



(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)



1-0038970

(51)¹⁹ C12P 19/32; C12N 9/10; C12N 15/52; (13) B
C12N 15/77

(21) 1-2019-06049

(22) 19/07/2019

(86) PCT/KR2019/008924 19/07/2019

(87) WO 2020/196993 01/10/2020

(30) 10-2019-0035683 28/03/2019 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/03/2021 396

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) LEE, JI HYE (KR); PARK, So-jung (KR); BAEK, MIN JI (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) BIẾN THỂ PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHAT AMIDOTRANSFERAZA,
POLYNUCLEOTIT, VECTƠ, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY, VÀ
PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PURIN NUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề xuất biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza,
polynucleotit mã hóa biến thể này, vectơ chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể này,
và phương pháp điều chế và tăng cường sản sinh purin nucleotit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, vi sinh vật chứa biến thể này, phương pháp sản sinh purin nucleotit sử dụng vi sinh vật này, chế phẩm để sản sinh purin nucleotit, phương pháp tăng cường sản sinh purin nucleotit, hoặc sử dụng biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, polynucleotit và các vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit 5-Inosinic (5'-inosin monophosphat; sau đây gọi là IMP) là vật liệu gốc nucleotit, là vật liệu trung gian của hệ thống chuyển hóa để tổng hợp axit nucleic và được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, như các sản phẩm y tế và các ứng dụng y tế. IMP là nguyên liệu được sử dụng rộng rãi làm phụ gia cho gia vị thực phẩm hoặc làm thực phẩm, cùng với axit 5'-guanylic (5'-guanin monophosphat; sau đây gọi là GMP). Bản thân IMP đã được biết đến là có hương vị thịt bò, và tăng hương vị của axit natri glutamic (MSG), giống như GMP. Do đó, IMP đã nhận được nhiều sự chú ý như là gia vị gốc nucleotit.

Các phương pháp điều chế IMP bao gồm phương pháp phân cắt các enzym axit ribonucleic được chiết xuất từ các tế bào nấm men, phương pháp hóa học phosphoryl hóa inosin được sản xuất bằng cách lên men (Hóa sinh và nông nghiệp, 36, 1511 (1972), v.v.), phương pháp nuôi cấy vi sinh vật có khả năng trực tiếp sản sinh IMP và sau đó thu hồi IMP trong môi trường nuôi cấy, v.v.. Trong số các phương pháp này, phương pháp được sử dụng phổ biến nhất là phương pháp sử dụng vi sinh vật có khả năng trực tiếp sản sinh IMP.

Hơn nữa, các phương pháp điều chế GMP bao gồm phương pháp chuyển đổi axit 5'-xanthylic (5'-xanthosine monophosphat; sau đây gọi là XMP) được sản xuất bằng lên men vi sinh vật tạo ra GMP sử dụng vi sinh vật coryneform và phương pháp biến đổi XMP được sản xuất bằng lên men vi sinh vật tạo ra GMP sử dụng vi khuẩn *Escherichia coli*. Theo các phương pháp nêu trên, khi XMP được sản xuất và sau đó được chuyển

đổi thành GMP, khả năng sản sinh XMP cần phải được tăng cường, là tiền chất của phản ứng biến đổi trong quá trình lên men vi sinh vật, và cần phải ngăn sự tổn thất GMP cũng như XMP đã được sản xuất trong suốt quá trình phản ứng biến đổi.

Trong khi đó, các enzym ở trạng thái tự nhiên của chúng không phải lúc nào cũng thể hiện các tính chất tối ưu về hoạt tính, tính ổn định, tính đặc hiệu của cơ chất cho các đồng phân quang học, v.v., được yêu cầu trong các ứng dụng công nghiệp. Do đó, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện các enzym thông qua các biến thể của các trình tự axit amin của chúng, v.v. sao cho chúng trở nên phù hợp với mục đích sử dụng. Trong đó, thiết kế hợp lý và gây đột biến định hướng điểm của các enzym đã được áp dụng để cải thiện các chức năng của enzym. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, có nhược điểm là thông tin về cấu trúc của enzym đích không đủ hoặc mối quan hệ cấu trúc-chức năng không rõ ràng, và do đó, các phương pháp không thể được áp dụng một cách hiệu quả. Về vấn đề này, đã có báo cáo rằng cải tiến hoạt tính của enzym được thử nghiệm bằng phương pháp tiến hóa có định hướng để sàng lọc enzym có đặc điểm mong muốn từ ngân hàng enzym đột biến được xây dựng thông qua đột biến ngẫu nhiên của gen enzym.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng để sản xuất purin nucleotit với năng suất cao bằng phương pháp sản xuất purin nucleotit thông qua quá trình lên men vi sinh vật và đã xác định được biến thể của protein có khả năng sản sinh purin nucleotit cao hơn, từ đó hoàn thành sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza.

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh purin nucleotit, vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza hoặc vector.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế purin nucleotit, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường nuôi cấy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất purin nucleotit, chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng cường sản sinh purin nucleotit, chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza để sản sinh purin nucleotit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng polynucleotit để sản xuất purin nucleotit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để sản xuất purin nucleotit.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, có thể tạo ra purin nucleotit với năng suất cao. Hơn nữa, purin nucleotit đã điều chế có thể được áp dụng không chỉ cho thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi mà còn cho các sản phẩm khác nhau như thực phẩm của con người hoặc các phụ gia thực phẩm, gia vị, thuốc, v.v..

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Trong đó, phương án và các mô tả tương ứng được bộc lộ trong đơn có thể được áp dụng cho các phương án và phần mô tả khác. Đó là, tất cả các kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong đơn này thuộc phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả chi tiết bên dưới.

Để đạt được các mục đích trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có polypeptit có sự thay thế của một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Cụ thể, sáng chế đề xuất biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có polypeptit có sự thay thế của một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó sự thay thế axit amin bao gồm thay thế axit amin ở vị trí thứ 2 và/hoặc thay thế axit amin ở vị trí thứ 445 từ đầu N- của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất biến thể phosphoribosyl pyrophosphat

amidotransferaza, trong đó i) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin, ii) axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin, hoặc iii) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin và axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin từ đầu N- của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza” đề cập đến enzym có vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp purin. Đối với các đối tượng của sáng chế, enzym đề cập đến protein liên quan đến sự sản sinh purin nucleotit.

Trong sáng chế, trình tự SEQ ID NO: 2 đề cập đến trình tự axit amin có hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza. Cụ thể, trình tự SEQ ID NO: 2 là trình tự protein có hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, được mã hóa bởi gen *purF*. Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được lấy từ cơ sở dữ liệu công khai của Ngân hàng Gen thuộc Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ví dụ, mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở đây, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được lấy từ chi *Corynebacterium* (*Corynebacterium* sp.), và có thể bao gồm bất kỳ trình tự nào có hoạt tính tương tự như trình tự axit amin nêu trên mà không bị giới hạn. Hơn nữa, phạm vi của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể bao gồm trình tự axit amin có hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80% sự tương đồng hoặc đồng nhất, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây. Cụ thể, trình tự axit amin có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Trình tự axit amin có tương đồng hoặc đồng nhất có thể không bao gồm trình tự có 100% đồng nhất từ phạm vi trên hoặc có thể là trình tự có đồng nhất dưới 100%. Hơn nữa, rõ ràng là protein có trình tự axit amin bị mất, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một số axit amin cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là nó có tính tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza” có thể được sử dụng thay thế cho biến thể polypeptit có khả năng sản xuất purin nucleotit, biến thể polypeptit sản xuất purin nucleotit, biến thể polypeptit có hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, biến thể

phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, v.v..

Biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể bao gồm (các) biến đổi ở vị trí thứ 2 và/hoặc thứ 445 từ đầu N- trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể có (các) axit amin khác thay thế cho (các) axit amin thứ 2 và/hoặc thứ 445 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và hoạt tính được tăng cường so với trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza không biến đổi có nguồn gốc từ vi sinh vật kiểu dại. Biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có nghĩa là có sự biến đổi của axit amin thứ 2 hoặc thứ 445 từ đầu N- của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, như được mô tả bên trên.

