



(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)



1-0038143

(51)⁸ C12N 15/77; C12P 13/06; C12N 9/10

(13) B

(21) 1-2018-01973

(22) 21/10/2016

(86) PCT/KR2016/011923 21/10/2016

(87) WO/2017/069578 27/04/2017

(30) 10-2015-0148157 23/10/2015 KR

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/07/2018 364A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) KWON, Su Yon (KR); JANG, Jae Woo (KR); KIM, Min Se (KR); KIM, Ju Jeong (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT L-ISOLEUXIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-ISOLEUXIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-isoleuxin mà chứa protein có hoạt tính của xitramalat synthaza, và phương pháp sản xuất L-isoleuxin sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-isoleuxin và phương pháp sản xuất L-isoleuxin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit amin mạch nhánh dùng để chỉ ba axit amin là L-valin, L-leuxin và L-isoleuxin và được sử dụng trong công nghiệp làm phụ gia thực phẩm, dược phẩm, v.v.. Cụ thể là, L-isoleuxin được chuyển hóa trong cơ thể tạo ra năng lượng, và tham gia vào quá trình tạo thành hemoglobin trong khi thực hiện chức năng làm giảm mệt mỏi và thúc đẩy sinh trưởng. Theo đó, L-isoleuxin có nhiều công dụng khác nhau như chế phẩm dạng lỏng, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, v.v., và việc sử dụng của nó làm thực phẩm bổ sung trong tập luyện đang tăng lên.

L-isoleuxin được sinh tổng hợp từ các tiền chất pyruvat và 2-xetobutyrat thông qua ba chất trung gian chuyển hóa (Jinhwan Park *et al.*, Appl. Microbial. Biotechnol. 85: 491-506, 2010).

Tuy nhiên, trong quá trình sinh tổng hợp của L-isoleuxin, threonin dehydrataza (gen *ilvA*), tạo ra 2-xetobutyrat từ L-isoleuxin, và sau đó axit axetohydroxy synthaza (gen *ilvBN*) cả hai đều chịu sự ức chế hồi dưỡng bởi L-isoleuxin.

Theo đó, đã biết rằng việc điều hòa của các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp bằng việc giải phóng từ sự ức chế hồi dưỡng bởi L-isoleuxin là thành phần quan trọng trong việc tạo ra chủng sản xuất L-isoleuxin có hiệu suất cao (Jinhwan Park *et al.*, Biotechnology Journal, 560-577, 2010). Ngoài ra, các axit amin mạch nhánh được tạo ra thông qua các con đường sinh tổng hợp giống nhau như pyruvat, và theo đó, việc tạo ra L-isoleuxin quy mô lớn có hiệu suất cao cần sự cung cấp L-threonin trọn chu trong bước trước 2-xetobutyrat (bằng sáng chế Hàn Quốc số. 10-0823044).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả đã thử nghiệm con đường sinh tổng hợp mới mà không sử dụng

L-threonin làm tiền chất, và đưa gen có hoạt tính xitramalat synthaza vào con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin. Kết quả là, các tác giả xác nhận rằng việc đưa vào này cải thiện việc sản xuất L-isoleuxin, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có con đường sinh tổng hợp mới được đưa vào và có khả năng sản xuất L-isoleuxin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-isoleuxin, bao gồm nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp có con đường sinh tổng hợp mới được đưa vào trong môi trường; và thu hồi L-isoleuxin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

Ưu điểm của sáng chế

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-isoleuxin theo sáng chế có hoạt tính xitramalat synthaza được đưa vào, và có thể sản xuất L-isoleuxin hiệu suất cao thông qua con đường sinh tổng hợp mới mà không sử dụng L-threonin làm tiền chất.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, để đạt được mục đích của sáng chế, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-isoleuxin và chứa protein có hoạt tính của xitramalat synthaza.

Thuật ngữ “L-isoleuxin” theo sáng chế dùng để chỉ axit amin thiết yếu, và theo cấu trúc, dùng để chỉ L-axit amin có công thức $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, tương ứng với axit amin mạch nhánh cùng với L-valin và L-leuxin.

Thuật ngữ “có khả năng sản xuất L-isoleuxin” theo sáng chế chỉ ra rằng khi vi sinh vật liên quan được nuôi cấy trong môi trường, nó biểu hiện khả năng tích tụ L-isoleuxin trong môi trường hoặc trong chính vi sinh vật. Khả năng sản xuất L-isoleuxin này có thể được kế thừa bởi chủng kiểu đại hoặc được tạo thành hoặc được tăng cường bằng cách biến đổi chủng.

Ví dụ, để có khả năng sản xuất L-isoleuxin, vi sinh vật có thể tuân theo các phương pháp được sử dụng để biến đổi chỉ một mình vi sinh vật hoặc kết hợp, chẳng hạn như thu được thể đột biến dinh dưỡng thụ động, thể đột biến đề kháng tương tự hoặc thể đột biến điều hòa chuyển hóa hoặc xây dựng chủng tái tổ hợp trong đó hoạt

tính enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-isoleuxin được tăng cường.

Ngoài ra, trong trường hợp tăng cường hoạt tính của enzym tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-isoleuxin, gen đích tham gia trong quá trình sinh tổng hợp L-isoleuxin, cụ thể là các gen *ilvG*, *ilvM*, *ilvE*, *ilvD* và *ilvA*, có thể được tăng cường một mình hoặc kết hợp hai hoặc nhiều gen. Các gen *ilvG*, *ilvM*, *ilvE*, *ilvD* và *ilvA* lần lượt mã hóa cho tiểu phần lớn và nhỏ của isoenzym II của axit axetohydroxy synthaza, transaminaza, axit dihydroxy dehydrotaza, và threonin deaminaza.

Thuật ngữ “xitramalat synthaza (EC2.3.1.182)” theo sáng chế là enzym xúc tác để chuyển hóa axetyl-coA và pyruvat thành xitramalat và coenzym A. Enzym này được tìm thấy ở cổ khuẩn chẳng hạn như *Methanocaldococcus jannaschii* (Howell *et al.*, J Bacteriol. 181: 331-333, 1999), *Leptospira interrogans* (Xu *et al.*, J Bacteriol. 186: 5400-5409, 2004), và *Geobacter sulfurreducens*, và tham gia trong con đường độc lập threonin trong quá trình sinh tổng hợp isoleuxin (Risso *et al.*, J Bacteriol. 190: 2266-2274, 2008). Enzym có tính đặc hiệu cao với pyruvat làm cơ chất, và được biết đến là thường bị ức chế bởi isoleuxin.

Các thuật ngữ “protein có hoạt tính xitramalat synthaza” và “gen mã hóa protein này” theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ protein nào có hoạt tính xitramalat synthaza như được mô tả ở trên và bất kỳ gen nào mã hóa cho các protein này mà không bị giới hạn.

Cụ thể, protein có hoạt tính xitramalat synthaza có thể có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus*, và cụ thể hơn là *Methanocaldococcus jannaschii*. Xitramalat synthaza có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và gen *cimA* mã hóa cho trình tự axit amin này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2. Các trình tự axit amin của protein cho thấy hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào loài hoặc chủng vi sinh vật, hoặc nhiều axit nucleic có chức năng tương tự có thể mã hóa cho protein định trước bất kỳ do mã di truyền có tính thoái hóa, và theo đó, các trình tự không bị giới hạn ở các SEQ ID NO được mô tả ở trên.

Ngoài ra, các protein về cơ bản có hoạt tính xitramalat synthaza có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này mà không bị giới hạn miễn là protein về cơ bản có hoạt tính xitramalat synthaza như là trình tự axit amin tương đồng 70% hoặc nhiều hơn với SEQ ID NO: 1, tốt hơn là tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là

tương đồng 90% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là tương đồng 95% hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là tương đồng 98% hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra, nếu trình tự axit amin có độ tương đồng đối với các trình tự về cơ bản có hoạt tính sinh học tương tự hoặc tương ứng với protein nêu trong SEQ ID NO: 1, trình tự axit amin mà phần của nó bị mất, biến đổi, thay thế hoặc thêm rõ ràng vẫn nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ngoài ra, gen mã hóa xitramalat synthaza có thể có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Ở đây, do sự thoái hóa của các mã bộ ba hoặc liên quan đến các mã bộ ba được ưu tiên hơn bởi các sinh vật để biểu hiện protein, polynucleotit có thể có nhiều biến đổi khác nhau trong các vùng mã hóa nằm trong phạm vi mà trình tự axit amin của protein không bị thay đổi. Trình tự polynucleotit có thể, ví dụ, có trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và trình tự nucleotit tương đồng 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nếu tương đồng 90% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa tương đồng 99% hoặc nhiều hơn, nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, để thu hồi đột biến có hoạt tính tăng cường của xitramalat synthaza, sáng chế đề xuất thư viện đột biến của CimA(M) được thu hồi bằng cách sử dụng phản ứng PCR dễ bị lỗi (error-prone PCR) như đột biến của protein nêu trong SEQ ID NO: 1.

Cụ thể, thư viện đột biến của CimA(M) theo sáng chế có thể bao gồm các thành phần dưới đây:

CimA(M)m1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4);

CimA(M)m2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6);

CimA(M)m3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8);

CimA(M)m4 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 10);

CimA(M)m5 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 12);

CimA(M)m6 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 14); và

CimA(M)m7 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15 (cụ thể, có thể được mã hóa từ polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 16).

Ngoài ra, bất kỳ protein nào về cơ bản có hoạt tính của đột biến xitramalat synthaza có nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn miễn là protein về cơ bản có hoạt tính của đột biến xitramalat synthaza như trình tự axit amin có độ tương đồng đối với trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn.

Thuật ngữ “độ tương đồng” theo sáng chế đề cập đến mức độ tương đồng đối với trình tự nucleotit hoặc axit amin được cho, và có thể được biểu diễn theo tỉ lệ phần trăm. Theo sáng chế, độ tương đồng về trình tự có hoạt tính tương đồng hoặc tương tự đối với trình tự nucleotit hoặc axit amin được cho được biểu diễn là “% tương đồng”. Ví dụ, độ tương đồng có thể được đồng nhất bằng cách sử dụng phần mềm chuẩn, cụ thể là BLAST 2.0, để tính toán các thông số như là điểm, tính giống nhau và độ tương đồng hoặc bằng cách so sánh các trình tự thông qua kỹ thuật lai hóa Southern dưới các điều kiện nghiêm ngặt được quy định. Các điều kiện lai hóa thích hợp có thể được xác định trong phạm vi của lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989), và có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo phương án cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể chứa xitramalat synthaza nêu trong SEQ ID NO: 1 có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus jannaschii*, thể đột biến của nó, và gen mã hóa protein có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, và 15. Cụ thể hơn, gen mong muốn có thể được biểu hiện bằng cách biến nạp các vectơ tái tổ hợp chứa mỗi gen vào trong vi sinh vật.

Thuật ngữ “vectơ tái tổ hợp” theo sáng chế dùng để chỉ cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein mong muốn, được liên kết có thể thao tác với trình tự điều hòa thích hợp để biểu hiện protein mong muốn trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa bao gồm vùng gen khởi đầu (promoter) có thể bắt đầu quá

trình phiên mã, trình tự vùng điều khiển tùy ý để điều hòa sự phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí liên kết riboxom mARN thích hợp, và trình tự điều hòa việc kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector tái tổ hợp được chuyển vào tế bào chủ thích hợp, vector tái tổ hợp này có thể được sao chép hoặc thực hiện chức năng không liên quan đến hệ gen của vật chủ, và có thể được tích hợp vào hệ gen của chính nó.

Vector tái tổ hợp được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể sao chép trong tế bào chủ, và có thể sử dụng bất kỳ vector nào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các vector được sử dụng thông thường có thể bao gồm plasmit, cosmit, virus và thể thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, là vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, hoặc các vector tương tự có thể được sử dụng. Là vector plasmit, loại pBR, loại pUC, loại pBluescriptII, loại pGEM, loại pTZ, loại pCL, loại pET, hoặc các vector tương tự có thể được sử dụng. Vector có thể được sử dụng trong sáng chế này không bị giới hạn cụ thể, và các vector biểu hiện đã biết bất kỳ có thể được sử dụng. Cụ thể, vector pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, hoặc pCC1BAC, hoặc các vector tương tự có thể được sử dụng.

Theo phương án minh họa, tế bào chủ có thể đưa polynucleotit mã hóa protein mong muốn trong nhiễm sắc thể bởi vector để chèn đoạn nhiễm sắc thể. Việc đưa polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, nhưng không giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “biến nạp” theo sáng chế có nghĩa là vector tái tổ hợp chứa polynucleotit mã hóa protein đích được đưa vào trong tế bào chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Polynucleotit biến nạp có thể là polynucleotit bất kỳ miễn là polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, không quan tâm đến liệu polynucleotit có được chèn vào trong hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể.

Ngoài ra, cụm từ “liên kết có thể thao tác” đề cập đến liên kết chức năng giữa các trình tự vùng gen khởi đầu mà bắt đầu và điều chỉnh sự phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích theo sáng chế, và trình tự gen.

Trong khi đó, theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi

Corynebacterium có thể còn có các hoạt tính tăng cường của 3-isopropylmalat dehydrogenaza và 3-isopropylmalat dehydrataza.

Thuật ngữ “tăng cường của hoạt tính protein” theo sáng chế đề cập đến hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính của protein trước khi được biến đổi hoặc kiểu đại. Cụ thể, việc tăng cường của hoạt tính protein có thể bao gồm việc tăng hoạt tính dẫn đến cải thiện hoạt tính của gen nội sinh mã hóa protein, khuếch đại gen nội sinh bằng các yếu tố bên trong hoặc bên ngoài, loại bỏ yếu tố điều hòa để ngăn chặn sự biểu hiện của gen, tăng số lượng bản sao của gen, đưa vào gen ngoại lai, biến đổi của trình tự điều hòa biểu hiện, cụ thể, thay thế hoặc biến đổi của vùng gen khởi đầu và đột biến bên trong gen.

