột biến được đưa vào *crpTM3* thể hiện cải thiện

khoảng 21% và 16% tỷ lệ tiêu thụ đường, so với chủng mẹ và chủng được đưa vào *crp* kiểu dại, tương ứng.

Hơn nữa, khi được nuôi cấy trong 48 giờ, chủng được đưa vào *crp* kiểu dại thể hiện sản xuất L-threonin 29,0 g/L, trong khi sản xuất L-threonin của chủng đột biến thu được ở trên đã tăng lên đến 32,5 g/L mặc dù tốc độ nuôi cấy được tăng lên, thể hiện cải thiện khoảng 13% và 12% về nồng độ, so với chủng mẹ và chủng được đưa vào *crp* kiểu dại, tương ứng.

Vì việc đưa vào biến thể *crp* đã làm tăng năng suất và tiêu thụ đường của chủng, nó có vẻ là đặc điểm biến thể tốt, có thể góp phần rất lớn vào việc cải thiện hiệu quả sản xuất trong quá trình lên men.

Bảng 4

So sánh hiệu giá của chủng threonin bao gồm biến thể *crp*

Chủng	Sử dụng đường (g/L)*	Threonin (g/L)**
KCCM10541/pCC1BAC	25,0	28,8
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	26,1	29,0
KCCM10541/pCC1BAC/ <i>crp</i> TM3	30,2	32,5

* giá trị được đo 24 giờ

** giá trị được đo 48 giờ

Ví dụ 4. Đưa biến thể pCC1BAC-*crp*TM3 vào chủng sản xuất tryptophan

4-1. Đưa vào pCC1BAC-*crp*TM3 vào chủng sàng lọc

pCC1BAC-*crp*TM3 thu được ở ví dụ 3 được biến nạp thành các tế bào khả biến

điện của chủng sản xuất tryptophan KCCM11166P bằng cách kết hợp điện. KCCM11166P được sử dụng trong ví dụ này là *E. coli* sản xuất L-tryptophan, trong đó gen *tehB* được xóa và hoạt tính NAD kinaza được tăng cường (patent Hàn Quốc số 10-1261147).

Là nhóm đối chứng của vi sinh vật được đưa vào pCC1BAC-*crp*^{TM3}, pCC1BAC-*crp* (WT) được biến nạp thành KCCM11166P theo cách tương tự như ở trên để tạo ra KCCM11166P/pCC1BAC-*crp* (WT).

4-2. So sánh tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật tái tổ hợp

Môi trường tối thiểu M9 chứa glucoza 1% và 0,2 g/L dịch chiết nấm men được phân phối trong vi tấm lỗ sâu, sau đó chất biến nạp và chủng đối chứng được tạo ra như trong ví dụ 4-1 lần lượt được gieo mầm vào đó. Các chủng được nuôi cấy bằng thiết bị lắc ủ nhiệt độ không đổi kích thước nhỏ (TAITEC, Nhật Bản) trong điều kiện 37°C và 200 vòng/phút bằng phương pháp HTS (sàng lọc thông lượng cao) trong 16 giờ để xác nhận sự cải thiện tăng trưởng của chất biến đổi KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*^{TM3} (bảng 5).

Chủng KCCM11166P được đưa vào gen *crp* kiểu đại thể hiện mức độ tương đương của OD do đưa vào bổ sung *crp* sau cùng thời gian nuôi cấy, trong khi thể biến nạp cải thiện tăng trưởng thể hiện giá trị OD cao, so với *crp* kiểu đại.

Bảng 5

Thông tin của thể biến nạp cải thiện tăng trưởng sau khi đưa *crp*^{TM3} vào chủng sản xuất tryptophan

Chủng	OD600	Biến thể
KCCM11166P/pCC1BAC	3,4	-

KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	3,5	-
KCCM11166P/pCC1BAC/ <i>crp</i> TM3	3,9	Q33K

4-3. So sánh hiệu giá tryptophan của vi sinh vật tái tổ hợp

Để đo hiệu giá tryptophan của vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra ở ví dụ 4-2, vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy ở môi trường chuẩn độ tryptophan được tạo ra như ở hợp phần của bảng 6 sau đây để kiểm tra sự cải thiện của năng suất L-tryptophan.