Ví dụ, biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể có i) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin, ii) axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin, hoặc iii) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin và axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và có thể đã tăng cường hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza so với polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây.

Đối với các đối tượng của sáng chế, vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có khả năng sản sinh purin nucleotit cao hơn so với vi sinh vật kiểu dại, vi sinh vật chứa phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza kiểu dại, hoặc vi sinh vật không chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza. Tầm quan trọng của sáng chế ở chỗ purin nucleotit sản sinh bởi các vi sinh vật có thể được tăng lên bằng cách sử dụng biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế, trong khi loài *Corynebacterium* thuộc chủng kiểu dại không thể sản xuất được purin nucleotit hoặc ngay cả khi nó sản xuất purin nucleotit thì chỉ có thể sản xuất lượng rất nhỏ.

Cụ thể, biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể bao gồm trình tự axit amin có sự thay thế axit amin khác cho axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 445. Cụ thể, biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể bao gồm

polypeptit chứa i) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin, ii) axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin, hoặc iii) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin và axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin từ đầu N- trong trình tự axit amin nêu trong nêu trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có thể bao gồm trình tự axit amin trong đó axit amin khác được thay thế cho axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 445 từ đầu N- trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80% tương đồng hoặc đồng nhất, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin hoặc axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, rõ ràng protein có trình tự axit amin bị mất, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung các trình tự axit amin khác ngoài trình tự axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 445 cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là nó có tính tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein trên.

Nói cách khác, mặc dù sáng chế mô tả “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO cụ thể”, rõ ràng là protein có trình tự axit amin bị mất, thay đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc bổ sung một số axit amin cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là nó có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với polypeptit có 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 biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, không loại trừ bổ sung trình tự, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến cam hoặc thay thế bảo thủ mà không làm thay đổi chức năng của protein, trước và sau trình tự axit amin. Rõ ràng là protein có sự bổ sung hoặc đột biến trình tự như vậy cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

“Thay thế bảo thủ” có nghĩa là thay thế axit amin bằng axit amin khác có đặc điểm cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin này thường 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 tính chất lưỡng tính. Ví dụ, các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin; các axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan

và tiroxin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tiroxin và tryptophan.

Do đó, theo sáng chế, “biến thể” còn có thể bao gồm sự thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi một hoặc nhiều axit amin trong “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO cụ thể”. Ví dụ, một số biến thể nhất định có thể bao gồm các biến thể một hoặc nhiều phân, như trình tự đầu N- hoặc vùng xuyên màng, đã bị loại bỏ. Biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phân đã được loại bỏ khỏi đầu N- và/hoặc C- của protein trưởng thành. Biến thể cũng có thể bao gồm các sửa đổi khác, bao gồm mất hoặc bổ sung các axit amin, có ảnh hưởng tối thiểu đến các tính chất và cấu trúc thứ cấp của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp thành trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu N- của protein có khả năng chuyển dịch trực tiếp đồng dịch hóa hoặc hậu dịch hóa protein. Polypeptit cũng có thể được liên hợp với trình tự hoặc liên kết khác để dễ nhận dạng, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế cho sự biến đổi, protein biến đổi, polypeptit biến đổi, đột biến, protein đột biến, phân kỳ, v.v., và bất kỳ thuật ngữ nào cũng có thể được sử dụng mà không bị giới hạn, miễn là nó được sử dụng theo nghĩa được sửa đổi.

Tương đồng và đồng nhất có nghĩa là mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit nhất định và có thể được biểu thị bằng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Trình tự tương đồng hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn với các điểm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai hóa trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt vừa phải hoặc cao dọc theo toàn bộ trình tự của chúng hoặc ít nhất là khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, hoặc khoảng 90% toàn bộ chiều dài. Đối với các polynucleotit được lai hóa, các polynucleotit bao gồm đơn vị mã hóa thoái biến thay vì đơn vị mã hóa cũng có thể được dự tính.

Nói chung, như đơn vị mã hóa xác định axit amin nào được mã hóa, đơn vị mã hóa được hình thành bằng cách ghép ba trình tự nucleotit. Có nhiều loại đơn vị mã hóa so với axit amin được mã hóa, và loại axit amin được sản sinh khác nhau theo sự kết hợp của các đơn vị mã hóa. Dịch mã bắt đầu từ đơn vị mã hóa khởi đầu và axit amin đầu tiên

được dịch mã có thể là fMet. Thông thường, quá trình dịch mã tiến hành bằng cách vận chuyển fMET cho đơn vị mã hóa mARN tương ứng với trình tự atg của ADN. Tuy nhiên, dịch mã có thể tiến hành bằng cách vận chuyển fMET khi ADN đầu tiên của mARN ORF (khung đọc mở) là gtg hoặc ttg. Tức là, đơn vị mã hóa khởi đầu có thể là atg, gtg hoặc ttg.

Cho dù bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng, ví dụ, thuật toán máy tính đã biết như chương trình “FASTA” sử dụng các tham số mặc định như trong [Tập san của Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ số 85]: 2444 Pearson *et al.* (1988) và cách khác, được xác định bằng cách sử dụng thuật toán NeedmanTHER Wunsch (Needman và Wunsch, 1970, Tạp chí sinh học phân tử 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needman của gói EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu, Rice *et al.*, 2000, Xu hướng gen 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 trở lên) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al.*, Nghiên cứu các axit nucleic 12 : 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [*et al.*, tạp chí sinh học phân tử 215]: 403 (1990); Hướng dẫn về máy tính khổng lồ, Martin J. Bishop, [ED.,] Nhà xuất bản Học thuật, San Diego, 1994 và [CARILLO ETA /.] (1988) SIAM J Ứng dụng Toán 48: 1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia.

Tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự bằng chương trình máy tính GAP, ví dụ, Tạp chí sinh học phân tử 48: 443, Needman *et al.* (1970), như được bộc lộ trong Thành tựu toán ứng dụng (1981) 2: 482, Smith và Waterman. Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa tương tự là số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (nghĩa là nucleotit hoặc axit amin) tương tự nhau, chia cho tổng số các ký hiệu của trình tự ngắn hơn giữa hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) đơn vị ma trận so sánh (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số (hoặc EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC 4.4) ma trận thay thế) của Gribskov *et al.* (1986) Nghiên cứu axit nucleic 14: 6745, như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, bài báo, Atlas về trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353-358 (1979); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi biểu tượng trong mỗi khoảng trống dịch

chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển là 10, và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển là 0,5); và (3) không có hàm phạt đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng. Theo đó, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến sự liên quan giữa các trình tự.

Do sự thoái biến của đơn vị mã hóa, rõ ràng là polynucleotit được dịch mã thành biến thể polypeptit có sự thay thế axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 445 bằng (các) axit amin khác từ đầu N- của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc cũng có thể bao gồm biến thể polypeptit có tính tương đồng hoặc đồng nhất. Hơn nữa, bằng cách lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò được tạo thành từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit, trình tự polynucleotit mã hóa biến thể amidotransferaza phosphoribosyl pyrophosphat bao gồm các trình tự axit amin trong đó i) axit amin thứ 2 được thay thế bởi methionin, ii) axit amin thứ 445 được thay thế bởi arginin, hoặc iii) axit amin thứ 2 được thay thế bởi methionin và axit amin thứ 445 được thay thế bởi arginin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được bao gồm nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập tới sợi ADN hoặc ARN có chiều dài nhất định như polyme nucleotit, là chuỗi dài các đơn phân nucleotit được kết nối bởi các liên kết cộng hóa trị, và cụ thể hơn là polynucleotit mã hóa đoạn polypeptit.

Polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit nào mà không bị giới hạn, miễn là nó mã hóa biến thể polypeptit có hoạt tính phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza theo sáng chế. Trong sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza là gen *purF*, và cụ thể, gen này có thể được lấy từ *Corynebacterium Stationis*, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây.

