



(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)



1-0037662

(51)⁸ C12N 1/21; C12P 13/08

(13) B

(21) 1-2019-02742

(22) 19/09/2017

(86) PCT/KR2017/010243 19/09/2017

(87) WO2018/093033 24/05/2018

(30) 10-2016-0152037 15/11/2016 KR

(45) 27/11/2023 428

(43) 26/08/2019 377A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BYUN Hyo Jeong (KR); KIM Hyung Joon (KR); BAE Hyun Won (KR); RYU Song-Gi (KR); CHOI Hyang (KR); MOON Jun Ok (KR); LEE Kyung-Chang (KR); CHOI Yunjung (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN XUẤT L-LYSIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-lysin, và phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-lysin thuộc giống *Corynebacterium* và phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-Lysin được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi, và trong các ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm cho con người, và nó thường được tạo ra thông qua quá trình lên men bằng cách sử dụng các chủng thuộc giống *Corynebacterium* hoặc các chủng thuộc giống *Escherichia*. Để tạo ra L-lysin, các nghiên cứu khác nhau để phát triển các chủng sản xuất có hiệu quả cao và công nghệ xử lý lên men vẫn đang được thực hiện. Cụ thể, chủ yếu sử dụng các phương pháp hướng đến các giải pháp cụ thể đối với vật liệu đích, như làm tăng sự biểu hiện của gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp L-lysin hoặc gây khuyết đoạn các gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp của nó (patent Hàn Quốc số 10-0838038).

Để tìm ra các đặc tính có hiệu quả có thể làm tăng năng suất lysin, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra gen liên quan đến việc sản xuất lysin có nồng độ cao bằng cách đưa vào ngẫu nhiên một gen nội sinh của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và với phát hiện này đã xác nhận được rằng khi sự biểu hiện của gen này tăng trong vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, năng suất của L-lysin có thể tăng, nhờ đó đã tạo ra sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần giải quyết

Một mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản xuất L-lysin thuộc giống *Corynebacterium*, có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được cải thiện so với hoạt tính nội sinh.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề

xuất vi sinh vật sản xuất L-lysin thuộc giống *Corynebacterium*, có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được cải thiện so với hoạt tính nội sinh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết. Trong khi đó, mỗi phần giải thích và các phương án ví dụ được đề cập trong bản mô tả này có thể áp dụng được với các phần giải thích và các phương án ví dụ khác. Nghĩa là, tất cả các tổ hợp của các yếu tố khác nhau được đề cập 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 đưa ra dưới đây.

Trong bản mô tả của sáng chế này, thuật ngữ “protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1” có thể được sử dụng thay cho thuật ngữ “protein HM1524”. Ngoài ra, nó có thể được sử dụng thay cho thuật ngữ “protein được ghi mã bởi gen HM1524”. Ngoài ra, cụm từ “protein về cơ bản chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1” hoặc “protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1” có thể được sử dụng thay nhau.

Ngoài ra, protein có thể chứa polypeptit có mức tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 ít nhất là 80%, 90%, 95%, 97%, hoặc 99%. Ví dụ, hiển nhiên rằng protein có trình tự axit amin trong đó trình tự này được làm khuyết đoạn, cải biến, thay thế, hoặc cài xen một phần nằm trong phạm vi của sáng chế, chừng nào nó có trình tự axit amin có mức tương đồng nêu trên và có hiệu quả tương đương với protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, chừng nào nó có hoạt tính tương đương với hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, sự đột biến có thể xảy ra bằng cách thêm đoạn trình tự vô nghĩa nằm phía trước hoặc nằm phía sau trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc đột biến tự nhiên trong đó, hoặc đột biến câm trong đó, không bị loại trừ, và protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả của sáng chế này, thuật ngữ “mức tương đồng” để chỉ tỷ lệ phần trăm sự giống nhau giữa hai gốc polynucleotit hoặc polypeptit, chỉ ra mức tương đương với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit nhất định, và có thể được biểu thị theo tỷ lệ phần trăm. Trong bản mô tả này, trình tự tương đồng của trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho có hoạt tính giống nhau hoặc tương đương với hoạt tính của trình tự axit amin

hoặc trình tự nucleotit đã cho có thể được biểu thị theo “% mức tương đồng”. Ví dụ, mức tương đồng có thể được xác nhận bằng cách sử dụng phần mềm tiêu chuẩn để tính toán các thông số như điểm số, mức đồng nhất, và mức tương tự, đặc hiệu, BLAST 2,0, hoặc bằng cách so sánh các trình tự bằng thử nghiệm lai hóa Nam trong các điều kiện nghiêm ngặt xác định, và các điều kiện lai hóa thích hợp xác định nằm trong phạm vi kỹ thuật có liên quan và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Gen mã hóa protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, mặc dù không bị giới hạn ở đó, có thể là polynucleotit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và có thể là polynucleotit có mức tương đồng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 ít nhất là 80%, 90%, 95%, 97%, hoặc 99%. Hiển nhiên rằng polynucleotit, do sự suy biến mã di truyền, có thể được dịch mã thành protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc protein có mức tương đồng trong đó cũng có thể nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo cách khác, đầu dò có thể được tạo ra từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bất kỳ lai hóa với trình tự bổ trợ với tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit này trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, có thể nằm trong phạm vi của sáng chế mà không giới hạn phạm vi của nó. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” được dùng để chỉ các điều kiện cho phép lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả một cách cụ thể trong tài liệu (ví dụ, bài báo của tác giả J. Sambrook *et al.*, nêu trên). Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có mức tương đồng cao, mức tương đồng là 80% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, và đặc biệt cụ thể là 99% hoặc cao hơn lai hóa với nhau, trong khi đó gen có mức tương đồng thấp hơn so với mức tương đồng nêu trên không lai hóa với nhau; hoặc có thể bao gồm các điều kiện rửa thông thường của thử nghiệm lai hóa Nam, tức là rửa một lần, cụ thể là hai lần hoặc ba lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ tương đương với 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS; cụ thể là 60°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS; và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS.

Thử nghiệm lai hóa cần hai axit nucleic chứa các trình tự bổ trợ, mặc dù

bắt cặp sai giữa các nucleotit có thể sẵn có tùy thuộc vào tính nghiêm ngặt của thử nghiệm lai hóa. Thuật ngữ “tính hỗ trợ” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các nucleotit có thể lai hóa với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin hỗ trợ với thymine, và xytosin hỗ trợ với guanin. Vì vậy, sáng chế cũng có thể bao hàm mảnh axit nucleic phân lập hỗ trợ với toàn bộ trình tự cũng như trình tự axit nucleic hầu như tương tự với nó.

Cụ thể, polynucleotit có mức tương đồng có thể được làm khuyết đoạn bằng cách sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai hóa ở trị số T_m là 55°C trong các điều kiện được mô tả trên đây. Ngoài ra, trị số T_m có thể là 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng không giới hạn ở đó, và có thể được kiểm soát một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào mục đích của họ.

Mức nghiêm ngặt thích hợp để lai hóa polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức hỗ trợ của polynucleotit, và các biến này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đầu dò được sử dụng trong sự lai hóa có thể là một phần của trình tự hỗ trợ với trình tự này nucleotit. Đầu dò như vậy có thể được sản xuất bằng PCR bằng cách sử dụng oligonucleotit được tạo ra trên cơ sở trình tự đã biết là đoạn mã và mảnh gen chứa trình tự nucleotit là khuôn mẫu. Mảnh gen có thể là, ví dụ, ít nhất khoảng 50 nucleotit, 60 nucleotit, 70 nucleotit, 80 nucleotit, 90 nucleotit, hoặc ít nhất 100 nucleotit. Ngoài ra, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chỉnh nhiệt độ và nồng độ muối của dung dịch rửa khi cần tùy thuộc vào các yếu tố như chiều dài của đầu dò.

Khi được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” để chỉ hoạt tính cụ thể của protein được sở hữu ban đầu bởi chủng vi sinh vật bố mẹ trước khi biến nạp chúng, trong trường hợp đó Đặc tính của vi sinh vật này thay đổi thông qua sự cải biến di truyền do các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo.