Bảng 6

Hợp phần của môi trường chuẩn độ tryptophan

Hợp phần	Nồng độ (với mỗi lit)
Glucosa	60 g
K ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Natri xitrat	5 g
Chiết xuất nấm men	2 g
Canxi cacbonat	40 g
Natri xitrat	5 g
Phenyl alanin	0,15 g
Tyrosin	0,1 g

Độ pH	6,8
-------	-----

Cụ thể là, mỗi một vòng platin của *E. coli* KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*(*WT*) và *E. coli* KCCM11166P/pCC1BAC-*crp**TM3* được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 37°C, được cấy lần lượt vào 25 mL môi trường chuẩn độ của bảng 6, sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ để so sánh tốc độ tiêu thụ đường và nồng độ tryptophan. Kết quả là, như được mô tả trong bảng 7 sau đây, chủng KCCM11166P/pCC1BAC-*crp* (*WT*) là nhóm đối chứng thể hiện mức tiêu thụ đường là 30,2 g/L sau 22 giờ, trong khi chủng đột biến được đưa vào *crp**TM3* thể hiện cải thiện khoảng 12% và 8% tỷ lệ tiêu thụ đường, so với chủng mẹ và chủng đưa vào *crp* kiểu dại, tương ứng.

Khi được nuôi cấy trong 48 giờ, chủng đưa vào *crp* kiểu dại thể hiện 8,4 g/L sản xuất L-tryptophan, trong khi sản xuất L-tryptophan của chủng đột biến thu được ở trên đã tăng lên đến 9,0 g/L mặc dù tốc độ nuôi cấy tăng lên, thể hiện sự cải thiện khoảng 7% và 10% về nồng độ, so với chủng mẹ và chủng đưa vào *crp* kiểu dại, tương ứng.

Vì việc đưa vào biến thể *crp* tăng việc sử dụng đường của chủng và năng suất, có vẻ như là đặc điểm biến thể tốt, có thể góp phần lớn vào việc cải thiện hiệu quả sản xuất trong quá trình lên men.

Bảng 7

So sánh hiệu giá của chủng tryptophan bao gồm biến thể *crp*

Chủng	Sử dụng đường (g/L)*	Tryptophan (g/L)**
KCCM11166P/pCC1BAC	29,0	8,2
KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> (<i>WT</i>)	30,2	8,4

KCCM11166P/pCC1BAC/crpTM3	32,5	9,0
---------------------------	------	-----

* giá trị được đo 22 giờ

** giá trị được đo 48 giờ

Ví dụ 5. Đưa vector nội sinh biến thể *crp* hiệu quả vào *E. coli* kiểu dại

5-1. Đưa biến thể pCC1BAC-*crp* hiệu quả vào chủng sản xuất threonin có nguồn gốc từ kiểu dại

Để kiểm tra liệu vector bao gồm cả biến thể *crp* được sàng lọc trong ví dụ 3 cũng thể hiện các hiệu quả tương đương ở chủng kiểu dại hay không, vector pCC1BAC-*crp* (WT) hoặc pCC1BAC-*crp*TM3 được biến nạp thành chủng có nguồn gốc từ kiểu dại có khả năng tạo ra threonin bằng công nghệ điện di, tương ứng. Hơn nữa, chủng được đưa vào pCC1BAC-*crp* (WT) được tạo ra như nhóm đối chứng.

Chủng có nguồn gốc kiểu dại có khả năng tạo ra threonin được sử dụng trong ví dụ này là W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC. W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC là chủng trong đó trình tự khởi đầu của gen *ppc* mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza trên nhiễm sắc thể được thế bằng đoạn khởi đầu của gen *cysK* và gen operon sinh tổng hợp threonin được đưa vào dưới dạng vector để tăng số lượng bản sao, do đó tăng năng suất threonin. Cụ thể là, chủng W3110::PcysK-ppc được tạo ra bằng cách sử dụng pUCpcysKmloxP theo cách tương tự như được mô tả trong patent Hàn Quốc số 10-0966324 và pACYC184-thrABC (patent Hàn Quốc số 10-1865998) được chuyển nạp thành chủng bằng công nghệ điện di.

Chủng đã tạo ra được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm threonin được tạo ra như ở hợp phần của Bảng 8 sau đây, và tốc độ tăng trưởng và năng suất L-threonin của chúng được so sánh.