Cụ thể, do sự thoái biến của đơn vị mã hóa hoặc bằng cách xem xét các đơn vị mã hóa được ưu tiên bởi vi sinh vật trong đó polypeptit được phép biểu hiện, các sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa của polynucleotit theo sáng chế trong phạm vi không thay đổi trình tự axit amin của polypeptit. Bất kỳ trình tự polynucleotit nào cũng có thể được đưa vào mà không bị giới hạn miễn là nó mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có axit amin thứ 2 hoặc axit

amin thứ 445 được thay thế bởi axit amin khác trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Ví dụ, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm trình tự có một số trình tự đã sửa đổi trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Hơn nữa, bằng cách lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò được tạo thành từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit, trình tự mã hóa protein có hoạt tính của biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có axit amin thứ 2 hoặc axit amin thứ 445 được thay thế bởi axit amin khác trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được bao gồm mà không bị giới hạn. “Điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện cho phép lai hóa cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, *supra*). Các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện theo đó các gen có tính tương đồng hoặc đồng nhất cao, ví dụ, các gen có tối thiểu 40%, cụ thể là tối thiểu 85% trở lên, tối thiểu 90%, cụ thể hơn là tối thiểu 95%, cụ thể hơn nữa là tối thiểu 97%, đặc biệt cụ thể là tương đồng hoặc đồng nhất tối thiểu 99% có thể lai với nhau và các gen có tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn không thể lai với nhau hoặc các điều kiện rửa phổ biến cho lai Southern, ví dụ, nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng là 60°C, 1×SSC (Saline Sodium Citrate: Salin Natri Xitrat), 0,1% SDS (sodium dodecyl sulphate: natri dodecyl sulphat), cụ thể là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, một lần, cụ thể, hai lần hoặc ba lần.

Phép lai hóa yêu cầu hai axit nucleic có các trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ là có thể phụ thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có khả năng lai hóa với nhau. Ví dụ, liên quan đến ADN, adenosin bổ sung cho thimin và xitozin bổ sung cho guanin. Theo đó, sáng chế có thể còn bao gồm các đoạn axit nucleic bị phân lập bổ sung cho các trình tự hoàn chỉnh cũng như các trình tự axit nucleic tương tự.

Cụ thể, polynucleotit có tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai ở T_m là 55°C và bằng cách sử dụng các điều kiện được mô tả ở trên. Hơn nữa, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C, nhưng không bị giới hạn và có thể được kiểm soát chính xác bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy theo mục đích.

Mức độ nghiêm ngặt thích hợp để lai hóa các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài của các polynucleotit và mức độ bổ sung, và các tham số được biết đến trong kỹ thuật (xem Sambrook *et al.*, *supra*, 9,50–9,51, 11,7–11,8).

Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza là gen *purF* và mã hóa polynucleotit giống như mô tả bên trên.

Theo sáng chế, polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza cũng giống như mô tả bên trên.

Khía cạnh khác của sáng chế là cung cấp polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, hoặc vector chứa polynucleotit.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vector” có nghĩa là cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát phù hợp sao cho polypeptit mong muốn được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Các trình tự kiểm soát có thể bao gồm vùng gen khởi động để phiên mã trực tiếp, trình tự vận hành nhất định để kiểm soát phiên mã đó, trình tự mã hóa vị trí gắn ribosom phù hợp trên mRNA và trình tự để kiểm soát phiên mã và dịch mã. Sau khi biến nạp vào vật chủ thích hợp, vector có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen của vật chủ hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chính nó.

Vector được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể miễn là vector có thể sao chép trong tế bào chủ và bất kỳ vector nào được biết trong kỹ thuật đều có thể được sử dụng. Các ví dụ về vector thường được sử dụng có thể bao gồm các plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmid, virus và vi khuẩn. Ví dụ, vector phage hoặc vector cosmid, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng, và vector plasmid gốc pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn có thể được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể trong tế bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách tái tổ hợp tương đồng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Dấu hiệu chọn lọc để xác nhận chèn vector vào nhiễm sắc thể có thể

được thêm vào. Dấu hiệu chọn lọc được sử dụng để lựa chọn các tế bào biến nạp với vector, tức là, để xác nhận có hay không sự chèn phân tử axit nucleic mong muốn, và các dấu hiệu chọn lọc có khả năng cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc như kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào, và biểu hiện của protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong trường hợp xử lý các tác nhân chọn lọc, chỉ các tế bào có khả năng biểu hiện các dấu hiệu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các đặc điểm kiểu hình khác, và do đó các tế bào biến nạp có thể được chọn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh purin nucleotit, vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza hoặc polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza. Cụ thể, vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza và/hoặc polynucleotit mã hóa giống nhau có thể là vi sinh vật được tạo thành bằng cách biến nạp với vector chứa polynucleotit, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ để protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Không quan trọng polynucleotit biến nạp được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm ở đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là polynucleotit biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Hơn nữa, polynucleotit có thể chứa ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới mọi hình thức, miễn là polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, có cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho biểu hiện của nó. Catxet biểu hiện có thể chứa vùng gen khởi động, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã có thể được liên kết hoạt động với polynucleotit. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện thực hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ để được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không bị giới hạn ở đây.

Hơn nữa, thuật ngữ “liên kết hoạt động” đề cập đến liên kết chức năng giữa trình tự gen và trình tự vùng gen khởi động để bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn của sáng chế.

Thuật ngữ “vi sinh vật chứa biến thể polypeptit” hoặc “vi sinh vật chứa biến thể

phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza”, như được sử dụng trong sáng chế, có nghĩa là vi sinh vật được tạo ra bằng cách tạo khả năng sản sinh purin nucleotit cho vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit tự nhiên yếu hoặc chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh purin nucleotit. Các vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza có polypeptit bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó thay thế axit amin có thể bao gồm methionin thay thế axit amin thứ 2 và/hoặc arginin thay thế cho axit amin thứ 445 từ đầu N- của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể polypeptit, trong đó vi sinh vật có hoạt tính amidotransferaza phosphoribosyl pyrophosphat do thay thế axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 445 bằng (các) axit amin khác trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

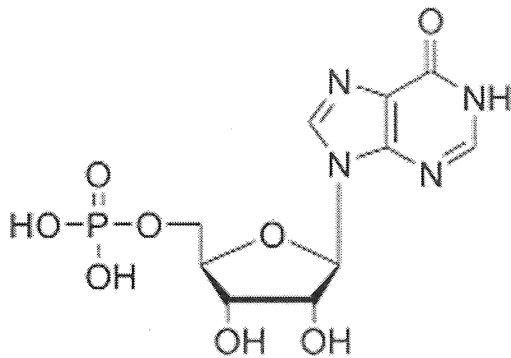
Các vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật có thể chứa polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza, hoặc có thể được biến nạp với vector chứa các polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza biểu hiện tương tự, và đối với các đối tượng của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật nào, miễn là nó chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza để sản sinh purin nucleotit.

Theo sáng chế, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit có thể được sử dụng thay thế cho vi sinh vật sản sinh được purin nucleotit hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit.

Đối với các đối tượng theo sáng chế, “purin nucleotit” có nghĩa là nucleotit chứa cấu trúc purin. Các ví dụ chúng có thể chứa IMP, XMP hoặc GMP, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, thuật ngữ “IMP (5'-inosin monophosphat)” là vật liệu gốc axit nucleic có công thức hóa học 1 bên dưới:

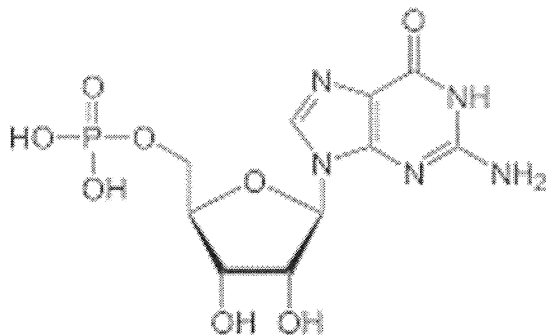
[Công thức hóa học 1]



IMP được gọi tên theo Danh pháp Hóa học theo Liên minh Quốc tế về Hóa học thuần túy và Hóa học ứng dụng (International Union of Pure and Applied Chemistry Nomenclature: IUPAC) là 5'-inosin monophosphat hoặc axit 5'-inosin, và được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm như chất tăng hương vị, cùng với XMP hoặc GMP.

