



(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)



1-0038971

(51)⁷ C12N 9/00; C12N 19/32; C12N 15/52; (13) B
C12N 15/77

(21) 1-2019-03515

(22) 23/08/2018

(86) PCT/KR2018/009714 23/08/2018

(87) WO 2020/027362 06/02/2021

(30) 10-2018-0089855 01/08/2018 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/06/2020 387

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BAEK, MIN JI (KR); LEE, Ji Hye (KR); PARK, So-jung (KR); BAE, Jee Yeon (KR).

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

(54) BIẾN THỂ ADENYLOSUCCINAT SYNTHETAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ, VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ IMP, XMP HOẶC GMP SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể adenylosuccinat synthetaza, polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza, vectơ chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza, và phương pháp điều chế IMP, XMP hoặc GMP sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể adenylosuccinat synthetaza mới, polynucleotit chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa adenylosuccinat synthetaza, và phương pháp điều chế 5'-inosin monophosphat (IMP), xanthosin 5'-monophosphat (XMP) hoặc 5'-guanin monophosphat (GMP) sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

5'-inosin monophosphat (sau đây gọi là IMP) là loại vật liệu gốc axit nucleic là một dạng trung gian của hệ thống trao đổi chất sinh tổng hợp axit nucleic được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau (như trong dược phẩm, ứng dụng y tế khác, v.v.), và là nguyên liệu được sử dụng rộng rãi như chất phụ gia cho gia vị thực phẩm hoặc thực phẩm cùng với 5'-guanin monophosphat (sau đây gọi là GMP). Như đã biết rằng bản thân IMP sản sinh ra hương vị thịt bò và làm tăng cường hương vị của axit glutamic (MSG) như GMP, vì thế được chú ý đến như loại gia vị axit nucleic làm tăng hương vị.

Phương pháp điều chế IMP có thể bao gồm phương pháp phân hủy enzym axit ribonucleic chiết xuất từ các tế bào nấm men, phương pháp để phosphoryl hóa inosin được sản xuất bằng cách lên men (*Agri. Biol. Chem.*, 36, 1511(1972), v.v.), phương pháp nuôi cấy vi sinh vật có thể trực tiếp sản sinh IMP và thu hồi IMP từ môi trường nuôi cấy, v.v.. Trong các phương pháp này, phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất là phương pháp sử dụng vi sinh vật có khả năng sản xuất trực tiếp IMP.

Ngoài ra, phương pháp điều chế GMP có thể bao gồm phương pháp biến đổi xanthosin 5'-monophosphat (sau đây gọi là XMP) được sản xuất bởi sự lên men vi sinh vật thành GMP sử dụng vi khuẩn coryneform và phương pháp biến đổi XMP được sản xuất bởi sự lên men vi sinh vật thành GMP sử dụng vi khuẩn *Escherichia coli*. Trong các phương pháp trên, khi GMP được sản xuất theo phương pháp trong đó XMP được sản xuất trước và sau đó được chuyển đổi thành GMP, năng suất của XMP (tức là, tiền chất của phản ứng biến đổi trong suốt quá trình lên men vi sinh vật) phải được tăng

cường, ngoài ra, cả XMP và GMP đã được sản xuất trong toàn bộ quá trình phản ứng chuyển đổi phải được bảo vệ khỏi bị tổn thất.

Trong khi đó, do các enzyme trong tự nhiên không phải lúc nào cũng thể hiện các tính chất tối ưu về hoạt tính, tính ổn định, tính đặc hiệu của chất nền đối với các đồng phân quang học, v.v. trong các ứng dụng công nghiệp, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện enzyme cho phù hợp với mục đích sử dụng bằng cách thay đổi trình tự axit amin của chúng. Trong số này, thiết kế hợp lý và gây đột biến điểm định vị của các enzyme đã được áp dụng để cải thiện chức năng enzyme trong nhiều trường hợp; tuy nhiên các phương pháp này có nhược điểm là thông tin về cấu trúc của enzyme đích là không phù hợp hoặc mối tương quan cấu trúc-chức năng không rõ ràng, do đó chúng không thể được áp dụng một cách hiệu quả. Trong trường hợp này, đã có báo cáo cho rằng hoạt tính của enzyme có thể được tăng cường bằng cách cải thiện enzyme thông qua phương pháp tiến hóa có hướng dẫn, trong đó enzyme của các tính trạng mong muốn được sàng lọc từ thư viện các enzyme được tạo ra thông qua các biến thể gen enzyme ngẫu nhiên của gen enzyme. Các tác giả của sáng chế đã thực hiện nghiên cứu sâu rộng để sản sinh purin nucleotit năng suất cao bằng phương pháp điều chế purin nucleotit chứa IMP hoặc XMP thông qua quá trình lên men vi sinh vật. Kết quả là, họ đã phát hiện ra các biến thể protein có năng suất cao hơn purin nucleotit, do đó hoàn thiện sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể adenylosuccin synthetaza.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza.

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật có khả năng sản sinh purin nucleotit chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza và vector.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế IMP, XMP hoặc GMP bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường; và thu hồi IMP, XMP hoặc GMP từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* điều chế purin nucleotit sử

dùng biến thể adenylosuccinat synthetaza của sáng chế có thể sản xuất purin nucleotit với năng suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án ví dụ. Trong đó, mỗi sự giải thích và các phương án ví dụ được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho các giải thích và các phương án ví dụ khác. Do đó, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ ở đây nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không nên bị giới hạn bởi công bố cụ thể được cung cấp dưới đây.

Để đạt được các mục đích trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 từ đầu N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác. Adenylosuccin synthetaza biến đổi đã được biến đổi về axit amin ở vị trí thứ 85 từ đầu N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Cụ thể, sáng chế đề xuất biến thể adenylosuccinat synthetaza có ít nhất một biến thể axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó việc biến đổi bao gồm thay thế vị trí thứ 85 từ đầu N bằng axit amin khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “adenylosuccinat synthetaza” đề cập đến enzym có vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp purin. Với mục đích của sáng chế, enzym đề cập đến protein liên quan đến việc sản sinh purin nucleotit chứa 5'-inosin monophosphat (IMP) hoặc 5'-xanthosin monophosphat (XMP).

Theo sáng chế, trình tự SEQ ID NO: 2 đề cập đến trình tự axit amin có hoạt tính adenylosuccinat synthetaza. Cụ thể, trình tự SEQ ID NO: 2 là trình tự protein có chứa hoạt tính adenylosuccinat synthetaza được mã hóa bởi gen *purA*. Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được lấy từ Ngân hàng gen Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI) là một cơ sở dữ liệu đã biết. Trong phương án, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, nhưng sáng chế không giới hạn ở vi sinh vật này, và có thể chứa bất kỳ trình tự có hoạt tính tương tự như trình tự axit amin ở trên mà không giới hạn. Ngoài ra, phạm vi của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có chứa hoạt tính adenylosuccinat synthetaza hoặc trình tự axit amin có 80% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 nhưng sáng chế không

giới hạn ở đây. Cụ thể, trình tự axit amin ở trên có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc trình tự axit amin có chứa ít nhất 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 là một trong những tỷ lệ trong phạm vi nêu trên, ngoại trừ trình tự có chứa 100% sự đồng nhất, hoặc có thể trình tự có chứa ít hơn 100% sự đồng nhất. Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bị mất, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một phần của trình tự cũng có thể được sử dụng trong sáng chế này miễn nó là protein có trình tự axit amin tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của protein ở trên.

Trong sáng chế, thuật ngữ “biến thể adenylosuccinat synthetaza” có thể được sử dụng thay thế cho biến thể polypeptit có khả năng sản xuất purin nucleotit, purin nucleotit điều chế biến thể polypeptit, biến thể polypeptit điều chế purin nucleotit, biến thể polypeptit có hoạt tính adenylosuccinat synthetaza, biến thể adenylosuccinat synthetaza, v.v.. Ngoài ra, protein có thể có nguồn gốc từ chi *Corynebacterium stationis*, nhưng protein không được giới hạn ở đây.

Biến thể adenylosuccinat synthetaza chứa biến đổi axit amin ở vị trí thứ 85 từ đầu N trong chuỗi axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Biến thể adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác. Biến thể adenylosuccinat synthetaza có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc nó có thể là biến thể adenylosuccinat synthetaza có hoạt tính yếu so với adenylosuccinat synthetaza không biến đổi có nguồn gốc từ vi sinh vật kiểu dại. Biến thể adenylosuccinat synthetaza chỉ ra sự biến đổi của axit amin thứ 85 từ đầu N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 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, như đã giải thích ở trên.

Cụ thể, biến thể adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic hoặc axit glutamic, và biến thể adenylosuccinat synthetaza có hoạt tính adenylosuccinat synthetaza yếu hơn so với polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, nhưng biến thể adenylosuccinat synthetaza không bị giới hạn ở đây.

Với mục đích của sáng chế, khi vi sinh vật chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza, hàm lượng purin nucleotit sản xuất chứa IMP hoặc XMP được tăng lên. Điều này có ý nghĩa rằng sáng chế cho phép tăng lượng sản sinh IMP hoặc XMP thông qua biến thể adenylosuccinat synthetaza của sáng chế trong khi chủng *Corynebacterium* kiểu đại không thể sản sinh IMP hoặc XMP, hoặc có thể chỉ sản sinh với một lượng rất nhỏ nếu IMP hoặc XMP được sinh ra.

