



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

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

(11)



1-0038333

(51)⁷ C12N 9/10; C12P 13/12; C12P 13/06; (13) B
C12N 1/21; C12N 9/12

(21) 1-2020-00207

(22) 29/06/2018

(86) PCT/KR2018/007408 29/06/2018

(87) WO 2019/004779 03/01/2019

(30) 10-2017-0083438 30/06/2017 KR

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/06/2020 387

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

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

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

(54) POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH O-SUXINYL HOMOSERIN TRANSFERAZA, VI SINH VẬT SẢN XUẤT O-SUXINYL HOMOSERIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-SUXINYL HOMOSERIN NÀY

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

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

O-suxinyl homoserin đóng vai trò làm tiền chất của methionin là một loại axit amin thiết yếu trong cơ thể sống. Methionin được sử dụng làm thức ăn và chất phụ gia thực phẩm và còn được sử dụng làm nguyên liệu tổng hợp cho các giải pháp y tế và vật tư y tế.

Methionin được sản xuất thông qua sự tổng hợp hóa học và tổng hợp sinh học. Trong khi đó, đã có tài liệu bộc lộ quy trình hai bước (WO/2008/013432), trong đó tiền chất L-methionin được sản xuất thông qua quá trình lên men, và sau đó được chuyển hóa thành L-methionin bằng phản ứng chuyển hóa enzym.

Trong quy trình hai bước, O-suxinyl homoserin hoặc O-axetyl homoserin được sử dụng làm tiền chất methionin, và để sản xuất methionin hàng loạt một cách kinh tế, điều rất quan trọng là sản xuất O-suxinyl homoserin với năng suất cao.

Gen metA là gen mã hóa homoserin O-suxinyltransferaza (MetA) là enzym mà tiếp hợp nhóm suxinyl của suxinyl-coA với homoserin để tạo ra O-suxinyl homoserin, và gen metA là một trong các gen quan trọng nhất để phát triển chủng sản xuất O-suxinyl homoserin.

Chủng tích lũy O-suxinyl homoserin có thể được tạo ra thông qua việc xóa bỏ gen metB mã hóa xystathionin gama synthaza trong con đường sinh tổng hợp methionin. Tuy nhiên, chủng sản xuất O-suxinylhomoserin cần đến L-methionin. Vì lý

do này, hoạt tính của homoserin O-suxinyltransferaza bị ức chế thông qua sự ức chế phản hồi bởi methionin được bổ sung vào môi trường, và cuối cùng là, rất khó để thu được O-suxinyl homoserin ở nồng độ cao.

Do đó, nhiều bằng sáng chế trước đây đã tập trung nghiên cứu vào việc giải phóng sự ức chế phản hồi của metA khỏi hệ thống kiểm soát phản hồi. Tuy nhiên, homoserin O-suxinyltransferaza được mã hóa bằng metA có vấn đề ở chỗ bản thân protein kiểu đại có độ ổn định thấp và việc tạo ra đột biến để giải phóng ức chế phản hồi làm trầm trọng thêm sự mất ổn định. Theo đó, để phát triển chủng vi khuẩn sản xuất O-suxinyl homoserin có năng suất cao, cần loại bỏ sự ức chế phản hồi của gen metA và bảo đảm độ ổn định của enzym.

Hầu hết các vi sinh vật có trong tự nhiên đã được biết đến sử dụng O-suxinyl homoserin hoặc O-axetyl homoserin làm chất trung gian cho quá trình sinh tổng hợp methionin. Nói chung, MetA tạo ra O-suxinyl homoserin và homoserin O-axetyltransferaza (MetX) tạo ra O-axetyl homoserin. Không giống như MetA, MetX không bị ức chế phản hồi và có độ ổn định enzym cao.

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nỗ lực để tăng cường sản xuất O-suxinyl homoserin, và kết quả là họ đã tìm thấy protein có hoạt tính tổng hợp O-suxinyl homoserin, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, peptit bao gồm thay thế của axit amin khác với leuxin đối với axit amin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

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

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin thuộc chi *Corynebacterium*, vi sinh vật bao gồm polypeptit có hoạt tính O-

suxinyl homoserin transferaza.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất O-suxinyl homoserin, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường; và phân lập hoặc thu O-suxinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường.

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

Hiệu quả của sáng chế

Biến thể của protein O-suxinyl homoserin transferaza theo sáng chế có thể có hoạt tính chuyển hóa O-suxinyl homoserin được tăng cường, so với dạng tự nhiên của nó, nhờ đó được áp dụng rộng rãi để sản xuất hàng loạt O-suxinyl homoserin hiệu quả hơn như một chất thay thế cho các con đường tổng hợp hóa học hiện có.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

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

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan có thể nhận dạng hoặc nhận biết nhiều phương án tương đương với các khía cạnh nhất định của sáng chế được mô tả trong phần mô tả này bằng cách chỉ sử dụng các thử nghiệm chung. Ngoài ra, các phương án tương đương như vậy được bao gồm trong sáng chế.

Để đạt được các mục đích này, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit mới có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza. Biến thể polypeptit mới này có thể là polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, polypeptit bao gồm thay

thể của axit amin khác với leuxin đối với axit amin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin thu được từ *Corynebacterium glutamicum*, cụ thể, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Hơn nữa, polypeptit có thể bao gồm thay thế của axit amin khác với leuxin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và có thể có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza. Cụ thể hơn, polypeptit có thể là polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, trong đó polypeptit này bao gồm thay thế của arginin, xystein, isoleuxin, hoặc lysin đối với axit amin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Biến thể polypeptit như vậy được đặc trưng bởi có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza được tăng cường, so với polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza có SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza” dùng để chỉ hoạt tính chuyển hóa homoserin thành O-suxinyl homoserin. O-suxinyl homoserin transferaza được gọi chung là enzym có khả năng chuyển hóa suxinyl CoA và L-homoserin làm cơ chất thành CoA và O-suxinyl homoserin.

Sơ đồ phản ứng



Theo sáng chế, O-suxinyl homoserin transferaza dùng để chỉ enzym có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, thu được bằng cách thay thế một axit amin khác cho một phần của trình tự axit amin của protein MetX mà là O-axetyl homoserin transferaza. Protein MetX có thể là MetX thu được từ chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn, MetX có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, mà thu được từ *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không giới hạn ở đó. Trình tự của protein MetX có sẵn từ ngân hàng gen NCBI (NCBI GenBank) là cơ sở dữ liệu đã biết.

Theo sáng chế, các phương pháp khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể áp dụng cho phương pháp thu O-suxinyl homoserin transferaza. Ví dụ, O-suxinyl homoserin transferaza có thể thu được từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được sử dụng rộng rãi để biểu hiện enzym, bằng cách sử dụng các

kỹ thuật tổng hợp gen dựa trên sự tối ưu hóa codon bằng enzym có thể thu được ở hiệu suất cao, hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp sàng lọc các nguồn enzym hữu ích, dựa trên tin sinh học của một lượng lớn thông tin di truyền về vi sinh vật, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, biến thể O-suxinyl homoserin transferaza có thể được sử dụng thay thế cho “O-suxinyl homoserin transferaza được đột biến” hoặc “O-suxinyl homoserin transferaza biến thể”. Trong khi đó, biến thể này có thể là biến thể không có trong tự nhiên.

Cụ thể, O-suxinyl homoserin transferaza được đột biến theo sáng chế có thể có thay thế axit amin khác với leuxin đối với gốc axit amin ở vị trí 313 từ đầu cuối N của MetX thu được từ chi *Corynebacterium* (*Corynebacterium* sp.) có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1. Cụ thể, gốc axit amin leuxin ở vị trí 313 có thể được thay thế bằng arginin, xystein, isoleuxin, hoặc lysin, nhưng không giới hạn ở đó. O-suxinyl homoserin transferaza được đột biến theo sáng chế có thể gồm polypeptit chứa biến thể ở vị trí 313 từ đầu cuối N của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó biến thể này gồm thay thế của axit amin được chọn từ nhóm bao gồm arginin, xystein, isoleuxin, và lysin, và polypeptit có thể có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ít nhất là 85% so với SEQ ID NO: 1, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza theo sáng chế có thể là một polypeptit bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75 và SEQ ID NO: 81, cụ thể là trình tự axit amin có polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, trong đó axit amin ở vị trí 313 từ đầu cuối N có SEQ ID NO: 1 được đột biến thành arginin, xystein, isoleuxin, hoặc lysin, một cách tương ứng, nhưng không giới hạn ở đó. Polypeptit có thể bao gồm polypeptit bất kỳ có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất là 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, hoặc 99% hoặc lớn hơn so với các trình tự nêu trên mà không bị giới hạn, miễn là polypeptit bao gồm biến thể nêu trên và có hoạt tính chuyển hóa O-suxinyl homoserin được tăng cường, so với kiểu đại.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể polypeptit” dùng để chỉ polypeptit, của một hoặc nhiều axit amin khác với trình tự được trích dẫn trong các thay thế và/hoặc cải biến bảo toàn, nhưng nó vẫn giữ chức năng hoặc đặc tính của polypeptit. Các polypeptit biến thể khác với trình tự được nhận biết bằng thay thế, xóa bỏ, hoặc bổ sung một vài axit amin. Các biến thể như vậy thường được nhận biết bằng cách cải biến một trong số các trình tự polypeptit nêu trên và đánh giá các đặc tính của polypeptit được cải biến. Nói cách khác, khả năng của biến thể có thể tăng lên, không thay đổi hoặc bị giảm, so với khả năng của protein tự nhiên. Các biến thể như vậy thường có thể được nhận biết bằng cách cải biến một trong số các trình tự polypeptit nêu trên và đánh giá tính phản ứng của polypeptit được cải biến. Hơn nữa, một số cải biến có thể gồm các cải biến trong đó một hoặc nhiều phần, như trình tự dẫn đầu đầu cuối N hoặc miền xuyên màng, đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể gồm các biến thể trong đó một phần được loại bỏ từ đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C của protein thuần thực. Thuật ngữ “biến thể” cũng có thể được sử dụng dưới dạng cải biến, protein được cải biến, polypeptit được cải biến, thể đột biến, mutein, phân hướng, v.v., và thuật ngữ bất kỳ không bị giới hạn, cũng như được sử dụng theo nghĩa được đột biến. Cụ thể, biến thể này gồm biến thể trong đó hoạt tính của O-suxinyl homoserin transferaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum* được cải thiện hiệu quả bằng biến thể của các axit amin của nó, so với kiểu đại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo toàn” có nghĩa là việc thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học tương

tự. Biến thể có thể có, ví dụ, một hoặc nhiều thay thế bảo toàn trong khi giữ lại một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Các thay thế axit amin như vậy nói chung có thể được thực hiện trên cơ sở tương tự về tính phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, các axit amin (bazơ) tích điện dương gồm arginin, lysin và histidin; các axit amin (axit) tích điện âm gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm gồm phenylalanin, tryptophan, và tyrosin; và các axit amin kỵ nước gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan. Nói chung, việc thay thế bảo toàn có ít hoặc không có tác dụng đối với hoạt tính của polypeptit tạo thành.