Khi được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “hoạt tính được cải thiện so với hoạt tính nội sinh” để chỉ sự tăng cường hoạt tính của protein của vi sinh vật so với hoạt tính nội sinh của nó hoặc hoạt tính của nó trước khi cải biến. Sự cải thiện hoạt tính có thể bao gồm cả việc đưa vào HM1524 ngoại lai và sự tăng cường nội sinh hoạt tính của HM1524.

Cụ thể, sự cải thiện hoạt tính theo sáng chế có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau:

1) phương pháp làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein,

2) phương pháp cải biến trình tự điều hoà sự biểu hiện sao cho sự biểu hiện của polynucleotit được tăng lên,

3) phương pháp cải biến polytrình tự nucleotit trên nhiễm sắc thể sao cho hoạt tính của protein được tăng cường,

4) phương pháp đưa vào polynucleotit đã được cải biến trong đó các codon của polynucleotit ngoại lai hoặc polynucleotit nêu trên có hoạt tính của protein đã được tối ưu hóa, hoặc

5) phương pháp cải biến để thu được sự tăng cường bằng cách kết hợp các phương pháp nêu trên, v.v.; tuy nhiên, sự cải thiện hoạt tính không bị giới hạn ở đó.

Việc làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong phương pháp 1) nêu trên có thể được thực hiện bằng cách liên kết có điều khiển với vector, hoặc có thể được thực hiện bằng cách cài xen vào nhiễm sắc thể trong tế bào vật chủ, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở đó. Cụ thể, nó có thể được thực hiện bằng cách liên kết có điều khiển polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế với vector có thể sao chép và hoạt động chức năng bất kể tế bào vật chủ, và đưa nó vào tế bào vật chủ. Theo cách khác, nó có thể được thực hiện bằng phương pháp làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể trong tế bào vật chủ bằng cách liên kết có điều khiển polynucleotit với vector có thể cài xen polynucleotit vào nhiễm sắc thể trong tế bào vật chủ, và đưa nó vào tế bào vật chủ.

Ngoài ra, trong phương pháp 2) nêu trên, việc cải biến trình tự điều hoà sự biểu hiện sao cho sự biểu hiện của polynucleotit tăng có thể được thực hiện bằng cách gây ra sự cải biến trong trình tự này nhờ việc gây khuyết đoạn, cài xen, hoặc sự thay thế không bảo toàn hoặc bảo toàn của trình tự axit nucleic, hoặc thông qua sự kết hợp của chúng để tăng cường tiếp hoạt tính của trình tự điều hoà sự biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính mạnh hơn, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở đó. Trình tự điều hoà sự biểu hiện có thể bao gồm gen khởi đầu, trình tự gen điều khiển, trình tự mã hoá cho vị trí gắn kết ribosom, trình tự điều hoà sự kết thúc của quá trình phiên mã và dịch mã, v.v., nhưng không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Gen khởi đầu khác loài mạnh có thể được liên kết với vùng phía bên trên của đơn vị biểu hiện của polynucleotit thay vì gen khởi đầu ban đầu; ví dụ về gen khởi đầu mạnh là gen khởi đầu *CJ7* (patent Hàn Quốc số 0620092 và Công bố đơn quốc tế số WO2006/065095), gen khởi đầu *lysCPI* (Công bố đơn quốc tế số WO2009/096689), gen khởi đầu *EF-Tu*, gen khởi đầu *groEL*, gen

khởi đầu *aceA* hoặc *aceB*, v.v., nhưng gen khởi đầu mạnh không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, trong phương pháp 3) nêu trên, việc cải biến polytrình tự nucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách gây ra cải biến trên trình tự điều hoà sự biểu hiện bằng cách làm khuyết đoạn, cài xen, hoặc thay thế không bảo toàn hoặc bảo toàn trình tự axit nucleic, hoặc thông qua sự kết hợp của chúng, để tăng cường tiếp hoạt tính của polytrình tự nucleotit, hoặc nó có thể được thực hiện bằng cách thay thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit được cải biến để có hoạt tính mạnh hơn nữa; tuy nhiên, cải biến này không giới hạn cụ thể ở đó.

Ngoài ra, trong phương pháp 4) nêu trên, việc đưa vào trình tự polynucleotit ngoại lai có thể được thực hiện bằng cách đưa vào tế bào vật chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa protein có hoạt tính của nó giống nhau hoặc tương đương với hoạt tính của protein nêu trên, hoặc polynucleotit đã được cải biến trong đó các codon của polynucleotit ngoại lai đã được tối ưu hóa. Polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn ở nguồn gốc hoặc trình tự của nó chừng nào nó có hoạt tính của nó giống nhau hoặc tương đương với hoạt tính của protein. Ngoài ra, đối với sự phiên mã và sự dịch mã đã được tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai trong tế bào vật chủ, nó có thể được đưa vào tế bào vật chủ sau khi tối ưu hóa các codon của nó. Việc đưa vào có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách chọn lọc phương pháp biến nạp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và thông qua sự biểu hiện của polynucleotit đã được đưa vào trong tế bào vật chủ, protein có thể được tạo ra, nhờ thế cải thiện được hoạt tính của nó.

Cuối cùng, phương pháp 5), đề cập đến việc cải biến để thu được sự tăng cường bằng cách kết hợp các phương pháp 1) đến 4), có thể được thực hiện bằng việc ứng dụng kết hợp ít nhất một trong số các bước sau: làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein, cải biến trình tự điều hoà sự biểu hiện sao cho biểu hiện của polynucleotit tăng, cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể, và cải biến polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của protein hoặc polynucleotit cải biến đã được tối ưu hóa codon của chúng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” để chỉ cấu trúc ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein đích, được liên kết có điều khiển với trình tự điều hoà thích hợp sao cho protein đích có thể được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hoà bao gồm gen khởi đầu có khả năng khơi mào quá trình phiên mã, trình tự gen điều khiển bất kỳ để kiểm soát quá trình phiên mã, trình tự mã hóa miền gắn kết ribosom ARN thông tin thích hợp, và trình tự

kiểm soát sự kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã. Sau khi được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp, vector có thể được sao chép hoặc hoạt động chức năng không phân biệt bộ gen vật chủ, và nó có thể được hợp nhất vào chính bộ gen vật chủ của nó. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa protein đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit đã được cải biến thông qua vector để cài xen nhiễm sắc thể. 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, tái tổ hợp tương đồng, nhưng không giới hạn ở đó.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Ví dụ về vector được sử dụng thông thường có thể bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virut, và thể thực khuẩn. Ví dụ, đối với vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v., có thể được sử dụng, và đối với vector plasmid, các vector trên cơ sở pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” để chỉ quy trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ, nhờ đó có thể biểu hiện protein được ghi mã bởi polynucleotit trong tế bào vật chủ. Chừng nào polynucleotit đã được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, không quan trọng việc nó được cài xen vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm trong đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, và có thể bao gồm cả hai trường hợp. 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 vật chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để tự biểu hiện. Catxet biểu hiện có thể thường bao gồm gen khởi đầu liên kết có điều khiển với polynucleotit, gen kết thúc, vị trí gắn kết ribosom, và codon kết thúc. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ như vậy và liên kết có điều khiển với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện của nó trong tế bào vật chủ, nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như được sử dụng trên đây, thuật ngữ “được liên kết có điều khiển” để chỉ liên kết về mặt chức năng giữa các trình tự gen nêu trên và trình tự gen khởi đầu khơi mào và làm trung gian quá trình phiên mã polynucleotit

mã hóa protein đích theo sáng chế.

Phương pháp biến nạp vectơ theo sáng chế bao gồm phương pháp bất kỳ đưa axit nucleic vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách chọn lọc kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này theo tế bào vật chủ. Ví dụ về phương pháp này bao gồm đục lỗ điện, kết tủa canxi phosphat (CaHPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), tiêm tế bào, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật liposom cation, kỹ thuật lithi axetat-DMSO, v.v., nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó.