Biến thể adenylosuccinat synthetaza có thể chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự axit amin trong đó axit amin thứ 85 từ đầu N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic và axit glutamic. Cụ thể, biến thể adenylosuccinat synthetaza có thể bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin, được chọn từ nhóm trình tự axit amin trong đó axit amin thứ 85 từ đầu N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic và axit glutamic. Ngoài ra, biến thể adenylosuccinat synthetaza có thể bao gồm trình tự axit amin trong đó axit amin thứ 85 đầu N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng một axit amin khác có chứa trình tự axit amin của biến thể adenylosuccinat synthetaza hoặc trình tự axit amin có từ 80% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin của biến thể adenylosuccinat synthetaza nhưng trình tự axit amin không được giới hạn ở đây. Cụ thể, biến thể adenylosuccinat synthetaza của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin, trong đó axit amin thứ 85 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic và axit glutamic. Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ trình tự axit amin nào có trình tự tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein cũng thuộc phạm vi của sáng chế, ngay cả khi phần của trình tự axit amin có thể bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung vào trong phần của trình tự, thêm axit amin tại vị trí thứ 85.

Do đó, mặc dù sáng chế mô tả “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO cụ thể”, rõ ràng là protein có trình tự axit amin với việc xóa, sửa đổi, thay thế

hoặc thêm vào một phần của trình tự cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là protein có hoạt tính giống hệt hoặc tương ứng với polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn là protein có hoạt tính giống hệt hoặc tương ứng với biến thể polypeptit, không loại trừ bổ sung trình tự, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến cảm hoặc thay thế bảo thủ 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 tính cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên sự giống nhau về độ phân cực của các gốc, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính không ưa nước và/hoặc tính lưỡng tính. Ví dụ, các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin; và các axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan.

Theo đó, trong sáng chế, “biến thể” có thể còn bao gồm sự thay thế bảo thủ và/hoặc biến đổi ít nhất một axit amin trong “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO cụ thể”. Ví dụ, một số biến thể nhất định có thể bao gồm các biến thể trong đó ít nhất một phần chẳng hạn như trình tự dẫn đầu N hoặc phần xuyên màng được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó phần được loại bỏ khỏi đầu N và/hoặc đầu C của protein hoàn chỉnh. Biến thể cũng có thể bao gồm biến đổi khác chứa xóa hoặc thêm 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 chất dẫn) tại đầu N của protein có khả năng đồng dịch hoặc chuyển dịch trực tiếp protein. Polypeptit cũng có được liên hợp với trình tự hoặc liên kết khác để tạo điều kiện cho việc xác định, tinh sạch hoặc tổng hợp polypeptit. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế cho biến đổi, protein biến đổi, polypeptit biến đổi, đột biến, mutein, dị biệt, v.v., và bất kỳ thuật ngữ nào cũng có thể được sử dụng mà không giới hạn trong sáng chế, miễn là nó được sử dụng theo nghĩa biến đổi.

Tương đồng và đồng nhất nghĩa là mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit nhất định và có thể được biểu thị dưới dạng phần trăm.

Thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” có thể thường được sử dụng để thay thế cho nhau.

Trình tự tương đồng hoặc đồng nhất của polypeptit được bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và các hàm phạt khoảng trống dịch chuyển mặc định được thiết lập bởi chương trình đang dùng có thể được sử dụng kết hợp. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai dưới điều kiện vừa phải hoặc nghiêm ngặt cao dọc theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất là khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80% hoặc khoảng 90% toàn bộ chiều dài của trình tự. Liên quan đến các polynucleotit được lai, các polynucleotit chứa đơn vị mã hóa thoái biến thay vì đơn vị mã hóa cũng có thể được xem xét.

Cho dù hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có tính tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng thuật toán máy tính đã biết, ví dụ như chương trình “FASTA” sử dụng tham số mặc định như trong Pearson et al., (1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444). Ngoài ra, nó có thể được xác định bằng thuật toán Needman-Wunsch (Needman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Needman của gói EMBOSS ((EMBOSS: Bộ phần mềm mở sinh học của khu vực Châu Âu, Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc các phiên bản sau đó) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., Nghiên cứu về axit nucleic 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [*et al.*, *J Molec Biol* 215]: 403 (1990); Hướng dẫn 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, tính 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 (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP (ví dụ, Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol* 48: 443) được công bố bởi Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa tính tương tự là số lượng các dấu hiệu được căn chỉnh (nghĩa là, nucleotit hoặc axit amin) là tương tự nhau, được chia cho tổng số dấu hiệu trong trình tự ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm (1) ma trận so sánh đơn (chứa giá trị 1 cho giống nhau và 0 cho không giống nhau) và ma trận so sánh trọng

lượng (hoặc EDNAFULL (EMBOSS phiên bản của NCBI NUC4.4) ma trận thay thế) của Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, được công bố bởi Schwartz và Dayhoff, biên tập, Atlas về trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353-358 (1979); (2) Trừ 3,0 điểm cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và trừ 0,10 điểm cho mỗi dấu hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc mở khoảng trống dịch chuyển trừ 10 điểm và mở rộng khoảng trống dịch chuyển trừ 0,5 điểm); và (3) không bị trừ điểm đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối. Theo đó, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” được sử dụng đề cập đến sự liên quan giữa các trình tự.

Ngoài ra, rõ ràng là polynucleotit có thể được dịch mã hóa bởi đơn vị mã hóa thoái hóa thành biến thể polypeptit chứa trình tự axit amin trong đó axit amin thứ 85 từ đầu N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 là thay thế bằng axit amin khác, hoặc cũng có thể được bao gồm biến thể polypeptit có tương đồng hoặc đồng nhất. Hơn nữa, bằng cách lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò để có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết (ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit), có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit nào mã hóa cho biến thể adenylosuccinat synthetaza chứa trình tự axit amin trong đó axit amin thứ 85 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm chứa serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic và axit glutamic, nhưng sáng chế không giới hạn ở các axit amin này.

Khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza hoặc vector chứa polynucleotit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến chuỗi ADN hoặc ARN có nhiều hơn chiều dài nhất định dưới dạng polyme nucleotit là chuỗi dài các đơn vị phân tử nucleotit được nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, và cụ thể hơn là đoạn polynucleotit mã hóa biến thể polypeptit.

Polynucleotit mã hóa biến thể polypeptit của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit mà không giới hạn, miễn là nó mã hóa cho polypeptit biến thể có chứa hoạt tính adenylosuccinat synthetaza. Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của adenylosuccinat synthetaza là *gen purA*, cụ thể là gen có thể có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium stationis* nhưng sáng chế không giới hạn ở vi khuẩn này.

Cụ thể, do sự thoái biến của đơn vị mã hóa hoặc bằng các xem xét các đơn vị mã

hóa được ưu tiên bởi vì sinh vật trong đó polypeptit có thể được biểu hiện, các biến đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa của polypeptit trong phạm vi mà không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit. Bất kỳ trình tự polypeptit nào có thể chứa nhưng không giới hạn miễn là nó mã hóa cho biến thể adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác.

Ngoài ra, lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò được điều chế từ trình tự gen đã biết (ví dụ, trình tự bổ sung tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit), có thể bao gồm bất kỳ trình tự nào mã hóa protein có hoạt tính của biến thể adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác, nhưng sáng chế không giới hạn ở các axit amin này.

“Điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện có khả năng lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Những 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, gen có 40% trở lên, tốt hơn là: 90% trở lên, 95% trở lên, 97% trở lên, và tốt nhất là 99% trở lên sự tương đồng hoặc đồng nhất) có thể lai với nhau; điều kiện theo đó các gen có tương đồng thấp hơn hoặc đồng nhất không thể lai với nhau; hoặc các điều kiện là điều kiện rửa thông thường cho lai Southern (ví dụ, nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1 × SSC (saline-sodium citrate: nước muối-natri xitrat), và 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate: natri đodexyl sulfat), tốt hơn là 60°C, 0,1 × SSC, và 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1 × SSC và 0,1% SDS, rửa một lần, tốt hơn là rửa hai hoặc ba lần).

Lai hóa yêu cầu hai axit nucleic có trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ có thể phụ thuộc vào tính nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin bổ sung cho thymin và cytosin bổ sung cho guanin. Theo đó, sáng chế cũng có thể bao gồm đoạn axit nucleic được tách chiết bổ sung cho toàn bộ trình tự cũng như trình tự axit nucleotit tương tự nhau.

Cụ thể, polynucleotit có tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện khi sử dụng điều kiện lai bao gồm bước lai ở giá trị T_m là 55°C và sử dụng 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 sáng chế không

giới hạn ở nhiệt độ này; có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo mục đích của nó.

Mức độ phù hợp nghiêm ngặt của việc lai các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài của polynucleotit, mức độ bổ sung và các biến được biết đến trong kỹ thuật này (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9,50 đến 9,51, 11,7 đến 11,8).

Trong sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của biến thể adenylosuccinat synthetaza là gen *purA* và polynucleotit mã hóa cho gen đã mô tả bên trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn, được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát thích hợp sao cho polypeptit đích được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát có thể bao gồm vùng gen khởi động để bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự khởi động nào để kiểm soát phiên mã như vậy, trình tự mã hóa cho một vị trí gắn với ribosom trên ARN thông tin, và trình tự để kiểm soát việc kết thúc phiên mã và dịch mã. Khi được biến nạp vào trong tế bào chủ thích hợp, vector có thể được sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen của tế bào chủ, hoặc có thể tích hợp vào chính bộ gen của nó.

