



(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)



1-0039171

(51)¹⁹ C12N 15/77; C12P 19/32

(13) B

(21) 1-2019-06464

(22) 14/12/2018

(86) PCT/KR2018/015935 14/12/2018

(87) WO2019/117671 20/06/2019

(30) 10-2017-0173504 15/12/2017 KR

(45) 25/03/2024 432

(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, Baek Seok (KR); LEE, Ji Hye (KR); KWON, Nara (KR);
KIM, Ju Jeong (KR); CHO, Jin Man (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH IMP, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ IMP

(57) Sáng chế đề cập vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-inosin monophosphat với hoạt tính protein sản sinh IMP được nâng cao, phương pháp điều chế 5'- inosin monophosphat sử dụng vi sinh vật này, chế phẩm để sản xuất 5'-inosin monophosphat, phương pháp tăng cường sản sinh 5'-inosin monophosphat.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-inosin monophosphat, với hoạt tính của protein sản sinh IMP được nâng cao; phương pháp để điều chế 5'-inosin monophosphat bằng cách sử dụng vi sinh vật này, bao gồm điều chế 5'-inosin monophosphat; phương pháp để tăng sản sinh 5'-inosin monophosphat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

5'-inosin monophosphat (sau đây gọi là 'IMP') là một nguyên liệu có bản chất là axit nucleic, là chất trung gian trong con đường chuyển hóa axit nucleic và được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, dược phẩm và các ứng dụng y tế khác nhau. Đặc biệt, IMP được sử dụng rộng rãi làm phụ gia hoặc gia vị thực phẩm cùng với 5'-guanine monophosphat (sau đây gọi là 'GMP'). Mặc dù bản thân IMP được biết là có hương vị thịt bò, nhưng nó cũng được biết đến để tăng hương vị của bột ngọt (MSG); và vì thế được chú ý đến như loại gia vị axit nucleic làm tăng hương vị.

Ví dụ về các phương pháp điều chế IMP bao gồm phương pháp phân hủy axit ribonucleic được chiết xuất từ các tế bào nấm men (Công bố Patent Nhật Bản số 1614/1957), phương pháp phosphoryl hóa inosin được sản xuất bằng cách lên men (Agri. Biol. Chem., 36, 1511, v.v.) và phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trực tiếp sản sinh IMP và thu hồi IMP trong môi trường nuôi cấy. Trong số các phương pháp này, được sử dụng rộng rãi nhất là phương pháp sử dụng vi sinh vật có khả năng trực tiếp sản sinh IMP.

Để sản xuất IMP với năng suất cao bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất trực tiếp IMP qua quá trình lên men vi sinh vật, IMP được sản sinh một cách thuận lợi. Để thực hiện mục đích đó, các tác giả của sáng chế đã tiến hành nghiên cứu sâu rộng và đã phát hiện ra protein liên quan đến sản sinh IMP; kết quả là, họ đã xác định ImpE1 và ImpE2 là những protein liên quan đến sản sinh IMP. Nó đã được xác nhận rằng khi các hoạt tính của ImpE1 và ImpE2, là các protein liên quan đến sản sinh IMP được tăng cường, nồng độ IMP đã tăng lên, do đó hoàn thành sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất

IMP, với hoạt tính của protein sản sinh IMP được nâng cao.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp để điều chế IMP bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* của sáng chế trong môi trường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất IMP chứa protein có hoạt tính sản sinh IMP của sáng chế được nâng cao.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp để tăng sản sinh IMP bao gồm tăng cường hoạt tính của protein sản sinh IMP của sáng chế trong vi sinh vật của chi *Corynebacterium*.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, IMP có thể được điều chế bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất IMP, với hoạt tính của protein sản sinh IMP được nâng cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong đó, mỗi mô tả và phương án ưu tiên của sáng chế có thể được áp dụng cho các mô tả và phương án khác, tương ứng. Tức là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được thể hiện ở đây thuộc về phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế sẽ không bị giới hạn bởi phần mô tả dưới đây. Hơn nữa, các mô tả cụ thể được thể hiện dưới đây không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Để đạt được các mục đích trên, theo khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh IMP, với hoạt tính của protein sản sinh IMP được tăng cường.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein sản sinh 5'-inosin monophosphat- đề cập đến protein liên quan đến sản sinh ngoại bào của 5'-inosin monophosphat (IMP). Đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ trên có thể được sử dụng thay thế cho protein có khả năng sản sinh IMP, protein có khả năng sản sinh 5'-inosin monophosphat, protein sản sinh IMP, v.v. và cụ thể là có thể được biểu thị như ImpE, cụ thể hơn là ImpE1 và ImpE2, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Ngoài ra, protein có thể được lấy từ *Corynebacterium* sp.,. Cụ thể là *Corynebacterium stationis*, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Ví dụ, protein có nguồn gốc từ *Corynebacterium stationis* và có khả năng sản sinh IMP và có tác dụng tương tự, có thể được sử dụng như protein của

sáng chế.

Protein có thể bao gồm, ví dụ, trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, mà còn chứa các trình tự có hoạt tính tương tự như protein và người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể có được thông tin trình tự từ Ngân hàng gen của NCBI, cơ sở dữ liệu đã biết. Ngoài ra, protein có thể chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, rõ ràng là protein bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm một số trình tự có thể được sử dụng làm protein của sáng chế miễn là trình tự axit amin có cấu trúc tương đồng hoặc đồng nhất với protein ở trên và thể hiện một tác dụng tương tự với protein.

Tức là, mặc dù được mô tả là “protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể” hoặc protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể” theo sáng chế, protein có thể có hoạt tính tương đồng hoặc tương tự với protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO tương ứng. Trong trường hợp như vậy, rõ ràng là bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc thêm vào một phần của trình tự cũng có thể được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, trong trường hợp có hoạt tính giống hoặc tương tự với hoạt tính của protein bị biến đổi, nó không loại trừ việc bổ sung trình tự phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin, không làm thay đổi chức năng của protein, đột biến có thể xảy ra một cách tự nhiên, đột biến im lặng hoặc thay thế bảo thủ và ngay cả khi có thêm hoặc đột biến trình tự, nó rõ ràng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến mức độ phù hợp với 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” hoặc “đồng nhất” thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Tương đồng hoặc đồng nhất về trình tự bảo thủ của các chuỗi polynucleotit hoặc polypeptit được bảo tồn có thể được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và có thể được sử dụng với hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình đang được sử dụng. Các chuỗi tương đồng về cơ bản hoặc giống hệt nhau thường

được dự kiến sẽ lai ghép với mức độ nghiêm ngặt trung bình hoặc cao, dọc theo toàn bộ chiều dài hoặc ít nhất khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, hoặc khoảng 90% toàn bộ chiều dài của trình tự. Polynucleotit có chứa đơn vị mã hóa (codon) thoái biến thay vì đơn vị mã hóa trong polypeptit lai hóa cũng 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 như chương trình “FASTA” (Pearson et al., (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444: sử dụng tham số mặc định trong 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 cao hơn) (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 ET AL.] (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 (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của các trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP (ví dụ, Needman et al., (1970), J Mol Biol. 48: 443) đã được công bố (ví dụ, Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2: 482). Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất là giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh tương ứng (nghĩa là, nucleotit hoặc axit amin) vào 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 phân (chứa giá trị 1 cho giống nhau và 0 cho không giống nhau) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14: 6745, như được bộc lộ trong 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) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt 0,10 cho mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống 0,5); và (3) không có hàm phạt cho

các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng. Theo đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến sự liên quan giữa các trình tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nâng cao hoạt tính”, có nghĩa là hoạt tính của protein được đưa vào hoặc hoạt tính được cải thiện so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi biến đổi của vi sinh vật. “Việc đưa vào” có nghĩa là hoạt tính của protein cụ thể, vốn không có tự nhiên hoặc nhân tạo đối với vi sinh vật, được biểu hiện. “Hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể được sở hữu bởi chủng gốc trước biến đổi khi vi sinh vật bị biến nạp do biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo.