Bảng 8

Hợp phần của môi trường thử nghiệm threonin

Hợp phần	Nồng độ (với mỗi lít)
Glucosa	70 g
K ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
DL-methionin	0,15 g
Chiết xuất nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Cụ thể là, mỗi một vòng platin của W3110 và chủng tương ứng được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 33°C được cấy lần lượt vào 25 mL môi trường chuẩn độ của bảng 8, sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 33°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Kết quả của chúng được thể hiện trong bảng 9 sau đây. Như được thể hiện trong các kết quả sau đây, protein biến thể được chọn theo sáng chế cũng có thể tạo ra threonin một cách hiệu quả với năng suất cao ở chủng kiểu dại.

Bảng 9

Kết quả kiểm tra sự tăng trưởng và năng suất threonin của chủng có nguồn gốc từ kiểu dại

Chủng	OD	Threonin (g/L)**
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC	10,8	1,5
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC- <i>crp(WT)</i>	11,0	1,6
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC- <i>crpTM3</i>	13,5	2,5

5-2. Đưa biến thể pCC1BAC-*crp* hiệu quả vào chủng sản xuất tryptophan có nguồn gốc từ kiểu dại

Để kiểm tra liệu vector bao gồm cả biến thể *crp* được sàng lọc trong ví dụ 4 cũng thể hiện các hiệu quả tương đương ở chủng kiểu dại hay không, vector pCC1BAC-*crp(WT)* hoặc pCC1BAC-*crpTM3* được biến nạp thành chủng có nguồn gốc từ kiểu dại có khả năng tạo ra tryptophan, tương ứng.

Chủng có nguồn gốc từ kiểu dại có khả năng sản xuất tryptophan được sử dụng ở ví dụ này là W3110 *trp* Δ 2/pCL-D*trp*_att-*trp*EDCBA. W3110 *trp* Δ 2/pCL-D*trp*_att-*trp*EDCBA là chủng được đưa vào với vector trong đó cơ chế điều hòa của vùng điều hòa operon tryptophan được giải phóng và biểu hiện operon tryptophan được tăng cường để quá biểu hiện tryptophan (patent Hàn Quốc số 10-1532129). Các chủng đã đưa vector vào được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm tryptophan được chuẩn bị như trong hợp phần của bảng 10 sau đây, và năng suất L-tryptophan của chúng được so sánh.

Bảng 10

Hợp phần của môi trường thử nghiệm tryptophan

Hợp phần	Nồng độ (với mỗi lít)
----------	-----------------------

Glucosa	2 g
K ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12 g
NaCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	15 mg
CuSO ₄ ·H ₂ O	3 mg
ZnSO ₄ ·H ₂ O	30 mg
Natri xitrat	1 g
Chiết xuất nấm men	1 g
Phenyl alanin	0,15 g
Độ pH	6,8

Cụ thể là, mỗi một vòng platin của chủng được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 37°C được cấy lần lượt vào 25 mL môi trường thử nghiệm của bảng 9, sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C và 200 vòng/phút trong 48 giờ. Giá trị OD và nồng độ tryptophan được so sánh và thể hiện trong bảng 11. Như được thể hiện trong các kết quả sau đây, protein biến thể được chọn theo sáng chế cũng có thể tạo ra tryptophan một cách hiệu quả với năng suất cao ở chủng kiểu dại.

Bảng 11

Kết quả kiểm tra sự tăng trưởng và năng suất tryptophan của chủng có nguồn gốc

từ kiểu đại

Chủng	OD	Tryptophan (g/L)**
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC	10,8	0,5
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	11,0	0,6
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC- <i>crp</i> TM3	12,7	0,9

Các tác giả sáng chế đã chỉ định chủng được đưa vào pCC1BAC-*crp*TM3, dựa trên KCCM11166P có năng suất tryptophan và tốc độ sử dụng đường cải thiện (KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*TM3) là “CA04-2807”, và sau đó gửi chủng này đến Trung tâm văn hóa vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) là cơ quan lưu ký quốc tế theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 07 tháng 11 năm 2018 với số tiếp cận KCCM12373P.