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

Trong phương án của sáng chế, polynucleotit mã hóa cho polypeptit đích có thể được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua vector. Việc chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp nào được biết đến trong kỹ thuật tương ứng (ví dụ, bằng tái tổ hợp tương đồng), nhưng sáng chế không giới hạn ở phương pháp này. Chỉ dấu chọn lọc để xác nhận việc chèn vector vào trong nhiễm sắc thể có thể được bao gồm thêm. Chỉ dấu chọn lọc được sử dụng để lựa chọn

các tế bào được biến nạp với vector (tức là, để xác nhận sự hiện diện của việc chèn phân tử axit nucleic đích), và các chỉ dấu có khả năng cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc (ví dụ, kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng tác nhân gây độc tế bào và biểu hiện polypeptit bề mặt) có thể được sử dụng. Trong trường hợp có tác nhân chọn lọc được xử lý, chỉ có các tế bào có khả năng biểu hiện các chỉ dấu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các đặc điểm kiểu hình khác, và do đó các tế bào được biến nạp có thể được chọn dễ dàng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh purin nucleotit bởi chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza hoặc polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza. Cụ thể, vi sinh vật chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza và/hoặc polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza có thể là vi sinh vật được điều chế bằng cách biến nạp sử dụng vector chứa polynucleotit, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa cho protein đích trong tế bào chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Không quan trọng có hay không polynucleotit biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm ở đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit có thể chứa ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào bất kỳ dưới hình thức nào miễn là polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ và biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện có cấu trúc gen chứa tất cả các yếu tố cần thiết cho sự tự biểu hiện. 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 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 được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không giới hạn ở đây.

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

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

adenylosuccinat synthetaza” được sử dụng ở đây, đề cập đến vi sinh vật sản sinh IMP hoặc XMP, chủng tự nhiên sản sinh IMP yếu hoặc chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh IMP hoặc XMP. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể adenylosuccinat synthetaza chứa ít nhất một biến thể axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và biến đổi axit amin có thể bao gồm thay thế axit amin thứ 85 từ đầu N của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 bằng axit amin khác. Ngoài ra, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể polypeptit có hoạt tính adenylosuccinat synthetaza trong đó axit amin thứ 85 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác, nhưng vi sinh vật không được giới hạn ở đây.

Vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật chứa polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza, hoặc tế bào hoặc vi sinh vật được biến nạp với vector và có thể biểu hiện biến thể adenylosuccinat. Để đạt được mục đích của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật nào có thể biểu hiện purin nucleotit miễn là chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza.

Trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh purin nucleotit” có thể được sử dụng để thay thế cho “purin nucleotit-vi sinh vật sản sinh” và “vi sinh vật sản xuất purin nucleotit”

Để đạt được mục đích của sáng chế, thuật ngữ “purin nucleotit” đề cập đến nucleotit chứa cấu trúc gốc purin, ví dụ, IMP hoặc XMP, nhưng purin nucleotit không được giới hạn ở đây.

Trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh purin nucleotit” có thể là vi sinh vật trong đó gen sửa đổi xuất hiện hoặc hoạt tính được tăng cường để sản sinh purin nucleotit mong muốn, bao gồm cả vi sinh vật kiểu dại hoặc vi sinh vật đã thực hiện sửa đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể được tăng cường hoặc làm suy yếu do các nguyên nhân như chèn gen ngoại sinh, tăng cường hoặc làm bất hoạt gen nội sinh, v.v.. Để đạt được mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit khác biệt ở chỗ nó tăng năng suất của các purin nucleotit mong muốn bằng cách chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể, vi sinh vật sản sinh purin nucleotit hoặc vi sinh vật có hoạt tính sản xuất purin nucleotit có thể là vi sinh vật trong đó một phần của gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin nucleotit được tăng

cường hoặc làm suy yếu. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó biểu hiện của *purF* mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza được tăng cường hoặc biểu hiện của *guaB* mã hóa 5'-inosin-monophosphat dehydrogenaza tương ứng với con đường suy thoái IMP bị suy yếu, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-purin nucleotit” đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit tự nhiên hoặc biến đổi. Cụ thể, khi sử dụng ở đây, 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 bằng cách tăng cường hoặc làm suy yếu hoạt động của gen *purA* mã hóa cho adenylosuccinat synthetaza. Cụ thể hơn khi sử dụng ở đây, 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 tăng cường nhờ chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza của sáng chế hoặc polynucleotit mã hóa cho biến thể adenylosuccinat synthetaza đó, hoặc bằng cách biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa cho biến thể adenylosuccinat synthetaza. “Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit được tăng cường” đề cập đến vi sinh vật sản sinh purin nucleotit được tăng cường so với chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến thể. “Vi sinh vật không biến thể” đề cập đến chính vi sinh vật đó nhưng là chủng kiểu dại, vi sinh vật không bao gồm biến thể protein sản sinh purin nucleotit, hoặc vi sinh vật không bị biến nạp với vec tơ chứa polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza.

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

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế purin nucleotit bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất purin nucleotit trong môi trường và thu hồi purin nucleotit từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

Trong phương pháp trên, nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng các phương pháp được biết đến như nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ-

bổ sung, v.v. nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở phương pháp nuôi cấy nào. Cụ thể, điều kiện nuôi cấy có thể không bị giới hạn cụ thể nhưng độ pH tối ưu (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 phospho hoặc axit sulfuric), và điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách bổ sung oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa oxy vào 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. Axit 5'-inosinic được sản xuất bằng cách nuôi cấy có thể được bài tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể vẫn còn bên trong tế bào.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy được sử dụng như là nguồn cacbon, đường và carbohydrat (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, 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 đó. Nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, nước 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 dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, 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 cũng có thể bao gồm các yếu tố nguyên liệu kích thích tăng trưởng cần thiết như là các muối kim loại khác (ví dụ, magie sufat hoặc sắt sufat), các axit amin hoặc các vitamin.

Phương pháp thu hồi purin nucleotit được sản xuất 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 kỹ thuật này 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 mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng các phương pháp được biết đến trong kỹ thuật này.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh sạch. Quá trình tinh sạch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp được biết đến trong kỹ thuật tương ứng. Vì thế, thu hồi purin nucleotit có thể thu được dưới dạng tinh sạch 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).

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả theo các phương án ví dụ. Tuy nhiên, hiển nhiên rằng người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật là những phương án ưu tiên này chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế chủng sản sinh IMP dựa trên chủng kiểu đại

Chủng kiểu đại thuộc chi *Corynebacterium* không thể sản sinh IMP hoặc có thể chỉ sản sinh với lượng rất nhỏ thậm chí là không thể. Theo đó, chủng sản sinh IMP được điều chế dựa trên chủng *Corynebacterium stationis* ATCC6872. Cụ thể hơn, chủng sản sinh IMP được điều chế bằng cách tăng cường hoạt động gen *purF* mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza là enzym thứ nhất của sinh tổng hợp purin, và làm suy yếu hoạt tính của gen *guaB* mã hóa axit 5'-inosinic dehydrogenaza tương ứng với con đường suy biến của IMP.

Ví dụ 1-1: Điều chế chủng được tăng cường gen *purF*

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa bắt đầu của gen *purF* được biến đổi, vector chèn chứa gen *purF* nêu trong SEQ ID NO: 3 được điều chế. Để nhân dòng gen *purF* vào trong vector chèn, cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng bộ gen ADN của *Corynebacterium stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các cặp mồi có các trình tự SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, và SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 trong 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. PCR được thực hiện lại sử dụng hai đoạn ADN thu được ở PCR trên làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7 trong 30 chu kỳ bao gồm biến tính 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút để thu được các đoạn ADN. Các đoạn ADN thu được được phân cắt với enzym giới hạn *XbaI*, và được nhân dòng vào trong vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn quốc tế số 2008-033001) được phân cắt enzym giới hạn

*Xba*I. Vector được điều chế như vậy được đặt tên là pDZ-purF-g1a.

Bảng 1

SEQ ID NO	Đoạn môi	Trình tự (5' đến 3')
4	purF g1a-1	GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC
5	purF g1a-2	AAGTAGTGTTCACCATGACGCTGATTCTACTAAGTTT
6	purF g1a-3	AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCCCCAG
7	purF g1a-4	GCTCTAGACTGTGCGCCCACGATATCCAG

Vector tái tổ hợp pDZ-purF-g1a được biến nạp vào trong *Corynebacterium stationis* ATCC6872 bằng điện biến nạp, và các chủng trong đó vector được chèn vào bộ gen ADN bằng cách tách tổ hợp tương đồng được sàng lọc trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và các chủng được sàng lọc này được giải trình tự, do đó chủng mong muốn có đột biến được chèn vào đã được chọn. Chủng thu được được đặt tên là chủng ATCC6872::purF(g1a).