Đối với tế bào vật chủ, tốt hơn là sử dụng vật chủ có hiệu quả đưa vào ADN cao và hiệu quả biểu hiện cao đối với ADN đã được đưa vào; ví dụ, tế bào vật chủ có thể là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “L-lysin” để chỉ α -axit amin cơ bản, như các axit amin thiết yếu, không thể tổng hợp được *in vivo*, và là L-axit amin với công thức hóa học $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. Ngoài ra, L-lysin có thể nằm trong phạm vi của sáng chế ngay cả khi ở dạng muối.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất L-lysin” để chỉ chủng vi sinh vật có thể tạo ra L-lysin theo mục đích của sáng chế, cụ thể là để chỉ chủng có thể tạo ra L-lysin ở nồng độ cao bằng các thao tác theo sáng chế. Do đó, miễn là vi sinh vật có khả năng sản xuất L-lysin, dạng chủng cha mẹ của nó không bị giới hạn cụ thể. Nghĩa là, theo sáng chế, chủng bố mẹ có thể bao gồm cả chủng có khả năng sản xuất L-lysin và chủng không có khả năng sản xuất L-lysin. Khả năng sản xuất L-lysin có thể bao gồm cả các khả năng xảy ra tự nhiên hoặc đã được thao tác di truyền nhân tạo. Vi sinh vật này đã được thao tác di truyền nhân tạo khả năng sản xuất L-lysin có thể được cải biến để có khả năng sản xuất L-lysin nhờ chất gây đột biến như nitrosoguanidin (NTG), v.v., hoặc mức biểu hiện hoặc hoạt tính của protein có mục đích cụ thể có thể được kiểm soát để thu được khả năng sản xuất L-lysin, nhưng vi sinh vật này không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, protein có mục đích cụ thể có thể bao gồm tất cả các protein tác động trực tiếp/gián tiếp cùng con đường sinh tổng hợp L-lysin, và bằng cách làm tăng hoặc làm giảm mức biểu hiện hoặc hoạt tính của nó, vi sinh vật này có thể được cải biến để có khả năng sản xuất L-lysin; ngoài ra, việc cải biến cũng có thể được gây ra trong trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit của protein này để thu được khả năng sản xuất L-lysin. Thao tác di truyền nhân tạo vi sinh vật này, bao gồm kiểm soát sự biểu hiện của protein có mục đích cụ thể và đưa vào đột biến ngẫu nhiên bằng cách sử dụng NTG, v.v. được mô tả trên đây, có thể được thực hiện thích hợp bằng kỹ thuật

đã biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vi sinh vật này có thể cụ thể là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*. Ví dụ, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, hoặc *Brevibacterium fermentum*, v.v. có thể được sử dụng, nhưng vi sinh vật này không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* có thể được sử dụng làm vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*. Tuy nhiên, vi sinh vật này không chỉ giới hạn ở các ví dụ này, và các vi sinh vật đã biết khác thuộc giống *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-lysine có thể được sử dụng.

Ví dụ về các vi sinh vật đã biết thuộc giống *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-lysine là vi sinh vật được mô tả trong patent Hàn Quốc số 10-0397322 (hoặc Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003-0124688), patent Hàn Quốc số 10-0924065 (hoặc Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010-0143984), patent Hàn Quốc số 10-0073610, và/hoặc Binder *et al.*, Genome Biology 2012, 13:R40, và nội dung của các tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-lysine, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật sản xuất L-lysine thuộc giống *Corynebacterium*, có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được cải thiện so với hoạt tính nội sinh, trong môi trường; và thu hồi L-lysine từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường chứa nó.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất L-lysine là như được mô tả trên đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nuôi cấy” nghĩa là sinh trưởng vi sinh vật trong các điều kiện môi trường có kiểm soát thích hợp. Quy trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo môi trường nuôi cấy thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quy trình nuôi cấy như vậy có thể được điều chỉnh dễ dàng để sử dụng bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này theo chúng được chọn lọc. Theo phương pháp nêu trên, việc nuôi cấy vi sinh vật này có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy theo mẻ, phương pháp nuôi cấy liên tục, phương pháp nuôi cấy nạp liệu theo mẻ, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể, đối với các điều kiện nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh đến độ pH thích hợp (ví dụ, pH 5 đến pH 9, cụ thể là pH 6 đến pH 8, và cụ thể nhất là pH 6,8) 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, trong quá

trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo có thể được cho vào để ngăn ngừa sự tạo bọt; ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của nó, hoặc, để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc ưa vi khí của môi trường nuôi cấy, nitơ, hydro, hoặc khí cacbon đioxit có thể được bơm, hoặc việc nuôi cấy có thể được thực hiện mà không cần phải bơm khí. Nhiệt độ môi trường nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, cụ thể là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, và việc nuôi cấy có thể được liên tục cho đến khi lượng mong muốn của vật liệu hữu ích được tạo ra thu được, cụ thể là trong khoảng từ 10 đến 160 giờ. Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy không chỉ giới hạn ở các môi trường nêu trên. L-lysine được tạo ra nhờ việc nuôi cấy có thể được tiết ra trong môi trường hoặc có thể duy trì trong các tế bào.

Ngoài ra, đối với nguồn cacbon cho môi trường nuôi cấy được sử dụng, đường và carbohydrat (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, molasza, tinh bột, và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu tương, dầu hoa hướng dương, dầu lạc, và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), cồn (ví dụ, glyxerol và etanol), axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v. có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở đó. Đối với nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm, nước thịt, dịch chiết mạch nha, dịch chiết ngô cô đặc, bột đậu tương, và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), v.v. có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không bị giới hạn ở đó. Đối với nguồn phospho, kali dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, muối chứa natri tương ứng, v.v. có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn phospho không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, các vật liệu kích thích sinh trưởng thiết yếu như các muối kim loại khác (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin, vitamin, v.v. có thể chứa trong môi trường.

Theo phương pháp thu hồi L-lysine được tạo ra trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế, axit amin đích có thể được thu gom từ canh trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v. có thể được sử dụng, và L-lysine đích có thể được thu hồi từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm trong quy trình tinh chế.

Hiệu quả có lợi theo sáng chế

L-Lysin có thể được tạo ra với hiệu suất cao bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, có khả năng sản xuất L-lysine.

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết thông qua các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra thư viện vi sinh vật dạng đại thuộc giống *Corynebacterium*

Khi chiết bộ gen ADN từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, bộ gen ADN này được xử lý bằng enzyme giới hạn Sau3AI và mảnh ADN được tách theo kích cỡ thông qua điện di trên gel agarosa, và nhờ đó thu được một cách có chọn lọc các mảnh ADN có kích thước nằm trong khoảng từ 3 kb đến 4 kb. Sau khi nối các mảnh này bằng vector pECCG117 (patent Hàn Quốc số 10-0057684), có vị trí giới hạn BamHI, và đưa vào *E. coli* DH5 α , sản phẩm thu được sau đó được đặt lên môi trường LB rắn chứa kanamycin (25 mg/L), và do đó thu được khuẩn lạc đã được biến nạp. PCR được thực hiện trên 100 khuẩn lạc ngẫu nhiên bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và 4, và nhờ đó đã phát hiện ra rằng tỷ lệ của khuẩn lạc chứa vector trong đó các mảnh ADN đích có kích thước nằm trong khoảng từ 3 kb đến 4 kb được cài xen là 90% hoặc cao hơn. Tất cả các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy đồng thời sau khi cấy trong môi trường LB lỏng chứa kanamycin (25 mg/L); plasmit sau đó được chiết bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmit đã biết thông thường, nhờ đó hoàn thành thư viện bộ gen ADN *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

SEQ ID NO: 3: 5'-ACGACGGGATCAGTACCGA-3'

SEQ ID NO: 4: 5'-AGCTATCTGTCGCAGCGCC-3'

Ví dụ 2: Điều chế và đánh giá vi sinh vật sản xuất lysine được đưa vào thư viện dạng đại

Bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, thư viện bộ gen ADN được tạo ra trong Ví dụ 1 được đưa vào chủng sản xuất lysine *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (tên gọi gốc là KFCC10881, vi sinh vật này được lưu giữ lại tại Tổ chức lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest và được chỉ

định theo số truy nhập KCCM11016P; patent Hàn Quốc số 10-0159812), và sau khi dần lên môi trường hộp lồng thiên nhiên chứa kanamycin (25 mg/L) và nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ, thu được khoảng 2,000 khuẩn lạc.