Các kết quả này chỉ ra rằng tốc độ sử dụng đường được cải thiện và năng suất L-axit amin được tăng lên ở vi sinh vật được đưa vào biến thể *crp* thuộc giống *Escherichia* theo sáng chế, và do đó, năng suất L-axit amin được tăng lên, so với chủng không biến đổi.

Dựa trên phân mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi tinh thần kỹ thuật hoặc các đặc tính cơ bản của sáng chế. Do đó, cần hiểu rằng phương án trên không phải là giới hạn, mà là minh họa ở tất cả các khía cạnh. Phạm vi của sáng chế được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bằng phần mô tả trước chúng, và do đó tất cả các thay đổi và sửa đổi nằm trong các điều kiện và giới hạn của các điểm yêu cầu bảo hộ, hoặc tương đương của các tiêu chuẩn và

giới hạn đó, do đó được dự định là được chấp nhận bởi các điểm yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể protein thụ thể cAMP, trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
2. Polynucleotit mã hóa biến thể protein thụ thể cAMP theo điểm 1.
3. Vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể protein thụ thể cAMP theo điểm 1.
4. Vi sinh vật giống *Escherichia* (*Escherichia* sp.) chứa biến thể protein thụ thể cAMP trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
5. Vi sinh vật giống *Escherichia* theo điểm 4, trong đó vi sinh vật giống *Escherichia* này là *E. coli*.
6. Vi sinh vật giống *Escherichia* theo điểm 4, trong đó vi sinh vật giống *Escherichia* này tạo ra L-axit amin.
7. Vi sinh vật giống *Escherichia* theo điểm 6, trong đó L-axit amin là L-threonin hoặc L-tryptophan.
8. Phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật giống *Escherichia* trong môi trường, vi sinh vật này bao gồm biến thể protein thụ thể cAMP trong đó lysin được thế cho axit amin ở vị trí 33 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
9. Phương pháp theo điểm 8, còn bao gồm thu gom L-axit amin từ vi sinh vật hoặc môi trường.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó L-axit amin là L-threonin hoặc L-tryptophan.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Biến thể protein thụ thể cAMP và phương pháp sản xuất L-axit amin sử dụng biến thể này

<130> OPA19116-PCT

<150> KR 10-2018-0150875

<151> 2018-11-29

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 210

<212> PRT

<213> Không biết

<220>

<223> CRP

<400> 1

Met Val Leu Gly Lys Pro Gln Thr Asp Pro Thr Leu Glu Trp Phe Leu
1 5 10 15

Ser His Cys His Ile His Lys Tyr Pro Ser Lys Ser Lys Leu Ile His
20 25 30

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

Ala Val Leu Ile Lys Asp Glu Glu Gly Lys Glu Met Ile Leu Ser Tyr
50 55 60

Leu Asn Gln Gly Asp Phe Ile Gly Glu Leu Gly Leu Phe Glu Glu Gly
65 70 75 80

Gln Glu Arg Ser Ala Trp Val Arg Ala Lys Thr Ala Cys Glu Val Ala
85 90 95

Glu Ile Ser Tyr Lys Lys Phe Arg Gln Leu Ile Gln Val Asn Pro Asp
100 105 110

Ile Leu Met Arg Leu Ser Ala Gln Met Ala Arg Arg Leu Gln Val Thr
115 120 125

Ser Glu Lys Val Gly Asn Leu Ala Phe Leu Asp Val Thr Gly Arg Ile
130 135 140

Ala Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Lys Gln Pro Asp Ala Met Thr His
145 150 155 160

Pro Asp Gly Met Gln Ile Lys Ile Thr Arg Gln Glu Ile Gly Gln Ile
165 170 175

Val Gly Cys Ser Arg Glu Thr Val Gly Arg Ile Leu Lys Met Leu Glu

	180		185		190										
Asp	Gln	Asn	Leu	Ile	Ser	Ala	His	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Val	Tyr	Gly
	195						200					205			