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

Để điều chế chủng chứa đơn vị mã hóa bắt đầu của gen *guaB* được sửa đổi, vector chèn vào chứa gen *guaB* nêu trong SEQ ID NO: 8 đã được điều chế. Nhân dòng gen *guaB* vào trong vector chèn, cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng bộ gen ADN của *Corynebacterium stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các cặp môi nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. Sản phẩm PCR được nhân dòng như trong ví dụ 1-1, và vector được điều chế được đặt tên là pDZ-guaB-alt. Vector được đưa vào trong ATCC6872::purF(g1a) và chủng chứa đột biến trên được đưa vào cuối cùng được chọn.

Chủng kiểu đại cuối cùng được chọn *Corynebacterium stationis* ATCC6872-dựa trên chủng điều chế IMP được đặt tên là CJI2330.

Bảng 2

SEQ ID NO	Đoạn môi	Trình tự (5' đến 3')
9	guaB alt-1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
10	guaB alt-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC
11	guaB alt-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTTTCT
12	guaB alt-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

Ví dụ 1-3: Thử nghiệm chuẩn độ lên men của CJI2330

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) vào trong ống thí nghiệm (đường kính: 18 mm), ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJI2330 được cấy lần lượt vào và ủ lắc ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha trong mỗi bình tam giác lắc 250 mL và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy vào trong môi trường lên men và được nuôi trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh tốc độ lắc ở 170 vòng/phút, 30°C và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo bởi HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 3 bên dưới. Kết quả sau đây cho thấy rằng chủng có *purF* được tăng cường và *purA* làm suy yếu có khả năng sản sinh IMP.

Bảng 3

Chủng	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2330	0,50

- Môi trường nuôi cấy giống: 1% glucoza, 1% pepton, 1% canh thịt, 1% dịch chiết nấm 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 sulfat, 0,01% canxi clorua, 20 mg/L sắt sulfat, 20 mg/L mangan sulfat, 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 thiamin hydroclorit, 30 mg/L adenin, 1,9% axit phospho (85%), 2,55% glucoza, 1,45% fructoza.

Ví dụ 2: Điều chế biến thể chứa adenylosuccinat synthetaza được làm suy yếu

Để tìm ra biến thể adenylosuccinat synthetaza có khả năng tăng cường sản sinh purin nucleotit, thư viện đột biến gen *purA* mã hóa adenylosuccinat synthetaza đã được điều chế.

Ví dụ 2-1: Điều chế vector chứa gen *purA*

Để điều chế thư viện đột biến gen *purA*, vector tái tổ hợp chứa gen *purA* được điều chế trước tiên. PCR được thực hiện sử dụng bộ gen ADN của *Corynebacterium stationis*

ATCC6872 làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, sản phẩm PCR được nhân dòng vào trong *E. coli* nhờ vector pCR2.1 sử dụng kit nhân dòng TOPO (Invitrogen) để thu được pCR-*guaB*.

Bảng 4.

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
13	Mồi xuôi purA 5' (mạch khuôn)	ATGGCTAAATACATTATCACT
14	Mồi ngược purA 3' (mạch khuôn)	TGTGCTGGAGACCCCTCATAG

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

Thư viện đột biến gen *purA* được điều chế dựa trên vector được điều chế trong ví dụ 2-1. Thư viện được điều chế sử dụng kit PCR tạo đột biến ngẫu nhiên (Clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit). Trong điều kiện đột biến có thể xảy ra, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Cụ thể, dưới các điều kiện trong đó 0 đến 3 đột biến trên 1.000 bp có thể xảy ra, gia nhiệt trước khi thực hiện 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. Sản phẩm PCR thu được để PCR sử dụng megaprimer (500 ng đến 125 ng) trong 25 chu kỳ bao gồm 95°C trong 50 giây, 60°C trong 50 giây, và 68°C trong 12 phút, được xử lý với *DpnI*, biến nạp vào *E. coli* DH5α và cấy trải trên môi trường thạch LB đặc chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi lựa chọn 20 loại khuẩn lạc khác nhau được biến nạp, plasmid thu được được giải trình tự. Kết quả là, đã được xác nhận rằng đột biến được đưa vào tại vị trí khác nhau với tần suất là 2 đột biến/kb. Khoảng 20.000 khuẩn lạc *E. coli* được thu và plasmid được tách, được đặt tên là thư viện pTOPO-*purA*.

Bảng 5

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
15	Mồi xuôi cho PCR lõi purA	AAGGGCAAAGCTACAGACATC
16	Mồi ngược cho PCR lõi purA	CCGCCGAGCATGAGAACCCGA

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

Ví dụ 3-1: Đánh giá thư viện

Thư viện pTOPO-*pur* được điều chế trong ví dụ 2-2 được biến nạp vào trong chủng CJI2330 được điều chế trong ví dụ 1 bằng điện biến nạp, và chủng được cấy trải trên môi trường dinh dưỡng chứa 25 mg/L kanamycin để thu được 10.000 khuẩn lạc có chứa

đột biến gen được chèn vào. Mỗi khuẩn lạc được đặt tên là CJI2330::pTOPO_purA(mt)1 đến CJI2330::pTOPO_purA(mt)10000.

- Môi trường dinh dưỡng: 1% pepton, 1% canh thịt, 0,25% natri clorua, 1% dịch chiết nấm men, 2% aga, độ pH 7,2.

Mỗi khuẩn lạc trong số 10.000 khuẩn lạc được cấy chuyển vào trong 200 μ L của môi trường nuôi cấy giống đã được hấp tiệt trùng, và được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng, lắc ở 30°C, 1200 vòng/phút trong 24 giờ sử dụng máy lắc vi đĩa (TAITEC), và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men được hấp tiệt trùng (290 μ L) được chia vào các giếng của đĩa 96 giếng, và 20 μ L của mỗi môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào đó, tiếp theo nuôi cấy được lắc trong cùng điều kiện như trên trong 72 giờ.

Để phân tích axit 5'-inosinic được sản xuất trong môi trường nuôi cấy, sau khi hoàn thành nuôi cấy, 3 μ L của dịch lỏng của môi trường nuôi cấy được chuyển đến đĩa UV 96 giếng trong đó mỗi giếng được chứa 197 μ L nước để pha loãng, và lắc trong 30 giây sử dụng máy đọc vi đĩa, và độ hấp thụ được đo tại 270 nm ở 25°C sử dụng máy quang phổ. Độ hấp thụ được so sánh với chủng CJI2330, và 50 khuẩn lạc của chủng đột biến thể hiện độ hấp thụ tăng 10% trở lên được chọn. Các khuẩn lạc khác thể hiện độ hấp thụ tương tự hoặc thấp hơn được so sánh với đối chứng.

Độ hấp thụ của 50 chủng đã chọn được đo tương tự như trên để kiểm tra hàm lượng của axit 5'-inosinic được sản sinh. Một chủng CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 được lựa chọn có biểu hiện tăng cường đáng kể năng suất axit 5'-inosinic so với chủng CJI2330.

Để xác nhận giá trị của đột biến được chọn, thí nghiệm chuẩn độ lên men được thực hiện.

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) trong ống thí nghiệm (đường kính: 18 mm), các ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng CJI2330 và CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 được cấy chuyển và nuôi lắc ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha vào trong mỗi bình tam giác 250 mL, và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy chuyển đến môi trường lên men và được nuôi cấy trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh tốc độ lắc 170 vòng/phút, 30°C, và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo bằng HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 6 bên dưới:

Bảng 6

Chủng	IMP (g/L)
CJI2330	0,50
CJI2330::pTOPO_purA(mt)333	0,61

Có thể thấy từ kết quả trên, đã được xác nhận rằng lượng IMP được tăng lên 122% trong chủng chứa đột biến gen *purA* so với chủng CJI2330. Theo đó, được xác định rằng đột biến được chọn trong thư viện là có giá trị.

Ví dụ 3-2: Xác nhận biến thể *purA*

Để xác nhận biến thể gen của chủng đột biến, PCR được thực hiện với chủng CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, sản phẩm PCR được giải trình tự, do đó xác nhận sự có mặt của biến thể trong gen *purA*.

Bảng 7

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
17	Trình tự mồi xuôi <i>purA</i>	GACGCGTCGGAATCGCCGATA
18	Trình tự mồi ngược <i>purA</i>	CCGCCGAGCATGAGAACCCGA

Cụ thể, đã được xác nhận rằng gen *purA* của chủng CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 chứa biến thể trong đó axit amin thứ 85 (tức là, glyxin) của trình tự axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng serin (tức là, nucleotit thứ 253 'g' được thay thế bằng nucleotit 'a'). Theo đó, trong ví dụ dưới đây, các thực nghiệm đã được thực hiện để xác nhận trong đó biến thể ở trên có thể ảnh hưởng đến lượng sản sinh purin nucleotit trong mỗi chủng vi sinh vật của chi *Corynebacterium*.

Ví dụ 4: Xác nhận sản sinh IMP trong chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872

Chủng điều chế IMP có nguồn gốc từ ATCC6872 được điều chế, biến thể được xác nhận trong ví dụ 3 được đưa vào trong chủng và năng suất IMP của chủng được xác nhận.