Ví dụ, việc nâng cao hoạt tính có thể bao gồm cả việc nâng cao hoạt tính bằng cách đưa protein sản sinh IMP từ bên ngoài vào trong tế bào chủ hoặc tăng hoạt tính của protein sản sinh IMP nội sinh.

Cụ thể, theo sáng chế, việc nâng cao hoạt tính có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau:

- 1) Tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa cho (tức là, mã hóa) protein;
- 2) Biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện polynucleotit;
- 3) Biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để nâng cao hoạt tính của protein; hoặc
- 4) Kết hợp của các phương pháp trên, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở các phương pháp này.

Trong phương pháp 1) ở trên, việc tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa các enzym có thể đạt được bằng cách liên kết chức năng của polynucleotit với vectơ, hoặc bằng cách chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở cách nào. Ngoài ra, trong một phương án, việc tăng số lượng bản sao có thể được thực hiện bằng cách đưa polynucleotit ngoại sinh biểu hiện hoạt tính protein hoặc polynucleotit dạng biến thể, trong đó đơn vị mã hóa được tối ưu hóa cho polynucleotit ở trên, vào tế bào chủ. Polynucleotit ngoại sinh có thể được sử dụng mà không giới hạn về nguồn gốc hoặc trình tự của nó miễn là nó thể hiện các hoạt tính giống/tương tự protein. Người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện việc thêm vào bằng cách chọn phương pháp biến nạp đã biết và protein có

thể được điều chế bởi sự biểu hiện của polynucleotit được đưa vào trong tế bào chủ để tăng hoạt tính của nó. Sự gia tăng số lượng bản sao có thể là do polynucleotit được biểu hiện sóng đôi liên tục. Trong trường hợp này, các trình tự polynucleotit mã hóa các protein sản sinh IMP khác nhau có thể xuất hiện theo cách bắt chéo, tuần tự và lặp lại. Khi polynucleotit liên tục biểu hiện ở dạng sóng đôi, một phần chồng lấp có thể xảy ra, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Cụ thể là, theo sáng chế, số lượng bản sao của trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5 có thể được tăng lên.

Ngoài ra, phương pháp 2) biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách tạo ra biến đổi trên trình tự điều hòa biểu hiện thông qua việc xóa, thêm, thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ của trình tự nucleotit hoặc kết hợp chúng; hoặc bằng cách thay thế trình tự điều hòa biểu hiện bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trình tự điều chỉnh biểu hiện bao gồm nhưng không giới hạn cụ thể ở vùng gen khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa cho vị trí gắn với ribosom và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Cụ thể là, vùng gen khởi động dị bản mạnh thay vì vùng gen khởi động nguyên bản có thể được liên kết phía trước với đơn vị biểu hiện polynucleotit và các ví dụ về vùng gen khởi động mạnh có thể bao gồm vùng gen khởi động CJ7, vùng gen khởi động lysCP1, vùng gen khởi động EF-Tu, vùng gen khởi động GroEL, vùng gen khởi động aceA hoặc aceB, v.v.. Tỷ lệ biểu hiện của polynucleotit mã hóa protein có thể được cải thiện bằng cách liên kết chức năng của chất xúc tác với polynucleotit, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Hơn nữa, phương pháp 3) biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể, mặc dù không giới hạn cụ thể ở đó, có thể được thực hiện bằng cách đưa vào biến thể của trình tự điều hòa biểu hiện thông qua việc xóa, thêm, thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ của trình tự polynucleotit hoặc kết hợp để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự polynucleotit được điều chỉnh để có hoạt tính mạnh hơn.

Cuối cùng, 4) phương pháp sửa đổi để tăng cường kết hợp từ các phương pháp 1) đến 3) có thể được thực hiện bằng cách áp dụng một hoặc nhiều phương pháp trong số phương pháp tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein, phương pháp biến đổi trình tự polynucleotit để tăng cường biểu hiện polynucleotit, và phương pháp biến

đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể và biến đổi polynucleotit ngoại sinh biểu hiện hoạt động của protein hoặc polynucleotit dạng biến thể, trong đó đơn vị mã hóa được tối ưu hóa.

Ngoài ra, rõ ràng là protein cũng có thể bao gồm polynucleotit có thể được dịch mã bởi đơn vị mã hóa thoái biến trong protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, hoặc vào protein có tương đồng của nó. Ví dụ, protein có thể bao gồm trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5. Ngoài ra, trình tự mã hóa protein có hoạt tính của protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 bằng cách lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò có thể được điều chế từ các trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit, có thể được đưa vào mà không bị giới hạn. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai hóa giữa các polynucleotit cụ thể. Những điều kiện này được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al., Sangdong). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có sự tương đồng cao (ví dụ, 40% trở lên, tốt hơn là 90% trở lên, 95% trở lên, 97% trở lên, và tốt nhất là 99% trở lên) có thể lai giữa chúng, trong khi các gen có sự tương đồng thấp hơn chúng không thể lai với nhau; hoặc các điều kiện để lai southern thông thường (nghĩa là điều kiện để rửa một lần, cụ thể là rửa hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1 × SSC (saline-sodium citrate: salin-natri xitrat), và 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate: natri đodexyl sulfat), tốt hơn là dưới 60°C, 0,1 × SSC, và 0,1% SDS, và tốt nhất là dưới 68°C, 0,1 × SSC và 0,1% SDS).

Phép lai đòi hỏi hai axit nucleic có trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ 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 với nhau. Ví dụ, liên quan đến ADN, adenosin bổ sung cho thymin và xytoxin bổ sung cho guanin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm các trình tự axit nucleic có bản chất tương tự nhau cũng như các đoạn axit nucleic bị cô lập bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể là, polynucleotit có sự tương đồng có thể được phát hiện bằng các 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. Hơn nữa, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C, nhưng sáng chế không giới hạn ở nhiệt độ này; và 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 của việc lai các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và tính bổ sung của các polynucleotit và các biến được biết đến trong kỹ thuật này (tham khảo Sambrook et al., *supra*, 9,50-9,51, 11,7-11,8).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein mong muốn, được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp sao cho protein mong muốn được biểu hiện trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể chứa vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự vận hành nào để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí ribosom liên kết với ARN thông tin phù hợp và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi được biến nạp trong tế bào chủ thích hợp, vector có thể được sao chép hoặc thực hiện chức năng của nó thông qua bộ gen của vật chủ, hoặc có thể được tích hợp vào chính bộ gen của nó.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, và bất kỳ vector nào được biết đến trong kỹ thuật này đều có thể được sử dụng. Ví dụ về vector thường được sử dụng bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmid, virus và vi khuẩn. Ví dụ, pwe15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A có thể được sử dụng làm vector phage hoặc vector cosmid; và vector gốc pBR, gốc pUC, gốc pBluescriptII, gốc pGEM, gốc pTZ, gốc pCL và gốc pET có thể được sử dụng như vector plasmid. Cụ thể, các vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 và pCC1BAC có thể được sử dụng, nhưng vector không bị giới hạn ở đây.