Thr Arg
210

<210> 2
<211> 633
<212> ADN
<213> Không biết

<220>
<223> crp

<400> 2
atgggtgcttg gcaaaccgca aacagacccg actctcgaat ggttcttgct tcattgccac
60

attcataagt acccatccaa gagcaagctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg
120

tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg
180

atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaac tgggcctgtt tgaagagggc
240

caggaacgta gcgcatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac
300

aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac ccggacattc tgatgcgttt gtctgcacag
360

atggcgctgc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggt cctcgacgtg
420

acgggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac
480

ccggacggta tgcaaatcaa aattaccctg caggaaattg gtcagattgt cggctgttct
540

cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac
600

ggtaaaacca tcgtcggtta cggcactcgt taa
633

<210> 3
<211> 210
<212> PRT
<213> Không biết

<220>
<223> CRP cải biến

<400> 3
 Met Val Leu Gly Lys Pro Gln Thr Asp Pro Thr Leu Glu Trp Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser His Cys His Ile His Lys Tyr Pro Ser Lys Ser Lys Leu Ile His
 20 25 30
 Lys Gly Glu Lys Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr Ile Val Lys Gly Ser Val
 35 40 45
 Ala Val Leu Ile Lys Asp Glu Glu Gly Lys Glu Met Ile Leu Ser Tyr
 50 55 60
 Leu Asn Gln Gly Asp Phe Ile Gly Glu Leu Gly Leu Phe Glu Glu Gly
 65 70 75 80
 Gln Glu Arg Ser Ala Trp Val Arg Ala Lys Thr Ala Cys Glu Val Ala
 85 90 95
 Glu Ile Ser Tyr Lys Lys Phe Arg Gln Leu Ile Gln Val Asn Pro Asp
 100 105 110
 Ile Leu Met Arg Leu Ser Ala Gln Met Ala Arg Arg Leu Gln Val Thr
 115 120 125
 Ser Glu Lys Val Gly Asn Leu Ala Phe Leu Asp Val Thr Gly Arg Ile
 130 135 140
 Ala Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Lys Gln Pro Asp Ala Met Thr His
 145 150 155 160
 Pro Asp Gly Met Gln Ile Lys Ile Thr Arg Gln Glu Ile Gly Gln Ile
 165 170 175
 Val Gly Cys Ser Arg Glu Thr Val Gly Arg Ile Leu Lys Met Leu Glu
 180 185 190
 Asp Gln Asn Leu Ile Ser Ala His Gly Lys Thr Ile Val Val Tyr Gly
 195 200 205
 Thr Arg
 210

<210> 4
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> Không biết

<220>
 <223> crp cải biến

<400> 4
 atggtgcttg gcaaaccgca aacagaccgc actctcgaat gggtcttgct tcattgccac
 60

attcataagt acccatccaa gagcaagctt attcacaagg gtgaaaaagc ggaaacgctg
120

tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg
180

atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaac tgggcctgtt tgaagagggc
240

caggaacgta gcgcattgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac
300

aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac ccggacattc tgatgcgttt gtctgcacag
360

atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggtt cctcgacgtg
420

acgggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac
480

ccggacggta tgcaaatcaa aattaccctg caggaaattg gtcagattgt cggctgttct
540

cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac
600

ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa
633

<210> 5
<211> 933
<212> ADN
<213> Không biết

<220>
<223> crp và vùng kiểm soát biểu hiện

<400> 5
tttgctactc cactgcgta attttcctga cagagtacgc gtactaacca aatcgcgcaa
60

cggaaggcga cctgggtcat gctgaagcga gacaccagga gacacaaagc gaaagctatg
120

ctaaaacagt caggatgcta cagtaataca ttgatgtact gcatgtatgc aaaggacgtc
180

acattaccgt gcagtacagt tgatagcccc ttcccaggta gcgggaagca tatttcggca
240

atccagagac agcggcggtta tctggctctg gagaaagctt ataacagagg ataaccgcgc
300

atgggtgcttg gcaaaccgca aacagaccctg actctcgaat ggttcttgtc tcattgccac
360

attcataagt acccatccaa gagcaagctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg
420

tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg
480

atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaac tgggcctggt tgaagagggc
540

caggaacgta gcgcatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac
600

aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac ccggacattc tgatgcgttt gtctgcacag
660

atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggt cctcgacgtg
720

acggggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac
780

ccggacggta tgcaaatcaa aattaccctg caggaaattg gtcagattgt cggctgttct
840

cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac
900

ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa
933

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

<220>
<223> crp-F

<400> 6
cacgaattct ttgctactcc actgcgtca
29

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> crp-R

<400> 7
acacgaattc ttaacgagtg ccgtaaacg
29