Hơn nữa, các biến thể có thể gồm một cải biến khác gồm khuyết hoặc bổ sung các axit amin mà có ảnh hưởng tối thiểu đối với các đặc tính và cấu trúc thứ hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể tiếp hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) tại đầu cuối N của protein, mà định hướng dịch mã đồng thời hoặc dịch mã sau sự di chuyển của protein. Polypeptit cũng có thể được tiếp hợp với trình tự khác hoặc trình tự liên kết để nhận biết, tinh chế, hoặc tổng hợp polypeptit. Nói cách khác, mặc dù 'protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO cụ thể' được mô tả ở đây, nhưng rõ ràng rằng protein có trình tự axit amin, một phần của trình tự được xóa bỏ, được cải biến, được thay thế, được thay thế bảo toàn, hoặc được bổ sung, có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là nó có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn là protein có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với hoạt tính của polypeptit biến thể, bổ sung trình tự mà không làm thay đổi chức năng của protein trước và sau trình tự axit amin, các đột biến có trong tự nhiên, đột biến cam hoặc thay thế bảo toàn của nó không được loại trừ. Rõ ràng rằng mặc dù polypeptit có sự bổ sung hoặc đột biến trình tự như vậy, nhưng nó vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hơn nữa, rõ ràng rằng, do sự thoái hóa codon, polynucleotit mà có thể được dịch mã thành protein bao gồm một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67,

SEQ ID NO: 75 và SEQ ID NO: 81, hoặc protein có độ tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự đó cũng có thể được bao gồm. Nói cách khác, đầu dò có thể được tạo ra từ trình tự nucleotit đã biết, ví dụ, trình tự mà lai với trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit dưới các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza cũng có thể được bao gồm mà không giới hạn. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện trong đó cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al., nêu trên). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể gồm, ví dụ, các điều kiện trong đó các gen có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao, có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất là 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 97% hoặc cao hơn, đặc biệt cụ thể là 99% hoặc cao hơn được lai với nhau và các gen có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất thấp hơn độ tương đồng hoặc độ đồng nhất nêu trên không được lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa thông thường trong kỹ thuật lai Southern, tức là, rửa một lần, cụ thể, hai lần hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Mặc dù sự không phù hợp giữa các nucleotit có thể xảy ra do quá trình lai nghiêm ngặt, nhưng hai axit nucleic này cần phải có trình tự bổ trợ. Thuật ngữ “bổ trợ” được sử dụng để mô tả mối liên hệ giữa các bazơ nucleotit mà có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin bổ trợ cho thymin và xytosin bổ trợ cho guanin. Do đó, sáng chế có thể không chỉ bao gồm các trình tự axit nucleic về cơ bản giống nhau, mà còn gồm các mảnh axit được phân lập bổ trợ cho toàn bộ trình tự.

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

Điều kiện khắc nghiệt thích hợp để lai các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ hỗ trợ của các polynucleotit, và các biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem Sambrook *et al.*, nêu trên, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

‘Độ tương đồng’ hoặc ‘độ đồng nhất’ dùng để chỉ mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho, và có thể được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm.

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

Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit được bảo toàn có thể được xác định bằng thuật toán sắp hàng tiêu chuẩn, và có thể được sử dụng với điểm GAP mặc định được thiết lập bằng chương trình được sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải hoặc cao để cho chiều dài đầy đủ của trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% trở lên của chiều dài đầy đủ có thể lai. Ngoài ra, được dự tính là các polynucleotit mà chứa các codon thoái hóa thay cho codon trong quá trình lai.

Có hay không hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ có độ tương đồng, độ tương tự hoặc độ đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán bằng máy tính đã biết như chương trình “FASTA”, bằng cách sử dụng, ví dụ, các thông số mặc định như trong Pearson *et al* (1988)[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85]: 2444, hoặc được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc sau đó) (gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al*, *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.](1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073).

Ví dụ, BLAST của Trung tâm cơ sở dữ liệu thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI), hoặc ClustalW có thể được sử dụng để xác định độ tương đồng, độ tương tự hoặc độ đồng nhất.

Độ tương đồng, độ tương tự hoặc độ đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự bằng cách sử dụng chương trình máy tính GAP như Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48: 443, như được bộc lộ trong Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP xác định tính tương tự như số lượng các ký tự được sắp hàng (tức là, nucleotit hoặc axit amin), là tương tự, chia cho tổng số các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự. Các thông số mặc định đối với chương trình GAP có thể gồm: (1) ma trận so sánh đơn phân (chứa giá trị bằng 1 đối với các mã đồng nhất và bằng 0 đối với các mã không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, như được bộc lộ trong Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Trình tự And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) điểm bằng 3,0 đối với mỗi GAP và điểm 0,10 bổ sung đối với mỗi ký tự trong mỗi GAP (hoặc điểm mở GAP bằng 10, điểm mở rộng GAP bằng 0,5); và (3) không có điểm đối với các GAP cuối. Do đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “độ tương đồng” hoặc “độ đồng nhất” thể hiện sự tương quan giữa các trình tự.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” dùng để chỉ chuỗi ADN hoặc ARN có chiều dài định trước hoặc lớn hơn, là polyme mạch dài của nucleotit được tạo ra bằng cách liên kết các monome nucleotit thông qua các liên kết cộng hóa trị. Cụ thể hơn, polynucleotit dùng để chỉ mảnh polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể.

Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của O-suxinyl homoserin transferaza có thể là gen của O-suxinyl homoserin transferaza biến thể, cụ thể, thu

được từ *Corynebacterium glutamicum*. Dựa trên sự thoái hóa mã di truyền, các trình tự nucleotit mã hóa cùng trình tự axit amin và các biến của nó cũng được bao gồm trong sáng chế, ví dụ, được nêu trong SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, hoặc SEQ ID NO: 82, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như đối với polynucleotit biến thể, dựa trên sự thoái hóa mã di truyền, các trình tự nucleotit mã hóa cùng trình tự axit amin và các biến của nó cũng được bao gồm theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể này, hoặc vi sinh vật được biến nạp bằng vector bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể này. Cụ thể, việc đưa vào có thể được tiến hành bằng kỹ thuật biến nạp, nhưng không giới hạn ở đó.

Cụ thể, vi sinh vật bao gồm polypeptit của O-suxinyl homoserin transferaza biến thể có thể đã nâng cao năng suất của O-suxinyl homoserin mà không ức chế sự phát triển của tế bào chủ, so với vi sinh vật bao gồm polypeptit của O-suxinyl homoserin transferaza kiểu dại, và do đó O-suxinyl homoserin có thể thu được từ vi sinh vật có hiệu suất cao.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” là sản phẩm thiết kế ADN mà gồm trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein mong muốn được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự điều hòa thích hợp để có khả năng biểu hiện protein mong muốn trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể gồm trình tự khởi đầu có khả năng khởi đầu sự phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã như vậy, trình tự mã hóa miền liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector này được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với hệ gen chủ, và có thể được tích hợp vào chính hệ gen đó.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó có khả năng sao chép trong tế bào chủ, và có thể sử dụng vector bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về các vector được sử dụng phổ biến có thể gồm plasmit,

cosmit, virut, và thể thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v.. có thể được sử dụng làm vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit. Loại pBR, loại pUC, loại pBluescriptII, loại pGEM, loại pTZ, loại pCL, loại pET, v.v.. có thể được sử dụng làm vector plasmid. Cụ thể, vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v.. có thể được sử dụng, nhưng không giới hạn ở các vector này.

Vector có thể áp dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng. Hơn nữa, polynucleotit mã hóa protein mong muốn có thể được cài vào nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng vector để cài nhiễm sắc thể nội bào. Việc cài nhiễm sắc thể của polynucleotit có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp tái tổ hợp tương đồng, nhưng không giới hạn ở đó. Chỉ thị lựa chọn để xác nhận việc cài nhiễm sắc thể cũng có thể được bao gồm. Chỉ thị lựa chọn là để lựa chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận sự cài polynucleotit mong muốn, và chỉ thị lựa chọn có thể gồm các chỉ thị cung cấp các kiểu hình có thể lựa chọn, như tính kháng thuốc, dị tăng trưởng, kháng các chất gây độc tế bào, hoặc biểu hiện các protein bề mặt. Do chỉ có các tế bào biểu hiện chỉ thị lựa chọn có khả năng sống sót hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, các tế bào được biến nạp có thể được lựa chọn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” dùng để chỉ việc đưa vector gồm polynucleotit mã hóa protein mong muốn vào tế bào chủ theo cách mà protein được mã hóa bằng polynucleotit được biểu hiện trong tế bào chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, nó có thể được gắn vào và được đặt trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, hoặc nó có thể tồn tại ngoài nhiễm sắc thể, hoặc không kể nó. Hơn nữa, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ, miễn là nó có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào

chủ dưới dạng caset biểu hiện, là sản phẩm thiết kế gen gồm tất cả các thành phần được yêu cầu để biểu hiện tự động của nó. Nói chung, caset biểu hiện gồm trình tự khởi đầu được liên kết theo cách hoạt động được với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Caset biểu hiện có thể có dạng vector biểu hiện có thể tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ và được liên kết theo cách hoạt động được với các trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không giới hạn ở đó. Phương pháp tiến hành biến nạp có thể gồm phương pháp bất kỳ để đưa axit nucleic vào tế bào, và sự biến nạp có thể được tiến hành bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp như được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này theo tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp này có thể gồm xung điện, kết tủa canxi phosphat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , hoặc $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, và phương pháp lithi axetat-DMSO, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết theo cách hoạt động được” dùng để chỉ mỗi liên kết chức năng giữa trình tự polynucleotit mã hóa protein mong muốn theo sáng chế và trình tự khởi đầu mà khởi đầu và điều tiết sự phiên mã của polynucleotit. Mỗi liên kết có thể hoạt động có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và sự phân cắt và liên kết ADN đặc hiệu vị trí có thể được tạo ra bằng cách sử dụng sự phân cắt và liên kết enzym, v.v., trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin” dùng để chỉ vi sinh vật mà tự nhiên có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin hoặc vi sinh vật được tạo ra bằng cách cung cấp chủng gốc không có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin với khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin.

Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin có thể là tế bào hoặc vi sinh vật mà có thể gồm polynucleotit mã hóa polypeptit biến thể này hoặc có thể biểu hiện polypeptit biến thể bằng cách biến nạp với vector gồm polynucleotit mã hóa polypeptit

biến thể này. Đối với các đối tượng của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là vi sinh vật bất kỳ, miễn là nó có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin bằng cách bao gồm polypeptit MetX biến thể. Các ví dụ cụ thể về nó có thể gồm các vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Serratia*, chi *Erwinia*, chi *Enterobacteria*, chi *Salmonella*, chi *Streptomyces*, chi *Pseudomonas*, chi *Brevibacterium*, và chi *Corynebacterium*, cụ thể, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn, *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin thuộc chi *Corynebacterium*” dùng để chỉ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin tự nhiên hoặc thông qua đột biến. Đã biết rằng môi trường nuôi cấy của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* gồm O-suxinyl homoserin. Tuy nhiên, khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin của nó là thấp đáng kể, và gen liên quan đến các cơ chế sản xuất hoặc các cơ chế của nó chưa được tiết lộ. Do đó, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin dùng để chỉ dạng tự nhiên của chính vi sinh vật, hoặc vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin mà được cải thiện bằng cách cài gen ngoại lai liên quan đến cơ chế sản xuất O-suxinyl homoserin hoặc bằng cách tăng cường hoặc làm bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh.

Theo sáng chế, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” cụ thể có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium amoniacgenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*, trong đó sự phát triển và khả năng sống sót của tế bào ít bị ảnh hưởng hơn ngay cả khi tiếp xúc với lượng cao O-suxinyl homoserin.

Ở vi sinh vật, hoạt tính của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza có thể bị bất hoạt. Nói cách khác, hoạt tính của một protein được chọn từ đó, hoạt tính của hai

protein được chọn từ đó, hoặc hoạt động của tất cả ba protein đều có thể bị bất hoạt.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm bất hoạt” hoạt tính của protein là khái niệm bao gồm việc làm suy yếu hoạt tính, so với hoạt tính nội tại của nó, hoặc không có hoạt tính.

Việc làm bất hoạt hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về các phương pháp có thể gồm phương pháp xóa bỏ toàn bộ hoặc một phần gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể, gồm trường hợp khi hoạt tính protein bị loại trừ; phương pháp thay thế gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bằng gen được đột biến để làm giảm hoạt tính của enzym; phương pháp đưa biến thể vào trình tự kiểm soát sự biểu hiện của gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát sự biểu hiện của gen mã hóa protein với trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế trình tự khởi đầu của gen với trình tự khởi đầu yếu hơn trình tự khởi đầu bên trong); phương pháp xóa bỏ toàn bộ hoặc một phần gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa oligonucleotit đối nghĩa (ví dụ, ARN đối nghĩa), mà ức chế sự dịch mã từ mRNA thành protein thông qua liên kết bổ trợ với sản phẩm phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp tạo thành sự gắn ribosom không thể bằng cách tạo thành cấu trúc thứ hai bằng cách bổ sung nhân tạo trình tự bổ trợ vào trình tự SD trên đầu phía trước của trình tự SD của gen mã hóa protein; phương pháp thiết kế phiên mã ngược (reverse transcription engineering - RTE) bằng việc bổ sung trình tự khởi đầu được phiên mã ngược trên đầu cuối 3' của khung đọc mở (open reading frame - ORF) của trình tự tương ứng; hoặc sự kết hợp của chúng, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó.

Cụ thể, phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein mong muốn nội sinh bên trong nhiễm sắc thể bằng polynucleotit hoặc gen chỉ thị có trình tự nucleotit được xóa một phần, thông qua vector để cài nhiễm sắc thể vào vi sinh vật. Ví dụ về nó, phương pháp xóa gen bằng sự tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng, nhưng

không giới hạn ở đó. Ngoài ra, “một phần”, mặc dù nó có thể thay đổi phụ thuộc vào các loại của polynucleotit, có thể được xác định thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan, và cụ thể có thể là 1 nucleotit đến 300 nucleotit, cụ thể hơn là 1 nucleotit đến 100 nucleotit, và thậm chí cụ thể hơn là 1 nucleotit đến 50 nucleotit, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó.

Hơn nữa, phương pháp cải biến trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách kích thích sự cải biến trong trình tự kiểm soát sự biểu hiện thông qua sự xóa bỏ, cài xen, hoặc thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc sự kết hợp của chúng để làm bất hoạt thêm hoạt tính của trình tự kiểm soát sự biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự nucleotit có hoạt tính yếu hơn. Trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể gồm trình tự khởi đầu, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa miền liên kết ribosom, và trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã, nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự nucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách kích thích sự cải biến trong trình tự thông qua sự xóa bỏ, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc sự kết hợp của chúng để làm bất hoạt thêm hoạt tính của protein, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự nucleotit được cải thiện để có hoạt tính yếu hơn hoặc trình tự nucleotit mà được cải thiện để không có hoạt tính, nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể, ở vi sinh vật, ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen metB mã hóa xystathionin gamma synthaza, gen metY mã hóa O-acetyl homoserin (thiol)-lyaza mà là con đường thoái biến O-suxinyl homoserin, và gen thrB mã hóa homoserin kinaza còn có thể được xóa bỏ hoặc làm suy yếu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “xóa bỏ” dùng để chỉ kiểu loại bỏ, trong nhiễm sắc thể, một phần hoặc toàn bộ vùng trình tự nucleotit của gen mong muốn khỏi trình tự nucleotit tương ứng với codon khởi đầu đến codon kết thúc, hoặc một phần hoặc toàn bộ trình tự nucleotit của vùng điều hòa của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm suy yếu” dùng để chỉ sự loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính nội bào của một hoặc nhiều enzym mà được mã hóa bằng ADN

tương ứng trong chủng vi sinh vật. Ví dụ, sự biểu hiện protein có thể được làm suy yếu bằng cách cải biến trình tự nucleotit của vùng trình tự khởi đầu hoặc 5'-UTR của gen, hoặc hoạt tính protein có thể được làm suy yếu bằng cách đưa vào đột biến trong vùng ORF của gen tương ứng.

Hơn nữa, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó hoạt tính aspartokinaza còn được tăng cường, so với vi sinh vật không phải biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sự tăng cường hoạt tính của protein” dùng để chỉ việc đưa vào hoạt tính của protein, hoặc tăng hoạt tính của protein, so với hoạt tính nội tại của nó. “Sự đưa vào” hoạt tính có nghĩa là sự xuất hiện hoạt tính của polypeptit đặc hiệu mà vi sinh không có một cách tự nhiên hoặc nhân tạo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng” hoạt tính của protein, so với hoạt tính nội tại của nó, có nghĩa là hoạt tính được cải thiện, so với hoạt tính nội tại của protein của vi sinh vật hoặc hoạt tính trước khi cải biến. Thuật ngữ “hoạt tính nội tại” dùng để chỉ hoạt tính của protein đặc hiệu ban đầu được sở hữu bởi chủng gốc hoặc vi sinh vật chưa được cải biến trước khi thay đổi tính trạng của nó, khi tính trạng của vi sinh vật được thay đổi do biến thể di truyền gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. Nó có thể được sử dụng thay thế cho hoạt tính trước khi cải biến.

Cụ thể, theo sáng chế, sự tăng cường hoạt tính có thể được tiến hành bằng cách:

- 1) làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein,
- 2) cải biến trình tự kiểm soát sự biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của polynucleotit,
- 3) cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của protein,
- 4) đưa vào polynucleotit ngoại lai thể hiện hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến thể trong đó polynucleotit được tối ưu hóa codon, hoặc
- 5) cải biến để tăng cường bằng sự kết hợp của chúng, nhưng không giới hạn ở đó.

1) làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit có thể, nhưng không giới hạn cụ thể ở, được tiến hành ở dạng trong đó polynucleotit được liên kết theo cách hoạt động được với vector, hoặc bằng cách cài polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Cụ thể, việc tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ có thể được tiến hành bằng cách đưa vector vào tế bào chủ, vector này có thể sao chép và hoạt động bất kể tế bào chủ và polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế được liên kết theo cách hoạt động được, hoặc có thể được tiến hành bằng cách đưa vector vào tế bào chủ, vector này có thể cài polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và polynucleotit được liên kết theo cách hoạt động được với nó.

Tiếp theo, 2) cải biến trình tự kiểm soát sự biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của polynucleotit có thể, nhưng không giới hạn cụ thể ở, được tiến hành bằng cách kích thích cải biến trên trình tự thông qua sự xóa bỏ, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn trình tự nucleotit, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự kiểm soát sự biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn. Trình tự kiểm soát sự biểu hiện gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, trình tự khởi đầu, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, và trình tự quy định việc kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã.

Trình tự khởi đầu ngoại sinh mạnh, thay vì trình tự khởi đầu ban đầu, có thể được nối với vùng ngược chiều của đơn vị biểu hiện của polynucleotit. Các ví dụ về trình tự khởi đầu mạnh có thể gồm trình tự khởi đầu CJ7 (Patent Hàn Quốc số 0620092 và WO2006/065095), trình tự khởi đầu lysCP1 (WO2009/096689), trình tự khởi đầu EF-Tu, trình tự khởi đầu groEL, trình tự khởi đầu aceA hoặc aceB, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Ngoài ra, 3) cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể, nhưng không giới hạn cụ thể ở, được tiến hành bằng cách kích thích cải biến trên trình tự kiểm soát sự biểu hiện thông qua sự xóa bỏ, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn của trình tự polynucleotit, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự

polynucleotit bằng trình tự polynucleotit được cải thiện để có hoạt tính mạnh hơn.

Ngoài ra, 4) đưa vào trình tự polynucleotit ngoại lai có thể được tiến hành bằng cách đưa vào trình tự polynucleotit ngoại lai mã hóa protein có hoạt tính tương tự/giống với hoạt tính của protein nêu trên hoặc bằng cách đưa polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon của nó vào tế bào chủ. Trình tự polynucleotit ngoại lai bất kỳ có thể được sử dụng mà không giới hạn ở nguồn gốc hoặc trình tự của nó, miễn là có hoạt tính giống hệt/tương tự với hoạt tính của protein nêu trên. Hơn nữa, polynucleotit ngoại lai có thể được đưa vào tế bào chủ, sau khi tối ưu hóa codon của nó để cho sự phiên mã và dịch mã được tối ưu có thể xuất hiện trong tế bào chủ. Việc đưa vào có thể được thực hiện bằng phương pháp biến nạp đã biết mà được lựa chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan, và protein có thể được sản xuất bởi sự biểu hiện của polynucleotit được đưa vào trong tế bào chủ, và kết quả là, hoạt tính của nó có thể tăng lên.