Thuật ngữ “GMP (5'-guanin monophosphat)” là vật liệu gốc axit nucleic có công thức hóa học 2 dưới đây:

[Công thức hóa học 2]

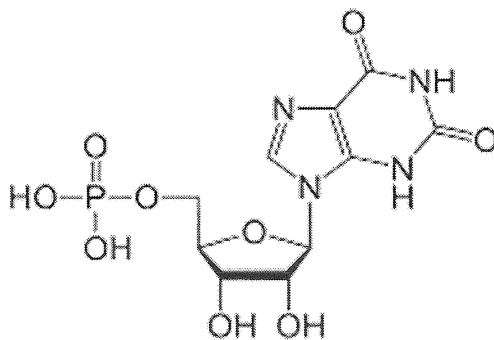


GMP có tên IUPAC là [(2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl] methyl dihydro phosphat, và còn được gọi là axit 5'-guanidylic, axit 5'-guanylic hoặc axit guanylic.

GMP ở dạng các muối của nó, như natri guanylat, đikali guanylat, và canxi guanylat được sử dụng rộng rãi như chất phụ gia thực phẩm. Khi được sử dụng làm phụ gia cùng với IMP, GMP thể hiện tác dụng hiệp đồng để tăng hương vị. Có thể tạo ra GMP bằng cách chuyển đổi từ XMP, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Như đã xác nhận trong một phương án của sáng chế, biến thể polypeptit của sáng chế có thể làm tăng sản sinh XMP, và từ việc tăng sản sinh XMP, GMP có thể được chuyển đổi và có thể tăng sản sinh. Theo đó, rõ ràng GMP cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “XMP (5'-xanthosin monophosphat)” là vật liệu trung gian của chuyển hóa purin và có công thức hóa học 3 bên dưới. XMP có tên IUPAC là 5'-inosin monophosphat hoặc 5'-xanthylic. XMP có thể được tạo thành từ IMP do tác động của IMP dehydrogenaza hoặc XMP có thể được chuyển đổi thành GMP bằng tác động của GMP synthetaza. Hơn nữa, XMP có thể được tạo thành từ XTP bởi deoxyribonucleosit triphosphat pyrophosphohydrolaza, đây là enzym có hoạt tính XTPase.

[Công thức hóa học 3]



Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh purin nucleotit” có thể là vi sinh vật trong đó có sự biến đổi gen xảy ra hoặc hoạt tính được tăng cường để tạo ra purin nucleotit theo mong muốn, bao gồm tất cả các vi sinh vật kiểu dại hoặc vi sinh vật trong đó xảy ra biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế bị suy yếu hoặc tăng cường cụ thể bằng cách chèn gen ngoại sinh hoặc bằng cách tăng cường hoặc bất hoạt của gen nội sinh. Đối với các đối tượng của sáng chế, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit có thể khác biệt ở chỗ vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza để tăng khả năng sản sinh purin nucleotit mong muốn, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật loài *Corynebacterium*. Cụ thể, theo sáng chế, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit có thể là vi sinh vật trong đó một số gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin nucleotit được tăng cường hoặc suy yếu hoặc một số gen liên quan đến phương thức phân cắt purin nucleotit được tăng cường hoặc suy yếu. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó biểu hiện của gen *purA* mã hóa adenylsuxinat synthetaza bị suy yếu. Ngoài ra, biểu hiện của *guaB*, là gen mã hóa inosin-5'-monophosphat dehydrogenaza trong phương thức thoái biến IMP, có thể được điều chỉnh theo purin nucleotit. Cụ thể, khi purin nucleotit là IMP, biểu hiện *guaB* có thể bị suy yếu hoặc khi purin nucleotit là XMP hoặc GMP, biểu hiện *guaB* có thể được tăng cường, nhưng biểu hiện của nó không bị hạn chế.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit” đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh nucleotit tự nhiên hoặc do đột biến. Cụ thể, như được sử dụng trong sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit được cải thiện do tăng cường hoạt tính của gen *purF* mã hóa phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza. Cụ thể hơn, như được sử dụng trong sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh purin nucleotit được cải thiện do chứa các biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza hoặc polynucleotit mã hóa cùng loại, hoặc do biến nạp với vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza. “Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có cải thiện khả năng sản sinh purin nucleotit” đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit được cải thiện so với chủng bố mẹ của chúng trước khi biến nạp hoặc không được sửa đổi. “Vi sinh vật không được sửa đổi” đề cập đến chủng kiểu đại của nó, hoặc vi sinh vật không chứa biến thể protein sản sinh purin nucleotit, hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza.

Như được sử dụng trong sáng chế, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium stationis*, v.v., nhưng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* không nhất thiết bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế purin nucleotit, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit trong môi trường nuôi cấy. Ví dụ, phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi purin nucleotit từ vi sinh vật hoặc môi trường được nuôi cấy sau bước nuôi cấy.

Trong phương pháp, bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã được biết đến nhưng sáng chế không giới hạn ở các phương pháp cụ thể này, như nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ-bổ sung, v.v.. Về vấn đề này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH thích hợp (ví dụ,

độ pH 5 đến pH 9, tốt hơn là độ pH 6 đến pH 8, và tốt nhất là độ pH 6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc amoniac) hoặc các hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric). Điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách thêm oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở 20°C đến 45°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, và nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, nhưng điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn ở đây. Purin nucleotit được sản sinh bằng nuôi cấy có thể được bài tiết vào trong môi trường nuôi cấy hoặc có thể được giữ trong các tế bào.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy được sử dụng, như nguồn cacbon, đường và cacbohydrat (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, mantoza, ri đường, tinh bột và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu đậu phộng, và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol) và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở đây. Nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, canh thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat hoặc amoni cacbonat và amoni nitrat), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không bị giới hạn ở đây. Nguồn phospho, kali dihydrophosphat, đikali hydrophosphat, muối có chứa natri tương ứng, v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn phospho không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy cũng có thể bao gồm các nguyên liệu kích thích tăng trưởng cần thiết như là các muối kim loại khác (ví dụ, magie sunfat hoặc sắt sunfat), các axit amin hoặc các vitamin.

Phương pháp thu hồi purin nucleotit được sản sinh trong các bước nuôi cấy của sáng chế để thu hoạch các purin nucleotit mong muốn từ môi trường nuôi cấy bằng phương pháp thích hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật dựa theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), v.v. có thể được sử dụng, và purin nucleotit có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh chế. Quá trình tinh chế có thể

được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Vì vậy, purin nucleotit được thu hồi có thể ở dạng tinh khiết hoặc dịch lên men vi sinh vật chứa purin nucleotit (Giới thiệu về công nghệ sinh học và kỹ thuật di truyền của A. J. Nair, 2008).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm để sản sinh purin nucleotit chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza.

Chế phẩm để sản sinh purin nucleotit đề cập đến chế phẩm có khả năng sản sinh purin nucleotit bởi polynucleotit của sáng chế. Ví dụ, chế phẩm chứa polynucleotit, và có thể còn chứa thành phần có khả năng hoạt động polynucleotit, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Polynucleotit có thể ở dạng chứa vector để biểu hiện gen liên kết hoạt động được đưa vào tế bào chủ.

Ngoài ra, chế phẩm có thể bao gồm bất kỳ tá dược phù hợp thông thường được sử dụng trong chế phẩm để sản sinh purin nucleotit. Tá dược có thể được sử dụng, ví dụ, chất bảo quản, chất tạo ẩm, chất gây phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định, chất đẳng trương, nhưng các tá dược không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường sản sinh purin nucleotit bao gồm bước nuôi cấy biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Thuật ngữ “biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza”, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*”, “nuôi cấy”, “homoserin hoặc L-amino axit gốc homoserin như được mô tả ở trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza để sản sinh purin nucleotit hoặc điều chế chế phẩm để sản sinh purin nucleotit.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sử dụng polynucleotit để sản sinh purin nucleotit, hoặc điều chế chế phẩm để sản sinh purin nucleotit

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sử dụng vi sinh vật của chi *Corynebacterium* để sản sinh purin nucleotit, hoặc điều chế chế phẩm để sản sinh purin nucleotit.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu các ví dụ thực hiện.