Cụ thể, việc tăng cường hoạt tính của 3-isopropylmalat dehydrogenaza và 3-isopropylmalat dehydrataza có thể được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm:

- 1) tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein này;
- 2) biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện của polynucleotit;
- 3) biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của protein; loại bỏ yếu tố điều hòa để ngăn biểu hiện của gen; hoặc
- 4) tổ hợp của chúng; tuy nhiên, phương pháp không chỉ giới hạn cụ thể ở đó.

Phương pháp tăng số lượng bản sao của polynucleotit có thể được thực hiện theo các dạng liên kết có thể thao tác đối với vector, hoặc bằng cách chèn vào trong nhiễm sắc thể trong tế bào chủ; tuy nhiên, phương pháp không chỉ giới hạn cụ thể ở đó. Cụ thể, có thể thực hiện bằng cách chèn vector vào trong tế bào chủ, trong đó vector được liên kết có thể thao tác với polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế, và có thể sao chép và thực hiện chức năng không liên quan đến tế bào chủ. Ngoài ra, có thể thực hiện bằng phương pháp để tăng số lượng bản sao của polynucleotit bên trong nhiễm sắc thể trong tế bào chủ bằng cách chèn vector vào trong tế bào chủ, trong đó vector được liên kết có thể thao tác với polynucleotit và cho phép polynucleotit được chèn vào trong nhiễm sắc thể trong tế bào chủ.

Phương pháp biến đổi trình tự điều hòa để tăng biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên trình tự này bằng cách loại bỏ, chèn

thêm hoặc thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự axit nucleic, hoặc tổ hợp các đột biến này, sao cho hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện có thể được tăng cường, hoặc bằng cách thay thế trình tự này bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính tăng cường; tuy nhiên, phương pháp không bị giới hạn cụ thể ở đó. Trình tự điều hòa biểu hiện bao gồm vùng gen khởi đầu, trình tự vùng điều khiển, trình tự mã hóa cho vị trí liên kết riboxom, trình tự điều hòa việc kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Vùng gen khởi đầu khác loại mạnh thay cho vùng gen khởi đầu ban đầu có thể được liên kết với phần đầu của đơn vị để biểu hiện polynucleotit, và các ví dụ về vùng gen khởi đầu mạnh có thể bao gồm vùng gen khởi đầu cj7 (patent Hàn Quốc số 10-0620092 và công bố đơn quốc tế số WO 2006/065095), vùng gen khởi đầu EF-Tu, vùng gen khởi đầu groEL, vùng gen khởi đầu aceA hoặc aceB, và tốt hơn là, vùng gen khởi đầu cj7 là vùng gen khởi đầu từ *Corynebacterium* được liên kết có thể thao tác sao cho tốc độ biểu hiện của polynucleotit mã hóa protein được tăng lên.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên trình tự điều hòa biểu hiện bằng loại bỏ, chèn thêm, hoặc thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự axit nucleic, hoặc tổ hợp của các đột biến này, sao cho hoạt tính của trình tự polynucleotit có thể được tăng cường, hoặc bằng cách thay thế trình tự này bằng trình tự polynucleotit đã biến đổi có hoạt tính được tăng cường; tuy nhiên, phương pháp không giới hạn cụ thể ở đó.

Các thuật ngữ “3-isopropylmalat dehydrogenaza” và “3-isopropylmalat dehydrataza” theo sáng chế đề cập đến các enzym tham gia vào các con đường sinh tổng hợp L-leuxin, L-isoleuxin và L-valin. Protein có hoạt tính của các enzym và gen mã hóa protein này có thể bao gồm các protein bất kỳ có hoạt tính của các enzym và gen bất kỳ mã hóa protein này mà không bị giới hạn.

Cụ thể, theo sáng chế, 3-isopropylmalat dehydrogenaza (EC1.1.1.85) có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể hơn là từ *Corynebacterium glutamicum*. Trong khi đó, 3-isopropylmalat dehydrogenaza theo sáng chế có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17. Ngoài ra, bất kỳ protein nào về cơ bản có hoạt tính của 3-isopropylmalat dehydrogenaza như là trình tự axit amin về cơ bản có độ tương đồng với SEQ ID NO: 17 là 70% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều

hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nhiều nữa là 99% hoặc nhiều hơn có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn.

Ngoài ra, gen mã hóa 3-isopropylmalat dehydrogenaza có thể có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17. Các trình tự axit amin của protein có hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào các loài hoặc chủng vi sinh vật, hoặc nhiều axit nucleic có chức năng tương tự có thể mã hóa cho các protein định trước bất kỳ do mã di truyền có tính thoái hóa, và theo đó, các gen không giới hạn ở các SEQ ID NO được mô tả ở trên. Ví dụ, gen có thể có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 18, hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng với SEQ ID NO: 18 là 80%, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra, 3-isopropylmalat dehydrataza (EC4.2.1.33) theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể hơn là từ *Corynebacterium glutamicum*. Trong khi đó, 3-isopropylmalat dehydrataza theo sáng chế bao gồm hai tiểu phần lớn/nhỏ có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 và 21. Ngoài ra, bất kỳ protein nào về cơ bản có hoạt tính của 3-isopropylmalat dehydrataza có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn miễn là protein về cơ bản có hoạt tính của 3-isopropylmalat dehydrataza như trình tự axit amin có độ tương đồng với các SEQ ID NO: 19 và 21 là 70% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nhiều nữa là 99% hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra, gen mã hóa 3-isopropylmalat dehydrataza có thể có trình tự nucleotit mã hóa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 và 21. Các trình tự axit amin của protein có hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào các loài hoặc chủng vi sinh vật, hoặc nhiều axit nucleic có chức năng tương tự có thể mã hóa cho các protein định trước bất kỳ do mã di truyền có tính thoái hóa, và theo đó, các gen không giới hạn ở các SEQ ID NO này. Ví dụ, gen có thể có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 20 và 22, hoặc các trình tự nucleotit có độ tương đồng là 80%, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn.

Trong khi đó, theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể chứa enzym tham gia vào con đường sinh tổng hợp của

L-isoleuxin còn có hoạt tính được tăng cường.

Theo sáng chế, thuật ngữ “enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp của L-isoleuxin” có thể bao gồm aspartat kinaza (gen *lysC*), aspartat- β -semialdehyt dehydrogenaza (gen *asd*), homoxerin dehydrogenaza (gen *hom*), homoxerin kinaza (gen *thrB*), threonin synthaza (gen *thrC*), threonin dehydrataza (gen *ilvA*), aminotransferaza (gen *ilvE*), hoặc tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Trong khi đó, theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể còn bao gồm pyruvat dehydrogenaza bị bất hoạt.

Thuật ngữ “pyruvat dehydrogenaza (EC1.2.4.1)” theo sáng chế dùng để chỉ enzym chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA và CO₂. Sáng chế có thể điều chế chủng bị mất gen *aceE* mã hóa enzym gia tăng sự cung cấp axetyl-CoA được sử dụng làm tiền chất của gen *cimA*.

Cụ thể, pyruvat dehydrogenaza (EC1.2.4.1) theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là từ *Corynebacterium glutamicum*. Trong khi đó, pyruvat dehydrogenaza theo sáng chế có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25. Ngoài ra, bất kỳ protein nào về cơ bản có hoạt tính của pyruvat dehydrogenaza như là trình tự axit amin về cơ bản có độ tương đồng với SEQ ID NO: 25 là 70% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn.

Ngoài ra, gen mã hóa pyruvat dehydrogenaza có thể có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25. Các trình tự axit amin của protein cho thấy hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào các loài hoặc chủng vi sinh vật, hoặc nhiều axit nucleic có chức năng tương tự có thể mã hóa cho các protein định trước bất kỳ do mã di truyền có tính thoái hóa, và theo đó, các gen không giới hạn ở các SEQ ID NO được mô tả ở trên. Ví dụ, gen có thể có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 26, hoặc các trình tự nucleotit có độ tương đồng là 80%, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn.

Thuật ngữ “bất hoạt” theo sáng chế dùng để chỉ các trường hợp trong đó gen mã hóa polypeptit liên quan không được biểu hiện, biểu hiện giảm hoạt tính do biểu

hiện không hoàn toàn, hoặc không tạo ra các polypeptit chức năng liên quan, thậm chí là gen được biểu hiện.

Ngoài ra, thuật ngữ dùng để chỉ trường hợp trong đó gen mã hóa polypeptit liên quan về cơ bản không được biểu hiện do mức độ biểu hiện thấp đáng kể cũng như trong trường hợp trong đó gen hoàn toàn bị bất hoạt. Theo đó, việc bất hoạt gen có thể hoàn toàn (bất hoạt) hoặc một phần (ví dụ, gen có thể biểu hiện hình thái ở mức độ thấp hơn bình thường hoặc sản phẩm của gen đột biến cho thấy giảm một phần trong hoạt tính bị tác động bởi gen).

Ngoài ra, “việc bất hoạt” của polypeptit liên quan theo sáng chế bao gồm các trường hợp loại bỏ hoạt tính của polypeptit cũng như giảm hoạt tính của polypeptit so với chủng không bị biến đổi. Cụ thể, việc bất hoạt của threonin dehydrataza theo sáng chế có thể được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm:

- 1) loại bỏ một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa cho protein;
- 2) biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện để giảm biểu hiện của polynucleotit;
- 3) biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để làm giảm hoạt tính của protein; hoặc
- 4) tổ hợp của chúng; tuy nhiên, phương pháp không giới hạn cụ thể ở đó.

Phương pháp loại bỏ một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa cho protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể bằng gen đánh dấu hoặc polynucleotit trong đó trình tự axit nucleic bị loại bỏ một phần, thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể vào trong vi khuẩn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “một phần” có thể khác nhau tùy thuộc vào các loại polynucleotit, nhưng có thể đề cập cụ thể đến từ 1 đến 300 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 1 đến 100 nucleotit, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 50 nucleotit.

Phương pháp biến đổi trình tự điều hòa để làm giảm biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách gây ra đột biến trên trình tự bằng cách loại bỏ, chèn thêm hoặc thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự axit nucleic, hoặc tổ hợp của các đột biến này, sao cho hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện bị suy giảm, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính suy giảm; tuy nhiên, phương pháp không giới hạn cụ thể ở đó. Trình tự điều hòa biểu hiện bao gồm

vùng gen khởi đầu, trình tự vùng điều khiển, trình tự mã hóa vị trí liên kết riboxom, trình tự điều hòa việc kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc tương tự; nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi của trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên trình tự này bằng cách loại bỏ, chèn thêm hoặc thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự polynucleotit, hoặc tổ hợp các đột biến này, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự polynucleotit bị biến đổi có hoạt tính suy giảm; tuy nhiên, phương pháp này không giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh cụ thể khác của sáng chế, vi sinh vật bất kỳ làm vi sinh vật để sản xuất L-isoleuxin có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn, miễn là vi sinh vật có thể được biểu hiện bằng cách đưa protein có hoạt tính xitramalat synthaza vào. Các ví dụ về vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Selenomanas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arcanobacterium*, *Alcaligenes*, hoặc các chi tương tự, và cụ thể là chi *Corynebacterium*, cụ thể hơn nữa là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không giới hạn ở đó.

Tuy nhiên, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-isoleuxin bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa protein có hoạt tính xitramalat synthaza trong môi trường; và

thu hồi L-isoleuxin từ vi sinh vật hoặc môi trường,

trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có gen được đưa vào mã hóa cho protein có hoạt tính xitramalat synthaza như được mô tả ở trên.

Tóm lại, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể có gen được đưa vào mã hóa cho xitramalat synthaza có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus*, trong đó xitramalat synthaza tốt hơn là có thể có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 và 15.

Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể còn bao gồm các hoạt tính được tăng cường của 3-isopropylmalat dehydrogenaza và

3-isopropylmalat dehydrataza. Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể còn bao gồm pyruvat dehydrogenaza bị bất hoạt.

Cụ thể, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo ví dụ của sáng chế có thể là *Corynebacterium glutamicum* có gen được đưa vào mã hóa cho xitramalat synthaza.

Theo phương pháp này, việc nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy bổ sung theo mẻ đã biết, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó.

Cụ thể, đối với các điều kiện nuôi cấy, độ pH thích hợp (ví dụ, pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9, và tốt hơn là, pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit photphoric hoặc axit sunphuric), nhưng không giới hạn cụ thể ở đó. Ngoài ra, sự hình thành bong bóng có thể được kiểm chế do chất chống tạo bọt, như este của polyglycol axit béo.

Oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy có thể được đưa vào trong môi trường để duy trì điều kiện hiếu khí, và nhiệt độ môi trường thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20°C to 40°C. Quá trình nuôi cấy liên tục cho đến khi thu được lượng tối đa của L-isoleuxin tạo ra, và có thể mất từ 10 giờ đến 160 giờ để đạt được mục đích này. L-isoleuxin có thể được tiết vào trong môi trường hoặc có thể được giữ trong các tế bào.

Ngoài ra, khi nguồn cacbon cho môi trường nuôi cấy được sử dụng, đường và các cacbohydrat (ví dụ, glucosơ, sucrosơ, lactosơ, fructosơ, maltosơ, mật rỉ đường, tinh bột và xenlulozơ), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu lạc và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), hoặc tương tự có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn cacbon không chỉ giới hạn ở đó.