Cuối cùng, 5) phương pháp cải biến để tăng cường bằng sự kết hợp của phương pháp từ 1) đến 4) có thể được tiến hành bằng cách áp dụng một hoặc nhiều phương pháp làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein, cải biến trình tự kiểm soát sự biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của polynucleotit, cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể, và cải biến polynucleotit ngoại lai thể hiện hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến thể, trong đó các codon của nó được tối ưu hóa codon.

Theo sáng chế, các trình tự của gen hoặc polynucleotit có sẵn từ cơ sở dữ liệu như Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI).

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất O-suxinyl homoserin, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật được mô tả ở trên; và thu O-suxinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-methionin, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật được mô tả ở trên; và cho vi sinh vật được nuôi cấy hoặc O-suxinyl homoserin phản ứng với sulfua.

Cụ thể, bước phản ứng với sulfua có nghĩa là bước tạo ra L-methionin từ O-suxinyl homoserin bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ. Ví dụ, L-methionin có thể được tạo ra bằng phản ứng của O-suxinyl homoserin với metyl mercaptan dưới dạng sulfua, hoặc methionin có thể được tạo bằng phản ứng từng bước thông qua sự sản xuất xystathionin bằng phản ứng của O-suxinyl homoserin với xystein dưới dạng sulfua. Hơn nữa, để cải thiện tốc độ và hiệu suất phản ứng, chất xúc tác hoặc enzym có thể được bổ sung vào, hoặc phản ứng có thể được cho phép ở vi sinh vật bao gồm enzym.

‘O-suxinyl homoserin’ có thể là dịch lên men chứa O-suxinyl homoserin được sản xuất bởi vi sinh vật được mô tả ở trên theo sáng chế hoặc dạng tinh chế của nó. Ngoài ra, ‘sulfua’ có thể ví dụ, là metyl mercaptan. Metyl mercaptan dùng để chỉ tất cả các dẫn xuất của metyl mercaptan có khả năng tạo ra các nguyên tử lưu huỳnh, như dạng natri metyl mercaptan hóa lỏng ($\text{CH}_3\text{S-Na}$), và dạng metyl mercaptan (CH_3SH) dạng khí hoặc hóa lỏng, cũng như metyl mercaptan bao gồm dimetylsulfua (DMS) được bộc lộ trong công bố sáng chế số WO2010/098629, v.v..

Phương pháp sản xuất L-methionin có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan trong các điều kiện nuôi cấy được tối ưu hóa và các điều kiện hoạt hóa enzym đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp và môi trường nuôi cấy đặc hiệu là giống với phương pháp và môi trường nuôi cấy được mô tả ở trên.

Hơn nữa, phương pháp sản xuất L-methionin còn có thể bao gồm bước phân lập hoặc thu O-suxinyl homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy trong bước nuôi cấy hoặc môi trường.

Rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan

rằng “O-suxinyl homoserin” theo sáng chế có thể gồm tất cả bản thân O-suxinyl homoserin và các muối của nó.

Trong phương pháp trên, bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy theo mẻ đã biết, phương pháp nuôi cấy liên tục, hoặc phương pháp nuôi cấy được cấp theo mẻ, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó. Liên quan đến điều kiện nuôi cấy, độ pH thích hợp (tức là, độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9, cụ thể độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và cụ thể nhất là độ pH=6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric), và điều kiện ưa khí có thể được duy trì bằng cách bổ sung oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào hỗn hợp, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó. Nhiệt độ môi trường nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, và vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong khoảng thời gian từ khoảng 10 giờ đến khoảng 160 giờ, nhưng không giới hạn ở đó. O-suxinyl homoserin được sản xuất bằng cách nuôi cấy như trên có thể được bài tiết vào môi trường hoặc giữ lại trong các tế bào.

Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy được sử dụng, các nguồn cacbon, như đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, mật đường, tinh bột, và xenluloza), 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), các rượu (ví dụ, glyxerol và ethanol), và các axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc trong hỗn hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Nguồn nitơ, như các hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, dịch chiết ngô cô đặc, bột đậu tương, và ure) hoặc các hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc trong hỗn hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Các nguồn kali, như kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng với nó, có thể được sử dụng riêng lẻ

hoặc trong hỗn hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, các chất kích thích sinh trưởng thiết yếu khác gồm các muối kim loại (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin, và vitamin có thể được bao gồm trong môi trường.

Phương pháp thu O-suxinyl homoserin hoặc L-methionin trong đó được sản xuất trong bước nuôi cấy theo sáng chế có thể thu axit amin mong muốn từ nước thịt nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., có thể được sử dụng, và O-suxinyl homoserin hoặc L-methionin mong muốn có thể được thu từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương thức mô tả

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Cấu trúc của plasmit metX có hoạt tính O-axetyl homoserin transferaza

Để khuếch đại gen mã hóa O-axetyl homoserin transferaza (MetX), các vị trí giới hạn BamHI được cài xen vào cả hai đầu của mồi (SEQ ID NO: 5 và 6) để khuếch đại từ vùng trình tự khởi đầu (khoảng 300 bp tính từ phía trên của codon khởi đầu) đến vùng kết thúc (khoảng 100 bp từ phía dưới của codon kết thúc), dựa trên trình tự có nguồn gốc từ WT (kiểu đại) được báo cáo.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
5	Mồi 1	GGATCCCCTCGTTGTTACCCAGCAACC
6	Mồi 2	GGATCCCAAAGTCACAACCTACTTATGTTAG

Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện

trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN có kích thước 1546 bp vùng mã hóa của gen metX. Vector pECCG117 (Patent Hàn Quốc số 10-0057684) và mảnh ADN metX được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI, và được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng, nhờ đó thu được plasmit, được chỉ định là pECCG117-metX WT.

Ví dụ 2: Cấu trúc của plasmit metX biến thể có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza

Các vị trí biến đổi metX mới được lựa chọn, và axit amin ở vị trí 313 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác với leuxin.

Cụ thể hơn, để tạo ra vector biến thể, trong đó axit amin ở vị trí 313 của O-axetyl homoserin transferaza được thay thế bằng một axit amin khác, bằng cách sử dụng plasmit pECCG117-metX WT được tạo cấu trúc trong ví dụ 1 dưới dạng mẫu, cặp môi (SEQ ID NO: 7 và 8) được thiết kế.

Bảng 2

SEQ ID NO:	Môi	Trình tự (5'-3')
7	Môi 3	GTAGATACCGATATTCGGTACCCCTACCACCAG
8	Môi 4	CTGGTGGTAGGGGTACCGAATATCGGTATCTAC

Các môi và kit gây đột biến định hướng điểm (stratagene, USA) được sử dụng để tạo ra gen biến thể metX. Plasmit biến thể L313R, dựa trên plasmit WT kiểu dại, được chỉ định là WT_L313R.

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

Để so sánh hoạt tính của metX biến thể sản xuất một lượng lớn O-suxinyl homoserin, một chủng trong đó homoserin được tích lũy và lượng O-suxinyl

homoserin được tạo ra sẵn có đã bị loại bỏ. Một chủng, trong đó gen metB mã hóa xystathionin gama synthaza có liên quan đến con đường thoái biến O-suxinyl homoserin và gen metY mã hóa O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza có liên quan đến con đường thoái biến O-suxinyl homoserin đã bị loại bỏ, được chuẩn bị. Đầu tiên, để xóa gen metB, cặp mồi (SEQ ID NO: 9 và 10) để khuếch đại vùng ngược chiều 5' của gen metB và cặp mồi (SEQ ID NO: 11 và 12) để khuếch đại vùng xuôi chiều 3' của gen metB đã được thiết kế, dựa trên trình tự nucleotit của gen metB có nguồn gốc từ WT. Các vị trí giới hạn XbaI (được gạch dưới) được cài vào mỗi đầu của các mồi có SEQ ID NO: 9 và 12.

Bảng 3

SEQ ID NO:	Mồi	Trình (5'-3')
9	Mồi 5	<u>TCTAGAT</u> GCCTGATTATCTCACC
10	Mồi 6	ACTGGTGGGTCATGGTTGCATATGAGATCAACTCCTGTAA
11	Mồi 7	TTACAGGAGTTGATCTCATATGCAACCATGACCCACCAGT
12	Mồi 8	<u>TCTAGAC</u> CTTGAAGTTCTTGACTG

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mẫu và các mồi có SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong thời gian 90 giây. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN có kích thước 450 bp vùng ngược chiều 5' của gen metB và mảnh ADN có kích thước 467 bp vùng phía dưới 3' của gen metB.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai loại đã được khuếch đại của mảnh ADN làm mẫu và các mồi có SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C

trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 3 phút. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN có kích thước 917 bp chỉ bao gồm các mảnh ngược chiều và xuôi chiều bằng sự xóa bỏ phần giữa của gen metB được khuếch đại.

Vectơ pDZ và mảnh ADN bằng 917 bp được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và sau đó được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng, nhờ đó thu được plasmit, được chỉ định là pDZ- Δ metB.

Vectơ pDZ- Δ metB được đưa vào chủng WT bằng phương pháp xung điện, và sau đó chủng biến nạp được lựa chọn trên môi trường chọn lọc chứa 25 mg/L kanamycin. Chủng WT Δ metB, trong đó gen metB được xóa bỏ bằng mảnh ADN được cài vào nhiễm sắc thể bằng quy trình tái tổ hợp thứ cấp (lai chéo) được thu.

Để xóa bỏ gen metY mà là một con đường thoái biến O-suxinyl homoserin khác, cặp mồi (SEQ ID NO: 13 và 14) để khuếch đại vùng ngược chiều 5' của gen metY và cặp mồi (SEQ ID NO: 15 và 16) để khuếch đại vùng xuôi chiều 3' của gen metY được thiết kế, dựa trên trình tự nucleotit của gen metY có nguồn gốc từ WT. Các vị trí giới hạn XbaI (được gạch dưới) được cài vào mỗi đầu của các mồi có SEQ ID NO: 13 và 16.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
13	Mồi 9	<u>TCTAGA</u> AAGTAGCGTTGCTGTACAC
14	Mồi 10	ATCAATGGTCTCGATGCCCATATGGCATTGGAGGTCCTTAAG
15	Mồi 11	CTTAAGGACCTCCAAATGCCCATATGGGCATCGAGACCATTGAT
16	Mồi 12	<u>TCTAGAT</u> GGAACCGTTGCAACCAC

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mẫu và các mồi có SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số

30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu mảnh ADN có kích thước 512 bp của vùng ngược chiều 5' của gen metY và mảnh ADN có kích thước 520 bp của vùng xuôi chiều 3' của gen metY.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai loại đã được khuếch đại của mảnh ADN làm mẫu và các mồi có SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 16. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 3 phút. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN có kích thước 1032 bp chỉ gồm các mảnh ngược chiều và xuôi chiều bằng cách xóa bỏ phần giữa của gen metY được khuếch đại.