Tuy nhiên, rõ ràng là đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế chủng sản sinh IMP từ chủng kiểu dại

Các chủng loại kiểu dại thuộc chi *Corynebacterium* không thể sản sinh IMP hoặc có thể sản sinh IMP với lượng rất nhỏ. Do đó, chủng sản sinh IMP đã được tạo ra dựa trên *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 kiểu dại. Cụ thể, chủng sản sinh IMP đã được tạo ra bằng cách làm suy yếu hoạt tính của *purA*, mã hóa adenylsuccinat synthetaza và hoạt tính của *guaB*, mã hóa axit 5'-inosinic dehydrogenaza.

Ví dụ 1-1: Điều chế chủng suy yếu *purA*

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa khởi đầu của *purA* đã bị thay đổi, đầu tiên vector chèn có chứa *purA* đã được điều chế. Để sao chép gen *purA* vào vector chèn, PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và cặp môi nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, và SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 trong 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN thu được từ PCR ở trên làm mạch khuôn và cặp môi nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 trong 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút để thu được đoạn ADN. Đoạn ADN thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI và được sao chép vào vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn quốc tế số 2008-033001) đã được phân cắt với cùng loại enzym. Vector được điều chế theo phương pháp trên được định danh là pDZ-purA-alt.

Bảng 1

SEQ ID NO	Tên đoạn môi	(Trình tự (5'-3'))
3	pDZ-purA(alt)-1	GCTCTAGAGGCCACGATGCCCGGAGCATC
4	pDZ-purA(alt)-2	TAACGATAGCTGCCAAGGTTATTCACCTCCTAGATTT
5	pDZ-purA(alt)-3	AGGAAGTGAATAACCTTGGCAGCTATCGTTATCGTCG
6	pDZ-purA(alt)-4	GCTCTAGAGGTCACGAATGGGTAGGTGCC

Vector tái tổ hợp pDZ-purA-alt đã được biến nạp thành chủng *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 bằng phương pháp xung điện, và sau đó các chủng trong đó vector

được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn phải trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và sau đó các chủng được chọn được giải trình tự, nhờ đó chọn ra chủng cuối cùng mà đột biến đã được đưa vào. Chủng này được định danh là ATCC6872-purA (a1t).

Ví dụ 1-2: Điều chế chủng suy yếu *guaB*

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa khởi đầu của *guaB* đã được thay đổi, trước tiên vector chèn có chứa *guaB* đã được điều chế. Để sao chép gen *guaB* vào vector chèn, PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10. PCR cũng được thực hiện bằng cách sử dụng các sản phẩm PCR ở trên làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10. Đoạn ADN thu được được sao chép theo cách tương tự như trong ví dụ 1-1. Vector điều chế được định danh là pDZ-*guaB*-a1t.

Bảng 2

SEQ ID NO	Tên đoạn mồi	(Trình tự (5'-3'))
7	pDZ- <i>guaB</i> (a1t)-1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
8	pDZ- <i>guaB</i> (a1t)-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC
9	pDZ- <i>guaB</i> (a1t)-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTTTCT
10	pDZ- <i>guaB</i> (a1t)-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

Vector tái tổ hợp pDZ-*guaB*-a1t đã được biến nạp thành chủng ATCC6872-purA (a1t) được điều chế trong ví dụ 1-1 bằng kỹ thuật xung điện, và sau đó các chủng trong đó vector được đưa vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn phải trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và sau đó các chủng được chọn được giải trình tự, qua đó chọn ra chủng cuối cùng mà đột biến đã được đưa vào.

Chủng sản sinh IMP cuối cùng được lựa chọn dựa trên *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 kiểu dại được định danh là CJI9088.

Ví dụ 1-3: Kiểm tra chuẩn độ lên men CJI9088

2 mL môi trường nuôi cấy giống được đưa vào các ống nghiệm có đường kính 18 mm và được hấp khử trùng dưới áp suất. Mỗi chủng ATCC6872 và CJI9088 đã được

cấy chủng và ủ ở 30°C trong 24 giờ với sử dụng lắc trong nuôi cấy giống. 29 mL môi trường lên men được đưa vào bình nón 250 ml lắc và được hấp khử trùng dưới áp suất ở 121°C trong 15 phút, và 2 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chủng và ủ trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh ở tốc độ quay 170 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, sản lượng của IMP được đo bằng HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy như thể hiện trong bảng 3 bên dưới. Các kết quả bên dưới cho thấy các chủng bị suy yếu *purA* và *guaB* có khả năng sản sinh IMP.

Bảng 3

Chủng	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI9088	0,52

- Môi trường nuôi cấy giống: 1% glucoza, 1% pepton, 1% canh thịt, 1% chiết xuất men, 0,25% natri clorua, 100 mg/L adenin, 100 mg/L guanin, độ pH 7,5.

- Môi trường lên men: 0,1% natri glutamat, 1% amoni clorua, 1,2% magie sunfat, 0,01% canxi clorua, 20 mg/L sắt sunfat, 20 mg/L mangan sunfat, 20 mg/L kẽm sunfat, 5 mg/L đồng sunfat, 23 mg/L L-xystein, 24 mg/L alanin, 8 mg/L axit nicotinic, 45 µg/L biotin, 5 mg/L axit thiamin hydrocloric, 30 mg/L adenin, 1,9% axit phosphoric (85%), 2,55% glucoza, 1,45% fructoza.

Ví dụ 2: Xác định biến thể tăng cường Phosphoribosyl pyrophosphat Amidotransferaza

Để tăng cường hoạt động của phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza là enzym đầu tiên trong quá trình sinh tổng hợp IMP, để cải thiện năng suất của IMP thì thư viện đột biến của *purF*, gen mã hóa phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza đã được điều chế, đột biến tăng cường khả năng sản sinh IMP đã được xác định.

Ví dụ 2-1: Điều chế vector chứa *purF*

Để tạo ra thư viện đột biến *purF*, trước tiên vector tái tổ hợp chứa *purF* đã được điều chế. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, và sản phẩm PCR được sao chép vào vector *E. coli* pCR2.1 bằng cách sử dụng

Kit nhân bản TOPO (E. Invitrogen) để thu được pCR-purF.

Bảng 4

SEQ ID NO	Tên đoạn mồi	(Trình tự (5'–3'))
11	purF tempF	AAGTTGATGCTTCAGGCACA
12	purF tempR	TGCAAGGATTGGCTCTTTGT

Ví dụ 2-2: Điều chế thư viện đột biến *purF*

Thư viện đột biến *purF* đã được điều chế dựa trên vector được điều chế trong ví dụ 2-1. Thư viện đã được điều chế bằng cách sử dụng kit PCR tạo đột biến ngẫu nhiên (Clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit). Trong các điều kiện có thể xảy ra đột biến, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14. Cụ thể, dưới các điều kiện có thể xảy ra 0 đến 3 đột biến trên 1000 bp, thực hiện gia nhiệt trước ở 94°C trong 30 giây, tiếp theo là 25 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây và 68°C trong 1 phút 30 giây. Do đó, sản phẩm PCR thu được đã được xử lý bằng cách sử dụng đoạn mồi lớn (500 ng đến 125 ng) trong 25 chu kỳ 95°C trong 50 giây, 60°C trong 50 giây và 68°C trong 12 phút và sau đó được xử lý bằng DpnI, và biến nạp vào *E. coli* DH5α và phát tán trên môi trường rắn LB có chứa kanamycin (25 mg/L). 20 loại khuẩn lạc biến nạp đã được chọn và sau đó là quá trình phân tích trình tự các plasmit thu được. Kết quả đã xác nhận rằng các đột biến đã được đưa vào tại các vị trí khác nhau với tần suất 2 đột biến/kb. Thu được khoảng 20.000 khuẩn lạc *E. coli* biến nạp và từ đó các plasmit được chiết xuất, và được định danh là thư viện pTOPO-purF.

Bảng 5

SEQ ID NO	Tên đoạn mồi	(Trình tự (5'–3'))
13	purF lib F	ACACGAGATAGCCCAGTGG
14	purF lib R	TCGTAGTTGCCATCAAAGCA

Ví dụ 2-3: Đánh giá thư viện được điều chế và lựa chọn chủng

Thư viện pTOPO-purF được điều chế trong ví dụ 2-2 đã được biến nạp vào chủng CJI9088 được điều chế trong ví dụ 1 bằng phương pháp xung điện, sau đó phát tán trên môi trường dinh dưỡng chứa 25 mg/L kanamycin để thu được 10.000 khuẩn lạc được chèn vào gen đột biến. Các khuẩn lạc được định danh là CJI9088_pTOPO_purF(mt)1 đến CJI9088_pTOPO_purF(mt)10000.