Vector có thể được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn vào nhiễm sắc thể nội bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào, ví dụ, bằng cách tái tổ hợp tương đồng, nhưng sáng chế không giới hạn ở phương pháp này. Vector có thể chứa dấu chọn lọc để chỉ ra việc chèn vector vào nhiễm sắc thể. Được sử dụng để chỉ ra tế bào được biến nạp với vector, tức là, xem gen đích có được đưa vào bộ gen của tế bào chủ hay không, dấu hiệu chọn lọc có thể cung cấp cho tế bào khả năng kháng thuốc, kháng tác nhân gây độc tế bào, khuyết dưỡng hoặc chọn lọc biểu

hiện kiểu hình như biểu hiện protein bề mặt. Trong môi trường có tác nhân chọn lọc được xử lý, chỉ các tế bào biểu hiện có dấu chọn lọc tồn tại hoặc biểu hiện kiểu hình khác, và do đó các tế bào được biến nạp có thể được chọn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích được đưa vào tế bào chủ, sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có khả năng biểu hiện trong tế bào chủ. Polynucleotit được biến nạp có thể là bất kể vị trí nào miễn là polypeptit có khả năng biểu hiện trong tế bào chủ, bất kể polynucleotit được chèn và định vị vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hay nằm ở phần ngoài của nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN, mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào với bất kỳ hình dạng nào miễn là polynucleotit có khả năng được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào 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 được liên kết chức năng với polynucleotit. Các catxet biểu hiện có thể là vector biểu hiện thực hiện tự sao chép. Ngoài ra, chính polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ để được liên kết chức năng với trình tự cần thiết cho biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Phương pháp biến nạp bao gồm bất kỳ phương pháp đưa axit nucleic vào tế bào và có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp được biết đến trong kỹ thuật này. Ví dụ, các ví dụ về phương pháp này có thể bao gồm điện biến nạp, canxi photphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kết tủa, canxi clorua (CaCl_2) kết tủa, vi tiêm, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật liposom cation, kỹ thuật lithium axetat-DMSO (đimetyl sulfoxit), nhưng sáng chế không giới hạn ở các kỹ thuật này.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết chức năng” tham chiếu đến liên kết chức năng giữa trình tự vùng gen khởi động, bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế và trình tự polynucleotit. Liên kết chức năng có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen được biết đến trong kỹ thuật này, sự phân tách và cắt ADN tại vị trí cụ thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng enzym giới hạn và ligaza trong kỹ thuật này, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản

sinh IMP” đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh IMP thông qua hình thức tự nhiên hoặc biến thể của nó. Cụ thể là, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh IMP có thể là vi sinh vật đã tăng cường khả năng sản sinh IMP bằng cách chèn gen liên quan đến cơ chế sản xuất của chủng bản địa hoặc IMP ngoại sinh, hoặc bằng cách tăng cường hoặc làm suy yếu hoạt động của gen nội sinh. Cụ thể hơn là, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh IMP có thể là vi sinh vật trong đó khả năng sản sinh IMP được cải thiện so với chủng gốc trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Theo sáng chế, “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. Cụ thể hơn là, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium stationis*. Ví dụ cụ thể của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium stationis* có khả năng sản sinh IMP được cải thiện bằng cách tăng cường hoạt tính của protein có chức năng sản sinh IMP ra bên ngoài tế bào, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế IMP bao gồm nuôi cấy vi sinh vật của chi *Corynebacterium* có hoạt tính tăng cường của protein sản sinh IMP trong môi trường nuôi cấy.

Cụ thể là, phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi IMP từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

Trong phương pháp, nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy theo mẻ-bổ sung thức ăn đã được biết đến trong kỹ thuật này. Hơn nữa, đối với điều kiện nuôi cấy, độ pH thích hợp (tức là, độ pH từ 5 đến 9, tốt hơn là độ pH từ 6 đến 8, và tốt nhất là độ pH 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hợp chất hóa học bazơ (tức là, natri hydroxit, kali hydroxit, amoniac) hoặc hợp chất hóa học axit (tức là, axit phosphoric hoặc axit sunfuric). Ngoài ra, điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách đưa 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. Hơn nữa, thời gian nuôi có thể khoảng 10 đến 160 giờ. Tuy nhiên, điều kiện

nuôi cấy không bị giới hạn ở đây. IMP được sản xuất ra bằng cách nuôi cấy nêu trên có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể vẫn còn bên trong tế bào.

Hơn nữa, môi trường nuôi cấy có thể chứa đường và cacbohyđrat (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) riêng lẻ hoặc kết hợp như nguồn cacbon, nhưng môi trường nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, chiết xuất nấm men, canh thịt, chiết xuất mạch nha, dịch chiết ngô, bột đậu nành và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, phosphat hoặc amoni, amoni cacbonat và amoni nitrat) riêng lẻ hoặc kết hợp như nguồn nitơ, nhưng môi trường nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa kali đihiđrogen phosphat, đipotali hiđro phosphat hoặc muối có chứa natri tương ứng riêng lẻ hoặc kết hợp như nguồn phospho, nhưng môi trường nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa các chất kích thích tăng trưởng thiết yếu khác bao gồm muối kim loại (ví dụ, magie sunfat hoặc sắt sunfat), axit amin và vitamin.

Phương pháp của sáng chế để thu hồi IMP được tạo ra từ phương pháp nuôi cấy ở trên có thể thu IMP mong muốn từ môi trường nuôi cấy bằng phương pháp phù hợp đã được biết đến trong kỹ thuật này theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu suất cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), v.v. có thể được sử dụng và IMP mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng phương pháp phù hợp đã được biết đến trong kỹ thuật này.

Ngoài ra, phương pháp thu hồi nêu trên có thể gồm quy trình tinh sạch và có thể được thực hiện bằng phương pháp phù hợp đã được biết đến trong kỹ thuật này. Do đó, IMP thu hồi có thể ở dạng tinh khiết hoặc canh lên men vi sinh vật có chứa IMP.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm để sản xuất IMP bao gồm protein theo sáng chế chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, hoặc polynucleotit mã hóa protein này.

Chế phẩm của sáng chế có thể còn bao gồm nhưng không giới hạn ở thành phần

có khả năng có chức năng của polynucleotit. Ngoài ra, trong chế phẩm của sáng chế, polynucleotit có thể ở dạng được chứa trong vectơ để biểu hiện gen liên kết chức năng trong tế bào chủ có thể được đưa vào.

Ngoài ra, chế phẩm có thể còn bao gồm bất kỳ tá dược nào phù hợp thường được sử dụng trong chế phẩm để sản xuất IMP. Các tá dược như vậy có thể là chất bảo quản, chất làm ẩm, dịch huyền phù, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất đẳng trương, nhưng sáng chế không giới hạn ở các tá dược này.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp để tăng sản sinh IMP bao gồm tăng cường hoạt tính của protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Các thuật ngữ “protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2”, “nâng cao”, và “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” như được mô tả ở trên.

Các ví dụ của sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án ưu tiên. Tuy nhiên, các phương án ưu tiên chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án ưu tiên. 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: Tạo ngân hàng bộ gen ADN

Ngân hàng bộ gen ADN của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 đã được điều chế để xác định protein màng của *Corynebacterium* liên quan đến việc sản sinh IMP.