Vector pDZ và mảnh ADN có kích thước 1032 bp được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và sau đó được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách dòng, nhờ đó thu được plasmit, được chỉ định là pDZ- Δ metY.

Vector pDZ- Δ metY được đưa vào chủng WT Δ metB được tạo ra bằng phương pháp xung điện, và sau đó chủng biến nạp được chọn trên môi trường chọn lọc chứa 25 mg/L kanamycin. Chủng WT Δ metB Δ metY trong đó gen metY được xóa bỏ bằng mảnh ADN được cài vào nhiễm sắc thể bằng quy trình tái tổ hợp thứ cấp (lai chéo) được thu.

Để tối đa sự sản xuất O-suxinyl homoserin, cặp mồi (SEQ ID NO: 19 và 20) để khuếch đại vùng ngược chiều 5' và cặp mồi (SEQ ID NO: 21 và 22) để khuếch đại vùng xuôi chiều 3' quanh vị trí biến đổi được thiết kế để tạo cấu trúc vector đưa vào biến thể đối với gen lysC (SEQ ID NO: 18) mã hóa aspartokinaza có nguồn gốc từ WT (SEQ ID NO: 17). Các mồi có SEQ ID NO: 19 và 22 được cài vào vị trí giới hạn XbaI (được gạch dưới) ở mỗi đầu, và các mồi có SEQ ID NO: 20 và 21 được cho phép đặt biến thể thay thế nucleotit (được gạch dưới) ở vùng mà được thiết kế để lai chéo với

nhau.

Bảng 5

SEQ ID NO:	Môi	Trình tự (5'-3')
19	Môi 13	TCCTCTAGAGCTGCGCAGTGTGAATACG
20	Môi 14	CACCGACATCACTTCACCTGCC
21	Môi 15	GGCAGGTGAAGATGATGTCGGTG
22	Môi 16	GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATTA

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mẫu và các môi có SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong thời gian 30 giây. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được mảnh ADN có kích thước 509 bp của vùng ngược chiều 5' và mảnh ADN có kích thước 520 bp của vùng xuôi chiều 3' quanh biến thể gen *lysC*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai loại đã được khuếch đại của mảnh ADN làm mẫu và các môi có SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 22. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện dưới đây: biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây; gắn ở 55°C trong thời gian 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 60 giây. Sau đó, phản ứng polyme hóa được tiến hành ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, mảnh ADN có kích thước 1011 bp gồm biến thể gen *lysC* (SEQ ID NO: 24) mã hóa biến thể aspartokinaza (SEQ ID NO: 23) trong đó threonin ở vị trí 311 được thay thế bằng isoleuxin được khuếch đại.

Vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 0924065) không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* và mảnh ADN bằng 1011 bp được xử lý bằng enzym giới hạn *XbaI*, và được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza, và được tách

dòng, nhờ đó thu được plasmit, được chỉ định là pDZ-lysC(T311I).

Vector pDZ-lysC(T311I) được đưa vào WT Δ metB Δ metY bằng phương pháp xung điện (Appl. Microbiol. Biothecnol.(1999) 52:541-545), và sau đó chủng biến nạp được chọn trên môi trường chọn lọc chứa 25 mg/L kanamycin. Chủng WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I) trong đó biến thể nucleotit được đưa vào gen lysC bằng mảnh ADN được cài xen vào nhiễm sắc thể bằng quy trình tái tổ hợp thứ cấp (lai chéo) được thu, và chủng này được chỉ định là *Corynebacterium glutamicum* WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I).

Các vector pECCG117-metX WT và pECCG117-metX WT_L313R được tạo ra trong ví dụ 1 và 2 được đưa vào WT Δ metB Δ metY được tạo ra như trên bằng phương pháp xung điện, và sau đó mỗi chủng biến nạp được chọn trên môi trường chọn lọc chứa 25 mg/L kanamycin.

Để so sánh khả năng sản xuất O-axetyl homoserin (O-AH) và O-suxinyl homoserin (O-SH) của các chủng được tạo ra, chúng được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây, và các nồng độ O-axetyl homoserin và O-suxinyl homoserin trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Mỗi vòng platin của các chủng được cấy vào bình vách ngăn góc 250 ml chứa 25 ml môi trường sau đây, và sau đó được nuôi cấy ở 37°C và lắc 200 vòng/phút trong 20 giờ. Nồng độ O-axetyl homoserin và O-suxinyl homoserin được phân tích bằng HPLC, và các nồng độ được phân tích được thể hiện trong bảng 6.

Thành phần của môi trường (độ pH=7,0)

100 g glucoza, 40 g (NH₄)₂SO₄, 2,5 g ptein đậu tương, 5 g bột ngô ngâm, 3 g ure, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 100 µg biotin, 1000 µg thiamin HCl, 2000 µg canxi pantothenat, 3000 µg nicotinamit, 30 g CaCO₃, 0,3 g L-methionin (trên 1 lít nước cất).

Bảng 6

Chủng	O-axetyl homoserin (g/L)			O-suxinyl homoserin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT	2,0	2,2	2,1	0,01	0,03	0,01
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/ pECCG117-metX WT_L313R	0,05	0,06	0,04	1,2	1,1	1,0

Như được thể hiện trong bảng 6, xác nhận được rằng chủng được đưa vào với plasmit metX WT đối chứng sản xuất O-axetyl homoserin, trong khi chủng này được đưa vào với plasmit biến thể metX sản xuất O-suxinyl homoserin. Nói cách khác, tính đặc hiệu cơ chất của transferaza được thay đổi trong chủng được đưa vào với biến thể, và kết quả là, O-suxinyl homoserin được sản xuất.

Hơn nữa, chủng WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT_L313R đã được tạo ra được chỉ định là CA05-5132, và sau đó được nộp lưu ở Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms) là cơ quan lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào 11 tháng 5 năm 2017 với số gia nhập KCCM12023P.

Ví dụ 4: Tạo ra biến thể MetX thông qua sự gây đột biến bão hòa và đánh giá khả năng sản xuất O-axetyl homoserin

Để tạo ra các biến thể trong đó một axit amin khác được thay thế ở vị trí biến đổi metX thể hiện khả năng sản xuất O-suxinyl homoserin cao, kỹ thuật gây đột biến bão hòa được sử dụng. 18 loại biến thể trong đó axit amin ở vị trí 313 của metX được thay thế bằng một axit amin khác được tạo ra, và plasmit được tạo ra trong ví dụ 1 được sử dụng làm mẫu. Mỗi biến thể, axit amin được thay thế, và SEQ ID NO. của các môi được sử dụng trong mỗi biến thể được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Biến thể plasmid	Thay thế axit amin	SEQ ID NO: của mỗi
Biến thể ở 313	L313R	SEQ ID NO: 7,8
	L313F	SEQ ID NO: 25,26
	L313S	SEQ ID NO: 27,28
	L313Y	SEQ ID NO: 29,30
	L313C	SEQ ID NO: 31,32
	L313P	SEQ ID NO: 33,34
	L313H	SEQ ID NO: 35,36
	L313Q	SEQ ID NO: 37,38
	L313I	SEQ ID NO: 39,40
	L313T	SEQ ID NO: 41,42
	L313N	SEQ ID NO: 43,44
	L313K	SEQ ID NO: 45,46
	L313V	SEQ ID NO: 47,48
	L313A	SEQ ID NO: 49,50
	L313D	SEQ ID NO: 51,52
	L313E	SEQ ID NO: 53,54
	L313G	SEQ ID NO: 55,56
	L313W	SEQ ID NO: 57,58

Cụ thể, các môi được đề xuất trong bảng 2 và kit gây đột biến định hướng vị trí (Stratagene, USA) được sử dụng để tạo ra các gen metX biến thể. Mỗi trong số các plasmid biến thể đã được tạo ra được đưa vào WT Δ metB Δ metY, chủng lysC(T311I), và thử nghiệm khung được tiến hành theo cách thức tương tự như trong ví dụ 4. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

Chủng	Vị trí đột biến	O-axetyl homoserin (g/L)			O-suxinyl homoserin (g/L)		
		Mẻ	Mẻ	Mẻ	Mẻ	Mẻ	Mẻ
		1	2	3	1	2	3
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT		2,0	2,2	2,1	0,01	0,03	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313R SEQ ID NO: 59	L313R	0,05	0,06	0,04	1,2	1,1	1,0
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313FSEQ ID NO: 61	L313F	2,0	2,3	2,0	0,02	0,01	0,02
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313S SEQ ID NO: 63	L313S	2,0	1,9	2,4	0,00	0,01	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313Y SEQ ID NO: 65	L313Y	2,2	2,3	1,8	0,03	0,01	0,03
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313C SEQ ID NO: 67	L313C	1,3	1,2	1,0	0,7	0,5	0,4
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313P SEQ ID NO: 69	L313P	1,6	1,5	1,8	0,02	0,02	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313H SEQ ID NO: 71	L313H	1,3	1,5	1,6	0,03	0,01	0,01

WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313Q SEQ ID NO: 73	L313Q	1,5	1,9	2,0	0,01	0,02	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313I SEQ ID NO: 75	L313I	2,0	2,1	2,2	0,6	0,5	0,5
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313T SEQ ID NO: 77	L313T	1,7	2,0	1,8	0,02	0,02	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313N SEQ ID NO: 79	L313N	1,9	2,2	2,1	0,01	0,00	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313K SEQ ID NO: 81	L313K	1,2	1,4	1,0	0,9	0,7	0,8
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313V SEQ ID NO: 83	L313V	1,9	1,5	1,8	0,02	0,03	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313A SEQ ID NO: 85	L313A	2,1	1,8	2,0	0,01	0,01	0,04
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313D SEQ ID NO: 87	L313D	2,0	2,2	1,8	0,02	0,02	0,03
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313E SEQ ID NO: 89	L313E	2,1	2,2	1,9	0,03	0,01	0,01
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313G	L313G	2,3	2,1	2,1	0,04	0,02	0,01

pECCG117- <i>metX</i> WT_L313G SEQ ID NO: 91							
WT Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> , <i>lysC</i> (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313W SEQ ID NO: 93	L313W	2,0	1,6	1,9	0,02	0,03	0,04

Như được thể hiện trong bảng 3, xác nhận được rằng hầu hết các biến thể không sản xuất O-suxinyl homoserin, trong khi biến thể (L313R), (L313C), (L313I), hoặc (L313K) có biến thể axit amin ở vị trí 313 của *metX* sản xuất O-suxinyl homoserin ở các mức cao hơn so với kiểu dại, một cách tương ứng. Nói cách khác, khi axit amin ở vị trí 313 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng arginin, xystein, isoleuxin, hoặc lysin, tính đặc hiệu cơ chất đối với suxinyl CoA có thể được tạo ra, và kết quả là, O-suxinyl homoserin có thể được sản xuất.