- Môi trường dinh dưỡng: 1% pepton, 1% canh thịt, 0,25% natri clorua, 1% chiết

xuất men, 2% thạch, độ pH 7,2.

Từng khuẩn lạc trong số 10.000 khuẩn lạc thu được được cấy trong 200 μ L môi trường nuôi cấy giống được hấp khử trùng dưới áp suất và được nuôi cấy trong đĩa sâu 96 lỗ và lắc 1200 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ bằng cách sử dụng máy lắc khay vi thể (TAITEC), và sau đó được sử dụng làm môi trường nuôi cấy giống. 290 μ L môi trường lên men được hấp khử trùng dưới áp suất được đưa vào đĩa sâu lòng 96 lỗ, và cấy chủng vào từng 20 μ L môi trường nuôi cấy giống, sau đó được lắc trong cùng điều kiện như trên trong 72 giờ.

Để phân tích lượng axit 5' inosinic sản sinh trong môi trường nuôi cấy, sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 3 μ L phần nổi trên bề mặt nuôi cấy được chuyển sang đĩa UV 96 lỗ, mỗi lỗ chứa 197 μ L nước cất. Tiếp theo, máy đọc khay vi thể được sử dụng để thực hiện lắc trong 30 giây và máy đo quang phổ được sử dụng để đo mật độ quang ở 25°C và 270 nm và so sánh với mật độ quang của chủng CJI9088 để chọn 50 chủng khuẩn lạc đột biến cho thấy sự tăng tối thiểu 10% mật độ quang. Các khuẩn lạc khác cho thấy mật độ quang tương đương hoặc giảm so với chủng đối chứng.

Mật độ quang của 50 chủng được chọn đã được đo theo cách tương tự như trên để kiểm tra lại lượng axit 5'-inosinic sản sinh. Hai chủng CJI9088_pTOPO_purF(mt)201 và CJI9088_pTOPO_purF(mt)5674, cho thấy sự cải thiện đáng kể về năng suất axit 5' inosinic so với chủng CJI9088 đã được chọn.

Ví dụ 2-4: Xác định đột biến bằng giải trình tự

Để xác định các đột biến gen của các chủng đột biến, từng chủng CJI9088_pTOPO_purF(mt)201 và CJI9088_pTOPO_guaB(mt)5674 đã được xử lý bằng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, sau đó được giải trình tự. Các gen *purF* của chúng được so sánh với các chủng ATCC6872 và CJI9088 có chứa gen *purF* kiểu dại.

Kết quả là cả hai chủng đã được tìm thấy có chứa đột biến gen *purF* ở các vị trí khác nhau.

Cụ thể, đã xác nhận rằng chủng CJI9088_pTOPO_purF(mt)201 có đột biến thay thế valin ở vị trí thứ 2 bằng methionin trong trình tự axit amin *purF* nêu trong SEQ ID NO: 2, và chủng CJI9088_pTOPO_purF(mt)5674 có đột biến thay thế glyxin ở vị trí

445 bằng arginin trong trình tự axit amin *purF* nêu trong SEQ ID NO: 2.

Bảng 6

SEQ ID NO	Tên đoạn mồi	(Trình tự (5'–3'))
15	purF-seq-F	ACACGAGATAGCCCAGTGG
16	purF-seq-R	ACCAAGTCATCGACGCACATT

Trong các ví dụ 3 và 4 sau đây, đã kiểm tra các đột biến trên có hay không ảnh hưởng đến sự sản sinh IMP của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Ví dụ 3: Kiểm tra khả năng sản sinh IMP của CJI9088

Các đột biến được xác định trong ví dụ 2 đã được đưa vào CJI9088, đây là chủng sản xuất IMP có nguồn gốc ATCC6872 và khả năng sản sinh IMP đã được kiểm tra.

Ví dụ 3-1: Điều chế vectơ chèn có chứa đột biến *purF*

Để đưa các chủng có đột biến được chọn trong ví dụ 2, vectơ chèn đã được điều chế. Vectơ để đưa đột biến *purF* được điều chế như sau.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN của ATCC6872 làm mạch khuôn và các cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20. PCR được thực hiện bằng cách biến tính ở 94°C trong 5 phút, và sau đó 20 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, ở 55°C trong 30 giây, ở 72°C trong 1 phút, tiếp theo là polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng từng đoạn ADN được tạo thành làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20. Đoạn ADN được tạo thành bị phân cắt bằng XbaI. Bằng cách sử dụng enzym nối T4, đoạn ADN đã được sao chép thành vectơ pDZ mạch thẳng đã được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI, và do đó pDZ-purF (V2M) đã được điều chế. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, và SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 theo cách tương tự như trên. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng từng đoạn ADN được tạo thành làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 24. Đoạn ADN được tạo thành được phân cắt bằng XbaI. Bằng cách sử dụng enzym nối T4, đoạn ADN đã được sao chép thành vectơ pDZ mạch thẳng đã được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI, và do đó pDZ-purF (G445R) đã được điều chế.

Bảng 7

SEQ ID NO	Tên đoạn mồi	(Trình tự (5'–3'))
17	purF V2M 1F	GGGTCTAGAAGTACTGACCCGACCACTGCA
18	purF V2M 1R	TGGGGAAAGTAGTGTTCATCACGACGC
19	purF V2M 2F	TAGTAGAATCAGCGTCGTGATGAACAC
20	purF V2M 2R	GGGTCTAGATGGATTCCTGCCTCATTGACA
21	purF G445R 1F	GGGTCTAGACCGATGGCAAGACCTTGTACG
22	purF G445R 1R	CAAACCCTAAAGAGTCTGCTCTGATAGCTTC
23	purF G445R 2F	CAGTGTGCGAAGCTATCAGAGCAGACTCTT
24	purF G445R 2R	GGGTCTAGACAAGGTCATCGATGTAGCCATCG

Ví dụ 3-2: Đưa đột biến vào chủng CJI9088 và đánh giá

CJI9088 đã được biến nạp với mỗi vector pDZ-purF(V2M) và pDZ-purF(G445R) được điều chế trong ví dụ 3-1, và các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn phải trải qua trao đổi chéo thứ cấp để chọn các chủng mà đột biến gen đích được đưa vào. Việc đưa đột biến gen vào các chủng biến nạp cuối cùng đã được kiểm tra bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và sau đó giải trình tự đã được thực hiện để xác nhận đưa đột biến vào các chủng. Cụ thể, chủng được đưa vào có đột biến V2F của gen *purF* được định danh là CJI9088_purF_m1 và chủng được đưa vào đột biến G445R của gen *purF* được định danh là CJI9088_purF_m2. Hơn nữa, để điều chế chủng đột biến có cả đột biến V2M và G445R, chủng CJI9088_purF_m1 đã được biến nạp với vector pDZ-purF(G445R) và các khuẩn lạc thu được theo cách tương tự như trên. Thông qua phân tích giải trình tự các khuẩn lạc thu được, chủng được đưa vào với cả hai đột biến V2F và G445R đã được chọn và được định danh là CJI9088_purF_m1m2.

Như được thể hiện trong các kết quả bên dưới, chủng CJI9088_purF_m1 hoặc CJI9088_purF_m2 có đột biến V2M hoặc đột biến G445R trong gen *purF* cho thấy nồng độ IMP tương ứng là 0,15 g/L (128%) hoặc 0,09 g/L (117%), cho thấy sự cải thiện so với chủng đối chứng CJI9088. Hơn nữa, chủng CJI9088_purF_m1m2 có cả đột biến V2M và G445R cho thấy sự cải thiện nồng độ IMP là 0,31 g/L (159%), cho thấy khi cả hai đột biến được đưa vào, nồng độ IMP thu được được cải thiện hiệu quả nhất.