Sau đó, do chủng *Corynebacterium* hoang dại không thể tạo ra IMP, hoặc ngay cả khi nó tạo ra IMP, nó chỉ tạo ra một lượng nhỏ, trong khi đó, chủng khác có tên là *CJI0323* có khả năng sản sinh ra IMP, có nguồn gốc từ chủng *ATCC6872* đã được điều chế cho việc xác định khả năng sản sinh IMP. Chủng *CJI0323* được điều chế đã được sàng lọc các protein màng liên quan đến việc sản sinh bằng cách sử dụng ngân hàng bộ gen ADN của chủng *ATCC6872*. Các chi tiết cụ thể của thí nghiệm như sau.

Ví dụ 1-1: Lựa chọn chủng sản sinh IMP, *CJI0323*

Chủng *ATCC6872* được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0) hoặc đệm xitrat (độ pH 5,5) ở nồng độ 10^7 tế bào/mL đến 10^8 tế bào/mL để điều chế chủng sản xuất IMP có nguồn gốc *ATCC6872* và các tế bào đã được xử lý bằng tia cực tím để gây đột biến. Các tế bào thu được được rửa hai lần bằng dung dịch muối 0,85%, sau đó pha loãng và đặt lên đĩa trong môi trường nuôi cấy chứa nồng độ thích hợp nguyên liệu cung cấp sức đề kháng vào môi trường tối thiểu chứa aga 1,7%, và các khuẩn lạc được lấy sau đó. Mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy các khuẩn lạc trong 3 đến 4 ngày trong môi trường lên men, khuẩn lạc có khả năng sản sinh IMP cao nhất được tích lũy trong môi trường nuôi cấy đã được chọn. Trong quá trình điều chế chủng có khả năng sản sinh IMP ở nồng độ cao, để cung cấp khuyết dưỡng adenin, ròi ri guanin, nhạy cảm với lysozym, kháng 3,4-đihydroprolin, kháng streptomycin, kháng axit azetidin cacboxylic, kháng thiaprolin, kháng azaserin, kháng sulfaguanidin, kháng Norvalin, và kháng trimethoprim, các quy trình trên được thực hiện tuần tự cho từng nguyên liệu. Kết quả là, cuối cùng đã chọn được *CJI0323* cho thấy khả năng chống lại các nguyên liệu trên và có khả năng tốt để sản xuất IMP. Mức độ kháng giữa *ATCC6872* và *CJI0323* đã được so sánh và kết quả được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Đặc điểm	<i>ATCC6872</i>	<i>CJI0323</i>
Khuyết dưỡng Adenin	Không khuyết dưỡng	Khuyết dưỡng
Khuyết dưỡng Guanin	Không khuyết dưỡng	Khuyết dưỡng không hoàn toàn
Độ nhạy cảm với Lysozym	80 µg/mL	8 µg/mL
Kháng 3,4-đihydroprolin	1.000 µg/mL	3.500 µg/mL
Kháng Streptomycin	500 µg/mL	2.000 µg/mL
Kháng axit Azetidin cacboxylic	5 mg/mL	30 mg/mL
Kháng Thiaprolin	10 µg/mL	100 µg/mL
Kháng Azaserin	25 µg/mL	100 µg/mL
Kháng Sulfaguanidin	50 µg/mL	200 µg/mL
Kháng Norvalin	0,2 mg/mL	2 mg/mL
Kháng Trimethoprim	20 µg/mL	100 µg/mL

Thành phần của môi trường nuôi cấy như sau:

- Môi trường tối thiểu: 2% glucoza, 0,3% natri sulfat, 0,1% KH_2SO_4 , 0,3% K_2HPO_4 , 0,3% sulfat magie, canxi clorua (10 mg/L), sulfat sắt (10 mg/L), kẽm sulfat (1 mg/L), mangan clorua (3,6 mg/L), L-xystein (20 mg/L), canxi pantothenat (10 mg/L), thiamin hydroclorua (5 mg/L), biotin (30 $\mu\text{g/L}$), adenin (20 mg/L), guanin (20 mg/L), pH 7,3.

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

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

- Môi trường lên men: 0,1% natri glutamat, 1% amoni clorua, 1,2% magie sunfat, 0,01% canxi clorua, sắt sunfat (20 mg/L), mangan sulfat (20 mg/L), kẽm sulfat (20 mg/L), đồng sunfat (5 mg/L), L-xystein (23 mg/L), alanin (24 mg/L), axit nicotinic (8 mg/L), biotin (45 $\mu\text{g/L}$), thiamin hydroclorua (5 mg/L), adenin (30 mg/L), 1,9% axit photphoric (85%), 2,55% glucoza, 1,45% fructoza.

Ví dụ 1-2: Các thí nghiệm về hàm lượng lên men của *CJI0323*

Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) được pha vào các ống nghiệm (đường kính: 18 mm), tiếp theo ống nghiệm được hấp khử trùng và lần lượt cấy chuyển với *ATCC6872* và *CJI0323*. Sau đó, các kết quả được nuôi cấy lắc ở 30°C trong 24 giờ và sau đó được sử dụng làm dung dịch nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha vào bình tam giác (250 mL) hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Sau đó, mỗi dung dịch nuôi cấy giống (2 mL) được cấy chuyển vào bình tam giác và nuôi cấy trong 3 ngày. Các điều kiện nuôi cấy được đặt ở 170 vòng/phút, 30°C và pH là 7,5.

Sau khi nuôi cấy, lượng IMP sản xuất được đo bằng HPLC (SHIMADZU LC20A) và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 2 bên dưới.

Bảng 2

Chủng	IMP (g/L)
<i>ATCC6872</i>	0
<i>CJI0323</i>	9,52

Ví dụ 1-3: Khảo sát sự sản sinh protein

Các điều kiện sàng lọc cho thấy sự ức chế tăng trưởng của chủng *CJI0323* đã được

thiết lập bằng cách bổ sung IMP vào môi trường tối thiểu chứa aga 1,7%. Các plasmit của thư viện gen của chủng *ATCC6872* đã được biến nạp vào chủng *CJI0323* bằng phương pháp điện biến nạp (van der Rest *et al.* 1999). Những khuẩn lạc trong đó ức chế tăng trưởng được giải phóng trong điều kiện nuôi cấy được bổ sung lượng dư IMP được chọn. Plasmit thu được từ các khuẩn lạc được chọn và được phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự. Kết quả là, một loại protein màng liên quan đến việc giải phóng sự ức chế tăng trưởng đã được xác định trong điều kiện lượng dư IMP được bổ sung.

Một loại protein màng từ *Corynebacterium* đã được xác định dựa trên trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795121, chất vận chuyển MFS). Protein màng được biết đến như là chất vận chuyển MFS nhưng chức năng cụ thể của nó chưa được xác nhận. Theo sáng chế, protein màng được định danh là ImpE2(WT).

Ví dụ 2: Xác định ImpE1 và ImpE2

Ví dụ 2-1: Xác nhận *impE1* và *impE2*

Để kiểm tra chức năng của protein màng ImpE2, cấu trúc gen có mã nhận biết SEQ ID NO: 5 đã được xác nhận trong NCBI (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795121, chất vận chuyển MFS). Do đó, có thể xác nhận rằng phần phân chia khởi đầu 7 bp của ORF SEQ ID NO: 5 (*impE2*) chồng lấp trong 7bp với một gen khác (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795119, chất điều hòa phiên mã), nằm ở phía sau của *impE2*. Do chức năng của gen nằm ở phía trước của *impE2* và protein được mã hóa bởi gen chưa được xác nhận, nên trong sáng chế, protein được đặt tên là ImpE1 (WT) (trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4).