Kết hợp lại với nhau, các kết quả này gợi ý rằng các biến thể theo sáng chế có thể làm tăng sự sản xuất O-suxinyl homoserin.

Dựa trên phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện ở dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi bản chất kỹ thuật hoặc các dấu hiệu cơ bản của nó. Do đó, nên hiểu rằng phương án nêu trên không phải giới hạn, mà là minh họa ở tất cả các khía cạnh. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải là phần mô tả trước đó, và do đó tất cả các thay đổi và cải biến đều nằm trong phạm vi và giới hạn của các điểm yêu cầu bảo hộ, hoặc các phương án tương đương của các phạm vi và giới hạn như vậy do đó được bao gồm bởi các điểm yêu cầu bảo hộ.

Số nộp lưu

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms)

Số gia nhập: KCCM12023P

Ngày nộp lưu: 11 tháng 5 năm 2017



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

INTERNATIONAL FORM

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

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA05-5132	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12023P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May. 11. 2017. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : Date: May. 11. 2017.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, polypeptit bao gồm thay thế của leuxin ở vị trí tương ứng với axit amin 313 nêu trong SEQ ID NO: 1 với arginin, xystein, isoleuxin, hoặc lysin, trong đó trình tự axit amin của polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75 và SEQ ID NO: 81.
3. Polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza theo điểm 1.
4. Polynucleotit theo điểm 3, trong đó trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76 và SEQ ID NO: 82.
5. Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó vi sinh vật này chứa polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza theo điểm 1.
6. Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5, trong đó vi sinh vật này biểu hiện quá mức aspartokinaza.
7. Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5, trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium glutamicum*.
8. Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5, trong đó một hoặc nhiều gen mã hóa xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza được làm bất hoạt.
9. Vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5, trong đó vi sinh vật này biểu hiện quá mức aspartokinaza và một hoặc nhiều gen mã hóa xystathionin synthaza, O-axetyl homoserin (thiol)-lyaza, và homoserin kinaza được làm bất hoạt.
10. Phương pháp sản xuất O-suxinyl homoserin, phương pháp này bao gồm các bước:
 - nuôi cấy vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5 trong môi trường để tạo ra O-suxinyl homoserin; và
 - phân lập hoặc thu O-suxinyl homoserin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

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

(a) nuôi cấy vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin theo điểm 5 trong môi trường để tạo ra O-suxinyl homoserin; và

(b) cho O-suxinyl homoserin phản ứng với sulfua để tạo ra L-methionin.

12. Phương pháp sản xuất L-methionin theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân lập hoặc thu O-suxinyl homoserin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

13. Phương pháp sản xuất L-methionin theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân lập hoặc thu L-methionin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

6413143_1

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Polypeptit có hoạt tính O-suxinyl homoserin transferaza, vi sinh vật sản xuất O-suxinyl homoserin và phương pháp sản xuất O-suxinyl homoserin này

<130> OPA18185

<150> KR 10-2017-0083438

<151> 2017-06-30

<160> 94

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 377

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(377)

<223> metX

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

6413143_1

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

<210> 2
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1134)
 <223> metX

<400> 2
 atgccacccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgatcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780

6413143_1

```

gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccttc      840
aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa      900
gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca ccagcaagaa      960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc     1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc     1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa          1134