Môi trường hộp lồng thiên nhiên

20 g glucoza, 50 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm, 1,5 g ure, 5 g KH_2PO_4 , 10 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 2000 μg nicotinamit, 20 g thạch, 25 mg kanamycin (trong 1 L nước cất)

200 μL môi trường lỏng thiên nhiên được phân tán vào mỗi đĩa của đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, và sau khi cấy từng khuẩn lạc thu được, việc nuôi cấy lắc được thực hiện trong 24 giờ trong các điều kiện 30°C và 1200 vòng/phút. Phần tế bào và dịch nổi bề mặt được tách bằng cách ly tâm canh trường nuôi cấy, và 50 μL dịch nổi bề mặt được trộn với dung dịch phản ứng chứa lysin oxidaza.

Môi trường lỏng thiên nhiên

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 2000 μg nicotinamit, 25 mg kanamycin (trong 1 L nước cất)

Dung dịch phản ứng

0,02 đơn vị lysin oxidaza (Sigma-Aldrich), 0,2 đơn vị peroxidaza (Sigma-Aldrich), 2 mg ABTS (trong mỗi 1 mL dung dịch đệm kali phosphat)

Sau đó, hệ số hấp phụ ở OD_{405} được phân tích trong 30 phút, và 15 nhóm thử nghiệm có hệ số hấp phụ cao hơn so với nhóm đối chứng (KCCM11016P/pECCG117) được chọn lọc. Để xác nhận khả năng sản xuất lysin của mỗi thể biến nạp, mỗi chủng được cấy trong bình chấn góc dung tích 250 mL chứa 25 mL môi trường nhân giống chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy lắc trong 20 giờ trong các điều kiện 30°C và 200 vòng/phút. 1 mL môi trường canh thịt nhân giống được cấy trong bình chấn góc dung tích 250 mL chứa 24 mL môi trường sản xuất chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy lắc trong 96 giờ ở 37°C và 200 vòng/phút. Sau khi kết thúc việc nuôi cấy, nồng độ L-lysin được phân tích bằng cách sử dụng HPLC (Bảng 1).

Môi trường nhân giống

20 g glucoza, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 2000 μg nicotinamit (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (pH 7,0)

100 g glucoza, 40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g protein đậu tương, 5 g chất rắn ngô cô đặc, 3 g ure, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 3000 μg nicotinamit, 30 g CaCO_3 (trong 1 L nước cất)

Bảng 1

Tên chủng	Số thứ tự	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Tên chủng	Số thứ tự	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)
KCCM11016P/pECCG117	1	43,2	43,8	KCCM11016P/M24	1	46,8	46,5
	2	44,3			2	46,0	
	3	43,9			3	46,7	
KCCM11016P/A56	1	43,5	43,4	KCCM11016P/O9	1	44,0	43,8
	2	44,3			2	43,8	
	3	42,5			3	43,6	
KCCM11016P/C2	1	41,8	42,2	KCCM11016P/Q21	1	43,1	42,8
	2	42,6			2	42,5	
	3	42,3			3	42,9	
KCCM11016P/D34	1	45,2	44,6	KCCM11016P/P85	1	43,1	43,4
	2	44,5			2	43,5	
	3	44,0			3	43,6	
KCCM11016P/F90	1	43,9	44,6	KCCM11016P/P95	1	44,6	44,4
	2	45,5			2	44,3	
	3	44,4			3	44,4	
KCCM11016P/H15	1	47,6	46,8	KCCM11016P/R48	1	42,6	42,9
	2	46,2			2	42,4	
	3	46,7			3	43,6	
KCCM11016P/J66	1	44,3	43,8	KCCM11016P/S47	1	42,5	41,7
	2	43,5			2	41,0	
	3	43,6			3	41,6	
KCCM11016P/K14		42,9	43,4	KCCM11016P/U77		43,7	43,9
		43,5				44,5	
		43,9				43,6	

Từ các kết quả nêu trên, KCCM11016P/H15 và KCCM11016P/M24 được chọn lọc, đã thể hiện hiệu quả của khả năng sản xuất lysin tăng so với nhóm đối chứng, và plasmit được chiết bằng cách sử dụng phương pháp chiết

plasmid đã biết thông thường. Plasmid có nguồn gốc từ KCCM11016P/H15 được gọi là pEC-H15, và có nguồn gốc từ KCCM11016P/M24 được gọi là pEC-M24. Sau đó, việc phân tích trình tự nucleotit được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 và 4. Kết quả là, đã phát hiện được plasmid pEC-H15 và pEC-M24 chứa trình tự nucleotit có lần lượt trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16. Do đó, đã phát hiện ra rằng cả hai plasmid nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Do đó, gen mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được gọi là HM1524, và từ phần sau trong bản mô tả này được gọi như vậy.

Ví dụ 3: Tạo ra vector biểu hiện quá mức gen HM1524

Để xác nhận hiệu quả của HM1524 được tìm thấy trong Ví dụ 2, vector để biểu hiện quá mức gen tương ứng được tạo ra.

Trên cơ sở trình tự nucleotit đã được báo cáo, các đoạn mồi được thiết kế để cho phép cài xen các vị trí giới hạn XhoI ở các đầu 5' và 3' (các trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 5 và 6) được tổng hợp để thu được mảnh ADN chứa vùng nằm trong khoảng từ 200 bp nằm phía trên của codon HM1524 bắt đầu đến khoảng 50 bp nằm phía dưới của codon kết thúc của nó, và PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* làm khuôn mẫu. PCR được thực hiện bằng cách biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 30 chu trình bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây; và polyme hóa cuối ở 72°C trong 7 phút.

SEQ ID NO: 5: 5'-TCACTCGAGTGATGGCCAGGTTGTTGTC-3'

SEQ ID NO: 6: 5'-TCACTCGAGTTAGTCATAGGTACTAGTTT-3'

Sau khi xử lý sản phẩm khuếch đại PCR trên đây bằng enzym giới hạn XhoI, vector pECCG117 được xử lý bằng XhoI, được nối với các mảnh ADN thu được, và được biến nạp vào DH5α *E. coli*, và sản phẩm thu được được dàn lên trên môi trường LB rắn chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi sàng lọc PCR (bằng cách sử dụng các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 và 4) khuẩn lạc được biến nạp với vector trong đó gen đích được cài xen, plasmid thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmid đã biết thông thường, và plasmid này được gọi là pECCG-HM1524.

Ví dụ 4: Phân tích khả năng sản xuất lysin của chủng được đưa vào vector biểu

hiện quá mức gen HM1524

Khi đưa vector pECCG-HM1524 được tạo ra trong Ví dụ 3 vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (tức là, chủng sản xuất lysin) bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, sản phẩm thu được được dàn lên trên môi trường hộp lồng thiên nhiên chứa kanamycin (25 mg/L), và khuẩn lạc thu được sau khi nuôi cấy trong 24 giờ ở 30°C. Chủng thu được được gọi là KCCM11016P/pECCG-HM1524, và nồng độ L-lysine của canh trường nuôi cấy được phân tích sau khi nuôi cấy 3 mẻ theo phương pháp nuôi cấy trong bình của Ví dụ 2 (Bảng 2).

Bảng 2

Tên chủng	Số thứ tự	Mẻ 1		Mẻ 2		Mẻ 3	
		Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)
KCCM11016P	1	43,9	44,0	43,5	43,9	43,1	43,6
	2	44,2		43,7		43,9	
	3	43,8		44,5		43,8	
KCCM11016P/pECCG-HM1524	1	46,8	46,9	45,6	46,2	46,5	46,3
	2	46,5		46,8		45,1	
	3	47,5		46,1		47,2	

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất lysin của KCCM11016P/pECCG-HM1524, chủng trong đó gen HM1524 được biểu hiện quá mức, đã tăng 6% so với khả năng sản xuất của chủng bố mẹ, KCCM11016P.