Ví dụ 2-2: Điều chế các vector khuyết *impE1*- hoặc *impE2*

Để xác nhận có hay không khả năng sản sinh IMP bị giảm khi mà ImpE1 và ImE2 có liên quan đến việc giải phóng ức chế tăng trưởng bởi IMP như được xác định trong các ví dụ 1 và ví dụ 2-1 được xóa, sự điều chế các vector khuyết được thực nghiệm cho từng gen.

Dùng PCR (Polymerase chain reaction: Phản ứng chuỗi polymeraza) với hệ gen ADN làm mạch khuôn là *ATCC6872* để thu được các đoạn gen trong vector đã được điều

chế.

Cụ thể, *impE1* được PCR với các đoạn môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 và cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, *impE2* được PCR với cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11 và cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13. Trình tự các đoạn môi được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

SEQ ID NO	Đoạn môi	Trình tự (5' đến 3')
5	<i>impE1</i> kop-1	GCTCTAGACGAGAAAGCTAAAGCCGGTGA
6	<i>impE1</i> kop-2	GTTTTTAGCTACCATTGTTACACCCCGTGCAAGTTT
7	<i>impE1</i> kop-3	GCACGGGGTGTAACAATGGTAGCTAAAACTCCACC
8	<i>impE1</i> kop-4	GCTCTAGAAATAGTTGGGGAAGTCCACTC
9	<i>impE2</i> kop-1	GCTCTAGACTTGGATGACCTGGTGGAAAA
10	<i>impE2</i> kop-2	CTTGGAGAAAATTTCTACCATTCCAGTCCTTTCGT
11	<i>impE2</i> kop-3	GGACTGGAATGGTAGGAAATTTTCTCCAAGGGAAAT
12	<i>impE2</i> kop-4	GGACTAGTGGATTGTGTTGACGCACGATG
13	<i>impE1E2</i> kop-2	CTTGGAGAAAATTTCTGTTACACCCCGTGCAAGTTT
14	<i>impE1E2</i> kop-3	GCACGGGGTGTAACAGAAATTTTCTCCAAGGGAAAT

Cụ thể, các đoạn môi được sử dụng đã được điều chế dựa trên thông tin về gen của *Corynebacterium stationis* (ATCC6872) (Ngân hàng Gen NCBI: NZ_CP014279) được đăng ký tại Ngân hàng Gen NIH và các trình tự nucleotit liên kế sau đó.

PCR được thực hiện bằng cách biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 25 chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở 52°C trong 30 phút, và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và sau đó trùng hợp cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. PCR chồng lắp được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn gen *impE1* làm mạch khuôn, được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, và cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, và kết quả là thu được mạch khuôn polynucleotit (1,8 kbp). Đoạn gen thu được được phân cắt với enzym giới hạn XbaI. pDZ- Δ *impE1* được chuẩn bằng cách sử dụng vector pDZ (Patent của Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn quốc tế số 2008-033001) thu được bằng cách phân cắt với các enzym giới hạn XbaI và T4 ligaza. Ngoài ra, PCR chồng lắp được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn gen *impE2* khuếch đại bằng cách sử dụng cặp môi có mã nhận

biết SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11 và hai đoạn gen *impE2* được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13 làm mạch khuôn, và kết quả là thu được mạch khuôn polynucleotit (1,7 kbp). Các đoạn gen thu được được phân cắt với enzym giới hạn *XbaI* và *speI*. Các đoạn gen sau khi được phân cắt với enzym giới hạn được nhân dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza gắn vào vector *pDZ* đã được phân cắt với enzym giới hạn *XbaI* và do đó vector *pDZ-ΔimpE2* đã được điều chế.

Ví dụ 2-3: Điều chế các vector khuyết *impE1*- và *impE2*

Do gen *impE1* và *impE2* mã hóa các protein liên quan đến việc giải phóng sự ức chế tăng trưởng gây ra bởi IMP bị chồng lấp, nên cần phải điều chỉnh đồng thời cả hai gen. Do vậy, các thực nghiệm đã được thực hiện để điều chế vector trong đó cả *impE1* và *impE2* đều thiếu.

Đối với phản ứng PCR gen *impE1* và *impE2*, các đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 13 và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 12 đã được sử dụng. Các đoạn mồi được sử dụng đã được điều chế dựa trên thông tin về gen của *Corynebacterium Stationis* (ATCC6872) (ngân hàng Gen NCBI: NZ_CP014279) được đăng ký tại Ngân hàng Gen NIH và các trình tự nucleotit liên kề. PCR chồng lấp được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn gen *impE1* được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 14, và hai đoạn của gen *impE2* được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 13 làm mạch khuôn, và kết quả là đã thu được mạch khuôn polynucleotit (2,0 kbp). Các đoạn gen thu được đã có sẵn thứ tự cắt bằng *XbaI* và *speI*, tương ứng. Các đoạn gen thu được được phân cắt với enzym giới hạn được nhân dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza gắn vào vector *pDZ* đã được phân cắt với enzym giới hạn *XbaI*, và do đó vector *pDZ-ΔimpE1E2* đã được điều chế.

Ví dụ 2-4: Điều chế các chủng thiếu *impE1*- và *impE2*

Hai plasmit được điều chế trong ví dụ 2-2 và một plasmit được điều chế trong ví dụ 2-3 được biến nạp vào chủng *CJI0323* bằng phương pháp điện biến nạp (sử dụng phương pháp biến nạp được mô tả trong Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541 đến 545). Các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các

chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Sự thiếu hụt di truyền ở các chủng biến đổi cuối cùng được xác định bằng cách thực hiện PCR sử dụng các đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 13.

Chủng được chọn có tên là *CJI0323_ΔimpE1*, *CJI0323_ΔimpE2*, và *CJI0323_ΔimpE1E2*. Ngoài ra, khả năng sản sinh IMP của các chủng này đã được đánh giá.

Môi trường nuôi cấy giống (2 mL) đã được pha vào các ống nghiệm (đường kính: 18 mm), sau đó được hấp khử trùng, lần lượt được cấy chuyển với *CJI0323*, *CJI0323_ΔimpE1*, *CJI0323_ΔimpE2* và *CJI0323_ΔimpE1E2* nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ và được sử dụng làm dung dịch nuôi cấy giống. Môi trường lên men (29 mL) được pha vào bình tam giác (250 mL) để lắc và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Sau đó, mỗi bình được bổ sung dung dịch nuôi cấy giống (2 mL) vào đó, và sản phẩm thu được được nuôi cấy trong 3 ngày. Các điều kiện nuôi cấy được đặt ở 170 vòng/phút, 30°C và độ pH là 7,5.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản xuất được đo bằng HPLC và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Chủng	IMP (g/L)
<i>CJI0323</i>	9,52
<i>CJI0323_ΔimpE1</i>	1,92
<i>CJI0323_ΔimpE2</i>	1,88
<i>CJI0323_ΔimpE1E2</i>	1,80

Lượng IMP tích lũy trong mỗi chủng được so sánh với chủng bố mẹ, *Corynebacterium stationis CJI0323*. Kết quả là, như thể hiện trong Bảng 4 ở trên, nồng độ IMP của các chủng *CJI0323_ΔimpE1*, *CJI0323_ΔimpE2* và *CJI0323_ΔimpE1E2* đã giảm khoảng 8 g/L trong cùng điều kiện so với chủng bố mẹ, do đó có thể xác nhận rằng Imp1 và ImpE2 là các protein liên quan đến việc sản sinh IMP.