Là nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, chiết xuất nấm men, nước ép thịt, chiết xuất mạch nha, phần lắng của ngô, bột thịt đậu nành, và ure), hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sunphat, amoni clorua, amoni photphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), hoặc tương tự có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không chỉ giới hạn ở đó.

Là nguồn photpho, kali dihydro photphat, dikali hydro photphat, các muối chứa natri tương ứng, hoặc tương tự có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp, nhưng nguồn photpho không chỉ giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, trong lúc nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo phương pháp để sản xuất L-isoleuxin, axetat có thể còn được cung cấp thêm.

Đối với phương pháp thu hồi L-isoleuxin được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp này, phương pháp thích hợp có thể được sử dụng để thu hồi axit amin đích từ chất lỏng nuôi cấy phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy bổ sung theo mẻ, v.v.. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, tinh thể hóa, HPLC, hoặc các kỹ thuật tương tự có thể được sử dụng, nhưng phương pháp để thu hồi L-isoleuxin không chỉ giới hạn ở đó.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa protein có hoạt tính xitramalat synthaza để sản xuất L-isoleuxin.

Trong việc sử dụng này, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có gen được đưa vào mã hóa protein có hoạt tính xitramalat synthaza như được mô tả ở trên.

Như được mô tả ở trên, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để sản xuất L-isoleuxin theo sáng chế có thể sản xuất L-isoleuxin hiệu suất cao thông qua con đường sinh tổng hợp mới mà không sử dụng L-threonin làm tiền chất bằng cách đưa vào hoạt tính của xitramalat synthaza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xây dựng vector tái tổ hợp chứa gen cimA có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus*

<1-1> Điều chế mảnh của gen cimA có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus*

Để thu được mảnh 1476 bp chứa khung đọc mở (ORF) của gen cimA (NC_000909.1) mã hóa cho xitramalat synthaza, ADN hệ gen của *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 được chiết sử dụng hệ thống Genomic-tip (Qiagen).

Xitramalat synthaza có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 có trình tự 491 axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và gen cimA mã hóa trình tự axit amin này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.

Phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được viết tắt là “PCR”) được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen (gADN) đã chiết làm khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 35 và 36 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng có kích thước mong muốn được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh cimA(M)”.

đoạn mồi cimA-5-NdeI (SEQ ID NO: 35):

5'-GCATCATATGATGGTAAGGATATTC-3'

đoạn mồi cimA-3-XbaI (SEQ ID NO: 36):

5'-CGATCTAGATTAATTCAACAACATGTT-3'

<1-2> Xây dựng vector tái tổ hợp p117-cj7-cimA(M)

Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng p117-cj7-gfp chứa vùng gen khởi đầu cj7 có nguồn gốc từ vi sinh vật đã biết thuộc chi *Corynebacterium* (patent Hàn Quốc số 10-0620092) làm khuôn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “p117” miêu tả pECCG117, là vector con thoi *E. coli*–*Corynebacterium* (Biotechnology Letters 13(10): 721-726, 1991). Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 27 và 28 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 20 giây, và kéo dài tại 72°C trong 30 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 323 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh cj7”.

đoạn mồi Pcj7-5-XbaI (SEQ ID NO: 27):

5'-GATGGTACCACCCCAGAAACATCCCAGC-3'

đoạn mồi Pcj7-3-NdeI (SEQ ID NO: 28):

5'-CGATCATATGGAGTGTTCCTTTCGTTGGG-3'

Phản ứng PRC và được thực hiện sử dụng mảnh cj7 và mảnh cimA(M) được điều chế theo ví dụ <1-1> ở trên làm khuôn. Phản ứng PCR và được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 27 và 36 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,0%, sau đó bằng 1799 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh cj7-cimA(M)”.

Mảnh cj7-cimA(M) thu được được xử lý bằng enzym giới hạn KpnI và XbaI, và sau đó kết hợp với mảnh p117 thẳng được xử lý bằng cùng các enzym giới hạn.

Các tế bào *E. coli* Dh5α được biến nạp bằng sốc nhiệt với vector đã xây dựng, sau đó được đặt trên 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin, và được nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Một vòng bạch kim của khuẩn lạc nuôi cấy được cấy chuyển vào 3 mL của 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin và nuôi cấy qua đêm, và sau đó thu hồi ADN plasmit sử dụng kit plasmit miniprep (Catalogue No. 27104, Qiagen, sau đây tương tự vậy).

Xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp bằng cách xử lý với các enzym giới hạn KpnI và XbaI, và dòng nhân bản được phát hiện bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 90 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “p117-cj7-cimA(M)”.

đoạn mồi 117-F (SEQ ID NO: 29): 5'-CCACAGCCGACAGGATGGTGA-3'

đoạn mồi 117-R (SEQ ID NO: 30): 5'-CTCAGGGTGTAGCGGTTCGGT-3'

<1-3> Điều chế mảnh của gen leuBCD tham gia vào con đường đường sinh tổng hợp 2-xetobutyrate.

Để điều chế vector tái tổ hợp để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp 2-xetobutyrate, mảnh của gen leuBCD mã hóa cho 3-isopropylmalat dehydrogenaza và 3-isopropylmalat dehydrataza có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được điều chế như được mô tả bên dưới.

Để thu mảnh 1359 bp chứa ORF của gen leuB mã hóa cho 3-isopropylmalat

dehydrogenaza (EC1.1.1.85), ADN hệ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 được chiết sử dụng hệ thống Genomic-tip (Qiagen).

3-isopropylmalat dehydrogenaza có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 có trình tự 340 axit amin được miêu tả bằng SEQ ID NO: 17, và gen leuB mã hóa cho các axit amin này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 18.

Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng gADN đã chiết làm khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 31 và 32 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng có kích thước mong muốn được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh leuB”.

đoạn mồi leuB-5-cimA (SEQ ID NO: 31):

5'-TTGTTGAATTAATCTAGAGGTGACACCCCAGTGG-3'

đoạn mồi leuB-3-leuC (SEQ ID NO: 32):

5'-TCGCAGCTGCCACCGATATTTAGCTTTGCAGCGC-3'

Để thu được mảnh 2078 bp chứa ORF của gen leuCD mã hóa cho 3-isopropylmalat dehydrataza (EC4.2.1.33), phản ứng PCR được thực hiện sử dụng gADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn.

Gen leuC mã hóa cho tiểu phần lớn của 3-isopropylmalat dehydrataza, và gen leuC có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 20 mã hóa cho polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19. Ngoài ra, gen leuD mã hóa cho tiểu phần nhỏ của 3-isopropylmalat dehydrataza, và gen leuD có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 22 mã hóa polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21.

Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 33 và 34 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 80 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng có

kích thước mong muốn được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh leuCD”.

đoạn mồi leuC-5-leuB (SEQ ID NO: 33):

5'-GCGCTGCAAAGCTAAATATCGGTGGCAGCTGCGA-3'

đoạn mồi leuD-3-XbaI (SEQ ID NO: 34):

5'-TGGCGGCCGCTCTAGAGCTTTCGCTATCAGACTG-3'

Phản ứng PRC và được thực hiện sử dụng mảnh leuB và mảnh leuCD được thu hồi ở trên làm khuôn. Phản ứng PCR và được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 31 và 34 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 120 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 3437 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh leuBCD”

<1-4> Xây dựng vector tái tổ hợp p117-cj7-cimA(M)-leuBCD

Để điều chế vector tái tổ hợp để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp 2-xetobutyrate, p117-cj7-cimA(M) là vector tái tổ hợp được xây dựng theo ví dụ <1-2> ở trên được xử lý bằng enzyme giới hạn XbaI, mảnh leuBCD được thu hồi theo ví dụ <1-3> ở trên được xử lý bằng enzyme giới hạn XbaI, sau đó cả hai mảnh này được kết nối lại.

Các tế bào *E. coli* Dh5α được biến nạp bằng sốc nhiệt với vector đã xây dựng, sau đó đặt lên trên 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin, và được nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Một vòng bạch kim của khuẩn lạc nuôi cấy được cấy chuyển vào 3 mL của 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin và nuôi cấy qua đêm, và sau đó ADN plasmit được thu hồi bằng cách sử dụng kit plasmit miniprep.

Xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp bằng cách xử lý với enzyme giới hạn XbaI, và dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 180 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “p117-cj7-cimA(M)-leuBCD”.

<1-5> Điều chế mảnh của thể đột biến *cimA(M)* sử dụng phản ứng PCR để bị lỗi.

Để đảm bảo tập hợp ADN có đột biến ngẫu nhiên được đưa vào trong gen *cimA*, phản ứng PCR được thực hiện sử dụng mảnh *cimA(M)* thu hồi trong ví dụ <1-1> ở trên làm khuôn và kit gây đột biến ngẫu nhiên của phản ứng PCR tăng lên (Catalogue No. 630703, Clontech). Phản ứng PCR được thực hiện trong điều kiện 4 của phản ứng gây đột biến trong bảng III theo sổ tay người dùng của sản phẩm bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 35 và 36 dưới các điều kiện dưới đây: 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây và kéo dài ở 68°C cho 30 giây.

Kết quả của phản ứng PCR, tập hợp ADN *cimA* kỹ thuật đột biến có sự biến đổi thay thế nucleotit ngẫu nhiên được điều chế. Sản phẩm PCR (sau đây, gọi là “mảnh *cimA(M)m*”) được điện di trên gel agarozơ 1,0% sau đó tách rửa để thu hồi.

đoạn mồi *cimA*-5-NdeI (SEQ ID NO: 35):

5'-GCATCATATGATGGTAAGGATATTC-3'

đoạn mồi *cimA*-3-XbaI (SEQ ID NO: 36):

5'-CGATCTAGATTAATTCAACAACATGTT-3'

<1-6> Xây dựng thư viện đột biến của p117-cj7-*cimA(M)m*

Vector tái tổ hợp, p117-cj7-*cimA(M)m*, được xây dựng theo ví dụ <1-2> ở trên, được xử lý bằng các enzym giới hạn NdeI và XbaI, và được nối với mảnh *cimA(M)m* thu hồi trong ví dụ <1-5> ở trên và được xử lý bằng cùng các enzym giới hạn.

Các tế bào *E. coli* Dh5α được biến nạp bằng sốc nhiệt với vector đã xây dựng, sau đó đặt lên trên 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Các khuẩn lạc nuôi cấy được tập hợp, và sau đó ADN plasmit được thu hồi sử dụng kit plasmit miniprep nhờ đó xây dựng “thư viện đột biến của p117-cj7-*cimA(M)m*”.

Ví dụ 2: Xác nhận khả năng sản xuất L-isoleuxin bằng cách đưa gen *cimA* vào

Để xác nhận liệu *Corynebacterium glutamicum* có thể có khả năng sản xuất L-isoleuxin khi gen *cimA* có nguồn gốc từ *Methanocaldococcus* được đưa vào, xây dựng chủng có gen *ilvA* được loại bỏ mã hóa threonin dehydrataza, và thu hồi khả năng sản xuất L-isoleuxin của chủng được kiểm tra bằng cách đưa vào gen *cimA*.

Threonin dehydrataza là enzym chuyển hóa L-threonin, là tiền chất của quá trình sinh tổng hợp L-isoleuxin, thành 2-xetobutytrat. Threonin dehydrataza có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23, và gen *ilvA* mã hóa trình tự axit amin này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 24. Ngoài ra, bất kỳ protein nào có hoạt tính của threonin dehydrataza đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế mà không bị giới hạn.

<2-1> Xây dựng vector bị mất gen *ilvA*

Để thu được mảnh gen *ilvA*, phản ứng PCR được thực hiện sử dụng ADN hệ gen được chiết từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 sử dụng hệ thống Genomic-tip (Qiagen) làm khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng mỗi cặp mồi trong số SEQ ID NO: 37 và 38, và SEQ ID NO: 39 và 40 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 45 giây.

Các sản phẩm PCR khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, và sau đó tách rửa để thu hồi băng 547 bp và 467 bp đối với mỗi phản ứng PCR.

Phản ứng PRC và được thực hiện sử dụng hai mảnh của gen *ilvA* đã thu hồi ở trên làm khuôn. Phản ứng PCR và được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 37 và 40 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 1014 bp được tách rửa để thu hồi, và dán nhãn mảnh bị mất gen *ilvA* được thu hồi là “DilvA”.

Mảnh DilvA được thu hồi ở trên được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, pDZ vector (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được xử lý bằng cùng enzym giới hạn để thu hồi mảnh pDZ thẳng, và sau đó các mảnh DilvA và pDZ thẳng được nối lại để tạo thành vector tái tổ hợp có gen *ilvA* bị mất.

Các tế bào *E. coli* Dh5α được biến nạp bằng sốc nhiệt với vector tái tổ hợp đã xây dựng, sau đó được đặt lên trên 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Một vòng bạch kim của khuẩn lạc nuôi cấy được cấy chuyển vào 3 mL của 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin và nuôi cấy qua

đêm, và sau đó ADN plasmit được thu hồi bằng cách sử dụng kit plasmit miniprep.

Xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 41 và 42 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 90 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “pDZ-ilvA(Del)”.