Ví dụ 5: Tạo ra vector để cài xen tiếp nhiễm sắc thể tiếp HM1524

Để xác nhận hiệu quả của gen HM1524 được tìm thấy trong Ví dụ 4, vector được tạo ra để cài xen tiếp gen trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium*. Để khuếch đại gen khởi đầu *Pcj7*, có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* (patent Hàn Quốc số 10-0620092), các đoạn môi được tổng hợp được thiết kế để cho phép cài xen vị trí giới hạn EcoRI ở đầu 5' và vị trí giới hạn NdeI ở đầu 3' của gen khởi đầu *Pcj7* (các trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8), và cho phép cài xen vị trí giới hạn SpeI ở đầu 5' và vị trí giới hạn SalI ở đầu 3' của gen khởi đầu *Pcj7* (các trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID

NO: 9 và 10). Kết quả của việc thực hiện PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi đã được tổng hợp (các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8, và SEQ ID NO: 9 và 10) với bộ gen ADN của *Corynebacterium ammoniagenes* làm khuôn mẫu, các mảnh ADN của gen khởi đầu *Pcj7* thu được chứa các vị trí giới hạn EcoRI và NdeI ở lần lượt các đầu 5' và 3', cũng như các vị trí giới hạn SpeI và Sall ở lần lượt các đầu 5' và 3'. PCR được thực hiện bằng biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 30 chu trình bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 30 giây; và polyme hóa cuối cùng ở 72°C trong 7 phút.

Trên cơ sở trình tự nucleotit đã được báo cáo, các đoạn mồi được thiết kế để cho phép cài xen vị trí giới hạn NdeI ở vị trí codon bắt đầu và vị trí giới hạn SpeI nằm phía dưới của codon kết thúc (các trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12) được tổng hợp để khuếch đại ORF của gen HM1524. Kết quả của việc thực hiện PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12 với bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu, gen HM1524 các mảnh ADN thu được chứa các vị trí giới hạn NdeI và SpeI lần lượt ở vị trí codon bắt đầu và nằm phía dưới của codon kết thúc. PCR được thực hiện bằng biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 30 chu trình bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây; và polyme hóa cuối cùng ở 72°C trong 7 phút.

SEQ ID NO: 7: 5'-TCAGAATTCTTCCTTCAGGCTAATCTTTT-3'

SEQ ID NO: 8: 5'-TCACATATGTGTTTCCTTTCGTTGGGTAC-3'

SEQ ID NO: 9: 5'-TCAACTAGTCTTCCTTCAGGCTAATCTTT-3'

SEQ ID NO: 10: 5'-TCAGTTCGACTGTTTCCTTTCGTTGGGTAC-3'

SEQ ID NO: 11: 5'-TCACATATGCGCGTAGCTATGATTTC-3'

SEQ ID NO: 12: 5'-TCAACTAGTTTAGCCGTGATGCGTTTCAC-3'

Khi xử lý mỗi sản phẩm trong số 3 sản phẩm khuếch đại PCR nêu trên bằng enzym giới hạn tương đương với các vị trí giới hạn ở mỗi đầu, vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được nối với mảnh ADN, thu được sau khi xử lý bằng enzym giới hạn EcoR và Sall, và nhờ đó vector pDZ-Pcj7-HM1524 được tạo ra.

Ví dụ 6: Phân tích khả năng sản xuất lysin của chủng bằng việc cài xen tiếp nhiễm sắc thể của gen HM1524

Vector pDZ-Pcj7-HM1524 được tạo ra trong Ví dụ 5 được đưa vào

Corynebacterium glutamicum KCCM11016P bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, và trong số khuẩn lạc được biến nạp nhờ tái tổ hợp tương đồng, các khuẩn lạc trong đó gen HM1524 được cài xen nằm phía dưới của gen HM1524 codon kết thúc trên nhiễm sắc thể được chọn lọc. Các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14 được sử dụng để sàng lọc khuẩn lạc bằng PCR. Chủng đã chọn lọc được gọi là KCCM11016P::Pcj7-HM1524, và nồng độ L-lysine của canh trường nuôi cấy được phân tích sau khi nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy trong bình của Ví dụ 2 (Bảng 3).

SEQ ID NO: 13: 5'-GTCGAACACGCCAGAACATT-3'

SEQ ID NO: 14: 5'-TACTCTCACGATCTCACCT-3'

Bảng 3

Tên chủng	Số thứ tự	Mê 1		Mê 2		Mê 3	
		Nồng độ Lysin (g/L)	Tên chủng	Số thứ tự	Mê 1	Mê 2	Mê 3
KCCM11016P	1	45,4	44,9	44,5	44,6	44,3	44,5
	2	44,8		44,3		45,1	
	3	44,5		44,9		44,1	
KCCM11016P::Pcj7-HM1524	1	47,7	47,4	46,8	47,1	47,2	47,2
	2	47,1		47,5		46,9	
	3	47,5		47,1		47,4	

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất lysine của KCCM11016P::Pcj7-HM1524, chủng trong đó gen HM1524 được cài xen tiếp, đã tăng khoảng 6% so với khả năng sản xuất của chủng bố mẹ, KCCM11016P. Chủng KCCM11016P::Pcj7-HM1524 được gọi là CA01-2297, và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), Tổ chức lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 2 tháng 8 năm 2016, được chỉ định theo số truy nhập KCCM11876P.

Ví dụ 7: Tạo ra lysine bằng cách sử dụng vi sinh vật có nguồn gốc từ KCCM10770P trong đó gen HM1524 được cài xen tiếp

Vector pDZ-Pcj7-HM1524 được tạo ra trong Ví dụ 5 được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P, chủng sản xuất lysine (patent Hàn Quốc số 10-0924065). Đặc tính *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P nêu trên trong đó 7 gen liên kết với con đường sinh tổng hợp L-lysine được cài

xen lên nhiễm sắc thể của nó. Khuẩn lạc được phân lập có chọn lọc bằng PCR, và chủng được đưa vào gen HM1524 được gọi là *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P::Pcj7-HM1524. Sau đó, nồng độ L-lysin của canh trường nuôi cấy được phân tích sau khi nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy trong bình của Ví dụ 2 (Bảng 4).

Bảng 4

Tên chủng	Số thứ tự	Mê 1		Mê 2		Mê 3	
		Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)
KCCM10770P	1	45,7	46,1	45,8	45,9	45,8	45,5
	2	46,3		46,2		45,1	
	3	46,2		45,8		45,7	
KCCM10770P::Pcj7-HM1524	1	47,8	48,3	48,5	48,1	47,5	47,7
	2	48,5		47,5		47,5	
	3	48,7		48,2		48,1	

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất lysin của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P::Pcj7-HM1524 đã tăng khoảng 5% so với khả năng sản xuất của chủng bố mẹ.

Ví dụ 8: Tạo ra lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật có nguồn gốc từ CJ3P trong đó gen HM1524 được cài xen tiếp

Vector pDZ-Pcj7-HM1524 được tạo ra trong Ví dụ 5 được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, chủng sản xuất lysin (Binder *et al.* Genome Biology 2012, 13:R40). Đặc tính của *Corynebacterium glutamicum* CJ3P trong đó 3 gen liên quan đến sự tăng cường khả năng sản xuất L-lysin được cài xen lên nhiễm sắc thể của nó. Khuẩn lạc được phân lập có chọn lọc bằng PCR, và chủng được đưa vào gen HM1524 được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CJ3P::Pcj7-HM1524. Nồng độ L-lysin của canh trường nuôi cấy được phân tích sau khi nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy trong bình của Ví dụ 2 (Bảng 5).

Bảng 5

Tên chủng	Số	Mê 1	Mê 2	Mê 3
-----------	----	------	------	------

	thứ tự	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)
CJ3P	1	8,0	8,0	7,5	8,4	8,1	8,1
	2	7,5		8,5		7,9	
	3	8,6		9,1		8,2	
CJ3P::Pcj7-HM1524	1	11,5	11,2	10,5	11,4	11,5	11,2
	2	11,2		11,5		11,4	
	3	10,9		12,1		10,6	

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất lysin của chủng *Corynebacterium glutamicum* CJ3P::Pcj7-HM1524 đã tăng khoảng 38% so với khả năng sản xuất của chủng bố mẹ.