Bảng 8

Chủng	IMP (g/L)
-------	-----------

CJI9088	0,52
CJI9088_purF_m1	0,67
CJI9088_purF_m2	0,61
CJI9088_purF_m1m2	0,83

Ví dụ 4: Kiểm tra khả năng sản sinh IMP của chủng sản sinh IMP gốc ATCC6872

Để kiểm tra tác động của đột biến *purF* đã được xác định trong ví dụ 2, dựa trên chủng sản sinh IMP với nồng độ cao, đột biến được đưa vào CJI0323 (số đăng ký KCCM12151P, patent Hàn Quốc số 10-1904675), là chủng sản sinh IMP nồng độ cao và khả năng sản sinh IMP đã được kiểm tra.

Ví dụ 4-1: Đưa đột biến vào chủng CJI0323 và đánh giá

Chủng CJI0323 đã được biến nạp với từng vector pDZ-purF(V2M) và pDZ-purF(G445R) được điều chế trong ví dụ 3-1, và các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn đã được trao đổi chéo thứ cấp để chọn các chủng mà đột biến gen đích được đưa vào. Việc đưa đột biến gen vào các chủng biến nạp cuối cùng đã được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và sau đó giải trình tự đã được thực hiện để xác nhận đưa đột biến vào các chủng. Cụ thể, chủng được đưa vào đột biến V2F của gen *purF* được định danh là CJI0323_purF_m1, và chủng được đưa vào đột biến G445R của gen *purF* được định danh là CJI0323_purF_m2. Hơn nữa, để điều chế chủng đột biến có cả đột biến V2M và G445R, chủng CJI0323_purF_m1 đã được biến nạp với vector pDZ-purF (G445R) và các khuẩn lạc thu được theo cách tương tự như trên. Thông qua phân tích giải trình tự các khuẩn lạc thu được, chủng được đưa vào với cả hai đột biến V2F và G445R của gen *purF* đã được chọn và được định danh là CJI0323_purF_m1m2.

Chủng CJI0323_purF_m1 được gọi là CJI2353, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo quy định của Hiệp ước Budapest và với số lưu chủng KCCM12316P. Ngoài ra, Chủng CJI0323_purF_m2 đã được gọi là CJI2354, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo quy định của Hiệp ước Budapest và với số lưu chủng KCCM12317P.

Như được thể hiện trong các kết quả dưới đây, chủng CJI0323_purF_m1 hoặc

CJI0323_purF_m2 có đột biến V2M hoặc đột biến G445R trong gen *purF* cho thấy nồng độ IMP tương ứng là 1,9 g/L (119%) hoặc 0,95 g/L (109%), cho thấy sự cải thiện so với chủng đối chứng CJI0323. Hơn nữa, chủng CJI0323_purF_m1m2 có cả đột biến V2M và G445R cho thấy sự cải thiện nồng độ IMP là 3,33 g/L (134%), cho thấy khi cả hai đột biến được đưa vào, nồng độ IMP thu được cải thiện hiệu quả nhất.

Bảng 9

Chủng	IMP (g/L)
CJI0323	9,52
CJI0323_purF_m1	11,42
CJI0323_purF_m2	10,47
CJI0323_purF_m1m2	12,85

Ví dụ 5: Kiểm tra khả năng sản sinh axit 5'-xanthylic của đột biến *purF*

Để kiểm tra tác động của đột biến *purF* đã được xác định trong ví dụ 2, dựa trên chủng sản sinh XMP, đột biến được đưa vào KCCM10530 (Công bố đơn patent Hàn Quốc số 10-2005-0056670), là chủng sản sinh XMP nồng độ cao và khả năng sản sinh XMP đã được kiểm tra.

Ví dụ 5-1: Đưa đột biến vào chủng KCCM10530 và đánh giá

Chủng KCCM10530 đã được biến nạp với từng vector pDZ-purF(V2M) và pDZ-purF(G445R) được điều chế trong ví dụ 3-1, và các chủng trong đó vector được đưa vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn đã được trao đổi chéo thứ cấp để chọn các chủng mà đột biến gen đích được đưa vào. Việc đưa đột biến gen vào các chủng biến nạp cuối cùng đã được kiểm tra bằng PCR bằng cách sử dụng cặp môi nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và sau đó giải trình tự đã được thực hiện để xác nhận đưa đột biến vào các chủng. Cụ thể, chủng được đưa vào đột biến V2F của gen *purF* được định danh là KCCM10530_purF_m1 và chủng được đưa vào với đột biến G445R của gen *purF* được định danh là KCCM10530_purF_m2. Hơn nữa, để điều chế chủng đột biến có cả đột biến V2M và G445R, chủng KCCM10530_purF_m1 đã được biến nạp với vector pDZ-purF(G445R) và các khuẩn lạc thu được theo cách tương tự bên trên. Thông qua phân tích giải trình tự các khuẩn lạc thu được, chủng được đưa vào với cả hai đột biến V2F và G445R của gen *purF* đã được chọn và được định danh là

KCCM10530_purF_m1m2.

Chủng KCCM10530_purF_m1 được gọi là CJX1681, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo quy định của Hiệp ước Budapest và với số lưu chủng KCCM12312P. Hơn nữa, chủng KCCM10530_purF_m2 đã được điều chế được gọi là CJX1682, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 10 tháng 9 năm 2018, theo quy định của Hiệp ước Budapest và với số lưu chủng KCCM12313P.

Như được thể hiện trong các kết quả bên dưới, chủng KCCM10530_purF_m1 hoặc KCCM10530_purF_m2 có đột biến V2M hoặc đột biến G445R trong gen *purF* cho thấy nồng độ XMP tương ứng là 1,77 g/L (115%) hoặc 0,8 g/L (107%) cho thấy sự cải thiện so với chủng đối chứng KCCM10530. Hơn nữa, chủng KCCM10530_purF_m1m2 có cả đột biến V2M và G445R cho thấy sự cải thiện nồng độ XMP là 2,36 g/L (120%), cho thấy khi cả hai đột biến được đưa vào, nồng độ XMP thu được cải thiện hiệu quả nhất.

Bảng 10

Chủng	IMP (g/L)
KCCM10530	11,8
KCCM10530_purF_m1	13,57
KCCM10530_purF_m2	12,68
KCCM10530_purF_m1m2	14,16

Dựa vào mô tả bên trên, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới hình thức cụ thể khác mà không làm thay đổi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm của chúng. Do đó, cần hiểu rằng các phương án bên trên không nhằm giới hạn mà để minh họa tất cả các khía cạnh của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ thay vì được phân mô tả bên trên, và do đó, tất cả các thay đổi và sửa đổi nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ, hoặc tương đương với các giới hạn và giới hạn đó sẽ được bao gồm trong các yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và có sự thay thế được lựa chọn từ nhóm bao gồm i) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin, ii) axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin, và iii) axit amin thứ 2 được thay thế bằng methionin và axit amin thứ 445 được thay thế bằng arginin.
2. Polynucleotit mã hóa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza theo điểm 1.
3. Vectơ chứa polynucleotit theo điểm 2.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit, trong đó vi sinh vật chứa biến thể phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza theo điểm 1.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium stationis*.
6. Phương pháp điều chế purin nucleotit, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 4 trong môi trường nuôi cấy.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi purin nucleotit từ vi sinh vật hoặc môi trường sau bước nuôi cấy.
8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium stationis*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> BIẾN THỂ PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHAT AMIDOTRANSFERAZA,
 POLYNUCLEOTIT, VECTO, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY, VÀ PHƯƠNG
 PHÁP ĐIỀU CHẾ PURIN NUCLEOTIT
 <130> OPA19164
 <150> KR 10-2019-0035683
 <151> 2019-03-28
 <160> 24
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> Không xác định
 <220>
 <223> purF