Ví dụ 4-1: Lựa chọn chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872

Để điều chế chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872, việc nuôi cấy của chủng ATCC6872 được hòa tan trong đệm phosphat (pH 7,0) hoặc đệm xitrat (pH 5,5) ở mật độ 10^7 tế bào/mL đến 10^8 tế bào/mL, và được xử lý với tia UV ở nhiệt độ phòng hoặc 32°C trong 20 phút đến 40 phút để gây đột biến. Chủng đó được rửa 2 lần với 0,85% dung dịch nước muối và cấy trải, sau khi pha loãng trên môi trường tối thiểu chứa 1,7% aga được bổ sung với nguyên liệu cung cấp sức đề kháng ở nồng độ thích hợp, do đó các khuẩn lạc được thu được. Mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng và sau đó được nuôi cấy vào môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy mỗi khuẩn lạc được nuôi trong môi trường lên men trong 3 đến 4 ngày, các khuẩn lạc biểu hiện sản sinh IMP tốt tích lũy trong môi trường nuôi cấy được chọn. Để điều chế chủng sản sinh IMP ở nồng độ cao, khuyết dưỡng adenin, rò rỉ guanin, nhạy cảm với lysozym, kháng 3,4-dehydroprolin, kháng streptomycin, kháng sulfaguanidin, kháng norvalin, và kháng trimethoprim được cung cấp bằng cách thực hiện các quy trình tương ứng một cách tuần tự. Kết quả là, chủng CJI2335 được cung cấp có sức đề kháng với các nguyên liệu ở trên và có năng suất IMP cuối cùng đã được chọn. Sức đề kháng của chủng CJI2332 liên quan đến các chủng ATCC6872 đã được so sánh và kết quả được thể hiện trong Bảng 8 bên dưới.

Bảng 8

Đặc điểm	ATCC6872	CJI2332
Khuyết dưỡng Adenin	Không khuyết dưỡng	Khuyết dưỡng
Rò rỉ Guanin	Không rò rỉ	Rò rỉ
Nhạy cảm với Lysozym	80 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$
Kháng 3,4-dehydroprolin	1.000 $\mu\text{g/mL}$	3.500 $\mu\text{g/mL}$
Kháng Streptomycin	500 $\mu\text{g/mL}$	2.000 $\mu\text{g/mL}$
Kháng Sulfaguanidin	50 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
Kháng Norvalin	0,2 mg/mL	2 mg/mL
Kháng Trimethoprim	20 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$

- Môi trường tối thiểu: 2% glucoza, 0,3% natri sulfat, 0,1% KH_2PO_4 , 0,3% K_2HPO_4 , 0,3% magie sunfat, 10 mg/L canxi clorua, 10 mg/L sắt sulfat, 1 mg/L kẽm sunfat, 3,6 mg/L mangan clorua, 20 mg/L L-xystein, 10 mg/L canxi pantothenat, 5 mg/L thiamin hydroclorua, 30 $\mu\text{g/L}$ biotin, 20 mg/L adenin, 20 mg/L guanin, điều chỉnh độ

pH 7,3.

Ví dụ 4-2: Thí nghiệm chuẩn độ lên men của CJ2332

Sau khi pha môi trường nuôi cấy giống (2 mL) trong ống thí nghiệm (đường kính: 18 mm), các ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJ2332 được cấy chuyển vào ống và nuôi lắc ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha vào mỗi bình tam giác 250 mL, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy chuyển vào môi trường lên men và nuôi cấy trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh tốc độ lắc 170 vòng/ phút, 30°C, độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản sinh được đo HPLC (SHIMADZU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 9 bên dưới.

Bảng 9

Chủng	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJ2332	1,74

Ví dụ 4-3: Điều chế vector chứa biến thể *purA*

Để đưa biến thể được chọn trong ví dụ 3 vào trong chủng, vector chèn đã được điều chế. Quá trình để điều chế vector để đưa biến thể *purA*(G85S) vào được thực hiện như sau. PCR được thực hiện sử dụng CJ2330::Topo_ *purA*(G85S) làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút; 20 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và trùng hợp ở 72°C trong 5 phút. Sau đó các đoạn gen thu được phân cắt với *Xba*I. Mỗi đoạn gen được nhân dòng vào trong vector pDZ tuyến tính được phân cắt với *Xba*I sử dụng T4 ligaza, do đó vector pDZ-*purA*(G85S) được điều chế.

Bảng 10

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
19	<i>purA</i> (G85S) F'	GCTCTAGATGCCGGCATTTCGAAGC
20	<i>purA</i> (G85S) R	GCTCTAGAAAGTAGTCGGTAAAGCCGTTG

Ví dụ 4-4: Đưa các biến thể vào trong chủng CJ2330 và chủng CJ2332 có nguồn

gốc từ ATCC6872 và đánh giá chúng

Biến thể *purA* được đưa vào mỗi chủng CJI2330 sản sinh IMP có nguồn gốc từ chủng hoang dại được điều chế trong ví dụ 1 và chủng CJI2332 được chọn trong ví dụ 4-1, lượng IMP sản sinh bởi mỗi chủng được đánh giá. Để xác nhận sự có mặt của biến thể gen *purA*, ADN nhiễm sắc thể của chủng CJI2332 được khuếch đại bằng PCR. Cụ thể, trước tiên, đoạn gen *purA* được khuếch đại PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng CJI2332 làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, trong đó PCR được thực hiện trong 28 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 1 phút; ủ để gắn mồi ở 58°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 2 phút sử dụng Taq ADN polymeraza. Trình tự nucleotit của các đoạn gen *purA* được khuếch đại được phân tích sử dụng cùng đoạn mồi, và kết quả là đã được xác nhận rằng là không có biến thể nào trong gen *purA* của chủng CJI2332.

Sau đó, vector pDZ-*purA*(G85S) được biến nạp vào trong chủng CJI2330 và chủng CJI2332, các chủng trong đó vector được chèn vào bộ gen ADN bằng cách tái hợp các trình tự tương đồng được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Chủng sơ cấp được chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và nhờ đó chủng trong đó biến thể của gen đích đưa vào được chọn. Để xác nhận việc đưa vào biến thể gen trong chủng biến nạp mong muốn, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và các sản phẩm PCR được xác nhận bằng giải trình tự. Kết quả là, đã được xác nhận rằng là biến thể gen được đưa vào trong các chủng. Các chủng được điều chế như vậy được đặt tên tương ứng là CJI2330::*purA*(G85S) và CJI2332::*purA*(G85S).

Năng suất của mỗi chủng CJI2330, CJI2332, CJI2330::*purA*(G85S), và CJI2332::*purA*(G85S) được đánh giá. Sau khi nuôi cấy hoàn thành, lượng IMP sản sinh bởi mỗi chủng được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 11 bên dưới.

Bảng 11

Chủng	IMP (g/L)
CJI2330	0,50
CJI2330:: <i>purA</i> (G85S)	0,61
CJI2332	1,74
CJI2332:: <i>purA</i> (G85S)	2,03

Trong kết quả bên trên, đã được xác nhận rằng là chủng trong đó biến thể gen *purA* đưa vào cho thấy sự tăng lượng IMP sản sinh là khoảng 122% và khoảng 116% so với chủng CJI2330 sản sinh IMP có nguồn gốc từ chủng hoang dại và chủng CJI2332 tương ứng.

Chủng CJI2332 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 22 tháng 6 năm 2018, theo theo Hiệp ước Budapest và cấp số lưu chủng KCCM12277P. Ngoài ra, chủng CJI2332::*purA*(G85S) được điều chế, cũng được gọi là CJI2348, được lưu giữ tại KCCM vào ngày 22 tháng 6 năm 2018, theo theo Hiệp ước Budapest và cấp số lưu chủng KCCM12280P.

Ví dụ 5: Xác nhận năng suất axit 5'-xanthylic bởi biến thể gen *purA*

Ví dụ 5-1: Chọn chủng sản sinh XMP có nguồn gốc từ ATCC6872

Để điều chế chủng sản sinh 5'-xanthosin monophosphat (XMP) có nguồn gốc từ ATCC6872, chủng *Corynebacterium stationis* ATCC6872 được hòa tan trong đệm phosphat (độ pH 7,0) và đệm xitrat (pH 5,5) có mật độ 10^7 tế bào/mL đến 10^8 tế bào/mL và được xử lý với UV ở nhiệt độ phòng hoặc 32°C trong 20 phút đến 40 phút để gây đột biến. Chủng được rửa 2 lần với 0,85% dung dịch nước muối và cấy trải, sau khi pha loãng trên môi trường tối thiểu chứa 1,7% aga được bổ sung nguyên liệu cung cấp sức đề kháng ở nồng độ thích hợp, do đó thu được các khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được cấy trong môi trường dinh dưỡng và sau đó được cấy trong môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy mỗi khuẩn lạc được nuôi trong môi trường lên men trong 3 đến 4 ngày, các khuẩn lạc biến hiện sản sinh tốt XMP được tích lũy trong môi trường nuôi cấy được chọn. Cụ thể, chủng được chọn từ các chủng có thể phát triển trong môi trường có bổ sung thêm fluorotryptophan theo nồng độ (được thêm vào môi trường), và cụ thể hơn là từ những chủng có thể phát triển trong môi trường chứa fluorotryptophan có nồng độ 100 mg/L và nồng độ được tăng cường của axit 5'-xanthylic. Chủng được chọn được đặt tên là CJX1664.

- Môi trường tối thiểu: glucoza 20 g/L, KH_2PO_4 1g/L, K_2HPO_4 1g/L, ure 2 g/L, amoni sulfat 3 g/L, magie sulfat 1 g/L, canxi clorua 100 mg/L, sắt sulfat 20 mg/L, mangan sulfat 10 mg/L, kẽm sulfat 10 mg/L, biotin 30 $\mu\text{g/L}$, thiamin hydroclorit 0,1 mg/L, đồng sulfat 0,8 mg/L, adenin 20 mg/L, guanin 20 mg/L, độ pH 7,2.