Ví dụ 9: Tạo ra lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật có nguồn gốc từ KCCM11347P trong đó gen HM1524 được cài xen tiếp

Vectơ pDZ-Pcj7-HM1524 được tạo ra trong Ví dụ 5 được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P, chủng sản xuất lysin (tên gọi gốc là KFCC10750, vi sinh vật này được lưu giữ lại tại Tổ chức lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest và được chỉ định theo số truy nhập KCCM11347P; patent Hàn Quốc số 10-0073610). Đặc tính của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P trong đó 3 gen liên quan đến sự tăng cường khả năng sản xuất L-lysin được cài xen lên nhiễm sắc thể của nó. Khuẩn lạc được phân lập có chọn lọc bằng PCR, và chủng được đưa vào gen HM1524 được gọi là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P::Pcj7-HM1524. Nồng độ L-lysin của canh trường nuôi cấy được phân tích sau khi nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy trong bình của Ví dụ 2 (Bảng 6).

Bảng 6

Tên chủng	Số thứ tự	Mê 1		Mê 2		Mê 3	
		Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình

			(g/L)		(g/L)		(g/L)
KCCM11347P	1	38,6	38,3	37,5	37,9	37,5	38,0
	2	37,8		38,2		38,6	
	3	38,5		38,0		37,9	
KCCM11347P::Pcj7-HM1524	1	41,5	41,9	42,1	41,9	41,6	41,7
	2	42,0		41,9		41,8	
	3	42,3		41,6		41,7	

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất lysin của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P::Pcj7-HM1524 đã tăng khoảng 10% so với khả năng sản xuất của chủng bố mẹ.

Nói chung, các kết quả nêu trên chứng minh rằng đối với chủng có hoạt tính cải thiện của gen HM1524 so với hoạt tính nội sinh của nó, khả năng sản xuất lysin được cải thiện, và đề xuất thêm rằng lysin có thể được tạo ra với lượng lớn bằng cách cải thiện hoạt tính của protein được ghi mã bởi gen nêu trên ở vi sinh vật.

Từ phần mô tả nêu trên, người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện theo các phương án cụ thể khác mà không làm thay đổi bản chất kỹ thuật hoặc các dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án cụ thể được đề cập trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án cụ thể này mà các phương án thay thế, cải biến, tương đương, và các phương án khác có thể nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bằng bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Số truy nhập

Tên Viện lưu giữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM)

Số truy nhập: KCCM11876P

Ngày truy nhập: 2/8/2016

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản xuất L-lysine thuộc giống *Corynebacterium*, có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được cải thiện so với hoạt tính nội sinh.
2. Vi sinh vật sản xuất L-lysine thuộc giống *Corynebacterium* theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium glutamicum*.
3. Phương pháp sản xuất L-lysine, bao gồm các bước:
nuôi cấy vi sinh vật sản xuất L-lysine thuộc giống *Corynebacterium*, có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được cải thiện so với hoạt tính nội sinh, trong môi trường; và
thu hồi L-lysine từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường chứa nó.
4. Phương pháp sản xuất L-lysine theo điểm 3, trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium glutamicum*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT SẢN XUẤT L-LYSIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA17196

<150> KR 10-2016-0152037

<151> 2016-11-15

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Axit amin HM1524

<400> 1

Met Arg Val Ala Met Ile Ser Met His Thr Ser Pro Leu Gln Gln Pro

1 5 10 15

Gly Thr Gly Asp Ser Gly Gly Met Asn Val Tyr Ile Leu Ser Thr Ala

20 25 30

Thr Glu Leu Ala Lys Gln Gly Ile Glu Val Asp Ile Tyr Thr Arg Ala

35 40 45

Thr Arg Pro Ser Gln Gly Glu Ile Val Arg Val Ala Glu Asn Leu Arg

50 55 60

Val Ile Asn Ile Ala Ala Gly Pro Tyr Glu Gly Leu Ser Lys Glu Glu

65 70 75 80

Leu Pro Thr Gln Leu Ala Ala Phe Thr Gly Gly Met Leu Ser Phe Thr

85 90 95

Arg Arg Glu Lys Val Thr Tyr Asp Leu Ile His Ser His Tyr Trp Leu

100 105 110

Ser Gly Gln Val Gly Trp Leu Leu Arg Asp Leu Trp Arg Ile Pro Leu

115 120 125

Ile His Thr Ala His Thr Leu Ala Ala Val Lys Asn Ser Tyr Arg Asp
 130 135 140

Asp Ser Asp Thr Pro Glu Ser Glu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Gln Gln
 145 150 155 160

Leu Val Asp Asn Ala Asp Val Leu Ala Val Asn Thr Gln Glu Glu Met
 165 170 175

Gln Asp Leu Met His His Tyr Asp Ala Asp Pro Asp Arg Ile Ser Val
 180 185 190

Val Ser Pro Gly Ala Asp Val Glu Leu Tyr Ser Pro Gly Asn Asp Arg
 195 200 205

Ala Thr Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Gly Ile Pro Leu His Thr Lys
 210 215 220

Val Val Ala Phe Val Gly Arg Leu Gln Pro Phe Lys Gly Pro Gln Val
 225 230 235 240

Leu Ile Lys Ala Val Ala Ala Leu Phe Asp Arg Asp Pro Asp Arg Asn
 245 250 255

Leu Arg Val Ile Ile Cys Gly Gly Pro Ser Gly Pro Asn Ala Thr Pro
 260 265 270

Asp Thr Tyr Arg His Met Ala Glu Glu Leu Gly Val Glu Lys Arg Ile
 275 280 285

Arg Phe Leu Asp Pro Arg Pro Pro Ser Glu Leu Val Ala Val Tyr Arg
 290 295 300

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

Val Ala Met Glu Ala Gln Ala Ser Gly Thr Pro Val Ile Ala Ala Arg
 325 330 335

Val Gly Gly Leu Pro Ile Ala Val Ala Glu Gly Glu Thr Gly Leu Leu
 340 345 350

Val Asp Gly His Ser Pro His Ala Trp Ala Asp Ala Leu Ala Thr Leu
 355 360 365

Leu Asp Asp Asp Glu Thr Arg Ile Arg Met Gly Glu Asp Ala Val Glu
 370 375 380

His Ala Arg Thr Phe Ser Trp Ala Ala Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ser
 385 390 395 400

Leu Tyr Asn Asp Ala Ile Ala Asn Glu Asn Val Asp Gly Glu Thr His
 405 410 415

His Gly

<210> 2

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nucleotit HM1524

<400> 2

```

atgcgcgtag ctatgatttc catgcacacc tctccattgc agcagcccgg aactggtgat      60
tcaggcgga tgaacgtcta cattctttcg accgcgactg agctagcgaa acagggatc      120
gaggtcgata ttacactcg tgccacgagg ccttctcagg gtgagatcgt gagagtagct      180
gagaatttgc gggtcattaa tatcgctgcg gggccgatg aggggctttc caaagaggag      240
cttcctactc agttggcggc gtttacgggc ggaatgttgt cgtttacgcg ccgggagaag      300
gttacttatg atctgatcca ttctcactat tggctgtctg gtcagggtgg gtggttgctg      360
cgcgatttgt ggcggattcc ccttattcat acggcacaca ctttggcggc ggtgaagaat      420
tcttatcgga atgattcgga cactccggag tcggaggcgc gtcgcatttg tgagcagcag      480
ctggtggata acgtgacgt gttggcgggt aacactcagg aggagatgca ggatttgatg      540
catcactacg atgcggatcc ggatcggatt tctgtggtgt caccgggtgc ggacgtggaa      600
ctttatagcc ctggaaatga tcgcgcgacg gaacgttccc gtcgtgagct gggcattccg      660
ctgcacacaa aggtagtggc ttttgtgggt cggttgacgc cgtttaaggg cccgcagggt      720
ctgatcaagg cggttgccgc gttgtttgat cgcgatccgg accgaaatct gcgcgtcatt      780
atgtgtggcg gcccttctgg tccgaatgcg acaccggata cctataggca tatggcagag      840
gaactgggag tcgaaaagcg aattcgcttt ttggaccgcg gcccgccgag cgagctagtg      900
gccgtgtatc gggcgccgga catcgtggcc gtgccaaagt ttaatgagtc cttcggactc      960
gtcgccatgg aggcgaagc cagcggcaca ccggtcattg cgccccgggt tggcggcctg     1020
cccatcgcag tcgcggaagg ggagacggga ttgcttgtcg acggccactc cccgcattgc     1080