đoạn mồi ilvA-5-XbaI (SEQ ID NO: 37):

5'-GCATCTAGAGAACACGGACAATGCCAC-3'

đoạn mồi ilvA-Del-R (SEQ ID NO: 38):

5'-CAAACAGCGTGATGTCCTGAGTGAGCTGCGCT-3' đoạn mồi

ilvA-Del-F (SEQ ID NO: 39):

5'-AGCGCAGCTCACTCAGGACATCACGCTGTTTG-3'

đoạn mồi ilvA-3-XbaI (SEQ ID NO: 40):

5'-GCATCTAGAACCTGCGGCACACCTTGGGC-3'

đoạn mồi Topo-F (SEQ ID NO: 41): 5'-GCAGTGAGCGCAACGCAAT-3'

đoạn mồi Topo-R (SEQ ID NO: 42): 5'-CGTTGTAAAACGACGGCCA-3'

<2-2> Xây dựng chủng bị mất gen ilvA

Vector tái tổ hợp pDZ-ilvA(Del) được xây dựng theo ví dụ <2-1> ở trên được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm chủng gốc bằng kỹ thuật điện thẩm màng, và được đặt lên trên môi trường rắn chứa 25 µg/mL kanamycin để chọn các khuẩn lạc đơn. Từ khuẩn lạc, mỗi chủng có vector pDZ-ilvA(Del) được đưa vào trong nhiễm sắc thể được chọn bằng đường dẫn thứ hai, và sau đó thực hiện phản ứng PCR bằng cách sử dụng gADN được thu hồi từ mỗi chủng được chọn lọc làm khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 43 và 44 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 90 giây.

Kết quả của phản ứng PCR, thu hồi được chủng bị mất gen ilvA, và được dán nhãn là chủng “ATCC13032ΔilvA”

đoạn mồi CFilvA (SEQ ID NO: 43): 5'-GATCTGTGATGAGGTGATG-3'

đoạn mồi CRilvA (SEQ ID NO: 44): 5'-CGTCCTTCCATGACTCTCA-3

<2-3> Điều chế mảnh gen tham gia con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin.

Để điều chế vector tái tổ hợp để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin, các mảnh của gen *lysC*, *asd*, *hom*, *thrB*, *thrC* và *ilvA* có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được điều chế như được mô tả dưới đây.

Đầu tiên, để thu mảnh ADN chứa ORF của gen *lysC*-*asd* mã hóa cho aspartat kinaza và aspartat- β -semialdehyt dehydrogenaza, thực hiện phản ứng PCR sử dụng ADN hệ gen được chiết từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn như được mô tả trong ví dụ <2-1>. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 45 và 46 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 90 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 2666 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh *lysC*-*asd*”.

đoạn mồi *lysC*-5-KpnI (SEQ ID NO: 45):

5'-TGAGGTACCCATGCGATTGTTAATGC-3'

đoạn mồi *asd*-3-SfoI (SEQ ID NO: 46):

5'-CTAGGCGCCAGTGTAGCACTCAAGCGGA-3'

Để thu được mảnh ADN chứa ORF của gen *hom*-*thrB* mã hóa cho homoxerin dehydrogenaza và homoxerin kinaza, thực hiện phản ứng PCR sử dụng ADN hệ gen được chiết từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn như được mô tả trong ví dụ <2-1>. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 47 và 48 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 90 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 2633 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh *hom*-*thrB*”.

đoạn mồi *hom*-5-BamHI (SEQ ID NO: 47):

5'-CTAGGATCCCTCACCATTCTCAATGGT-3'

đoạn mồi *thrB*-3-BamHI (SEQ ID NO: 48):

5'-CTAGGATCCGCCTTCCTTGTTGGGC-3'

Để thu được mảnh ADN chứa ORF của gen thrC mã hóa cho threonin synthaza, thực hiện phản ứng PCR sử dụng ADN hệ gen được chiết từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn như được mô tả trong ví dụ <2-1>. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 49 và 50 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 1703 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh thrC”.

đoạn mồi thrC-5-SpeI (SEQ ID NO: 49):

5'-TGCACTAGTGAGAACATACAGGTTCCA-3'

đoạn mồi thrC-3-ilvA (SEQ ID NO: 50):

5'-GGCATTGTCCGTGTTCTTACTTCACGGAAGTG-3'

Để thu được mảnh ADN chứa ORF của gen ilvA mã hóa cho threonin dehydrataza, thực hiện phản ứng PCR sử dụng ADN hệ gen được chiết từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn như được mô tả trong ví dụ <2-1>. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 51 và 52 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 60 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozơ 1,0%, sau đó băng 1862 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “đoạn ilvA”.

đoạn mồi ilvA-5-thrC (SEQ ID NO: 51):

5'-CACTTCCGTGAAGTAAGAACACGGACAATGCC-3'

đoạn mồi ilvA-3-SpeI (SEQ ID NO: 52):

5'-TGCACTAGTACCTGCGGCACACCTTGGGC-3'

Phản ứng PRC và được thực hiện bằng cách sử dụng mảnh thrC và mảnh ilvA được thu hồi ở trên làm khuôn. Phản ứng PCR và được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 49 và 52 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài tại 72°C trong 120 giây.

Sản phẩm PRC khuếch đại được điện di trên gel agarozo 1,0%, sau đó bằng 3565 bp được tách rửa để thu hồi, và sản phẩm được dán nhãn là “mảnh thrC-ilvA”.

<2-4> Xây dựng vector để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin

Để điều chế vector tái tổ hợp để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin, mảnh lysC-asd thu được trong ví dụ <2-3> ở trên được xử lý bằng các enzym giới hạn KpnI và SfoI, và sau đó nối với mảnh p117 thẳng được xử lý bằng các enzym giới hạn KpnI và EcoRV.

Thu hồi ADN plasmit theo cách tương tự cách trong ví dụ <1-2> ở trên. Để xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp, dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 100 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “p117-lysC-asd”.

Mảnh hom-thrB thu được trong ví dụ <2-3> ở trên được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI và sau đó nối với mảnh p117-lysC-asd thẳng được xử lý bằng cùng enzym giới hạn.

Thu hồi ADN plasmit theo cách tương tự trong ví dụ <1-2> ở trên. Để xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp, dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 180 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “p117-lysC-asd-hom-thrB”.

Mảnh thrC-ilvA thu được trong ví dụ <2-3> ở trên được xử lý bằng enzym giới hạn SpeI và sau đó nối với đoạn p117-lysC-asd-hom-thrB thẳng được xử lý bằng cùng enzym giới hạn.

Thu hồi ADN plasmit theo cách tương tự trong ví dụ <1-2> ở trên. Để xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp, dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 300 giây.

Dán nhãn vectơ tái tổ hợp được thu hồi là “p117-IBGC (Isoleucine Biosynthesis Genes Cluster)”, là vectơ tái tổ hợp để tăng cường gen trong con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin chứa các mảnh của gen *lysC*, *asd*, *hom*, *thrB*, *thrC* và *ilvA*, sáu gen tham qua quá trình sinh tổng hợp của L-isoleuxin.

<2-5> So sánh sản lượng L-isoleuxin

Các vectơ tái tổ hợp p117-cj7-cimA(M), p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, và p117-IBGC được xây dựng trong các ví dụ <1-2>, <1-4>, và <2-4> ở trên được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng kỹ thuật điện thẩm màng và được đặt lên trên môi trường rắn chứa 25 µg/mL kanamycin để chọn lọc khuẩn lạc đơn. Từ khuẩn lạc, mỗi trong số các chủng được chọn được dán nhãn là *Corynebacterium glutamicum* “ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)”, “ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD”, và “ATCC13032/p117-IBGC”.

Ngoài ra, p117-cj7-cimA(M) và p117-cj7-cimA(M)-leuBCD được đưa vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032Δ*ilvA* được chuẩn bị trong ví dụ <2-2> ở trên bằng kỹ thuật điện thẩm màng và được đặt lên trên môi trường rắn chứa 25 µg/mL kanamycin để chọn lọc khuẩn lạc đơn. Từ khuẩn lạc, mỗi trong số các chủng được chọn được dán nhãn là *Corynebacterium glutamicum* “ATCC13032Δ*ilvA*/p117-cj7-cimA(M)”, và “ATCC13032Δ*ilvA*/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD”.

Thực hiện đánh giá chuẩn độ trên sản lượng L-isoleuxin sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, ATCC13032/p117-IBGC, ATCC13032/p117-cj7-cimA(M), ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, ATCC13032Δ*ilvA*, ATCC13032Δ*ilvA*/p117-cj7-cimA(M), và ATCC13032Δ*ilvA*/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD.

Cụ thể, mỗi trong số các chủng được cấy chuyển vào trong bình 250 mL chứa 25 mL môi trường chuẩn độ chứa glucosơ có các thành phần được trình bày trong bảng 1 dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong tủ ấm ở 32°C và 200 rpm trong 30 giờ. Các nồng độ của L-isoleuxin tạo ra được trình bày trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 1

Thành phần	Nồng độ (trên mỗi lít)
------------	------------------------

Glucose	60 g
KH ₂ PO ₄	1,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	90 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	90 mg
Thiamin-HCl	4,5 mg
d-Biotin	0,9 mg
HSM	20 g
Canxi carbonat	30 g
pH	7,0

Bảng 2

Chủng	L-isoleuxin (g/L)
ATCC13032	0,02
ATCC13032/p117-IBGC	0,70
ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)	0,83
ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD	1,25
ATCC13032 Δ ilvA	0,00
ATCC13032 Δ ilvA/p117-cj7-cimA(M)	0,08
ATCC13032 Δ ilvA/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD	0,15

Như được trình bày trong bảng 2 ở trên, chủng kiểu đại ATCC13032 có gen *ilvA* sản xuất được 0,02 g/L L-isoleuxin, và ATCC13032/p117-IBGC, chủng biến nạp được đưa vào các gen tham gia vào trong con đường sinh tổng hợp l-isoleuxin, sản xuất được 0,07 g/L L-isoleuxin, cho thấy rằng sản lượng L-isoleuxin tăng lên khoảng

3400% so với chủng kiểu đại.

Ngoài ra, các chủng biến nạp ATCC13032/p117-cj7-cimA(M) và ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD lần lượt sản xuất được 0,83 g/L và 1,25 g/L L-isoleuxin, cho thấy rằng sản lượng L-isoleuxin lần lượt tăng lên 4050% và 6150%, so với chủng kiểu đại.

Từ sự so sánh này, sản lượng L-isoleuxin của ATCC13032/p117-cj7-cimA(M), chủng biến nạp để đưa gen cimA vào trong con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin hiện tại, được xác nhận là cao hơn so với sản lượng L-isoleuxin của ATCC13032/p117-IBGC, chủng biến nạp để tăng cường chính con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin. Ngoài ra, sản lượng L-isoleuxin của ATCC13032/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, chủng biến nạp còn được tăng cường thêm bằng gen leuBCD, được xác nhận là có khả năng hơn nữa.

Trong khi đó, chủng ATCC13032 Δ ilvA bị mất gen ilvA mất khả năng sản xuất L-isoleuxin, trong khi chủng ATCC13032 Δ ilvA/p117-cj7-cimA(M) có gen cimA được đưa vào sản xuất được 0,08 g/L L-isoleuxin, và chủng ATCC13032 Δ ilvA/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD có gen cimA được đưa vào và gen leuBCD được tăng cường sản xuất được 0,15 g/L L-isoleuxin.

Các kết quả trên cho thấy rằng việc sản xuất L-isoleuxin có thể sử dụng con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin mới bằng cách đưa gen cimA, thay vì con đường sinh tổng hợp L-isoleuxin hiện tại sử dụng L-isoleuxin làm tiền chất.

Ví dụ 3: Điều chế chủng tái tổ hợp được biến nạp và so sánh sản lượng L-isoleuxin

<3-1> Điều chế chủng tái tổ hợp sử dụng vi sinh vật kiểu đại thuộc chi *Corynebacterium*

Để tạo ra axetyl-CoA được sử dụng làm tiền chất của gen cimA, chuẩn bị chủng dinh dưỡng thụ động axetat *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu đại trong đó gen aceE mã hóa cho pyruvat dehydrogenaza được loại bỏ, và dán nhãn là “ATCC13032 Δ aceE” (Schreiner *et al.*, J Bacteriol. 187: 6005-18, 2005).

Pyruvat dehydrogenaza có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 và gen aceE mã hóa trình tự axit amin này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 26.

Vectơ tái tổ hợp p117-cj7-cimA(M) và thư viện đột biến của p117-cj7-cimA(M)m được chuẩn bị theo ví dụ 1 ở trên được đưa vào trong chủng ATCC13032 Δ aceE đã chuẩn bị ở trên bằng kỹ thuật điện thẩm màng. Dán nhãn các chủng được xây dựng lần lượt là “ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)” và “thư viện đột biến ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m”.

ATCC13032 Δ aceE, ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M), và thư viện đột biến ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m được đặt lên trên môi trường rắn chứa 25 μ g/mL kanamycin để chọn khuẩn lạc đơn, và thực hiện đánh giá chuẩn độ trên sản lượng L-isoleuxin sử dụng các chủng được chọn.

Cụ thể, các chủng được cấy chuyển vào trong bình 250 mL chứa 25 mL môi trường chuẩn độ chứa axetat ở dạng amoni axetat có các thành phần được trình bày trong bảng 3 dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong tủ ấm ở 32°C 200 rpm trong 30 giờ. Kết quả là, chọn được bảy loại khuẩn lạc có nồng độ L-isoleuxin tăng lên, và danh sách và các nồng độ L-isoleuxin được trình bày trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 3

Thành phần	Nồng độ (mỗi lít)
Glucose	60 g
C ₂ H ₇ NO ₂	5 g
KH ₂ PO ₄	1,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	90 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	90 mg
Thiamin-HCl	4,5 mg
d-Biotin	0,9 mg

HSM	20 g
Canxi carbonat	30 g
pH	7,0

Bảng 4

Chủng	L-isoleuxin (g/L)
ATCC13032 Δ aceE	0,05
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)	0,84
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m1	1,02
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m2	1,35
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m3	2,23
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m4	1,24
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m5	0,96
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m6	1,73
ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m7	0,97

Kết quả là, như được trình bày trong bảng 4 ở trên, chủng ATCC13032 Δ aceE là chủng gốc sản xuất được 0,05 g/L L-isoleuxin, và các chủng biến nạp sản xuất được từ 0,84 g/L đến 2,23 g/L L-isoleuxin, cho thấy rằng sản lượng L-isoleuxin lần lượt tăng lên từ 1580% đến 4360%, so với chủng gốc. Cụ thể, chủng biến nạp ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m3 ghi nhận là sản lượng L-isoleuxin cao nhất trong số các chủng so với chủng gốc ATCC13032 Δ aceE.