- Môi trường bổ sung: môi trường trong đó fluorotryptophan có các nồng độ

10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L, và 200 mg/L được thêm vào trong môi trường tối thiểu.

Các đặc tính hóa sinh của chủng CJX1664 được biểu hiện trong Bảng 12 bên dưới. Dựa vào Bảng 12, chủng CJX1664 có thể phát triển trong môi trường có fluorotryptophan được thêm vào có nồng độ 100 mg/L.

Bảng 12

Đặc tính	ATCC6872	CJX1664
Kháng Fluorotryptophan	10 mg/L	100 mg/L

Ví dụ 5-2: Thí nghiệm chuẩn độ lên men CJX1664

Sau khi hòa tan môi trường nuôi cấy giống (2 mL) vào trong ống nghiệm (đường kính: 18 mm), các ống được hấp tiệt trùng. Mỗi chủng ATCC6872 và CJX1664 lần lượt được cấy chuyển vào các ống và được nuôi lắc ở 30°C trong 24 giờ và được sử dụng như môi trường nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha loãng vào mỗi bình tam giác 250 mL, và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được cấy chuyển vào môi trường lên men và được nuôi cấy trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh tốc độ lắc 170 vòng/ phút, 30°C, và độ pH 7,5.

Sau khi nuôi cấy hoàn thành, lượng XMP sản sinh được đo bằng HPLC (SHIMAZDU LC20A), và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 13 bên dưới.

Bảng 13

Chủng	XMP (g/L)
ATCC6872	0
CJX1664	4,72

Ví dụ 5-3: Đưa biến thể vào trong chủng CJX1664 và đánh giá các chủng đó.

Để xác nhận sự có mặt các biến thể của gen *purA* trong chủng CJX1664 được chọn trong ví dụ 5-1, PCR của ADN nhiễm sắc thể của chủng CJX1664 được khuếch đại bằng PCR. Cụ thể, trước tiên, các đoạn *purA* được khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng CJX1664 làm mạch khuôn và cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, PCR được thực hiện bởi 28 chu kỳ của biến tính ở 94°C trong 1 phút; ủ để gắn mồi ở 58°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 2 phút sử dụng Taq ADN polymeraza. Các trình tự nucleotit của các đoạn gen *purA* đã được khuếch đại được phân

tích sử dụng cùng cặp mồi, và kết quả là đã được xác nhận rằng không có biến thể nào trong gen *purA* của chủng CJX1664.

Vector được điều chế trong ví dụ 4-3 được biến nạp vào trong chủng CJX1664, và chủng trong đó vector được chèn vào bộ gen ADN bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai, và do đó các chủng đó chứa biến thể gen đích đưa vào được chọn. Sự đưa vào của biến thể gen trong các chủng biến nạp mong muốn được xác nhận bằng giải trình tự.

Năng suất XMP của mỗi chủng CJX1664 và CJX1664::*purA*(G85S) được đánh giá. Sau khi nuôi cấy hoàn thành, lượng XMP sản sinh bởi mỗi chủng được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 14 bên dưới.

Bảng 14

Chủng	XMP (g/L)
CJX1664	4,72
CJX1664:: <i>purA</i> (G85S)	5,19

Có thể thấy trong Bảng 14 ở trên, chủng CJX1664::*purA*(G85S) biểu hiện tăng lượng XMP sản sinh là khoảng 109% so với chủng CJX1664 (tức là chủng sản sinh XMP có nguồn gốc từ ATCC6872).

Chủng CJX1664 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 6 tháng 6 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được cấp số lưu chủng KCCM12285P. Ngoài ra, chủng được điều chế CJX1664::*purA*(G85S), cũng được gọi là CJX1665, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 6 tháng 6 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest và được cấp số lưu chủng KCCM12286P.

Ví dụ 6: Thay thế axit amin trong biến thể *purA* bằng axit amin khác

Ví dụ 6-1: Điều chế vector để chèn axit amin của biến thể *purA*

Thông qua các ví dụ trên, đã được xác nhận rằng biến thể *purA*(G85S) có thể được cải thiện năng suất của purin nucleotit. Về vấn đề này, để xác nhận vị trí quan trọng của biến thể *purA*, ảnh hưởng về năng suất purin nucleotit của việc thay thế axit amin thứ 85 bằng axit amin khác đã được kiểm tra. Quá trình điều chế vector để chèn biến thể

purA(G85S) như sau. Đột biến điểm định vị được thực hiện sử dụng vector pDZ-purA(G85S) được điều chế trong ví dụ 4 đóng vai trò chính. Cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng các trình tự đoạn mỗi thể hiện trong Bảng 15 dưới các điều kiện sau: 18 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 68°C trong 12 phút. Sản phẩm PCR thu được được xử lý với *DpnI*, biến nạp vào trong chủng DH5 α , và các khuẩn lạc thu được từ đó. Các plasmit của các khuẩn lạc thu được, được thu bằng cách sử dụng phương pháp tách chiết plasmit đã biết, và thông tin của các plasmit thu được được thể hiện trong Bảng 15 bên dưới.

Bảng 15

SEQ ID NO	Đoạn mỗi	Trình tự (5' đến 3')
21	purA(G85A) F	CTTTGAGGAAATTGAAGCTCTCGAAGCCCGCGGCGC
22	purA(G85A) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGAGCTTCAATTTCTCAAAG
23	purA(G85V) F	CTTTGAGGAAATTGAAGTCCTCGAAGCCCGCGGCGC
24	purA(G85V) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGACTTCAATTTCTCAAAG
25	purA(G85L) F	CTTTGAGGAAATTGAACTGCTCGAAGCCCGCGGCGC
26	purA(G85L) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCAGTTCAATTTCTCAAAG
27	purA(G85M) F	CTTTGAGGAAATTGAAATGCTCGAAGCCCGCGGCGC
28	purA(G85M) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCATTTCATTTCTCAAAG
29	purA(G85I) F	CTTTGAGGAAATTGAAATCCTCGAAGCCCGCGGCGC
30	purA(G85I) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGATTTCAATTTCTCAAAG
31	purA(G85T) F	CTTTGAGGAAATTGAAACTCTCGAAGCCCGCGGCGC
32	purA(G85T) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGAGTTTCAATTTCTCAAAG
33	purA(G85N) F	CTTTGAGGAAATTGAAAACCTCGAAGCCCGCGGCGC
34	purA(G85N) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTTTTCAATTTCTCAAAG
35	purA(G85Q) F	CTTTGAGGAAATTGAACAGCTCGAAGCCCGCGGCGC
36	purA(G85Q) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCTGTTCAATTTCTCAAAG
37	purA(G85C) F	CTTTGAGGAAATTGAATGCCTCGAAGCCCGCGGCGC
38	purA(G85C) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGCATTCAATTTCTCAAAG
39	purA(G85P) F	CTTTGAGGAAATTGAACCACTCGAAGCCCGCGGCGC
40	purA(G85P) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGTGGTTCAATTTCTCAAAG
41	purA(G85Y) F	CTTTGAGGAAATTGAATACCTCGAAGCCCGCGGCGC
42	purA(G85Y) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTATTCAATTTCTCAAAG
43	purA(G85W) F	CTTTGAGGAAATTGAATGGCTCGAAGCCCGCGGCGC
44	purA(G85W) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCCATTCAATTTCTCAAAG

45	purA(G85K) F	CTTTGAGGAAATTGAAAAGCTCGAAGCCCGCGGCGC
46	purA(G85K) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCTTTTCAATTCCTCAAAG
47	purA(G85R) F	CTTTGAGGAAATTGAACGCCTCGAAGCCCGCGGCGC
48	purA(G85R) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGCGTTCAATTCCTCAAAG
49	purA(G85H) F	CTTTGAGGAAATTGAACACCTCGAAGCCCGCGGCGC
50	purA(G85H) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTGTTCAATTCCTCAAAG
51	purA(G85D) F	CTTTGAGGAAATTGAAGATCTCGAAGCCCGCGGCGC
52	purA(G85D) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGATCTTCAATTCCTCAAAG
53	purA(G85E) F	CTTTGAGGAAATTGAAGAACTCGAAGCCCGCGGCGC
54	purA(G85E) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGTTCTTCAATTCCTCAAAG

Bảng 16

Số thứ tự	Plasmit
1	pDZ-purA G85A
2	pDZ-purA G85V
3	pDZ-purA G85L
4	pDZ-purA G85M
5	pDZ-purA G85I
6	pDZ-purA G85T
7	pDZ-purA G85N
8	pDZ-purA G85Q
9	pDZ-purA G85C
10	pDZ-purA G85P
11	pDZ-purA G85Y
12	pDZ-purA G85W
13	pDZ-purA G85K
14	pDZ-purA G85R
15	pDZ-purA G85H
16	pDZ-purA G85D
17	pDZ-purA G85E

Ví dụ 6-2: Điều chế chủng trong đó axit amin được thay thế bằng axit amin khác theo vị trí biến thể của biến thể purA, và so sánh năng suất của axit 5'-inosinic

Mỗi loại vector trong số 18 loại vector, để chèn vào của các biến thể, được điều chế trong ví dụ 6-1 được biến nạp vào trong chủng CJI2332, và những chủng đó trong đó các vector này được chèn vào trong bộ gen ADN bằng tái tổ hợp tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua

lai chéo lần thứ hai, và do đó những chủng này trong đó biến thể của gen đích đưa vào được chọn. Để xác nhận việc đưa gen biến thể vào trong chủng được biến nạp, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và sản phẩm PCR được xác nhận bằng giải trình tự. Các chủng được đặt tên theo các biến thể được chèn vào thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17

Số thứ tự	Chủng
1	CJI2332::purA(G85A)
2	CJI2332::purA(G85V)
3	CJI2332::purA(G85L)
4	CJI2332::purA(G85M)
5	CJI2332::purA(G85I)
6	CJI2332::purA(G85T)
7	CJI2332::purA(G85N)
8	CJI2332::purA(G85Q)
9	CJI2332::purA(G85C)
10	CJI2332::purA(G85P)
11	CJI2332::purA(G85Y)
12	CJI2332::purA(G85W)
13	CJI2332::purA(G85K)
14	CJI2332::purA(G85R)
15	CJI2332::purA(G85H)
16	CJI2332::purA(G85D)
17	CJI2332::purA(G85E)

Nồng độ của axit 5'-inosinic được phân tích bằng nuôi cấy các chủng tương tự như trong ví dụ 1.