```

```

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

```

```

<220>
<221>     PEPTIT
<222>     (1)..(379)
<223>     metX1

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```


6413143_1

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

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

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1140)
 <223> metX1

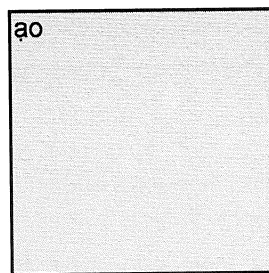
<400> 4
 atgccacag tcttccccga cgactccgtc ggtctggtct cccccagac gctgcacttc 60
 aacgaaccgc tcgagctgac cagcggcaag tccctggccg agtacgacct ggtgatcgaa 120
 acctacggcg agctgaatgc cacgcagagc aacgcggtgc tgatctgcca cgccctctcc 180
 ggccaccacc acgccgccgg ctaccacagc gtcgacgagc gcaagccggg ctggtgggac 240
 agctgcatcg gtccgggcaa gccgatcgac acccgcaagt tcttcgtcgt cgccctcaac 300
 aacctcggcg gttgcaacgg atccagcggc cccgccagca tcaatccggc gaccggcaag 360
 gtctacggcg cggacttccc gatggttacg gtggaagact ggggtgcatag ccaggcgcg 420
 ctggcagacc gcctcggcat ccgccagtgg gccgcggtgg tcggcggcag cctcggcggc 480
 atgcaggcgc tgcaatggac catcagctat cccgagcgcg tccgtcactg cctgtgcatc 540
 gccagcgcg cgaagctgtc ggcgcagaac atcgcttca acgaagtcgc ccggcaggcg 600
 attctttccg accctgagtt cctcggcggc tacttccagg agcagggcgt gattcccaag 660
 cgcggcctca agctggcgcg gatggtcggc catatcacct acctgtccga cgacgccatg 720
 ggcgccaagt tcggccgtgt actgaagacc gagaagctca actacgacct gcacagcgtc 780

6413143_1

gagttccagg tcgagagtta cctgcgctac cagggcgagg agttctccac ccgcttcgac 840
 gccaatacct acctgctgat gaccaaggcg ctggactact tcgaccccg cgcgcgccac 900
 ggcgacgacc tgggtgcgcac cctggagggc gtcgaggcgg acttctgcct gatgtccttc 960
 accaccgact ggcgtttctc gccggcccg cgcgggaaa tcgtcgacgc cctgatcgcg 1020
 gcgaaaaaga acgtcagcta cctggagatc gacgccccgc aaggccacga cgccttcctc 1080
 atgccgatcc cccggtacct gcaagccttc agcggttaca tgaaccgat cagcgtgtga 1140
 1140

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

<220>
 <223> mỗi 1



<400> 5
 ggatcccctc gttgttcacc cagcaacc

28

<210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 2

<400> 6
 ggatcccaaa gtcacaacta cttatgtag

30

<210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 5

<400> 7
 gtagataccg atattcggtta cccctaccac cag

33

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 6

<400> 8
 ctggtgtag ggtaccgaa tatcggtatc tac

33

6413143_1

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 7

<400> 9
 tctagatgcg ctgattatct cacc

24

<210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 8

<400> 10
 actggtgggt catggttgca tatgagatca actcctgtaa

40

<210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 9

<400> 11
 ttacaggagt tgatctcata tgcaaccatg acccaccagt

40

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 10

<400> 12
 tctagacctt gaagttcttg actg

24

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 11

<400> 13
 tctagaagta gcgttgctgt acac

24

<210> 14
 <211> 43
 <212> ADN

6413143_1

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi 12

<400> 14

atcaatggtc tcgatgccca tatggcattt ggaggtcctt aag

43

<210> 15

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi 13

<400> 15

cttaaggacc tccaaatgcc atatgggcat cgagaccatt gat

43

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi 14

<400> 16

tctagatgga accgttgcaa ccac

24

<210> 17

<211> 421

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(421)

<223> lysC

<400> 17

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

6413143_1

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 18
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>

6413143_1

<221> gen
 <222> (1)..(1266)
 <223> lysc

<400> 18
 atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt gggtgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatccccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgtccttg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
 ggtgtgtctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccagggtcgt 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgttaat 420
 aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
 accgctgacc cgcgcatcgt tcctaattgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
 atgctggaac ttgtgtctgt tggctccaag attttgggtg tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
 cgtgcattca atgtgccact tcgctacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
 aagggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgac tggatgctgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
 cgctaa 1266

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi 15

<400> 19
 tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg 29

<210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

6413143_1

<220>
<223> mỗi 16

<400> 20
caccgacatc atcttcacct gcc 23

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi 17

<400> 21
ggcaggtgaa gatgatgtcg gtg 23

<210> 22
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi 18

<400> 22
gactctagag ttcacctcag agacgatta 29

<210> 23
<211> 421
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

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

<400> 23
Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110

6413143_1

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

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Ile Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
355 360 365

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg
420

<210> 24
<211> 1266
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> gen

6413143_1

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

<400> 24
 atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcagggt 300
 ggtgtgtcga ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgttaat 420
 aaagaaacc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
 accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
 atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtc tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
 cgtgcattca atgtgccact tcgcgtagcg tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccggct ctatggagga tttcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
 aagggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
 cgctaa 1266

<210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313F

<400> 25
 gtagataccg atatttttta cccctaccac cag 33

<210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

6413143_1

<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313F		
<400>	26		33
	ctggtggtag gggtaaaaaa tatcggtatc tac		
<210>	27		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313s		
<400>	27		33
	gtagataccg atatttctta cccctaccac cag		
<210>	28		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313s		
<400>	28		33
	gtagataccg atatttctta cccctaccac cag		
<210>	29		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313y		
<400>	29		33
	gtagataccg atatttatta cccctaccac cag		
<210>	30		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313Y		
<400>	30		33
	ctggtggtag gggtaataaa tatcggtatc tac		
<210>	31		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313c		

6413143_1

<400>	31		
gtagataccg	atatttggtta	cccctaccac	cag
			33
<210>	32		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313c		
<400>	32		
ctggtggtag	gggtaacaaa	tatcggtatc	tac
			33
<210>	33		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313P		
<400>	33		
gtagataccg	atattcctta	cccctaccac	cag
			33
<210>	34		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313P		
<400>	34		
ctggtggtag	gggtaaggaa	tatcggtatc	tac
			33
<210>	35		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313H		
<400>	35		
gtagataccg	atattcatta	cccctaccac	cag
			33
<210>	36		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313H		
<400>	36		
ctggtggtag	gggtaatgaa	tatcggtatc	tac
			33

6413143_1

<210> 37
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313Q

<400> 37
 gtagataccg atattcaata cccctaccac cag 33

<210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi ngược cho L313Q

<400> 38
 ctggtggtag ggggtattgaa tatcggtatc tac 33

<210> 39
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313I

<400> 39
 gtagataccg atattatcta cccctaccac cag 33

<210> 40
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi ngược cho L313I

<400> 40
 ctggtggtag gggtagataa tatcggtatc tac 33

<210> 41
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313T

<400> 41
 gtagataccg atattaccta cccctaccac cag 33

<210> 42

6413143_1

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi ngược cho L313T

<400> 42
 ctggtggttag gggtaggtaa tatcggtatc tac 33

<210> 43
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313N

<400> 43
 gtagataccg atattaacta cccctaccac cag 33

<210> 44
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi ngược cho L313N

<400> 44
 ctggtggttag gggtagttaa tatcggtatc tac 33

<210> 45
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho L313K

<400> 45
 gtagataccg atattaaata cccctaccac cag 33

<210> 46
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi ngược cho L313K

<400> 46
 ctggtggttag gggattttaa tatcggtatc tac 33

<210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

6413143_1

<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313V		
<400>	47		33
	gtagataccg atattgttta cccctaccac cag		
<210>	48		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313V		
<400>	48		33
	ctggtggtag gggtaaaca tatcggtatc tac		
<210>	49		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313A		
<400>	49		33
	gtagataccg atattgcata cccctaccac cag		
<210>	50		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313A		
<400>	50		33
	ctggtggtag gggatatgcaa tatcggtatc tac		
<210>	51		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi xuôi cho L313D		
<400>	51		33
	gtagataccg atattgacta cccctaccac cag		
<210>	52		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Mỗi ngược cho L313D		

6413143_1

<400> 52 33
ctggtggtag gggtagtcaa tatcggtatc tac

<210> 53
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi xuôi cho L313E

<400> 53 33
gtagataccg atattgaata cccctaccac cag

<210> 54
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi ngược cho L313E

<400> 54 33
ctggtggtag gggatttcaa tatcggtatc tac

<210> 55
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi xuôi cho L313G

<400> 55 33
gtagataccg atattggata cccctaccac cag

<210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi ngược cho L313G

<400> 56 33
ctggtggtag gggatatcaa tatcggtatc tac

<210> 57
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi xuôi cho L313W

<400> 57

6413143_1
gtagataccg atatttggtta cccctaccac cag 33

<210> 58
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi ngược cho L313W

<400> 58
ctggtggttag ggggtacaaa tatcggtatc tac 33

<210> 59
<211> 377
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> metX L313R

<400> 59
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160
Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
165 170 175
Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
180 185 190
Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
195 200 205
Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
210 215 220

6413143_1

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

<210> 60
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metX L313R

<400> 60
 atgccaccac tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataaccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt gggtgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggcg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgac gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag ccaaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840

6413143_1

aaccgccacg acattgggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagttcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcggt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313F

<400> 61
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr

<210>	62
<211>	1134
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	313F

<400>	62						
atgcccaccc	tcgcgcttc	aggtcaactt	gaaatccaag	cgatcggtga	tgtctccacc		60
gaagccggag	caatcattac	aaacgctgaa	atcgctatc	accgctgggg	tgaataccgc		120
gtagataaa	aaggacgcag	caatgtcggt	ctcatcgaac	acgccctcac	tggagattcc		180
aacgcagccg	attggtgggc	tgacttgctc	gggtcccgga	aagccatcaa	cactgatatt		240
tactgctga	tctgtaccaa	cgatcatcgg	ggttgcaacg	gttccaccgg	acctggctcc		300
atgcatccag	atggaaattt	ctggggtaat	cgcttccccg	ccacgtccat	tcgtgatcag		360
gtaaacgccg	aaaaacaatt	cctcgacgca	ctcggcatca	ccacggtcgc	cgcagtactt		420
ggtggttcca	tgggtggtgc	ccgcacccta	gagtgggccc	caatgtaccc	agaaactgtt		480
ggcgcagctg	ctgttcttgc	agtttctgca	cgcgccagcg	cctggcaa	atcggaattca		540
tccgccccaa	ttaaggcgat	tgaaaacgac	caccactggc	acgaaggcaa	ctactacgaa		600
tccggctgca	accagccac	cggactcggc	gccgccgac	gcacgcccc	cctcacctac		660
cgtggcgaac	tagaaatcga	cgaacgcttc	ggcaccaaa	cccaaaagaa	cgaaaaccca		720
ctcggtcctt	accgcaagcc	cgaccagcgc	ttcgccgtgg	aatcctactt	ggactaccaa		780
gcagacaagc	tagtacagcg	tttcgacgcc	ggctcctacg	tcttgctcac	cgacgccctc		840
aaccgccacg	acattggctg	cgaccgcgga	ggcctcaaca	aggcactcga	atccatcaaa		900
gttccagtc	ttgtcgcagg	cgtagatacc	gatatttttt	accctaccca	ccagcaagaa		960

6413143_1

cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcattctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313S

<400> 63
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313S

<400> 64
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attgggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgctgta tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata caacggctgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggcg caatgtaccc agaaactgtt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa 540
 tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgcca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtc tttgtcgcagg cgtagatacc gatatttctt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc 1020
 cagatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080

6413143_1

ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa

1134

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

<220>
 <223> 313Y

<400> 65
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285

6413143_1

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

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

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

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

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

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 66
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 313Y

<400> 66
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataaccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgctga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcata caacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt cggcattcaa 540
 tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcgggtcct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatatttatt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc cctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

6413143_1

<210> 67
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 313C

<400> 67
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Cys Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu

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

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

<220>
<223> 313C

<400>	68						
atgccacccc	tcgcgccttc	aggtcaactt	gaaatccaag	cgatcgggtga	tgtctccacc		60
gaagccggag	caatcattac	aaacgctgaa	atcgcctatc	accgctgggg	tgaataccgc		120
gtagataaa	aaggacgcag	caatgtcggt	ctcatcgaac	acgccctcac	tggagattcc		180
aacgcagccg	attggtgggc	tgacttgctc	gggtcccggca	aagccatcaa	cactgatatt		240
tactgcgtga	tctgtaccaa	cgtcatcggg	ggttgcaacg	gttccaccgg	acctgggtcc		300
atgcatccag	atggaaattt	ctggggtaat	cgcttccccg	ccacgtccat	tcgtgatcag		360
gtaaacgccg	aaaaacaatt	cctcgacgca	ctcggcatca	ccacggtcgc	cgcagtactt		420
ggtggttcca	tgggtggtgc	ccgcacccta	gagtggggccg	caatgtaccc	agaaactggt		480
ggcgcagctg	ctgttcttgc	agtttctgca	cgcgccagcg	cctggcaa	at	cggcattcaa	540
tccgccaaa	ttaaggcgat	tgaaaacgac	caccactggc	acgaaggcaa	ctactacgaa		600
tccggctgca	accagccac	cggactcggc	gccgcccgc	gcacgcacca	cctcacctac		660
cgtggcgaac	tagaaatcga	cgaacgcttc	ggcaccaaag	cccaaaagaa	cgaaaaccca		720
ctcgggtccct	accgcaagcc	cgaccagcgc	ttcgccgtgg	aatcctactt	ggactaccaa		780
gcagacaagc	tagtacagcg	tttcgacgcc	ggctcctacg	tcttgctcac	cgacgccctc		840
aaccgccacg	acattggtcg	cgaccgcgga	ggcctcaaca	aggcactcga	atccatcaaa		900
gttccagttc	ttgtcgcagg	cgtagatacc	gatatttggt	accctacca	ccagcaagaa		960
cacctctcca	gaaacctggg	aaatctactg	gcaatggcaa	aaatcgatatc	ccctgtcggc		1020
cacgatgctt	tcctcaccga	aagccgcaa	atggatcgca	tcgtgaggaa	cttcttcagc		1080
ctcatctccc	cagacgaaga	caacccttcg	acctacatcg	agttctacat	ctaa		1134

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

6413143_1

<220>

<223> 313P

<400>

```

      69
Met  Pro  Thr  Leu  Ala  Pro  Ser  Gly  Gln  Leu  Glu  Ile  Gln  Ala  Ile  Gly
  1          5          10          15
Asp  Val  Ser  Thr  Glu  Ala  Gly  Ala  Ile  Ile  Thr  Asn  Ala  Glu  Ile  Ala
          20          25          30
Tyr  His  Arg  Trp  Gly  Glu  Tyr  Arg  Val  Asp  Lys  Glu  Gly  Arg  Ser  Asn
          35          40          45
Val  Val  Leu  Ile  Glu  His  Ala  Leu  Thr  Gly  Asp  Ser  Asn  Ala  Ala  Asp
          50          55          60
Trp  Trp  Ala  Asp  Leu  Leu  Gly  Pro  Gly  Lys  Ala  Ile  Asn  Thr  Asp  Ile
  65          70          75          80
Tyr  Cys  Val  Ile  Cys  Thr  Asn  Val  Ile  Gly  Gly  Cys  Asn  Gly  Ser  Thr
          85          90          95
Gly  Pro  Gly  Ser  Met  His  Pro  Asp  Gly  Asn  Phe  Trp  Gly  Asn  Arg  Phe
          100          105          110
Pro  Ala  Thr  Ser  Ile  Arg  Asp  Gln  Val  Asn  Ala  Glu  Lys  Gln  Phe  Leu
          115          120          125
Asp  Ala  Leu  Gly  Ile  Thr  Thr  Val  Ala  Ala  Val  Leu  Gly  Gly  Ser  Met
          130          135          140
Gly  Gly  Ala  Arg  Thr  Leu  Glu  Trp  Ala  Ala  Met  Tyr  Pro  Glu  Thr  Val
          145          150          155          160
Gly  Ala  Ala  Ala  Val  Leu  Ala  Val  Ser  Ala  Arg  Ala  Ser  Ala  Trp  Gln
          165          170          175
Ile  Gly  Ile  Gln  Ser  Ala  Gln  Ile  Lys  Ala  Ile  Glu  Asn  Asp  His  His
          180          185          190
Trp  His  Glu  Gly  Asn  Tyr  Tyr  Glu  Ser  Gly  Cys  Asn  Pro  Ala  Thr  Gly
          195          200          205
Leu  Gly  Ala  Ala  Arg  Arg  Ile  Ala  His  Leu  Thr  Tyr  Arg  Gly  Glu  Leu
          210          215          220
Glu  Ile  Asp  Glu  Arg  Phe  Gly  Thr  Lys  Ala  Gln  Lys  Asn  Glu  Asn  Pro
          225          230          235          240
Leu  Gly  Pro  Tyr  Arg  Lys  Pro  Asp  Gln  Arg  Phe  Ala  Val  Glu  Ser  Tyr
          245          250          255
Leu  Asp  Tyr  Gln  Ala  Asp  Lys  Leu  Val  Gln  Arg  Phe  Asp  Ala  Gly  Ser
          260          265          270
Tyr  Val  Leu  Leu  Thr  Asp  Ala  Leu  Asn  Arg  His  Asp  Ile  Gly  Arg  Asp
          275          280          285
Arg  Gly  Gly  Leu  Asn  Lys  Ala  Leu  Glu  Ser  Ile  Lys  Val  Pro  Val  Leu
          290          295          300
Val  Ala  Gly  Val  Asp  Thr  Asp  Ile  Pro  Tyr  Pro  Tyr  His  Gln  Gln  Glu
          305          310          315          320
His  Leu  Ser  Arg  Asn  Leu  Gly  Asn  Leu  Leu  Ala  Met  Ala  Lys  Ile  Val
          325          330          335

```

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313P

<400> 70
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaaatt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacga ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggcg caatgtaccc agaaactgtt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa 540
 tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgcca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctccggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcctt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313H

6413143_1

<400> 71
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile His Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350

6413143_1

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

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

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

<220>
 <223> 313H

<400> 72
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaatct ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctccggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaact cggcattcaa 540
 tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctccggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttccgctggt aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg ttccgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcatt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313Q

<400> 73
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15

6413143_1

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Gln Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile

6413143_1

370

375

<210> 74
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 313Q

<400> 74
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggctgc cgagctactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggcg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgccgac gcacgcca ctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgctt ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcaat acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcactccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313I

<400> 75
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Ile Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

6413143_1

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

<220>
 <223> 313I

<400> 76
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgctatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctccggcatca ccacggtcgc cgagtgactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactgtt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgcca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgctt gccaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctccgtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattatct acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313T

<400> 77
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp

6413143_1

50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Thr Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

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

6413143_1

<220>

<223> 313T

<400> 78