Để xác định vị trí đột biến của các đột biến trên gen cimA(M) được chọn theo sản lượng L-isoleuxin tăng lên được trình bày trong bảng 4, và các axit amin được thế của mỗi đột biến, tiến hành giải trình tự.

Kết quả là, như thư viện đột biến CimA(M)m,

CimA(M)m1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4;

CimA(M)m2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 6;

CimA(M)m3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 8;

CimA(M)m4 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 10;

CimA(M)m5 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 12;

CimA(M)m6 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 14; và

CimA(M)m7 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, và có thể được mã hóa bằng polynucleotit có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 16.

<3-2> Điều chế chủng tái tổ hợp sử dụng p117-cj7-cimA(M)m3 có hoạt tính cao nhất của của thư viện đột biến p117-cimA(M)m được chọn.

Vector p117-cj7-cimA(M)m3 được xác định là có sản lượng L-isoleuxin cao nhất theo ví dụ <3-1> ở trên được xử lý bằng XbaI, và được nối với mảnh ADN thu được bằng xử lý mảnh leuBCD được thu trong ví dụ <1-3> ở trên bằng cùng enzym giới hạn.

Các tế bào *E. coli* Dh5α được biến nạp bằng sốc nhiệt với vector đã xây dựng, sau đó đặt lên trên 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Một vòng bạch kim của khuẩn lạc nuôi cấy được cấy chuyển vào trong 3 mL của 25 µg/mL môi trường LB rắn chứa kanamycin và nuôi cấy qua đêm và sau đó ADN plasmit được thu hồi bằng cách sử dụng kit plasmit miniprep.

Xác nhận việc xây dựng vector tái tổ hợp bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và dòng vô tính được phát hiện bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 29 và 30 dưới các điều kiện sau đây: 30 chu kỳ, mỗi chu

kỳ bao gồm biến tính tại 95°C trong 30 giây, ủ tại 56°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 180 giây. Dán nhãn vector tái tổ hợp được thu hồi là “p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD”.

Mỗi trong số 17-cj7-cimA(M) của ví dụ <1-2>, p117-cj7-cimA(M)-leuBCD của ví dụ <1-4>, p117-cj7-cimA(M)m3 của ví dụ <3-1>, và p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD của ví dụ <3-2> ở trên được đưa vào trong chủng ATCC13032ΔaceE được sử dụng theo ví dụ <3-1> bằng kỹ thuật điện thẩm màng, và được đặt lên trên môi trường chứa 25 µg/mL kanamycin để chọn khuẩn lạc đơn.

Các chủng được chọn được cấy chuyển vào trong bình 250 mL chứa 25 mL môi trường chuẩn độ chứa glucosơ có thành phần được trình bày trong bảng 3 ở trên, và sau đó được nuôi cấy trong tủ ấm ở 32°C và 200 rpm trong 30 giờ để kiểm tra sản lượng L-isoleuxin. Các kết quả được trình bày trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Chủng	L-isoleuxin (g/L)
ATCC13032ΔaceE	0,04
ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)	0,98
ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD	2,09
ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)m3	2,22
ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD	3,76

Như được trình bày trong bảng 5 ở trên, trong khi chủng ATCC13032ΔaceE là chủng gốc sản xuất được 0,04 g/L L-isoleuxin, chủng biến nạp ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M) sản xuất được 0,98 g/L L-isoleuxin và ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD sản xuất được 2,09 g/L L-isoleuxin, cho thấy sự tăng lên 0,94 g/L và 2,05 g/L so với sản lượng L-isoleuxin của chủng gốc.

Ngoài ra, các chủng biến nạp ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)m3 và ATCC13032ΔaceE/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD chứa gen đột biến cimA(M)m3 được thu hồi theo ví dụ <3-1> lần lượt sản xuất được 2,22 g/L và 3,76 g/L L-isoleuxin, tăng lên 5450% và 9300% sản lượng so với chủng gốc. Theo đó, kết quả này chứng tỏ rằng đột biến cimA(M)m3 có hiệu quả hơn so với chủng kiểu dại của nó trong việc làm tăng sản lượng L-isoleuxin.

Trong số các chủng biến nạp theo các ví dụ, ATCC13032 Δ aceE/p117-cj7-cimA(M)m3 được dán nhãn là “*Corynebacterium glutamicum* CA10-1002”, ký gửi vào Trung tâm nuôi giữ vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms) theo Hiệp ước Budapest ngày 27 tháng 2 năm 2015, và được cung cấp với số nhận diện truy cập là KCCM11672P.

<3-3> Điều chế chủng tái tổ hợp sử dụng chủng sản xuất L-isoleuxin KCCM11248P

Mỗi trong số p117-cj7-cimA(M), p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, p117-cj7-cimA(M)m3, và p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD, các vectơ tái tổ hợp được sử dụng trong các ví dụ <3-1> và <3-2>, được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum* KCCM11248P, chủng sản xuất L-isoleuxin (patent Hàn Quốc số 10-1335789), và được đặt lên trên môi trường rắn chứa 25 μ g/mL kanamycin để chọn khuẩn lạc đơn.

Mỗi chủng trong số các chủng được chọn lọc được dán nhãn là KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M), KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3, và KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD.

Sản lượng L-isoleuxin của các chủng được kiểm tra sử dụng môi trường chuẩn độ L-isoleuxin có thành phần được trình bày trong bảng 6 dưới đây và nuôi cấy các chủng trong các bình như được mô tả ở trên.

Bảng 6

Thành phần	Nồng độ (mỗi lít)
Glucose	45 g
BM	10 g
KH ₂ PO ₄	1,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	180 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	180 mg
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0,9 mg

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,9 mg
Thiamin-HCl	9 mg
d-Biotin	1,8 mg
Ca-Pantothenat	9 mg
NCA	60 mg
HSM	20 g
Canxi carbonat	30 g
pH	7,0

Cụ thể, chủng gốc KCCM11248P và các chủng biến nạp KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M), KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD, KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3, và KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD được cấy chuyển vào trong bình 250 mL chứa 25 ML môi trường chuẩn độ chứa glucosơ có thành phần được trình bày trong bảng 6, và sau đó được nuôi cấy trong tủ ấm ở 32°C và 200 rpm trong 60 giờ để kiểm tra sản lượng L-isoleuxin. Các kết quả được trình bày trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Chủng	L-isoleuxin (g/L)
KCCM11248P	3,33
KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)	4,04
KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD	4,82
KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3	4,71
KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD	11,21

Như được trình bày trong bảng 7 ở trên, trong khi chủng gốc KCCM11248P sản xuất được 3,33 g/L L-isoleuxin, các chủng biến nạp KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M) sản xuất được 4,04 g/L L-isoleuxin, và KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)-leuBCD sản xuất được 4,82 g/L L-isoleuxin, cho thấy tăng lên 0,71 g/L và 1,49 g/L so với năng suất L-isoleuxin của chủng gốc.

Trong khi đó, các chủng biến nạp KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3 và

KCCM11248P/p117-cj7-cimA(M)m3-leuBCD lần lượt sản xuất được 4,71 g/L và 11,21 g/l L-isoleuxin, tăng lên 41,4% và 236,6% sản lượng so với chủng gốc.

Như được minh họa trong kết quả của ví dụ <3-2> sử dụng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, kết quả này còn chứng tỏ rằng đột biến cimA(M)m3 có hiệu quả hơn so với chủng kiểu dại của nó trong việc tăng sản lượng L-isoleuxin.

Từ những điều nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ những gì sáng chế đề cập rằng sáng chế được thể hiện ở các dạng cụ thể mà không thay đổi khái niệm kỹ thuật hoặc đặc tính cần thiết trong sáng chế. Về vấn đề này, các phương án minh họa này được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được coi là làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngược lại, sáng chế được dự định để bao hàm không chỉ các phương án minh họa mà còn các phương án thay thế khác nhau, các biến thể, các phương án tương đương, và các phương án khác nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất L-isoleuxin, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa protein có hoạt tính xitramalat synthaza trong môi trường; và

thu hồi L-isoleuxin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó xitramalat synthaza có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Methanocaldococcus*.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó xitramalat synthaza có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 và 15.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* còn có các hoạt tính được tăng cường của 3-isopropylmalat dehydrogenaza và 3-isopropylmalat dehydrataza.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* còn có pyruvat dehydrogenaza bị bất hoạt.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó axetat còn được cung cấp vào trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

8. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-isoleuxin, trong đó vi sinh vật này chứa protein có hoạt tính xitramalat synthaza.

9. Vi sinh vật theo điểm 8, trong đó xitramalat synthaza có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 và 15.

10. Vi sinh vật theo điểm 8, trong đó vi sinh vật còn có các hoạt tính được tăng cường của 3-isopropylmalat dehydrogenaza và 3-isopropylmalat dehydrataza.

11. Vi sinh vật theo điểm 8, trong đó vi sinh vật còn có pyruvat dehydrogenaza bị bất hoạt.

12. Vi sinh vật theo điểm 8, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT L-ISOLEUXIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-ISOLEUXIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA16137-PCT

<150> KR 10-2015-0148157

<151> 2015-10-23

<160> 52

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 491

<212> PRT

<213> cimA từ Methanocaldococcus jannaschii

<400> 1

Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr
1 5 10 15

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

Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Ile Thr
35 40 45

Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu
50 55 60

Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp
65 70 75 80

Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr
85 90 95

Ser Pro Ile His Met Lys Tyr Lys Leu Arg Lys Thr Glu Asp Glu Val
100 105 110

Leu Glu Thr Ala Leu Lys Ala Val Glu Tyr Ala Lys Glu His Gly Leu
115 120 125

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

Leu Ile Lys Leu Phe Asn Glu Gly Glu Lys Val Gly Ala Asp Arg Val
145 150 155 160

Cys Val Cys Asp Thr Val Gly Val Leu Thr Pro Gln Lys Ser Gln Glu
165 170 175

Leu Phe Lys Lys Ile Thr Glu Asn Val Asn Leu Pro Val Ser Val His
 180 185 190
 Cys His Asn Asp Phe Gly Met Ala Thr Ala Asn Thr Cys Ser Ala Val
 195 200 205
 Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu
 210 215 220
 Arg Ala Gly Asn Ala Ser Leu Glu Glu Val Val Ala Ala Leu Lys Ile
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Lys Ile Lys Met Glu Lys Leu Tyr Glu Val
 245 250 255
 Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Lys Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys
 260 265 270
 Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val
 275 280 285
 Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu
 290 295 300
 Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp
 325 330 335
 Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu
 340 345 350
 Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val
 355 360 365
 Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val
 370 375 380
 Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Asp Ile Thr Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro
 405 410 415
 Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala
 420 425 430
 Asp Ile Lys Leu Val Glu Tyr Arg Val Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr
 435 440 445
 Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile
 450 455 460
 Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Arg Ala Ser Val Asp

465

470

475

480

Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn
 485 490

<210> 2

<211> 1476

<212> ADN

<213> cimA tûr Methanocaldococcus jannaschii

<400> 2

atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaacacc aggagtttct 60
 ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatggt 120
 atagaggcag gttcagctat aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggt taaatgcaga aatctgctca tttgttagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacatgg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactgaaa atgttaattt accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaata cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagttat atgaggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tgaaacttcc tgttcacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaataca tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttta aatacaaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggtag aagagaaaat caaattagat 1140
 gaattaactg ttgtatctgg aaataaaata acaccaattg catctgttaa actccattat 1200
 aaaggagaag atataacttt aatagaaact gcttatggtg ttggaccggt agatgcagca 1260
 ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaagttggt agagtataga 1320

gttgaagcaa ttggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgtaa attaagaaaa 1380
 ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taataagggc ttctgtagat 1440
 gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa 1476

<210> 3
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CimA(M)m1

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

Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu
 210 215 220
 Arg Ala Gly Asn Ala Ser Leu Glu Glu Val Val Ala Ala Leu Lys Ile
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Lys Ile Lys Met Glu Lys Leu Tyr Glu Val
 245 250 255
 Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Lys Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys
 260 265 270
 Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val
 275 280 285
 Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu
 290 295 300
 Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp
 325 330 335
 Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu
 340 345 350
 Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val
 355 360 365
 Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val
 370 375 380
 Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Asp Ile Arg Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro
 405 410 415
 Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala
 420 425 430
 Asp Ile Lys Leu Val Glu Tyr Arg Val Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr
 435 440 445
 Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile
 450 455 460
 Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Arg Ala Ser Val Asp
 465 470 475 480
 Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn
 485 490

<210> 4
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m1

<400> 4
 atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaacacc aggagtttct 60
 ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatgtt 120
 atagaggcag gttcagctgt aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggt taaatgcaga aatctgctca tttgtttagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacatgg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactaaaa atgttaattt accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaatt cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagttat atgaggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tgaaacttcc tgttcacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaataca tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttta aatacaaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggttag aagagaaaat caaattagat 1140
 gaattaactg ttgtatctgg aaataaaata acaccaattg catctgttaa actccattat 1200
 aaaggagaag atataagggt aatagaaact gcttatggtg ttggaccggt agatgcagca 1260
 ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaagttggt agagtataga 1320
 gttgaagcaa ttgggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgttta atttaaaaaa 1380

ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taataagggc ttctgtagat 1440

gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa 1476

<210> 5
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CimA(M)m2

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

210	215	220
Arg Ala Gly Asn Ala Ser Leu Glu Glu Val Val Ala Ala Leu Lys Ile		
225	230	235 240
Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Lys Ile Lys Met Glu Lys Leu Tyr Glu Val		
	245	250 255
Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Glu Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys		
	260	265 270
Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val		
	275	280 285
Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu		
	290	295 300
Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg		
	305	310 315 320
Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp		
	325	330 335
Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu		
	340	345 350
Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val		
	355	360 365
Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val		
	370	375 380
Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr		
	385	390 395 400
Lys Gly Glu Asp Ile Thr Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro		
	405	410 415
Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala		
	420	425 430
Asp Ile Lys Leu Val Glu Tyr Arg Val Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr		
	435	440 445
Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile		
	450	455 460
Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Glu Ala Ser Val Asp		
	465	470 475 480
Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn		
	485	490

<210> 6

<211> 1476
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m2

<400> 6
 atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaaccaggagggtttct 60
 ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatgtt 120
 atagaggcag gttcagctat aacttcaaaa ggagaggggag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggt taaatgcaga aatctgctca ttgtttagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttgtag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacaagg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactgaaa atgttaattt accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaatt cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagttat atgagggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tggagcttcc tgttcacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaatata tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttta aatacaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggttag aagagaaaat caaattagat 1140
 gaattaactg ttgtatctgg aaataaaaata acaccaattg catctgttaa actccattat 1200
 aaaggagaag atataacttt aatagaaact gcttatggtg ttggaccggt agatgcagca 1260
 ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaagttggt agagtataga 1320
 gttgaagcaa ttggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgttaa attaagaaaa 1380

ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taatagaggc ttctgtagat 1440
gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa 1476

<210> 7
<211> 372
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CimA(M)m3

<400> 7
Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr
1 5 10 15
Pro Gly Val Ser Leu Thr Pro Asn Asp Lys Leu Glu Ile Ala Lys Lys
20 25 30
Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Thr
35 40 45
Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu
50 55 60
Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp
65 70 75 80
Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr
85 90 95
Ser Pro Ile His Met Lys Tyr Lys Leu Arg Lys Thr Glu Asp Glu Val
100 105 110
Leu Val Thr Ala Leu Lys Ala Val Glu Tyr Ala Lys Glu Gln Gly Leu
115 120 125
Ile Val Glu Leu Ser Ala Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Val Asn Phe
130 135 140
Leu Ile Lys Leu Phe Asn Glu Gly Glu Lys Val Gly Ala Asp Arg Val
145 150 155 160
Cys Val Cys Asp Thr Val Gly Val Leu Thr Pro Gln Lys Ser Gln Glu
165 170 175
Leu Phe Lys Lys Ile Thr Glu Asn Val Asn Leu Pro Val Ser Val His
180 185 190
Cys His Asn Asp Phe Gly Met Ala Thr Ala Asn Ala Cys Ser Ala Val
195 200 205
Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu

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

<210> 8
 <211> 1119
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m3

<400> 8	
atgatggttaa ggatattcga taccacactt cgcgacggag agcagacacc aggagtttct	60
ttaacaccaa acgataagct ggagatagct aaaaagttgg atgaacttgg ggttgatggt	120
atagaggccg gtagcgctgt cactagcaag ggagagcgcg aaggaataaa actcattaca	180
aaagaaggtc ttaacgcaga aatctgcagt ttcgtgcgtg cactccctgt agacatagac	240
gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtg cacctcgtgg tgcccacatc tccaatacac	300
atgaagtaca aacttcgtaa aacggaggat gaggttctcg tgaccgcact taaggctgtg	360

```

gaatacgcta aagagcaggg cttgatcggt gagttatcag cggaggatgc gacaagatcc      420
gatgttaatt tcttaataaa actcttcaat gaaggggaaa aggttggagc agaccgtgtt      480
tgtgtttgcg acaccgtagg agttttaacg ccacaaaagt cgcaggaact gttaaagaaa      540
ataaccgaga atgtgaatth accggtctcg gttcattgcc acaacgactt tggaatggct      600
actgctaatt cttgctccgc agtgctcggc ggagctgttc agtgccacgt gacagttaac      660
ggatattggcg agcgcgcagg gaatgcctcc ttagaagagg tcgttgccgc gtcaaaaatc      720
ctctacggct atgatactaa aataaagatg gaaaagttat acgaggtttc acgcattgtc      780
tcccgcttga tgaaacttcc tgttcccccg aacaaagcga ttgttggcga caatgcgttc      840
gctcacgaag caggtatcca tgatgatgga ttaattaaaa atactgaaac ctatgagcca      900
atcaaaccag aaatgggtggg caaccgccgg cgtatcattc tcggttaagca ctctggtcgg      960
aaagcgtaa agtacaagct tgatctaatt ggcataaacg tgtctgatga gcaattaaac     1020
aaaatttatg aacgcgtaa agaattcggg gacctaggta agtacatttc agatgctgat     1080
ttgctcgcta tagttcgcg agtcacggga aagttgtaa                               1119

```

<210> 9
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CimA(M)m4

<400> 9
 Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr
 1 5 10 15
 Pro Gly Val Ser Leu Thr Pro Asn Asp Lys Leu Glu Ile Ala Lys Lys
 20 25 30
 Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Thr
 35 40 45
 Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu
 50 55 60
 Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 10
 <211> 1119
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m4

<400> 10
 atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaacacc aggagtttct 60
 ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatggt 120
 atagaggcag gttcagctgt aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggt taaatgcaga aatctgctca tttgtagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacaagg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactgaaa atgttaattt accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaata cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagtc atgagggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tgaaacttcc tgttccacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaataca tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttta aatacaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattgtga 1119

<210> 11
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CimA(M)m5

<400> 11

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

Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val
275 280 285

Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu
290 295 300

Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg
305 310 315 320

Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp
325 330 335

Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu
340 345 350

Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val
355 360 365

Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val
370 375 380

Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr
385 390 395 400

Lys Gly Glu Asp Ile Thr Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro
405 410 415

Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala
420 425 430

Asp Ile Lys Leu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr
435 440 445

Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile
450 455 460

Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Arg Ala Ser Val Asp
465 470 475 480

Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn
485 490

<210> 12
<211> 1476
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cimA(M)m5

<400> 12
atgatggtaa ggaattttga tacaacactt agagatggag agcaaaccaggagtttct

ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatgtt 120
 atagaggcag gttcagctat aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggtt taaatgcaga aatctgctca tttgttagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacatgg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactgaaa atgttaattt accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaattg cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc ttcaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagttat atgaggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tgaaacttcc tgttccacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaataca tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttaa aatacaaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggtag aagagaaaat caaattagat 1140
 gaattaactg ttgtatctgg aaataaaaata acaccaattg catctgttaa actccattat 1200
 aaaggagaag atataacttt aatagaaact gcttatgggt ttggaccggt agatgcagca 1260
 ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaagttggt agagtataga 1320
 gccgaagcaa ttggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgtaa attaagaaaa 1380
 ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taataagggc ttctgtagat 1440
 gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa 1476

<210> 13
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CimA(M)m6

<400> 13

Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr
 1 5 10 15

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

Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Thr
 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu
 50 55 60

Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr
 85 90 95

Ser Pro Ile His Met Lys Tyr Lys Leu Arg Lys Thr Glu Asp Glu Val
 100 105 110

Leu Glu Thr Ala Leu Lys Ala Val Glu Tyr Ala Lys Glu Gln Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Ile Lys Leu Phe Asn Glu Gly Glu Lys Val Gly Ala Asp Arg Val
 145 150 155 160

Cys Val Cys Asp Thr Val Gly Val Leu Thr Pro Gln Lys Ser Gln Glu
 165 170 175

Leu Phe Lys Lys Ile Thr Glu Asn Val Asn Leu Pro Val Ser Val His
 180 185 190

Cys His Asn Asp Phe Gly Met Ala Thr Ala Asn Ala Cys Ser Ala Val
 195 200 205

Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu
 210 215 220

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

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Lys Ile Lys Met Glu Lys Leu Tyr Glu Val
 245 250 255

Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Lys Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys
 260 265 270

Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val
 275 280 285

Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu
 290 295 300

Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Lys
 325 330 335

Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu
 340 345 350

Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val
 355 360 365

Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val
 370 375 380

Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr
 385 390 395 400

Lys Gly Glu Asp Ile Thr Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro
 405 410 415

Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala
 420 425 430

Asp Ile Asn Leu Val Glu Tyr Arg Val Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr
 435 440 445

Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile
 450 455 460

Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Arg Ala Ser Val Asp
 465 470 475 480

Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn
 485 490

<210> 14
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m6

<400> 14
 atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaaccaggagtttct

ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatgtt 120
 atagaggcag gttcagctgt aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca 180
 aaagaagggtt taaatgcaga aatctgctca tttgttagag ctttacctgt agatattgat 240
 gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac 300
 atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttag agacagcttt aaaggctgta 360
 gagtatgcta aagaacaagg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt 420
 gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt 480
 tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa 540
 ataactgaaa atgttaatth accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct 600
 actgctaattg cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat 660
 ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata 720
 ctctatggct atgatactaa gataaagatg gaaaagttat atgaggtttc aagaattgtc 780
 tcaagattga tgaaacttcc tgttccacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt 840
 gctcatgaag caggaatata tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca 900
 ataaaaccag aaatgggttg gaatagaaga agaattattt tgggtaagca ttctggtaga 960
 aaagctttaa aatacaaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtaaaga gcaattaaat 1020
 aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatttc agacgctgat 1080
 ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggtag aagagaaaat caaattgat 1140
 gaattaactg ttgtatctgg aaataaaaata acaccaattg catctgttaa actccattat 1200
 aaaggagaag atataacttt aatagaaact gcttatgggt ttggaccggt agatgcagca 1260
 ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaacttgggt agagtataga 1320
 gttgaagcaa ttggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgtaa attaagaaaa 1380
 ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taataagggc ttctgtagat 1440
 gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa 1476

<210> 15
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CimA(M)m7

<400> 15

Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr
 1 5 10 15

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

Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Thr
 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu
 50 55 60

Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr
 85 90 95

Ser Pro Ile His Met Lys Tyr Lys Leu Arg Lys Thr Glu Asp Glu Val
 100 105 110

Leu Met Thr Ala Leu Lys Ala Val Glu Tyr Ala Lys Glu His Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Ile Lys Leu Phe Asn Glu Gly Glu Lys Val Gly Ala Asp Arg Val
 145 150 155 160

Cys Val Cys Asp Thr Val Gly Val Leu Thr Pro Gln Lys Ser Gln Glu
 165 170 175

Leu Phe Lys Lys Ile Thr Glu Asn Val Asn Leu Pro Val Ser Val His
 180 185 190

Cys His Asn Asp Phe Gly Met Ala Thr Ala Asn Thr Cys Ser Ala Val
 195 200 205

Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu
 210 215 220

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

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

Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Lys Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys
 260 265 270

Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val
 275 280 285

Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu
 290 295 300

Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp
 325 330 335

Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu
 340 345 350

Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val
 355 360 365

Thr Gly Lys Leu Val Glu Glu Lys Ile Lys Leu Asp Glu Leu Thr Val
 370 375 380

Val Ser Gly Asn Lys Ile Thr Pro Ile Ala Ser Val Lys Leu His Tyr
 385 390 395 400

Lys Gly Glu Asp Ile Thr Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Gly Val Gly Pro
 405 410 415

Val Asp Ala Ala Ile Asn Ala Val Arg Lys Ala Ile Ser Gly Val Ala
 420 425 430

Asp Ile Lys Leu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Ala Ile Gly Gly Gly Thr
 435 440 445

Asp Ala Leu Ile Glu Val Val Val Lys Leu Arg Lys Gly Thr Glu Ile
 450 455 460

Val Glu Val Arg Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ile Arg Ala Ser Val Asp
 465 470 475 480

Ala Val Met Glu Gly Ile Asn Met Leu Leu Asn
 485 490

<210> 16
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA(M)m7

<400> 16
 atgatggtaa ggatatttga tacaacactt agagatggag agcaaacc aggagtttct

60

ttaacaccaa atgataagtt agagatagca aaaaaattgg atgagcttgg agttgatgtt	120
atagaggcag gttcagctgt aacttcaaaa ggagagagag aaggaataaa attaataaca	180
aaagaaggtt taaatgcaga aatctgctca tttgttagag ctttacctgt agatattgat	240
gctgccttag aatgtgatgt agatagtgtc catttagtag tgccaacatc tccaatacac	300
atgaaatata agcttagaaa aacagaagat gaggttttaa tgacagcttt aaaggctgta	360
gagtatgcta aagaacatgg attgattgtt gagttatctg cagaggatgc aacaagaagt	420
gatgtaaatt tcttaataaa actatttaaat gaaggggaaa aggttggagc agacagagtt	480
tgtgtttgtg acacagtagg agttttaact ccacaaaaga gtcaggaatt atttaaaaaa	540
ataactgaaa atgttaatth accggtctca gttcattgcc acaacgactt tggaatggct	600
actgctaata cttgctcagc agtttttaggt ggagctgttc agtgccacgt aacagttaat	660
ggtattggag agagagcagg aaatgcctca ttggaagagg ttgttgctgc tttaaaaata	720
ctctatggct atgatactaa gataaagcag gaaaagttat atgaggtttc aagaattgtc	780
tcaagattga tgaaacttcc tgttccacca aataaagcaa ttgttgggga caatgcattt	840
gctcatgaag caggaataca tgttgatgga ttaataaaaa atactgaaac ctatgagcca	900
ataaaaccag aaatggttgg gaatagaaga agaattatth tgggtaagca ttctggtaga	960
aaagctthaa aatacaaaact tgatttgatg ggcataaacg ttagtgatga gcaattaaat	1020
aaaatatatg aaagagttaa agaatttggg gatttgggta aatacatthc agacgctgat	1080
ttgttggcta tagttagaga agttactgga aaattggtag aagagaaaat caaattagat	1140
gaattaaactg ttgtatctgg aaataaaaata acaccaattg catctgttaa actccattat	1200
aaaggagaag atataactth aatagaaact gcttatggtg ttggaccggt agatgcagca	1260
ataaatgctg tgagaaaggc aataagtgga gttgcagata ttaagttggt agagtataga	1320
gctgaagcaa ttggtggagg aactgatgcg ttaatagagg ttgttgthaa attaagaaaa	1380
ggaactgaaa ttgttgaagt tagaaaatca gacgctgata taataagggc ttctgtagat	1440
gctgtaatgg aaggaatcaa tatgttattg aattaa	1476