Bảng 18

Nồng độ của axit 5'-inosinic với các biến thể trong purA (g/L)		
Số thứ tự	Chủng	Trung bình
		Axit 5'-inosinic
	CJI2332	1,74
Nhóm đối chứng	CJI2332::purA(G85S)	2,03
1	CJI2332::purA(G85A)	1,93
2	CJI2332::purA(G85V)	1,84

3	CJI2332::purA(G85L)	2,01
4	CJI2332::purA(G85M)	2,01
5	CJI2332::purA(G85I)	2,02
6	CJI2332::purA(G85T)	2,02
7	CJI2332::purA(G85N)	1,83
8	CJI2332::purA(G85Q)	2,03
9	CJI2332::purA(G85C)	1,82
10	CJI2332::purA(G85P)	1,10
11	CJI2332::purA(G85Y)	1,92
12	CJI2332::purA(G85W)	0,39
13	CJI2332::purA(G85K)	1,86
14	CJI2332::purA(G85R)	1,30
15	CJI2332::purA(G85H)	1,67
16	CJI2332::purA(G85D)	2,02
17	CJI2332::purA(G85E)	1,94

Tham chiếu trên bảng 18 bên trên, đã được xác nhận rằng các chủng chứa *purA*, trong đó axit amin thứ 85 của trình tự axit amin mã hóa cho gen *purA* được thay thế bằng axit amin khác, được thể hiện thay đổi đáng kể trong lượng IMP sản sinh, được so sánh với những chủng khác không chứa biến thể trên. Do đó đã được xác nhận rằng axit amin thứ 85 của trình tự axit amin mã hóa cho gen *purA* là vị trí quan trọng cho sự thay đổi liên quan đến sản sinh purin nucleotit, và khi axit amin thứ 85 của trình tự axit amin mã hóa cho gen *purA* được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic, và axit glutamic, các vi sinh vật chứa biến thể có thể tăng đáng kể sản sinh của purin nucleotit.

Từ phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không sửa đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án ưu tiên được thực hiện ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án ưu tiên khác mà còn bao gồm nhiều phương án, sửa đổi, tương đương và các phương án khác có thể nằm trong nguyên lý và phạm vi bảo hộ của sáng chế như đã được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể adenylosuccinat synthetaza, trong đó axit amin thứ 85 từ đầu N của trình tự axit amin của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng axit amin khác, trong đó axit amin khác được chọn từ nhóm bao gồm serin, alanin, valin, leuxin, methionin, isoleuxin, threonin, asparagin, glutamin, xystein, tyrosin, lysin, axit aspartic, và axit glutamic.
2. Polynucleotit mã hóa biến thể adenylosuccinat synthetaza theo điểm 1.
3. Vectơ chứa polynucleotit theo điểm 2.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh purin nucleotit chứa biến thể adenylosuccinat synthetaza theo điểm 1 hoặc vectơ theo điểm 3.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium stationis*.
6. Phương pháp điều chế 5'-inosin monophosphat (IMP), xanthosin 5'-monophosphat (XMP) hoặc 5'-guanin monophosphat (GMP), phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 4 trong môi trường nuôi cấy; và

thu hồi IMP, XMP hoặc GMP từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.
7. 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 ADENYLOSUCCINAT SYNTHETAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTO, VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ IMP, XMP HOẶC GMP SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY
 <130> OPA18284
 <150> 10-2018-0089855
 <151> 2018-08-01
 <160> 54
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1293
 <212> ADN
 <213> Chưa xác định
 <220>
 <223> purA NT
 <400> 1
 atggcagcta tcgttatcgt cggcgccc aa tggggcgacg aaggcaaggg caaagctaca 60
 gacatcctgg gtggacgcgt ggactacgtc gtcaagccca acggtggtaa caatgctggc 120
 cacaccgttg tagtcggtgg cgaaaagtac gaactcaagc tgctgcccgc cggcatcctc 180
 tccgaaaacg ccgtgccagt gctgggcaac ggcgtagtta tcaacctcga agcactcttt 240
 gaggaaattg aaggcctcga agcccgcggc gctgatgctt cccgcttgcg tatttccgcc 300
 aacgcgcacc tggttgcgcc ataccaccag accttagacc gcgtgcagga acgtttcttg 360
 ggcaagcgcg cgattggcac caccggccgc ggtatcggcc cagcttatgc cgacaaggtc 420
 gcgcgcgtgg gagttcgcgt gcaagacatc ttcgacgaat ccatcctgcg tcagaaggtc 480
 gaatccgcgc tggatatcaa aaaccagatg ctggtcaaaa tgtacaaccg caaggcgatt 540
 gaccctgaga ccacgtcga atacttctgt tcctaccgcg accgcctcga gcctatggtc 600
 gtggactccg agtacgagct caacaccgct ctggatgccg gcaagcacgt gctcatggaa 660
 ggcggccagg ccaccatgct cgacgtggac cacggcacct acccattcgt gacctcgtcc 720
 aaccaaacg ccggtgggtg atcggtaggc tctggcgctg ggcctaccg catcacgcac 780
 tccctgggca tcattaaggc gtacaccacc cgcgttggtg ctggcccatt cccaaccgag 840
 ctctttgaca agtggggcga atacctccag accaccggcg gcgaggtcgg cgtcaacacc 900
 ggcgcacccc gtcgttggtg ctggtatgac tctgtcattg cacgctacgc atcgcgcgtc 960
 aacggcttta ccgactactt ccttactaaa ctgcacgtgc tcaccggcat cggcgaaatc 1020
 cctatttgcg tcgcctacga cgtcgatggc gaacgcttcg atgaaatgcc gctgactcag 1080

tcgcagtttc accacgcaca accaatttat gaaaccatgc cagcgtggga agaagacatc 1140
 accggttgca ccacctttga ggagctgccg caaaaggcac aggattacgt gctgcggcta 1200
 gaggagctgt ccggcacccg catgtcatac atcggcgttg gccctggccg tgaccagacc 1260
 atcgtgcgcc acgacgtgct cgacgagaaa taa 1293

<210> 2
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Chưa xác định

<220>
 <223> purA AA

<400> 2
 Met Ala Ala Ile Val Ile Val Gly Ala Gln Trp Gly Asp Glu Gly Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Ala Thr Asp Ile Leu Gly Gly Arg Val Asp Tyr Val Val Lys
 20 25 30
 Pro Asn Gly Gly Asn Asn Ala Gly His Thr Val Val Val Gly Gly Glu
 35 40 45
 Lys Tyr Glu Leu Lys Leu Leu Pro Ala Gly Ile Leu Ser Glu Asn Ala
 50 55 60
 Val Pro Val Leu Gly Asn Gly Val Val Ile Asn Leu Glu Ala Leu Phe
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Glu Gly Leu Glu Ala Arg Gly Ala Asp Ala Ser Arg Leu
 85 90 95
 Arg Ile Ser Ala Asn Ala His Leu Val Ala Pro Tyr His Gln Thr Leu
 100 105 110
 Asp Arg Val Gln Glu Arg Phe Leu Gly Lys Arg Ala Ile Gly Thr Thr
 115 120 125
 Gly Arg Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Ala Asp Lys Val Ala Arg Val Gly
 130 135 140
 Val Arg Val Gln Asp Ile Phe Asp Glu Ser Ile Leu Arg Gln Lys Val
 145 150 155 160
 Glu Ser Ala Leu Asp Ile Lys Asn Gln Met Leu Val Lys Met Tyr Asn
 165 170 175
 Arg Lys Ala Ile Asp Pro Glu Thr Ile Val Glu Tyr Phe Leu Ser Tyr
 180 185 190
 Arg Asp Arg Leu Glu Pro Met Val Val Asp Ser Glu Tyr Glu Leu Asn
 195 200 205
 Thr Ala Leu Asp Ala Gly Lys His Val Leu Met Glu Gly Gly Gln Ala
 210 215 220
 Thr Met Leu Asp Val Asp His Gly Thr Tyr Pro Phe Val Thr Ser Ser
 225 230 235 240