Ví dụ 3: Tăng cường *impE1* và *impE2* hoang dại

Chủng hoang dại của chi *Corynebacterium* không thể sản sinh IMP, hoặc ngay cả khi nó sản sinh IMP, thì chỉ sản sinh một lượng nhỏ. Do đó, chủng có tên là *CJI0323* có

khả năng sản sinh ra IMP, protein ImpE đã bị loại bỏ và sau đó được phục hồi bằng cách đưa ImpE vào protein của chủng hoang dại. Hơn nữa, hoạt tính của ImpE đã được cải thiện; do đó có thể xác nhận rằng khả năng sản sinh IMP đã tăng lên nhờ tăng cường ImpE kiểu hoang dại. Nâng cao hoạt tính protein đã đạt được bằng cách sử dụng phương pháp “tăng số lượng bản sao” và phương pháp tăng cường vùng gen khởi động, là một trong số các phương pháp tăng cường.

Ví dụ 3-1: Điều chế vector đã được đưa vào *impE1*- và *impE2* hoang dại

Để điều chế chủng trong đó chứa ImpE hoang dại được đưa vào, các đoạn gen để điều chế vector thu được thông qua PCR sử dụng bộ gen ADN ATCC6872 làm mạch khuôn. Sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 13 trong phản ứng PCR cho *impE1* và *impE2* hoang dại. Toàn bộ các đoạn gen của *impE1-impE2* hoang dại đã được phân cắt với các enzyme giới hạn XbaI và SpeI, được khuếch đại bằng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 13, sau đó được nhân dòng vào vị trí enzyme giới hạn XbaI của vector pDZ để điều chế pDZ-*impE1E2* (WT).

Ví dụ 3-2: Điều chế vector được tăng cường *impE1*- hoang dại

Để tạo ra vector được tăng cường *impE1*, các đoạn gen để điều chế vector đã thu được bằng PCR sử dụng bộ gen ADN của ATCC6872 làm mạch khuôn. Để tăng cường *impE1*, cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17 chứa khoảng 370 bp ở phía trước *impE1* là vùng gen khởi động được cân nhắc tăng cường. Các đoạn gen *impE1* đã tăng cường được phân cắt với enzyme giới hạn XbaI và sau đó được nhân dòng vào vị trí enzyme giới hạn XbaI của vector pDZ để điều chế pDZ-*impE1E2*(WT). Sau đó, để điều chế 2 bản sao của vector *impE1* được trải qua PCR với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19. Mỗi đoạn ADN thu được được phân cắt với enzyme giới hạn NotI là enzyme giới hạn ADN, sau đó được nhân dòng vào trong vector DZ-*impE1*(WT)2-1 đã được phân cắt với enzyme giới hạn ADN. Vector được điều chế được gọi là pDZ-*impE1*(WT) 2X.

Ví dụ 3-3: Điều chế vector được tăng cường *impE1*-và *impE2*- hoang dại

Để điều chế chủng trong đó cả hai *impE1*-và *impE2* đã được tăng cường, các gen tích hợp của *impE1*-và *impE2* hoang dại được tăng cường bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 20. Các đoạn gen thu được được phân cắt enzyme giới hạn XbaI, sau đó được nhân dòng vào vị trí enzyme giới hạn

XbaI của vector pDZ để điều chế pDZ-impE1E2(WT)2-1. Sau đó, để điều chế 2 bản sao của vector, *impE1E2* trải qua phản ứng PCR với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21 được sử dụng. Mỗi một đoạn ADN thu được được phân cắt với enzym giới hạn NotI là enzym giới hạn ADN, và được nhân dòng vào trong pDZ-impE1E2(WT)2-1 đã được phân cắt với enzym giới hạn ADN. Vector được điều chế được gọi là pDZ-impE1E2(WT) 2X. Trình tự các cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
16	impE1 2-1	GCTCTAGAGAACGGAGTCATCTCCTTTGC
17	impE1 2-2	GGGTCTAGAGAAGCGGCCGCCTACCATTCCAGTCCTTTTCGT
18	impE1 2-3	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAACGGAGTCATCTCCTTTGC
19	impE1 2-4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCTACCATTCCAGTCCTTTTCGT
20	impE1E2 2-2	GGGTCTAGAGAAGCGGCCGCCCAAACGCTCTGCAAGAAACTG
21	impE1E2 2-4	ATAAGAATGCGGCCGC CCAAACGCTCTGCAAGAAACTG

Ví dụ 3-4: Đánh giá các chủng được tăng cường/đưa vào *impE1* và *impE2* hoang dại

Vector pDZ-impE1E2(WT) được điều chế trong ví dụ 3-1 được biến nạp vào trong pDZ-impE1E2(WT), chủng được điều chế ở ví dụ 2 bằng điện biến nạp (sử dụng phương pháp biến nạp được thể hiện trong Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541 đến 545). Sau đó, các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Các gen được đưa vào trong các chủng biến nạp cuối cùng đã được xác nhận bằng cách thực hiện PCR bằng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 13. Sau đó, chủng đã được điều chế là CJI0323_Δ*impE1E2*_impE1E2(WT) được đánh giá để xác định khả năng sản sinh IMP sau khi *impE1* và *impE2* hoang dại được đưa vào trong chủng CJI0323.

Ngoài ra, vector pDZ-impE1(WT) 2X và pDZ-impE1E2(WT) 2X được biến nạp vào chủng CJI0323_Δ*impE1E2*_impE1E2(WT) bằng điện biến nạp, và sau đó, các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được lựa chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng

sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Sự tăng cường gen trong các chủng biến nạp cuối cùng đã được xác nhận bằng cách thực hiện phản ứng PCR bằng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 19 và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 21. CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT), CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1(WT) 2X, và CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1E2(WT) 2X được nuôi cấy theo cùng cách như trong ví dụ 2-4 để thu được các chủng, và khả năng sản sinh IMP của các chủng trên được đánh giá. Sau khi nuôi cấy hoàn thành, lượng IMP sản sinh được đo bằng HPLC và kết quả nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Chủng	IMP (g/L)
CJI0323_ΔimpE1E2	1,80
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)	2,32
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1(WT) 2X	2,52
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1E2(WT) 2X	2,97

Lượng IMP tích lũy trong mỗi chủng được so sánh với chủng gốc, *Corynebacterium stationis* CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT). Kết quả là, như thể hiện trong Bảng 6 ở trên, nồng độ IMP của các chủng có hoạt tính của ImpE1 hoặc ImpE1 và ImpE2 đồng thời được tăng cường trong cùng các điều kiện và tăng lên 28%. Đối với vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, không tạo ra IMP hoặc tạo ra lượng rất nhỏ, sự gia tăng sản xuất IMP do sự gia tăng hoạt tính của protein ImpE, có thể được hiểu là rất có ý nghĩa.

Các chủng được điều chế là CJI0323 và CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2 (WT) _impE1E2 (WT) 2X (CJI2236) lần lượt được đặt tên là *Corynebacterium Stationis* CN01-0323 và *Corynebacterium Stationis* CN01-2236. Các chủng đã được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest đến Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 7 tháng 11 năm 2017 và ngày 25 tháng 10 năm 2017, tương ứng. Ngoài ra, các chủng được định danh lần lượt là KCCM12151P và KCCM12137P.