```

tgggccgacg ccttagccac actcttggac gatgacgaaa cgcgcatcag aatgggtgaa 1140

gacgccgtcg aacacgccag aacattctcc tggggcggcca ccgccgcaca gctatcgctg 1200

ctgtacaacg acgctattgc caacgaaaat gtcgacgggtg aaacgcatca cggctaa 1257

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi của thư viện ADN bộ gen WT-1

<400> 3

acgacgggat cagtaccga

19

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi của thư viện ADN bộ gen WT-2

<400> 4

agctatctgt cgcagcgcc

19

<210> 5

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi XhoI đầu 5'

<400> 5

tcaactcgagt gatggccagg ttgttgtc

28

<210> 6

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi XhoI đầu 3'

<400> 6

tcactcgagt tagtcatagg tactagttt

29

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi EcoRI 5'

<400> 7

tcagaattct tccttcaggc taatctttt

29

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi NdeI đầu 3'

<400> 8

tcacatatgt gtttcctttc gttgggtac

29

<210> 9

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi SpeI đầu 5'

<400> 9

tcaactagtc ttccttcagg ctaatcttt

29

<210> 10

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

 <220>
 <223> Đoạn mỗi SalI đầu 3'

 <400> 10
 tcagtcgact gtttcctttc gttgggtac 29

 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi s-NdeI

 <400> 11
 tcacatatgc gcgtagctat gatttc 26

 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi t-SpeI

 <400> 12
 tcaactagtt tagccgtgat gcgtttcac 29

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi chọn lọc HM1524-1

 <400> 13
 gtcgaacacg ccagaacatt 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi chọn lọc HM1524-2

<400> 14

tactctcacg atctcaccct

20

<210> 15

<211> 4102

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pEC-H15

<400> 15

gatcggatac ggctcagtc actacgtttc ccacaccgga agggaaggcg attggtttca	60
gtgtggtttc agcccggcga agtccaaaat ctgcctgtat ggcctgaagg attcgccctcg	120
cggtgaggaa ttgctgcaga aacttggaat atacaccgaa ggccgcggat gcgtgtacat	180
caataaaccg gaagacatcg atttgatgt tttagaggcc atgatcagcg agtcatgggc	240
cggccaaggc taggttgcaa atccccacca caagttgctc tgatcagcga tttgtggtg	300
gatttttgcg tctccgccac ctgaaaccgc aaggattcac cacagattcg agttttcctt	360
tgaaacgtgg tggatccttg ccttgcaaac tttcaggaat cacaccagtc cactggcca	420
caaatgggaa acccctcaga atcgcttctg aggggttata tagcgccagt tgggtaagt	480
gcccatttgg gaaactcgac ctcttaaata ggcgtctact tgccgagctt cttcaacgtc	540
cactcgtgcg gggcctgagt tgcaaatccc caccacaaat tgctctgatt agtggatttg	600
tggtggattt ttgcgtcttc gctatctgaa accgcgagga tccaccacag attcgagttt	660
tcctttgaaa cgtggttgat ccttgccctg gaatctttca ggaatcacat cagtccact	720
ggttacaaag tggaaacccc tcagaatcgc ttctgggggg tgaactagcg ccagttgggg	780
taagtgccca tttgggaaac tcgacctctt aaatcgcgct ctacttgccg agcttcttca	840
acaactccgc ctgcacttca cgacgcctaa tcttgcccat ctgatccgc ggcattctct	900
caaagtggta gaaagtgcgc ggaaccttgt agcgggtgag gttcttgccg gcgaattcct	960

tcaggccatc cggatccagc gctgcacctt ccaccaaagt gatggcagca acgacgtttt	1020
cggagccgtc ttcacgcggg ataccaacga ctgcggaatc ttcaatgtct ggggtgctctg	1080
cgaggacttc ttcaacctca gctgggtaca cgttgaaacc gccagtgatg atgacttcct	1140
tgatgcgagc aactaggcgg atgaaccctt cttcttccat cactccgacg tcgccgggtgc	1200
ggtaccactc gccgtggaag ctgttcttgg tggtcttctt ctggttgagg taacccttga	1260
acacctgtgg gcccttgact aggacttcgc ctctcgctgcc gtccggcatg gtttcgtcga	1320
ggttttctgg gtttgcatg cgcacgatgg tgctggggaa ggggattcct acgtagcctt	1380
ggcgtcgggtg atcgctcatg gggttacca cgatgatggg ggaggtttcg gtgaggccgt	1440
agccttcgac gaggcgtccg ccggtgtgct tttccagcg ttcaacggtg cgctgggaga	1500
gtgtggatgc accggagaag gcgttgcgga ctcccttgat ggggattcct tctttttcgg	1560
aggcgtcgac gattttttcg taaaggggtg gcacgcctgg tagccagggt ggggtgtgct	1620
ttttcattac gttcatgatc aggtcgatgc gtgggggtgg aagtagcacc atttcgccac	1680
cgatgaacac ggacagtgtg ccgaccatgg tcagaccgta tgctggaac attggtaggg	1740
ctgcaagcat gcgttctggt ttgtctccga gacctggaac ccagtgtttt ccttgaggga	1800
gattggagaa caggtttccg tgggtgagct gggcaccctt ggggcgtccg gtggtgccgg	1860
aggtgtagag gatcagcgcg acggattctt tggtcacggt gggttctgaa actacgtcgt	1920
cgccgtcgcc gccattgct gcgctggtca gggtttcaa aggaacggtg ttgggggctg	1980
cgccggagag ggattcgcg ctcttgcgca gtgcagggat tgggagccga agtgctaggc	2040
gctggagtgg tggcatcgcg ttgatcatgt tgaccgacac gatgggtttc aactgggtct	2100
gtccacgtag ctgttcgacg gtgggggagg ctttgtccca gacgatggca acgcgggcac	2160
cgtggtcttt gaagggttcg agcagttcgt gggcgggtga gagcgggttg tgctcaatga	2220
ctactgcgcc gagtttcagc actgcgtaga aagctgcgat gtgctgtggg cagttgggga	2280
ggataatcgc tacgtgatcg ccggggcgga cacctagtgc gcgcaggcca gcggcagttt	2340
tgccgacttc tttgtccagt tcaccgtagg tttgtgaacg accgaaaaag taggtggctg	2400
gcttgtctgc gttgatggcc aggttgttgt cgtaaacgtc cagcagggtg gtgtcgccat	2460