Asn Pro Thr Ala Gly Gly Ala Ser Val Gly Ser Gly Val Gly Pro Thr
 245 250 255
 Arg Ile Thr His Ser Leu Gly Ile Ile Lys Ala Tyr Thr Thr Arg Val
 260 265 270
 Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Lys Trp Gly Glu Tyr
 275 280 285
 Leu Gln Thr Thr Gly Gly Glu Val Gly Val Asn Thr Gly Arg Thr Arg
 290 295 300
 Arg Cys Gly Trp Tyr Asp Ser Val Ile Ala Arg Tyr Ala Ser Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Phe Thr Asp Tyr Phe Leu Thr Lys Leu Asp Val Leu Thr Gly
 325 330 335
 Ile Gly Glu Ile Pro Ile Cys Val Ala Tyr Asp Val Asp Gly Glu Arg
 340 345 350
 Phe Asp Glu Met Pro Leu Thr Gln Ser Gln Phe His His Ala Gln Pro
 355 360 365
 Ile Tyr Glu Thr Met Pro Ala Trp Glu Glu Asp Ile Thr Gly Cys Thr
 370 375 380
 Thr Phe Glu Glu Leu Pro Gln Lys Ala Gln Asp Tyr Val Leu Arg Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Leu Ser Gly Thr Arg Met Ser Tyr Ile Gly Val Gly Pro Gly
 405 410 415
 Arg Asp Gln Thr Ile Val Arg His Asp Val Leu Asp Glu Lys
 420 425 430

<210> 3
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> Chưa xác định

<220>
 <223> purF

<400> 3
 gtggtgaaca ctactttccc cagcgacgtg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc 60
 cgcgaagagt gcggtgtctt tggcgtctgg gctcctggtg aagatgttgc gacactgacc 120
 tactttggtc tgttcgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggtat cggcgtcggg 180
 gatggagacc gcctcgttgt cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat tttcgatgag 240
 tccattttta attccctcca tggctccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctcgactgcc 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
 cgtgaccgcg acggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttggt 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 acatggtcac ccccggtcca gaatccggaa acccggcagc tgttggttac 960
 gcccggaat cgggcctgac atttgcgcac ggcttggtca aaaacgccta cgtgggtcga 1020
 accttcattc agcccacca gaccttgcg cagctgggta ttgcctcaa gctcaacccc 1080
 ctgcgcgagg tcatcgagg caagtcactc gttgttgtag atgactctat tgtccgcggc 1140
 aacacccaac gcgcgctggt gcgcatgctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgacgtg 1200
 cgcatcgctt caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgctcgct 1260
 ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatcctc aggtagtaac cgatgcagtg 1320
 tgcaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca 1380
 acgcaccaac ctatcaattc cttgtgtacc gcttgctttg atggcaacta cgaactcgga 1440
 cttccgaccg ctaaccccaa tgctgacgct gtgcgaactt tgctcagcca aaagaactga 1500

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purF gla-1

<400> 4
 gctctagacc actctaagac gcggccacc 29

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

<220>
 <223> purF gla-2

<400> 5
 aagtagtggt caccatgacg ctgattctac taagttt 37

<210> 6
 <211> 38
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> purF gla-3

<400> 6

agtagaatca gcgtcatggt gaacactact ttccccag

38

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> purF gla-4

<400> 7

gctctagact gtgcgcccac gatatccag

29

<210> 8

<211> 1521

<212> ADN

<213> Chưa xác định

<220>

<223> guaB

<400> 8

atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataagggtgc attgcatggc 60
 ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta 120
 gacacttcgg cgagttcac ccgcaatact cgtttaggta ttcttttggc atcggtgcg 180
 atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cagccagggt tggcattggg 240
 gtcttgacc gcaacttgct ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc 300
 tctgagtcgg gcatggcac cgaccctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa 360
 gttgatgacc tgtgtgcacg cttccgcac tctgggtctt ctgtgggtcaa cgaagacggc 420
 accttggttg gcatttgac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgcaag 480
 gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa 540
 gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaaac 600
 aacaagctgg tcggtctgat taccgttaaa gactttgtta agaccgaaca gttcccgaat 660
 tcctccaagg atgcttcggg ccgcttgcta gtagcagcag gtattggtac cggcgaggag 720
 tcttatgagc gtgcaggctt gcttgctgat gccggcgtgg acgttctcat tgtcgactcc 780
 gcacacgcgc acaataaccg cgtgctggaa atggtctcgc gcgtcaagaa tgacttcggc 840
 tccaagattg atgttgctcg cggaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcgatgatt 900
 gaggctggcg cagacgccat caaggtgggt attggtcctg gttctatctg caccaccgt 960

gtggttgctg gtggttggtgc accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct 1020
 tctgctgctg gcgtgccttt gattgcagac ggccgcatgc agtactccgg tgacgttgct 1080
 aaggcttttg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcgc aggcaccctg 1140
 gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg 1200
 ggttcgatgg gcgctatgca aggcctggc ctctccggcg agaagcgttc ttactccaag 1260
 gaccgtact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1320
 ggcaaggttc cttaccgcgg cgaaattggc cagattaccc accagattgt gggcggtttg 1380
 cgcgcggaac tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1440
 gtgcgtatta ccaactgctg cttggctgag tcgcacccgc accacctgca gcaaactgta 1500
 gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> guaB alt-1

<400> 9
 gctctagact acgacaacac ggtgcctaa 29

<210> 10
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> guaB alt-2

<400> 10
 cacgattttc ggtcaatacg ggtcttctcc ttcgcac 37

<210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> guaB alt-3

<400> 11
 aggagaagac ccgtattgac cgaaaatcgt gtttct 36

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> guaB alt-4

 <400> 12
 gctctagaat cgacaagcaa gcctgcacg 29

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi xuôi purA 5' (mạch khuôn)

 <400> 13
 atggctaaat acattatcac t 21

 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi ngược purA 5' (mạch khuôn)

 <400> 14
 tgtgctggag acccctcata g 21

 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi xuôi cho PCR lõi purA

 <400> 15
 aagggcaaag ctacagacat c 21

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi ngược cho PCR lõi purA

 <400> 16
 ccgccgagca tgagaacccg a 21

 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN

<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự purA xuôi dòng	
<400>	17	
	gacgcgtcgg aatcgccgat a	21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự purA ngược dòng	
<400>	18	
	ccgccgagca tgagaacccg a	21
<210>	19	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purA(G85S) F	
<400>	19	
	tgccggcatt tttcgaagc	19
<210>	20	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purA(G85S) R	
<400>	20	
	aagtagtcgg taaagccgtt g	21
<210>	21	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	purA(G85A) F	
<400>	21	
	ctttgaggaa attgaagctc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	22	
<211>	36	

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85A) R

 <400> 22
 gcgccgcggg cttcgagagc ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85V) F

 <400> 23
 ctttgaggaa attgaagtcc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85V) R

 <400> 24
 gcgccgcggg cttcgaggac ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85L) F

 <400> 25
 ctttgaggaa attgaactgc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85L) R

 <400> 26
 gcgccgcggg cttcgagcag ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 27

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85M) F

 <400> 27
 ctttgaggaa attgaaatgc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 28
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85M) R

 <400> 28
 gcgccgcggg cttcgagcat ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 29
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85I) F

 <400> 29
 ctttgaggaa attgaaatcc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85I) R

 <400> 30
 gcgccgcggg cttcgaggat ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85T) F

 <400> 31
 ctttgaggaa attgaaactc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85T) R

 <400> 32
 gcgccgcggg cttcgagagt ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 33
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85N) F

 <400> 33
 ctttgaggaa attgaaaacc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85N) R

 <400> 34
 gcgccgcggg cttcgagggt ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85Q) F

 <400> 35
 ctttgaggaa attgaacagc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 36
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85Q) R

 <400> 36
 gcgccgcggg cttcgagctg ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 37
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85C) F

 <400> 37
 ctttgaggaa attgaatgcc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85C) R

 <400> 38
 gcgccgcggg cttcgaggca ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85P) F

 <400> 39
 ctttgaggaa attgaaccac tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85P) R

 <400> 40
 gcgccgcggg cttcgagtgg ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 41
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85Y) F

 <400> 41
 ctttgaggaa attgaatacc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 42
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85Y) R

 <400> 42
 gcgcgcgcggg cttcgaggta ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 43
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85W) F

 <400> 43
 ctttgaggaa attgaatggc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 44
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85W) R

 <400> 44
 gcgcgcgcggg cttcgagcca ttcaatttcc tcaaag 36

 <210> 45
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85K) F

 <400> 45
 ctttgaggaa attgaaaagc tcgaagcccg cggcgc 36

 <210> 46
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> purA(G85K) R

 <400> 46

gcgccgcggg cttcgagctt ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85R) F

<400> 47
 ctttgaggaa attgaacgcc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 48
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85R) R

<400> 48
 gcgccgcggg cttcgaggcg ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 49
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85H) F

<400> 49
 ctttgaggaa attgaacacc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 50
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85H) R

<400> 50
 gcgccgcggg cttcgaggtg ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 51
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85D) F

<400> 51
 ctttgaggaa attgaagatc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 52
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85D) R

<400> 52
 gcgcgcggg cttcgagatc ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 53
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85E) F

<400> 53
 ctttgaggaa attgaagaac tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 54
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> purA(G85E) R

<400> 54
 gcgcgcggg cttcgagtcc ttcaatttcc tcaaag 36