<210> 17

<211> 340

<212> PRT

<213> leuB từ Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<400> 17

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

290	295	300
Ala Val Arg Ile Glu Thr Ala Ile Ala Ala Asp Val Ala Gly Arg Asp		
305	310	315 320
Asn Ser Gln Pro Ile Ser Thr Thr Glu Val Gly Asp Arg Ile Val Lys		
	325	330 335
Ala Leu Gln Ser		
340		

<210> 18
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> leuB từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 18

atgaaacttg ctgttattgg tggagatggg atcggtccag aggttactgc agaagccctc	60
aaggttctaa acgctgtccg cgacgacatc gagaccaccg attatgacct tggcgcacgc	120
cgttacctca aaaatggcga gctgctcacc gacgaggatc tggcatccct gcgcgagcat	180
gacgcgatcc ttcttggcgc tatcggtgca ccaggttccg tccctccagg aattctcgag	240
cgtggtttgc tgctgaagat gcgattcgca ctggatcacc acgtgaacct gcgcccattc	300
aagctgtacg acggcgtgga gtccccactg cgtaaccag gcaagattga tttcgttgtg	360
gtccgcgaag gtaccgaagg cgcctacact ggcaacgggtg gagcaatccg cgtgggaacc	420
cctcacgaga ttgccaatga aacctccgtg aacactcgct acggcgctga gcgcgttatt	480
cgctacgcat tcgagctggc acagagccgc cgcaagaagc tcaccctcgt gcacaagacc	540
aacgtcctgg ttcacgggtg tggcctgtgg cagcgcaccg tagatgaggt tgcaaaggaa	600
taccagagg tagccgtcga ttacaaccac atcgatgcag caaccatcta tctggtcact	660
gatccttccc gtttcgatgt gattgttacc gataacctct tcggcgacat cctcaccgat	720
gaggcaggcg cagtctctgg cggaattggc ctgcgagcat ccggcaacat cgatgccacg	780
ggcaccaacc cttccatgtt cgagccagtc cacggctctg caccagatat cgcaggccag	840
ggaatcgag acccaacggc agcaatccta tccgctgcga tgctgctgcg tcacttaggt	900
gatgaagaca acgcagtacg tattgaaaca gccatcgag ctgatgtggc tggccgagat	960
aactctcagc cgatttctac cactgaggtg ggagaccgca tcgtcaaggc gctgcaaagc	1020
taa	1023

<210> 19
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> leuC từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 19
 Met Thr Ser Pro Val Glu Asn Ser Thr Ser Thr Glu Lys Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Lys Val Trp Arg Asp His Val Val Ser Lys Gly Glu Asn Gly
 20 25 30
 Glu Pro Asp Leu Leu Tyr Ile Asp Leu Gln Leu Leu His Glu Val Thr
 35 40 45
 Ser Pro Gln Ala Phe Asp Gly Leu Arg Met Thr Gly Arg Lys Leu Arg
 50 55 60
 His Pro Glu Leu His Leu Ala Thr Glu Asp His Asn Val Pro Thr Glu
 65 70 75 80
 Gly Ile Lys Thr Gly Ser Leu Leu Glu Ile Asn Asp Lys Ile Ser Arg
 85 90 95
 Leu Gln Val Ser Thr Leu Arg Asp Asn Cys Glu Glu Phe Gly Val Arg
 100 105 110
 Leu His Pro Met Gly Asp Val Arg Gln Gly Ile Val His Thr Val Gly
 115 120 125
 Pro Gln Leu Gly Ala Thr Gln Pro Gly Met Thr Ile Val Cys Gly Asp
 130 135 140
 Ser His Thr Ser Thr His Gly Ala Phe Gly Ser Met Ala Phe Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Glu Val Glu His Val Met Ala Thr Gln Thr Leu Pro Leu
 165 170 175
 Lys Pro Phe Lys Thr Met Ala Ile Glu Val Thr Gly Glu Leu Gln Pro
 180 185 190
 Gly Val Ser Ser Lys Asp Leu Ile Leu Ala Ile Ile Ala Lys Ile Gly
 195 200 205
 Thr Gly Gly Gly Gln Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Arg Gly Glu Ala Ile
 210 215 220
 Arg Lys Met Ser Met Asp Ala Arg Met Thr Met Cys Asn Met Ser Ile
 225 230 235 240
 Glu Ala Gly Ala Arg Ala Gly Met Ile Ala Pro Asp Gln Thr Thr Phe
 245 250 255
 Asp Tyr Val Glu Gly Arg Glu Met Ala Pro Lys Gly Ala Asp Trp Asp

260 265 270
 Glu Ala Val Ala Tyr Trp Lys Thr Leu Pro Thr Asp Glu Gly Ala Thr
 275 280 285
 Phe Asp Lys Val Val Glu Ile Asp Gly Ser Ala Leu Thr Pro Phe Ile
 290 295 300
 Thr Trp Gly Thr Asn Pro Gly Gln Gly Leu Pro Leu Gly Glu Ser Val
 305 310 315 320
 Pro Ser Pro Glu Asp Phe Thr Asn Asp Asn Asp Lys Ala Ala Ala Glu
 325 330 335
 Lys Ala Leu Gln Tyr Met Asp Leu Val Pro Gly Thr Pro Leu Arg Asp
 340 345 350
 Ile Lys Ile Asp Thr Val Phe Leu Gly Ser Cys Thr Asn Ala Arg Ile
 355 360 365
 Glu Asp Leu Gln Ile Ala Ala Asp Ile Leu Lys Gly His Lys Ile Ala
 370 375 380
 Asp Gly Met Arg Met Met Val Val Pro Ser Ser Thr Trp Ile Lys Gln
 385 390 395 400
 Glu Ala Glu Ala Leu Gly Leu Asp Lys Ile Phe Thr Asp Ala Gly Ala
 405 410 415
 Glu Trp Arg Thr Ala Gly Cys Ser Met Cys Leu Gly Met Asn Pro Asp
 420 425 430
 Gln Leu Lys Pro Gly Glu Arg Ser Ala Ser Thr Ser Asn Arg Asn Phe
 435 440 445
 Glu Gly Arg Gln Gly Pro Gly Gly Arg Thr His Leu Val Ser Pro Ala
 450 455 460
 Val Ala Ala Ala Thr Ala Ile Arg Gly Thr Leu Ser Ser Pro Ala Asp
 465 470 475 480
 Ile

<210> 20
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> leuC từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 20
 atgaccagcc ccgtggagaa cagcacctca actgagaagc tgaccctggc agagaaggtg 60
 tggcgcgacc atgtcgtgtc caaggagaaa aacggcgagc ccgacctcct ctacatcgac 120

ctgcagctgc tgcataaagt gacctcacca caggcatttg acggcctgcg catgaccggc 180
 cgtaaactgc gccacccaga actgcacctg gccaccgaag accacaacgt gccaacccgaa 240
 ggcatcaaga ctggctcact gctggaaatc aacgacaaga tttcccgctt gcaggtatct 300
 actctgcgcg acaactgtga agaattcggc gtgcgcctgc acccaatggg tgatgtccga 360
 cagggcatcg tgcacaccgt cggcccacag ctccggcgcaa cccagccagg catgaccatt 420
 gtgtgcggtg actcccacac ctccaccac ggtgcttttg gctccatggc attcggcatc 480
 ggtacctcag aggttgagca cgtcatggct actcaaacc tgccactgaa gcctttcaag 540
 accatggcca ttgaagttac tggatgaactg cagccagggtg tttcctccaa ggacctgatt 600
 ctggcgatta tcgccaagat cggcaccggc ggccggacagg gctacgttct ggaataccgc 660
 ggccaagcaa tccgtaagat gtccatggat gcacgcatga ccatgtgcaa catgtccatc 720
 gaagctggcg cacgtgccgg catgatcgcc ccagacaaaa ccaccttcga ctacgttgaa 780
 ggccgcgaaa tggcaccaaaa gggcgccgac tgggacgaag cagttgctta ctggaagacc 840
 ctgccaaccg acgaaggcgc aacctttgac aaggctcgtg aaatcgatgg ctccgcactg 900
 accccattca tcacctgggg caccaacca ggccagggcc tgccactggg cgaatccgta 960
 ccaagcccag aagacttcac caacgacaac gacaaggcag cagccgaaaa ggactgcag 1020
 tacatggacc tggtagcagg aacccccactg cgcgacatca agatcgacac cgtcttcctg 1080
 ggatcctgca ccaacgcccg catcgaagac ctgcagatcg ccgctgacat cctcaagggc 1140
 caaaaaatcg ccgacggcat gcgcatgatg gtcgtgcctt cctccacctg gatcaagcaa 1200
 gaggcagaag cgctcggact ggacaaaatc ttcaccgacg ctggcgctga atggcgctacc 1260
 gcaggctgct ccatgtgcct gggcatgaac ccagaccaac tgaagccagg cgagcgctcc 1320
 gcatccacct ccaaccgaaa cttcgaagga cgccaaggac caggaggccg caccacctg 1380
 gtatccccag cagtcgcagc cgccaccgca atccgcggca ccctgtctc acctgcagat 1440
 atctaa 1446

<210> 21
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> leuD từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 21
 Met Glu Lys Phe Thr Thr Tyr Thr Gly Val Gly Val Pro Leu Gln Arg
 1 5 10 15

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

<210> 22

<211> 594

<212> ADN

<213> leuD từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 22

atggaaaaat ttaccaccta caccggcggtt ggcgttccac tgcagcgatc caacgtggac	60
accgaccaga tcatcccagc cgtctacctc aagcgcggtca cccggaccgg cttcgaagac	120
ggactgtttt ccaactggcg ccaaaacgac cccaactttg tcctcaacac cgacacctac	180
aagaacggct ccgttctcgt agcaggccct gactttggca ccggctcctc ccgcgagcac	240
gccgtctggg cactcatgga ctacggcttc cgcgctgtct tctcctcacg attcgccgac	300
atcttccgcg gcaactccgg aaaagcgggc atgctcaccg gcatcatgga acagtccgac	360

atcgaacttc tgtggaagct catggaacaa accccaggcc tcgaactgac cgtgaacctg 420
 gaaaagcaga tcgtcaccgc aggcgacgta gtgatcagct tcgaagttga cccctacatc 480
 cgctggcggtt tgatggaagg cctcgacgac gctggcctga ccctgcgcaa gctcgatgaa 540
 attgaagact acgaggctaa gcgccctgcg tttaagccac gcactaacgc ttaa 594

<210> 23
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> ilvA từ Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<400> 23
 Met Ser Glu Thr Tyr Val Ser Glu Lys Ser Pro Gly Val Met Ala Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Glu Leu Ile Arg Ala Ala Asp Ile Gln Thr Ala Gln Ala Arg
 20 25 30
 Ile Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Pro Leu Gln Tyr Cys Pro Arg Leu
 35 40 45
 Ser Glu Glu Thr Gly Ala Glu Ile Tyr Leu Lys Arg Glu Asp Leu Gln
 50 55 60
 Asp Val Arg Ser Tyr Lys Ile Arg Gly Ala Leu Asn Ser Gly Ala Gln
 65 70 75 80
 Leu Thr Gln Glu Gln Arg Asp Ala Gly Ile Val Ala Ala Ser Ala Gly
 85 90 95
 Asn His Ala Gln Gly Val Ala Tyr Val Cys Lys Ser Leu Gly Val Gln
 100 105 110
 Gly Arg Ile Tyr Val Pro Val Gln Thr Pro Lys Gln Lys Arg Asp Arg
 115 120 125
 Ile Met Val His Gly Gly Glu Phe Val Ser Leu Val Val Thr Gly Asn
 130 135 140
 Asn Phe Asp Glu Ala Ser Ala Ala Ala His Glu Asp Ala Glu Arg Thr
 145 150 155 160
 Gly Ala Thr Leu Ile Glu Pro Phe Asp Ala Arg Asn Thr Val Ile Gly
 165 170 175
 Gln Gly Thr Val Ala Ala Glu Ile Leu Ser Gln Leu Thr Ser Met Gly
 180 185 190
 Lys Ser Ala Asp His Val Met Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu Leu
 195 200 205

Ala Gly Val Val Ser Tyr Met Ala Asp Met Ala Pro Arg Thr Ala Ile
 210 215 220

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

Asn Gly Gly Pro Ile Thr Leu Glu Thr Val Asp Pro Phe Val Asp Gly
 245 250 255

Ala Ala Val Lys Arg Val Gly Asp Leu Asn Tyr Thr Ile Val Glu Lys
 260 265 270

Asn Gln Gly Arg Val His Met Met Ser Ala Thr Glu Gly Ala Val Cys
 275 280 285

Thr Glu Met Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Glu Gly Ile Ile Ala Glu Pro
 290 295 300