attccagcga gtgtggcgtc cactctgggt agtgctggag ccattctttg gtttcgtatg	2520
ctgacatggt gtcccttcaa ctgcgttgct ttagtgccct ttagtatata gagacgtccc	2580
gctgctttct tcggcgatct agaagtgtgg catgcgcgta gctatgattt ccatgcacac	2640
ctctccattg cagcagcccc gaactggtga ttcaggcggc atgaacgtct acattctttc	2700
gaccgcgact gagctagcga aacagggtat cgaggtcgat atttacactc gtgccacgag	2760
gccttctcag ggtgagatcg tgagagtagc tgagaatttg cgggtcatta atatcgctgc	2820
ggggccgcat gaggggcttt ccaaagagga gcttctact cagttggcgg cgtttaccgg	2880
cggaatgttg tcgtttacgc gccgggagaa ggttacttat gatctgatcc attctcacta	2940
ttggctgtct ggtcaggtag ggtggttgct gcgcgatttg tggcggattc cccttattca	3000
tacggcacac actttggcgg cgggaagaa ttcttatcgg gatgattcgg aactccgga	3060
gtcggaggcg cgtcgcattt gtgagcagca gctggtggat aacgctgacg tgttggcggg	3120
gaacactcag gaggagatgc aggatttgat gcatcactac gatgcggatc cggatcggat	3180
ttctgtggtg tcaccgggtg cggacgtgga actttatagc cctggaaatg atcgcgcgac	3240
ggaacgttcc cgtcgtgagc tgggcattcc gctgcacaca aaggtagtgg cttttgtggg	3300
tcggttgacg ccgtttaagg gccgcaggt gctgatcaag gcggttgcg cgttgtttga	3360
tcgcgatocg gaccgaaatc tgcgcgtcat tatttggtgg gcccttctg gtcogaatgc	3420
gacaccggat acctataggc atatggcaga ggaactgggc gtcgaaaagc gaattcgctt	3480
tttggaaccg cggccgccga gcgagctagt ggccgtgtat cgggcggcgg acatcgtggc	3540
cgtgccaagt tttaatgagt ccttcggact cgtcgccatg gaggcgcaag ccagcggcac	3600
accggtcatt gcggcccggg ttggcggcct gcccatcgca gtcgcggaag gggagacggg	3660
attgcttgtc gacggccact ccccgcatgc ctgggcccgc gccttagcca cactcttgga	3720
cgatgacgaa acgcgcacga gaatgggtga agacgccgtc gaacacgcca gaacattctc	3780
ctgggcggcc accgccgcac agctatcgtc gctgtacaac gacgctattg ccaacgaaaa	3840
tgtcgacggt gaaacgcac acggctaagt aaacgcgcgt cgtggaacat aaagtggcaa	3900
actagtacct atgactaacg gaaaattgat tcttcttcgt cacggtcaga gcgaatggaa	3960

cgcatccaac cagttcactg gatgggtcga cgtcaatctg accgaacagg gtgaggctga 4020
 ggccaagcgc ggaggcgaac tcctcgtcga ggcaggcgtc ctcccaggcg ttgtatacac 4080
 ctcccttgctg cgtcgcgcga tc 4102

<210> 16
 <211> 3181
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pEC-M24

<400> 16
 gatcgccggg gcggacacct agtgcgcgca ggccagcggc agttttgcgg acttctttgt 60
 ccagttcacc gtaggtttgt gaacgaccga aaaagtaggt ggctggcttg tctgcgttga 120
 tggccagggtt gttgtcgtaa acgtccagca ggggtggtgtc gccatattcc agcgagtgtg 180
 gcgtccactc tgggtagtgc tggagccatt ctttggtttc gtatgctgac atgggtgtccc 240
 ttcaactgcg ttgctttagt gccctttagt atatagagac gtcccgtgc tttcttcggc 300
 gatctagaat gtgggcatgc gcgtagctat gatttccatg cacacctctc cattgcagca 360
 gcccggaaact ggtgattcag gcggcatgaa cgtctacatt ctttcgaccg cgactgagct 420
 agcgaacacag ggtatcgagg tcgatattta cactcgtgcc acgaggcctt ctcagggtga 480
 gatcgtgaga gtagctgaga atttgcgggt cattaatatc gctgcggggc cgtatgaggg 540
 gctttccaaa gaggagcttc ctactcagtt ggcggcgttt accggcggaa tgttgctggt 600
 tacgcgccgg gagaaggtta cttatgatct gatccattct cactattggc tgtctggtca 660
 ggtgggggtgg ttgctgcgcg atttgtggcg gattcccctt attcatagcg cacacacttt 720
 ggcggcgggtg aagaattctt atcgggatga ttccggacact ccggagtcgg aggcgcgtcg 780
 cttttgtgag cagcagctgg tggataacgc tgacgtgttg gcggtgaaca ctcaggagga 840
 gatgcaggat ttgatgcac actacgatgc ggatccggat cggatttctg tgggtgcacc 900
 ggggtcgggac gtggaacttt atagccctgg aaatgatcgc gcgacggaac gttcccgtcg 960

tgagctgggc attccgctgc acacaaaggt agtggccttt gtgggtcggg tgcagccgtt	1020
taagggcccg caggtgctga tcaaggcggg tgcggcgctt tttgatcgcg atccggaccg	1080
aaatctgcgc gtcattatct gtggcgggcc ttctgggtccg aatgcgacac cggataccta	1140
taggcatatg gcagaggaac tgggcgtcga aaagcgaatt cgcttttttg acccgcgccc	1200
gccgagcgag ctagtggccg tgtatcgggc ggcggacatc gtggccgtgc caagttttaa	1260
tgagtccttc ggactcgtcg ccatggaggc gcaagccagc ggcacaccgg tcattgcggc	1320
ccgggttggc ggcttgccta tcgcagtcgc ggaaggggag acgggattgc ttgtcgacgg	1380
ccactccccg catgcctggg ccgacgcctt agccacactc ttggacgatg acgaaacgcg	1440
catcagaatg ggtgaagacg ccgtcgaaca cgccagaaca ttctcctggg cggccaccgc	1500
cgcacagcta tcgtcgtgtg acaacgacgc tattgccaac gaaaatgtcg acggtgaaac	1560
gcatcacggc taagtaaacg cgcgtcgtgg aacataaagt ggcaaactag tacctatgac	1620
taacggaaaa ttgattcttc ttctgcacgg tcagagcgaa tggaacgcat ccaaccagtt	1680
cactggatgg gtcgacgtca atctgaccga acaggggtgag gctgaggcca agcgcggagg	1740
cgaactcctc gtcgaggcag gcgtcctccc aggcgttgta tacacctcct tgctgcgtcg	1800
cgcgatccgc actgcaaaca tcgcactgaa cgctgcagac cgccactgga tccagtgat	1860
ccgcgactgg cgctcaacg agcgtcacta cggcgactg cagggccttg acaaggctgc	1920
aaccaaggaa aaatacggcg acgaccagtt catggaatgg cgccgctcct acgacacccc	1980
accaccagag ctgcgggatg acgcagagta ctcccaggca aatgaccctc gttacgcgga	2040
cctcgacgta gttccacgca ccgaatgcct caaggacgtt gtggttcgtt ttgttcctta	2100
cttcgaggaa gaaatcctgc cacgcgcaaa gaaggcgaa accgtcctca tcgcagcaca	2160
cggcaactcc ctgcgtgcgc tggtaagca ccttgacggc atctccgatg ctgatatcg	2220
agagctcaac atcccaaccg gcatcccaact ggtctacgaa atcgccgaag acggttcgt	2280
agtaaaccga ggcggcacct acctcgatcc tgaggcagca gcagccggcg cagcagcagt	2340
agcaaaccag ggtaataagt agctatttgt aggtgagcac tcttcttgct ttctgattgg	2400
gcgtggtcct catgggcctc gccctacctg cgtatacgaa aattaaagat cggatgcgtc	2460

gccacaagtc cgcggtcacc ctgtccgaaa accaggtcac cacggtggg caggtcctcc	2520
acctggcgat tcaaggctcc ccaacgggaa tcacggttgt cgatcgacc ggcgacgtca	2580
tcttatccaa cgcccgcc cacaattgg gcatcgcca cgaaagatcc gtcgacggca	2640
acgtttggcg cgtcgcccag gaagccttc aagaccaaga aaccactca ctcgacgtcc	2700
accagaccg caatccggg cgccgggta gtgcacac cgagtgag gcagtggtca	2760
agcctttaac gcttatcgac gatcgtttcg tgatcatcta tgctccgac gaatccgaaa	2820
acgtgcgat ggaatcgga cgccgagact tcgtcgaaa cgtctccac gaactgaaaa	2880
ccccgtcg cgcatggca ctctcgcg aagccctcat ggaatcctc gacgaccag	2940
aacaagtcga atacttcgga tccaggctcc accggaagc ccaccgatg gccgacatga	3000
tcaacgaact gatctccct tccaaacttc agggcgccga acgactccct gatatggaac	3060
ccgtccaggc tgacgacac atcagcgaag ccacgaacg caccactc gccgcccaca	3120
acgccaacat cgaaatcatt cgcgcgacc gcaccggcgt ttgggtagaa gccgatgat	3180
c	3181