Ví dụ 3-5: Điều chế vector được tăng cường vùng gen khởi động cải tiến của *impE1* hoặc *impE2* hoang dại

Các đoạn để điều chế vector để thay thế vùng gen khởi động của mỗi gen bằng vùng

gen khởi động được tăng cường được thu được bằng PCR sử dụng làm mạch khuôn ADN là *ATCC6872*

Để tăng cường vùng gen khởi động, vùng gen khởi động Pcj7 (Công bố Patent không xét nghiệm của Hàn Quốc số 10-0620092) được báo cáo là biểu hiện mạnh trong chủng *Corynebacterium stationis* được sử dụng.

Thực hiện PCR cho *impE1*, mỗi đoạn gen được nâng cao bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 13 và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25 đã được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và NdeI, sau đó được nhân dòng vào trong vị trí enzym giới hạn XbaI của vector pDZ. Để khuếch đại các đoạn gen Pcj7, các đoạn thu được bằng cách thực hiện PCR với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31 sử dụng bộ gen ADN ATCC6872 làm mạch khuôn được xử lý bằng NdeI, và vector đã được điều chế được xử lý bằng NdeI để tạo ra vector pDZ -Pcj7_ *impE1* (WT).

Thực hiện PCR cho *impE2*, mỗi đoạn gen được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27 và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29 được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và NdeI, sau đó được nhân dòng vào trong vị trí enzym giới hạn XbaI của vector pDZ. Các đoạn gen Pcj7 thu được và vector đã được điều chế được xử lý với enzym NdeI để điều chế vector pDZ-Pcj7_ *impE2*(WT). Trình tự các đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Trình tự (5' đến 3')
22	<i>impE1</i> Pcj7-1	GCTCTAGAGGTGAGCGCGAAGGGGACGCG
23	<i>impE1</i> Pcj7-2	GGAATTCCATATGTGTTACACCCCGTGCAAGTTT
24	<i>impE1</i> Pcj7-3	GGAATTCCATATGCATGCTGTGCAAGAAGTT
25	<i>impE1</i> Pcj7-4	GCTCTAGATTGAGCATTTGGCCACTGGGAA
26	<i>impE2</i> Pcj7-1	GCTCTAGATTGCATGCTGTGCAAGAAGTT
27	<i>impE2</i> Pcj7-2	GGAATTCCATATGCTACCATTCAGTCCTTTCGT
28	<i>impE2</i> Pcj7-3	GGAATTCCATATGGTAGCTAAAACTCCACC
29	<i>impE2</i> Pcj7-4	GCTCTAGAAATAGTTGGGGAAGTCCACTC
30	Pcj7 F	GGAATTCCATATGTCCCAGCGCTACTAATAGG
31	Pcj7 R	GGAATTCCATATGGAGTGTTTCCTTTCGTTGGG

Ví dụ 3-6: Đánh giá các chủng trong đó các vùng gen khởi động *impE1* và *impE2*

hoang đại được thay thế

Hai plasmit được điều chế trong ví dụ 4-1 được biến nạp vào trong chủng CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT), chủng được điều chế trong ví dụ 3-3 bằng điện biến nạp (sử dụng phương pháp biến nạp được thể hiện trong Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541 đến 545). Sau đó, các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Sự tăng cường các chủng biến nạp cuối cùng đã được xác nhận bằng cách thực hiện PCR bằng các đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27. Hai chủng được điều chế ở trên được định danh là CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT) và CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT). Ngoài ra, dựa trên chủng đã được điều chế, CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT), pDZ-Pcj7_impE2(WT) được biến nạp. Sau đó các chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Sự tăng cường gen trong các chủng biến nạp cuối cùng đã được xác định bằng cách thực hiện PCR bằng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 29. Hai chủng được điều chế ở trên được định danh là CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT). Sau đó, mỗi chủng được điều chế, CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT), CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT), và CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT) được nuôi cấy trong cùng một cách như trong ví dụ 2-4 và sau đó đánh giá khả năng sản sinh IMP.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hàm lượng IMP sản sinh được đo bằng HPLC và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

Chủng	IMP (g/L)
CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)	2,32
CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)	2,47
CJI0323_ Δ impE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT)	2,81

CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT)	2,97
--	------

Lượng IMP tích lũy trong mỗi chủng được so sánh với chủng gốc, *Corynebacterium stationis* CJI0323. Kết quả là, có thể thấy rằng như thể hiện trong Bảng 8 ở trên, nồng độ IMP của các chủng trong đó hoạt tính ImpE1 và/hoặc ImpE2 nâng cao được tăng lên 28% trong các điều kiện giống nhau.

Để điều chế chủng CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT) và CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT) được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest đến Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 2 tháng 11 năm 2018. Ngoài ra, các chủng lần lượt được định danh là KCCM12357P và KCCM12358P.

Ví dụ 4: Tăng cường chủng sản sinh IMP dựa trên *impE1* và *impE2*

Ví dụ 4-1: Điều chế chủng sản sinh IMP dựa trên *impE1* và *impE2*

Để xác nhận ảnh hưởng hiệu quả nâng cao của *impE1* và *impE2*, chủng sản sinh IMP được điều chế có hoạt tính adenylosuccinat synthetaza và enzym khử hydrogen của IMP tương ứng với con đường thoái biến của *ATCC6872* bị suy giảm. Đơn vị mã hóa khởi đầu được thay đổi bằng cách thay đổi bazơ đầu tiên từ ‘a’ thành ‘t’ trong trình tự nucleotit của gen *purA* và *guaB* mã hóa cho hai enzym trên. Chủng trong đó biểu hiện hai gen trên bị suy giảm trong *ATCC6872* được định danh là CJI9088. Vector pDZ-*impE1*(WT) 2X và pDZ-*impE1E2*(WT)2X được điều chế trong ví dụ 3-3 được biến nạp vào chủng CJI9088 bằng điện biến nạp, và các chủng trong đó các vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã được lựa chọn trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp được lựa chọn đã trải qua lai chéo lần thứ hai. Sự đưa vào gen trong các chủng biến nạp cuối cùng đã được xác nhận bằng cách thực hiện PCR bằng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 13.

Sự sản sinh IMP của CJI9088 và chủng đã điều chế CJI9088_*impE1*(WT)2X và CJI9088_*impE1E2*(WT)2X được đánh giá. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, khả năng sản sinh IMP được đo bằng HPLC và kết quả nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

Chủng	IMP (g/L)
CJI9088	0,52
CJI9088_ <i>impE1</i> (WT) 2X	0,68

CJI9088_impE1E2(WT) 2X	0,87
------------------------	------

Theo kết quả bên trên có thể xác nhận rằng lượng IMP được sản sinh tích lũy trong môi trường, khả năng sản sinh IMP được tăng lên tới 67% so với chủng gốc *CJI9088*. Từ kết quả nêu trên, có thể xác nhận rằng khả năng sản sinh IMP có thể được tăng lên bằng cách tăng cường hoạt tính của protein (ImpE) sản sinh IMP trong sáng chế này.