<400> 1
 gtggtgaaca ctactttccc cagcgacgtg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc 60
 cgcaagagt gcggtgtctt tggcgtcttg gtccttggtg aagatgttgc gacactgacc 120
 tactttggtc tgttcgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggtat cggcgtcggc 180
 gatggagacc gcctcgttgt cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat tttcgatgag 240
 tccattttta attccctcca tggctccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctgcactgcc 300
 ggtggcaaag agtggtcgaa tgtccagccg atgtttaata ccacctcaaa tggggtagac 360
 atcgctttgt gccacaacgg caacttggtg aactaccaag aactgcgcga tgaagcagta 420
 gctctgggac tttaccgaga gaatgaaaaa tccctgtcgg attccatgat catgacagct 480
 ttgctggcgc acggagtcgg ggaaggcaac tctgtctttg acgccgctaa gcaactgctg 540
 ccaagcatca aaggcgcttt ttgcttgacc tttaccgatg gcaagacctt gtacgccgcg 600
 cgtgacccgc acgggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttgtt 660
 gcttccgaaa cctgtgcgct ggatatcgtg ggcgcacagt ttatccgtga ggtagagccc 720
 ggtgaactta tctctgtcaa tgaggcagga atccacagcg aaaaattcgc tgagccgaag 780
 cgccagggct gcgtctttga atacgtctac ttggcacgtc cagacaccgt gatcaaaggc 840
 cgcaacgttc acgcgacgcg cgtggatatt ggtcgcgcac ttgcgaaatc tcaccctgcg 900
 ccagaagctg acatgggtcat ccccggtcca gaatccggaa acccggcagc tgttggctac 960
 gcccggaat cgggcctgac atttgcgcac ggcttgggtca aaaacgccta cgtgggtcga 1020

accttcattc agcccaccca gaccttgccg cagctgggta ttgcctcaa gctcaacccc 1080
 ctgcgcgagg tcatcgaggg caagtcactc gttgtttag atgactctat tgtccgcggc 1140
 aacacccaac gcgcgctggt gcgcatgctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgcacgtg 1200
 cgcattgctt caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgcctcgcct 1260
 ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatcctc aggtagtaac cgatgcagtg 1320
 tgccaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca 1380
 acgcaccaac ctatcaattc cttgtgtacc gcttgctttg atggcaacta cgaactcgga 1440
 cttccgaccg ctaaccccaa tgctgacgct gtgcgaactt tgctcagcca aaagaactga 1500

<210> 2
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Không xác định

<220>
 <223> purF

<400> 2
 Met Val Asn Thr Thr Phe Pro Ser Asp Val Asn Leu Asp Asp Gln Gly
 1 5 10 15
 Glu Gln Glu Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Phe Gly Val Trp Ala Pro
 20 25 30
 Gly Glu Asp Val Ala Thr Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Ala Leu Gln
 35 40 45
 His Arg Gly Gln Glu Ala Ala Gly Ile Gly Val Gly Asp Gly Asp Arg
 50 55 60
 Leu Val Val Phe Lys Asp Met Gly Leu Val Ser Asn Ile Phe Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Ile Leu Asn Ser Leu His Gly Ser Val Gly Val Gly His Thr Arg
 85 90 95
 Tyr Ser Thr Ala Gly Gly Lys Glu Trp Ser Asn Val Gln Pro Met Phe
 100 105 110
 Asn Thr Thr Ser Asn Gly Val Asp Ile Ala Leu Cys His Asn Gly Asn
 115 120 125
 Leu Val Asn Tyr Gln Glu Leu Arg Asp Glu Ala Val Ala Leu Gly Leu
 130 135 140
 Tyr Arg Glu Asn Glu Lys Ser Leu Ser Asp Ser Met Ile Met Thr Ala
 145 150 155 160
 Leu Leu Ala His Gly Val Gly Glu Gly Asn Ser Val Phe Asp Ala Ala
 165 170 175

Lys Gln Leu Leu Pro Ser Ile Lys Gly Ala Phe Cys Leu Thr Phe Thr
 180 185 190
 Asp Gly Lys Thr Leu Tyr Ala Ala Arg Asp Pro His Gly Val Arg Pro
 195 200 205
 Leu Val Ile Gly Arg Leu Ala Gln Gly Trp Val Val Ala Ser Glu Thr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Asp Ile Val Gly Ala Gln Phe Ile Arg Glu Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Gly Glu Leu Ile Ser Val Asn Glu Ala Gly Ile His Ser Glu Lys Phe
 245 250 255
 Ala Glu Pro Lys Arg Gln Gly Cys Val Phe Glu Tyr Val Tyr Leu Ala
 260 265 270
 Arg Pro Asp Thr Val Ile Lys Gly Arg Asn Val His Ala Thr Arg Val
 275 280 285
 Asp Ile Gly Arg Ala Leu Ala Lys Ser His Pro Ala Pro Glu Ala Asp
 290 295 300
 Met Val Ile Pro Val Pro Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ala Val Gly Tyr
 305 310 315 320
 Ala Arg Glu Ser Gly Leu Thr Phe Ala His Gly Leu Val Lys Asn Ala
 325 330 335
 Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Gln Pro Thr Gln Thr Leu Arg Gln Leu
 340 345 350
 Gly Ile Arg Leu Lys Leu Asn Pro Leu Arg Glu Val Ile Glu Gly Lys
 355 360 365
 Ser Leu Val Val Val Asp Asp Ser Ile Val Arg Gly Asn Thr Gln Arg
 370 375 380
 Ala Leu Val Arg Met Leu Arg Glu Ala Gly Ala Ala Glu Val His Val
 385 390 395 400
 Arg Ile Ala Ser Pro Pro Val Lys Trp Pro Cys Phe Tyr Gly Ile Asp
 405 410 415
 Phe Ala Ser Pro Gly Glu Leu Ile Ala Asn Ile Lys Pro Ser Asp Asp
 420 425 430
 Pro Gln Val Val Thr Asp Ala Val Cys Glu Ala Ile Gly Ala Asp Ser
 435 440 445
 Leu Gly Phe Val Ser Val Asp Glu Met Val Glu Ala Thr His Gln Pro
 450 455 460
 Ile Asn Ser Leu Cys Thr Ala Cys Phe Asp Gly Asn Tyr Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Pro Thr Ala Asn Pro Asn Ala Asp Ala Val Arg Thr Leu Leu Ser
 485 490 495
 Gln Lys Asn

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA alt-1

<400> 3
 gctctagagg ccacgatgcc cggagcatc

29

<210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA alt-2

<400> 4
 taacgatagc tgccaagggtt attcacttcc tagattt

37

<210> 5
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA alt-3

<400> 5
 aggaagtga taaccttggc agctatcggt atcggtcg

37

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

<220>
 <223> purA alt-4

<400> 6
 gctctagagg tcacgaatgg gtaggtgcc

29

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

<220>

<223>	guaB alt-1	
<400>	7	
	gctctagact acgacaacac ggtgcctaa	29
<210>	8	
<211>	37	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	guaB alt-2	
<400>	8	
	cacgattttc ggtcaatacg ggtcttctcc ttcgcac	37
<210>	9	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	guaB alt-3	
<400>	9	
	aggagaagac ccgtattgac cgaaaatcgt gtttct	36
<210>	10	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	guaB alt-4	
<400>	10	
	gctctagaat cgacaagcaa gcctgcacg	29
<210>	11	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF tempF	
<400>	11	
	aagttgatgc ttcaggcaca	20
<210>	12	
<211>	20	

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF tempR	
<400>	12	
	tgcaaggatt ggctcttttgt	20
<210>	13	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF lib F	
<400>	13	
	acacgagata gcccgatgg	19
<210>	14	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF lib R	
<400>	14	
	tcgtagttgc catcaaagca	20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF seq F	
<400>	15	
	acacgagata gcccgatgg	19
<210>	16	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF seq R	
<400>	16	
	accaagtcacat cgacgcacacat t	21

<210>	17	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF V2M 1F	
<400>	17	
	gggtctagaa gtactgaccc gaccactgca	30
<210>	18	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF V2M 1R	
<400>	18	
	tggggaaagt agtgttcac acgacgc	27
<210>	19	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF V2M 2F	
<400>	19	
	tagtagaatc agcgtcgtga tgaacac	27
<210>	20	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF V2M 2R	
<400>	20	
	gggtctagat ggattcctgc ctcattgaca	30
<210>	21	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purF G445R 1F	

<400>	21		
		gggtctagac cgatggcaag accttgtagc	30
<210>	22		
<211>	31		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	purF G445R 1R		
<400>	22		
		caaaccctaa agagtctgct ctgatagctt c	31
<210>	23		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	purF G445R 2F		
<400>	23		
		cagtgtgcga agctatcaga gcagactctt	30
<210>	24		
<211>	32		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	purF G445R 2R		
<400>	24		
		gggtctagac aaggtcatcg atgtagccat cg	32