```

atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc      60
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc      120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc      180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt      240
tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc      300
atgcatccag atggaaatct ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag      360
gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt      420
ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt      480
ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa      540
tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa      600
tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgcca cctcacctac      660
cgtggcgaa tagaaatcga cgaacgctt cggaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca      720
ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactacaa      780
gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc      840
aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa      900
gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattacct acccctacca ccagcaagaa      960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc     1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc     1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa      1134

```

<210> 79

<211> 377

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 313N

<400> 79

```

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

```

6413143_1

Tyr	Cys	Val	Ile	Cys 85	Thr	Asn	Val	Ile	Gly 90	Gly	Cys	Asn	Gly	Ser 95	Thr
Gly	Pro	Gly	Ser 100	Met	His	Pro	Asp	Gly 105	Asn	Phe	Trp	Gly	Asn 110	Arg	Phe
Pro	Ala	Thr 115	Ser	Ile	Arg	Asp	Gln 120	Val	Asn	Ala	Glu	Lys 125	Gln	Phe	Leu
Asp	Ala 130	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr 135	Val	Ala	Ala	Val	Leu 140	Gly	Gly	Ser	Met
Gly 145	Gly	Ala	Arg	Thr	Leu 150	Glu	Trp	Ala	Ala	Met 155	Tyr	Pro	Glu	Thr	Val 160
Gly	Ala	Ala	Ala	Val 165	Leu	Ala	Val	Ser	Ala 170	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp 175	Gln
Ile	Gly	Ile	Gln 180	Ser	Ala	Gln	Ile	Lys 185	Ala	Ile	Glu	Asn	Asp 190	His	His
Trp	His	Glu 195	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Glu 200	Ser	Gly	Cys	Asn	Pro 205	Ala	Thr	Gly
Leu	Gly 210	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile 215	Ala	His	Leu	Thr	Tyr 220	Arg	Gly	Glu	Leu
Glu 225	Ile	Asp	Glu	Arg	Phe 230	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln 235	Lys	Asn	Glu	Asn	Pro 240
Leu	Gly	Pro	Tyr	Arg 245	Lys	Pro	Asp	Gln	Arg 250	Phe	Ala	Val	Glu	Ser 255	Tyr
Leu	Asp	Tyr	Gln 260	Ala	Asp	Lys	Leu	Val 265	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala 270	Gly	Ser
Tyr	Val	Leu 275	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu 280	Asn	Arg	His	Asp	Ile 285	Gly	Arg	Asp
Arg	Gly 290	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala 295	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys 300	Val	Pro	Val	Leu
Val 305	Ala	Gly	Val	Asp	Thr 310	Asp	Ile	Asn	Tyr	Pro 315	Tyr	His	Gln	Gln	Glu 320
His	Leu	Ser	Arg	Asn 325	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu 330	Ala	Met	Ala	Lys	Ile 335	Val
Ser	Pro	Val	Gly 340	His	Asp	Ala	Phe	Leu 345	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln 350	Met	Asp
Arg	Ile	Val 355	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser 360	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp 365	Glu	Asp	Asn
Pro	Ser 370	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe 375	Tyr	Ile							

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

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ 313N

6413143_1

<400> 80
 atgcccaccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggctgc cgagctactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactgtt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgccc cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaacca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactacaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattaact acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcactctcc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313K

<400> 81
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly 15
 1 5 10
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala 30
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn 45
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp 60
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile 80
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr 95
 85 90 95

6413143_1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

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

<220>
 <223> 313K

<400> 82
 atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataaccgc 120

6413143_1

gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtgggttcca tgggtgggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactacaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggctc cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattcatt acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcactctcc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313V

<400> 83
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313V

<400> 84	
atgcccccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc	60
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc	120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc	180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccgcca aagccatcaa cactgatatt	240

6413143_1

tactgcgtga tctgtacca cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
atgcatccag atggaaatct ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
gggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaaactgtt 480
ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa 540
tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccagc gcacgcacca cctcacctac 660
cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattgttt acccctacca ccagcaagaa 960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
<223> 313A

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

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313A

<400> 86	
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc	60
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc	120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc	180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccgga aagccatcaa cactgatatt	240
tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc	300
atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag	360

6413143_1

gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
 aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattgcat acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcactctcc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313D

<400> 87
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160

6413143_1

Gly Ala Ala Ala Val₁₆₅ Leu Ala Val Ser₁₇₀ Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln₁₇₅
 Ile Gly Ile Gln₁₈₀ Ser Ala Gln Ile Lys₁₈₅ Ala Ile Glu Asn Asp₁₉₀ His His
 Trp His Glu₁₉₅ Gly Asn Tyr Tyr Glu₂₀₀ Ser Gly Cys Asn Pro₂₀₅ Ala Thr Gly
 Leu Gly₂₁₀ Ala Ala Arg Arg Ile₂₁₅ Ala His Leu Thr Tyr₂₂₀ Arg Gly Glu Leu
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe₂₃₀ Gly Thr Lys Ala Gln₂₃₅ Lys Asn Glu Asn Pro₂₄₀
 Leu Gly Pro Tyr Arg₂₄₅ Lys Pro Asp Gln Arg₂₅₀ Phe Ala Val Glu Ser₂₅₅ Tyr
 Leu Asp Tyr Gln₂₆₀ Ala Asp Lys Leu Val₂₆₅ Gln Arg Phe Asp Ala₂₇₀ Gly Ser
 Tyr Val Leu₂₇₅ Leu Thr Asp Ala Leu₂₈₀ Asn Arg His Asp Ile₂₈₅ Gly Arg Asp
 Arg Gly₂₉₀ Gly Leu Asn Lys Ala₂₉₅ Leu Glu Ser Ile Lys₃₀₀ Val Pro Val Leu
 Val Ala Gly Val Asp Thr₃₁₀ Asp Ile Asp Tyr Pro₃₁₅ Tyr His Gln Gln Glu₃₂₀
 His Leu Ser Arg Asn₃₂₅ Leu Gly Asn Leu Leu₃₃₀ Ala Met Ala Lys Ile₃₃₅ Val
 Ser Pro Val Gly₃₄₀ His Asp Ala Phe Leu₃₄₅ Thr Glu Ser Arg Gln₃₅₀ Met Asp
 Arg Ile Val₃₅₅ Arg Asn Phe Phe Ser₃₆₀ Leu Ile Ser Pro Asp₃₆₅ Glu Asp Asn
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe₃₇₅ Tyr Ile
 370

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

<220>
 <223> 313D

<400> 88
 atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataaccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcgcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt 480

6413143_1

ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt cggcattcaa 540
 tccgccccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcacgcacca cctcacctac 660
 cgtggcgcaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttccgctgag aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccttc 840
 aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattgact acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcattctcc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313E

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

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313E

<400> 90	60
atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc	
gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc	120
gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc	180
aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt	240
tactgctga tctgtaccaa cgatcggt ggttgcaac gttccaccgg acctggctcc	300
atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag	360
gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt	420
ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt	480
ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaact cggcattcaa	540
tccgccc aaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa	600

6413143_1

tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgcac gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgcaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgcctc 840
 aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
 gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattgaat acccctacca ccagcaagaa 960
 cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
 cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
 ctcattctcc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
 <223> 313G

<400> 91
 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30
 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45
 Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60
 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95
 Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110
 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125
 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205

6413143_1

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

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

<220>
 <223> 313G

<400> 92
 atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc cgcacccta gagtgggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcatcgccca cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720

6413143_1

ctcgggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
aaccgccacg acattgggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa 900
gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattggat acccctacca ccagcaagaa 960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc 1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

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

<220>
<223> 313W

<400> 93
Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly
1 5 10 15
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
20 25 30
Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
35 40 45
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
50 55 60
Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
65 70 75 80
Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
85 90 95
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
100 105 110
Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
115 120 125
Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
130 135 140
Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
145 150 155 160
Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
165 170 175
Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
180 185 190
Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
195 200 205
Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
210 215 220

6413143_1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

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

<220>
 <223> 313W

<400> 94
 atgcccaccc tcgcgcccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgctga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt 420
 ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtggggccg caatgtaccc agaaactggt 480
 ggcgcagctg ctgttcttg agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa 540
 tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
 tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgccc cctcacctac 660
 cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
 ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
 gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840

6413143_1

aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa	900
gttcagtcg ttgtcgcagg cgtagatacc gatatttggt acccctacca ccagcaagaa	960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc	1020
cacgatgctt tcctcaccga aagccgcca atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc	1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa	1134