Ala Gly Ala Leu Ser Ile Ala Gly Leu Lys Glu Met Ser Phe Ala Pro
 305 310 315 320

Gly Ser Val Val Val Cys Ile Ile Ser Gly Gly Asn Asn Asp Val Leu
 325 330 335

Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Val His Arg Gly Leu Lys
 340 345 350

His Tyr Phe Leu Val Asn Phe Pro Gln Lys Pro Gly Gln Leu Arg His
 355 360 365

Phe Leu Glu Asp Ile Leu Gly Pro Asp Asp Asp Ile Thr Leu Phe Glu
 370 375 380

Tyr Leu Lys Arg Asn Asn Arg Glu Thr Gly Thr Ala Leu Val Gly Ile
 385 390 395 400

His Leu Ser Glu Ala Ser Gly Leu Asp Ser Leu Leu Glu Arg Met Glu
 405 410 415

Glu Ser Ala Ile Asp Ser Arg Arg Leu Glu Pro Gly Thr Pro Glu Tyr
 420 425 430

Glu Tyr Leu Thr
 435

<210> 24

<211> 1311

<212> ADN

<213> ilvA từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 24

atgagtgaaa catacgtgtc tgagaaaagt ccaggagtga tggctagcgg agcggagctg

60

attcgtgccg ccgacattca aacggcgcag gcacgaattt cctccgtcat tgcaccaact

120

```

ccattgcagt attgccctcg tctttctgag gaaaccggag cggaaatcta ccttaagcgt      180
gaggatctgc aggatgttcg ttcctacaag atccgcggtg cgctgaactc tggagcgcag      240
ctcacccaag agcagcgcga tgcaggtatc gttgccgcat ctgcaggtaa ccatgcccag      300
ggcgtggcct atgtgtgcaa gtccttgggc gttcagggac gcatctatgt tcctgtgcag      360
actccaaagc aaaagcgtga ccgcatcatg gttcacggcg gagagtttgt ctccttggtg      420
gtcactggca ataacttcga cgaagcatcg gctgcagcgc atgaagatgc agagcgcacc      480
ggcgcaacgc tgatcgagcc tttcgatgct cgcaacaccg tcatcggtca gggcaccgtg      540
gctgctgaga tcttgtcgca gctgacttcc atgggcaaga gtgcagatca cgtgatggtt      600
ccagtcggcg gtggcggact tcttgagggt gtggtcagct acatggctga tatggcacct      660
cgcactgcga tcgttggtat cgaaccagcg ggagcagcat ccatgcaggc tgcattgcac      720
aatggtggac caatcacttt ggagactgtt gatccctttg tggacggcgc agcagtcaaa      780
cgtgtcggag atctcaacta caccatcgtg gagaagaacc agggtcgctg gcacatgatg      840
agcgcgaccg agggcgctgt gtgtactgag atgctcgatc tttacaaaaa cgaaggcatc      900
atcgcgggagc ctgctggcgc gctgtctatc gctgggttga aggaaatgtc ctttgcacct      960
ggttctgtcg tgggtgtgcat catctctggt ggcaacaacg atgtgctgcg ttatgcggaa     1020
atcgctgagc gtccttggt gcaccgcggt ttgaagcact acttcttggt gaacttcccg     1080
caaaagcctg gtcagttgcg tcacttcctg gaagatatcc tgggaccgga tgatgacatc     1140
acgctgtttg agtacctcaa gcgcaacaac cgtagagaccg gtactgcgtt ggtgggtatt     1200
cacttgagtg aagcatcagg attggattct ttgctggaac gtatggagga atcggcaatt     1260
gattcccgtc gcctcgagcc gggcaccct gagtacgaat acttgaccta a                 1311

```

<210> 25

<211> 922

<212> PRT

<213> aceE từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 25

Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
1 5 10 15

Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
20 25 30

Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln

35	40	45
Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu		
50	55	60
Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp		
65	70	75
Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp		
	85	90
Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala		
	100	105
Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His		
	115	120
Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn		
	130	135
His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe		
145	150	155
Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu		
	165	170
Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser		
	180	185
Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys		
	195	200
Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp		
	210	215
Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile		
225	230	235
Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu		
	245	250
Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn		
	260	265
Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu		
	275	280
Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser		
	290	295
Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg		
305	310	315
Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu		
	325	330

Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn
 340 345 350
 Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr
 355 360 365
 Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro
 370 375 380
 Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys
 405 410 415
 Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln
 420 425 430
 Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln
 435 440 445
 Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro
 450 455 460
 Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn
 485 490 495
 Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg
 500 505 510
 Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg
 515 520 525
 Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val
 530 535 540
 Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe
 545 550 555 560
 Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val
 565 570 575
 Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile
 580 585 590
 Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Val Ala Ser Phe Ile Ala
 595 600 605
 Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr
 610 615 620

Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala
 645 650 655
 Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His
 660 665 670
 Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro
 675 680 685
 Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg
 690 695 700
 Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile
 705 710 715 720
 Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val
 725 730 735
 Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr
 740 745 750
 Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala
 755 760 765
 Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn
 770 775 780
 Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala
 785 790 795 800
 Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala
 805 810 815
 Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val
 820 825 830
 Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro
 835 840 845
 Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr
 850 855 860
 Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val
 865 870 875 880
 Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser
 885 890 895
 Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser
 900 905 910
 Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu

915

920

<210> 26
 <211> 2769
 <212> ADN
 <213> aceE từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

<400> 26
 atggccgatc aagcaaaact tgggtggcaag ccctcggatg actctaactt cgcgatgatc 60
 cgcgatggcg tggcatctta tttgaacgac tcagatccgg aggagaccaa cgagtggatg 120
 gattcactcg acggattact ccaggagtct tctccagaac gtgctcgtta cctcatgctt 180
 cgtttgcttg agcgtgcatc tgcaaagcgc gtatctcttc cccaatgac gtcaaccgac 240
 tacgtcaaca ccattccaac ctctatggaa cctgaattcc caggcgatga ggaaatggag 300
 aagcgttacc gtcgttggat tcgctggaac gcagccatca tggttcaccg cgctcagcga 360
 ccaggcatcg gcgtcggcgg acacatttcc acttacgcag gcgcagcccc tctgtacgaa 420
 gttggcttca accacttctt ccgcggcaag gatcaccag gcggcggcga ccagatcttc 480
 ttccagggcc acgcatcacc aggtatgtac gcacgtgcat tcatggaggg tcgcctttct 540
 gaagacgatc tcgatggctt ccgtcaggaa gtttcccgtg agcagggtgg cattccgtcc 600
 taccctcacc cacacggtat gaaggacttc tgggagttcc caactgtgtc catgggtctt 660
 ggcccaatgg atgccattta ccaggcacgt ttcaaccgct acctcgaaaa ccgtggcatc 720
 aaggacacct ctgaccagca cgtctgggcc ttccttggcg acggcgaaat ggacgagcca 780
 gaatcacgtg gtctcatcca gcaggctgca ctgaacaacc tggacaacct gaccttcgtg 840
 gttaactgca acctgcagcg tctcgacgga cctgtccgcg gtaacaccaa gatcatccag 900
 gaactcgagt ctttcttccg tggcgcaggc tggctctgtga tcaaggttgt ttggggtcgc 960
 gagtgggatg aacttctgga gaaggaccag gatggtgcac ttgttgagat catgaacaac 1020
 acctccgatg gtgactacca gaccttcaag gctaacgacg gcgcatatgt tcgtgagcac 1080
 ttcttcggac gtgaccacg caccgcaaag ctggttgaga acatgaccga cgaagaaatc 1140
 tggaagcttc cacgtggcgg ccacgattac cgcaaggttt acgcagccta caagcgagct 1200
 cttgagacca aggatcgccc aaccgtcatc cttgctcaca ccattaaggg ctacggactc 1260
 ggccacaact tcgaaggccg taacgcaacc caccagatga agaagctgac gcttgatgat 1320
 ctgaagttgt tccgcgacaa gcagggcac ccaatcaccg atgagcagct ggagaaggat 1380

ccttaccttc ctccttacta ccacccaggt gaagacgctc ctgaaatcaa gtacatgaag 1440
 gaacgtcgcg cagcgctcgg tggctacctg ccagagcgctc gtgagaacta cgatccaatt 1500
 caggttccac cactggataa gcttcgctct gtccgtaagg gtc ccggcaa gcagcagatc 1560
 gctaccacca tggcgactgt tcgtaccttc aaggaactga tgcgcgataa gggcttggct 1620
 gatcgccttg tcccaatcat tcctgatgag gcacgtacct tcggtcttga ctcttggttc 1680
 ccaaccttga agatctacaa cccgcacggt cagaactacg tgcctgttga ccacgacctg 1740
 atgctctcct accgtgaggc acctgaagga cagatcctgc acgaaggcat caacgaggct 1800
 ggttccgtgg catcgttcat cgctgcgggt acctcctacg ccacccacgg caaggccatg 1860
 attccgctgt acatcttcta ctgatgttc ggattccagc gcaccggtga ctccatctgg 1920
 gcagcagccg atcagatggc acgtggcttc ctcttgggcg ctaccgcagg tcgcaccacc 1980
 ctgaccggtg aaggcctcca gcacatggat ggacactccc ctgtcttggc ttccaccaac 2040
 gagggtgtcg agacctacga cccatccttt gcgtacgaga tcgcacacct ggttcaccgt 2100
 ggcatcgacc gcatgtacgg cccaggcaag ggtgaagatg ttatctacta catcaccatc 2160
 tacaacgagc caaccccaca gccagctgag ccagaaggac tggacgtaga aggcctgcac 2220
 aagggtcatct acctctactc ccgcggtgaa ggcaccggcc atgaggcaaa catcttggct 2280
 tccggtgttg gtatgcagtg ggctctcaag gctgcatcca tccttgaggc tgactacgga 2340
 gttcgtgcca acatttactc cgctacttct tgggttaact tggctcgca tggcgctgct 2400
 cgtaacaagg cacagctgcg caaccaggt gcagatgctg gcgaggcatt cgtaaccacc 2460
 cagctgaagc agacctccgg cccatacgtt gcagtgtctg acttctccac tgatctgcca 2520
 aaccagatcc gtgaatgggt cccaggcgac tacaccgttc tcggtgcaga tggcttcggt 2580
 ttctctgata cccgcccagc tgctcgtcgc ttcttcaaca tcgacgctga gtccattggt 2640
 gttgcagtgc tgaactccct ggcacgcgaa ggcaagatcg acgtctccgt tgctgctcag 2700
 gctgctgaga agttcaagtt ggatgatacct acgagtgttt ccgtagatcc aaacgctcct 2760
 gaggaataa 2769

<210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Pcj7-5-KpnI

<400> 27

gatggtacca cccagaaac atcccagc

28

<210> 28

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Pcj7-3 NdeI

<400> 28

cgatcatatg gagtggttcc tttcgttggg

30

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 117-F

<400> 29

ccacagccga caggatggtg a

21

<210> 30

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 117-R

<400> 30

ctcagggtgt agcggttcgg t

21

<210> 31

<211> 34

<212> ADN

<213> leuB-5-cimA

<400> 31

ttgttgaatt aatctagagg tgacacccca gtgg

34

<210> 32
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> leuB-3-leuC

<400> 32
 tcgcagctgc caccgatatt tagctttgca gcgc

34

<210> 33
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> leuC-5-leuB

<400> 33
 gcgctgcaaa gctaaatatt ggtggcagct gcga

34

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

<220>
 <223> leuD-3-XbaI

<400> 34
 tggcgggccgc tctagagctt tcgctatcag actg

34

<210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cimA-5-NdeI

<400> 35
 gcatcatatg atggttaagga tatttc

25

<210> 36
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cimA-3-XbaI

<400> 36

cgatctagat taattcaaca acatggt

27

<210> 37

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ilvA-5-XbaI

<400> 37

gcatctagag aacacggaca atgccac

27

<210> 38

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ilvA-Del-R

<400> 38

caaacagcgt gatgtcctga gtgagctgcg ct

32

<210> 39

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ilvA-Del-F

<400> 39

agcgcagctc actcaggaca tcacgctggt tg

32

<210> 40

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ilvA-3-XbaI

<400> 40
gcatctagaa cctgcggcac accttgggc

29

<210> 41
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Topo-F

<400> 41
gcagtgcgcg caacgcaat

19

<210> 42
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Topo-R

<400> 42
cgttgtaaaa cgacggcca

19

<210> 43
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CFilvA

<400> 43
gatctgtgat gaggtgatg

19

<210> 44
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CRilvA

<400>	44	
cgtcctttcca	tgactctca	19
<210>	45	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	lysC-5-KpnI	
<400>	45	
tgaggtaccc	atgcgattgt taatgc	26
<210>	46	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	asd-3-SfoI	
<400>	46	
ctaggcgcca	gtgtagcact caagcgga	28
<210>	47	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	hom-5-BamHI	
<400>	47	
ctaggatccc	tcaccattct caatggt	27
<210>	48	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	thrB-3-BamHI	
<400>	48	
ctaggatccg	ccttccttgt tgggc	25

<210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> thrC-5-SpeI

<400> 49
 tgcactagtg agaacatata ggttcca

27

<210> 50
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> thrC-3-ilvA

<400> 50
 ggcatgtgcc gtgttcttac ttcacggaag tg

32

<210> 51
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ilvA-5-thrC

<400> 51
 cacttccgtg aagtaagaac acggacaatg cc

32

<210> 52
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ilvA-3-SpeI

<400> 52
 tgcactagta cctgcggcac accttgggc

29