Từ phân mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rằng sáng chế này có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không sửa đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc đặc điểm thiết yếu 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 được thực hiện nằm trong nguyên lý kỹ thuật và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-inosin monophosphat có hoạt tính protein được nâng cao chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật của chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-inosin monophosphat là *Corynebacterium stationis*.
3. Phương pháp điều chế 5'-inosin monophosphat bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 1 trong môi trường nuôi cấy; và thu hồi 5'-inosin monophosphat từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh 5'-inosin monophosphat là *Corynebacterium stationis*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> VI SINH VẬT SẢN SINH IMP, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ IMP
 <130> OPA18596
 <150> KR10-2017-0173504
 <151> 2017-12-15
 <160> 31
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> ImpE1
 <400> 1
 Leu His Ala Val Gln Glu Val Asn Asp Asn Glu Glu Asp Ser Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Asp Leu Gly Leu Arg Glu Gln Lys Arg Leu Ala Thr Lys His
 20 25 30
 Arg Ile Glu Asp Ala Ala Thr Arg Leu Val Asp Glu Ser Ser Phe Asp
 35 40 45
 Lys Val Thr Ile Glu Glu Ile Cys Glu Ala Ala Gly Ile Ser Arg Arg
 50 55 60
 Thr Phe Phe Asn Tyr Phe Ser Thr Lys Glu Ser Ala Val Ile Gly Ala
 65 70 75 80
 Ser Ser Glu Pro Leu Thr Glu Lys Gln Arg Asn Asp Phe Leu Asn Ala
 85 90 95
 Asp Ala Ser Asn Leu Leu Gln Leu Met Val Glu Gln Ile Lys Gln His
 100 105 110
 Leu Glu Ser Ser His Gln Ser Gln Ala Ile His Asp Arg Arg Gln Arg
 115 120 125
 Ile Phe Ala Asp Pro Asp Val Ala Val Arg Ala Met Ala Phe Arg Lys
 130 135 140
 Glu Arg Ser Arg Glu Thr Met Glu Leu Ile Ala Gln Arg Leu Arg Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Glu Gln Arg Ala Pro Glu Leu Asp Pro Glu Thr Glu Ala
 165 170 175
 Met Leu Leu Ser Gly Phe Ile Arg Glu Ala Thr Trp Met Ala Ile Ser

39171

					180						185						190
Arg	Pro	Asp	Arg	Asp	Cys	Ala	Leu	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Ile	Tyr	Arg		
		195					200					205					
Ala	Met	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Tyr	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp				
	210					215					220						
<210>	2																
<211>	549																
<212>	PRT																
<213>	Chưa biết																
<220>																	
<223>	ImpE2																
<400>	2																
Met	Val	Ala	Lys	Asn	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Ala	Gly	His	Ala	Ser	Ala		
1				5					10					15			
His	Thr	Ala	Glu	Glu	Phe	Pro	Val	Ala	Asn	Ala	Glu	Met	Ala	Thr	Pro		
			20					25					30				
Ser	Ala	Ile	Asp	Pro	Asn	His	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Asp	Asn	Val	Gly		
		35					40					45					
Ile	Ile	Phe	Ala	Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Met	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	Gly		
	50					55					60						
Gln	Met	Ile	Phe	Gly	Ser	Ala	Leu	Pro	Thr	Ile	Val	Gly	Glu	Leu	Gly		
65					70					75					80		
Gly	Val	Asp	Gln	Met	Ser	Trp	Val	Ile	Ser	Ala	Phe	Met	Val	Thr	Met		
				85					90					95			
Thr	Ile	Ala	Met	Pro	Leu	Ala	Gly	Gln	Leu	Gly	Asp	Arg	Met	Gly	Arg		
			100					105					110				
Lys	Trp	Val	Tyr	Ile	Ser	Gly	Ile	Ser	Ile	Phe	Val	Ile	Gly	Ser	Thr		
		115					120					125					
Leu	Gly	Gly	Phe	Ala	Asn	Gly	Met	Gly	Met	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Ala		
	130					135					140						
Ile	Gln	Gly	Phe	Gly	Ala	Gly	Ile	Met	Met	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile		
145					150					155					160		
Val	Ala	Glu	Val	Val	Ser	Ala	Arg	Glu	Arg	Gly	Lys	Phe	Met	Gly	Ile		
				165					170					175			
Met	Gly	Gly	Val	Phe	Gly	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	Pro	Val	Leu	Gly		
			180					185					190				
Gly	Trp	Phe	Thr	Asp	Gly	Pro	Gly	Trp	Arg	Trp	Gly	Leu	Trp	Ile	Asn		
		195					200					205					

Ile	Pro	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Ile	Ile	Val	Cys	Ala	Phe	Val	Leu	Lys
	210					215					220				
Leu	Arg	Val	Gly	Glu	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Phe	Asp	Trp	Met	Gly	Phe
225					230					235					240
Ala	Ala	Ile	Ala	Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Thr	Trp
				245					250					255	
Gly	Gly	Ser	Glu	Tyr	Glu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Ile	Leu	Ser	Met	Ala
			260					265					270		
Ala	Val	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Ile	Glu	Ser	Arg
		275					280					285			
Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Gln	Leu	Phe	Lys	Asn	Arg	Asn	Met
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Thr	Leu	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Gly
305					310					315					320
Val	Leu	Gly	Tyr	Met	Pro	Thr	Tyr	Leu	Gln	Met	Val	His	Thr	Leu	Thr
				325					330					335	
Pro	Thr	Glu	Ala	Gly	Leu	Met	Met	Ile	Pro	Met	Met	Val	Gly	Met	Ile
			340					345					350		
Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Phe	Ile	Ile	Ala	Lys	Thr	Gly	Asn	Tyr
		355					360					365			
Lys	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Thr	Ala	Phe	Ala	Leu	Trp
	370					375					380				
Trp	Met	Ser	Gln	Met	Thr	Val	Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	Gly	Val
385					390					395					400
Arg	Phe	Leu	Val	Phe	Gly	Val	Gly	Leu	Gly	Phe	Val	Met	Gln	Val	Leu
				405					410					415	
Val	Leu	Ile	Val	Gln	Asn	Ser	Phe	Pro	Val	Ser	Gln	Val	Gly	Thr	Ala
			420					425					430		
Thr	Ala	Ala	Asn	Asn	Phe	Phe	Arg	Gln	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala
		435					440					445			
Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Met	Phe	Ile	His	Asn	Met	Gln	Asn	Glu	Met	Ala
	450					455					460				
Thr	Arg	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Ala	Ala
465					470					475					480
Ile	Ser	Gln	Gln	Phe	Gln	Gly	Ala	Asp	Ala	Ala	Asn	Ser	Leu	Thr	Pro
				485					490					495	
His	Ala	Val	Ala	Glu	Leu	Pro	Asp	Val	Leu	Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Asn
			500					505					510		
Ser	Tyr	Asn	Asp	Gly	Leu	Thr	Pro	Val	Ile	Gly	Met	Met	Val	Pro	Leu

515	520	525
Ala Ile Val Ala Met Leu	Ile Leu Phe Pro Leu Arg	Gln Glu Arg Leu
530	535	540

Lys Glu Thr Ile Glu
545

<210> 3
 <211> 2312
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> impE1E2

<400> 3
 ttgcatgctg tgcaagaagt taatgacaat gaagaagact ccctccctgg cagtgcctc
 60
 ggggttaaggg agcagaagcg attggcaacc aagcatcgca tcgaagacgc cgcgacacgg
 120
 ttggttgatg aatcgagctt tgacaaagta acaattgaag aaatttgcca agccgccggg
 180
 atttcccgac gcaccttttt taattatttc agcacgaaag aaagcgccgt tattggcgcg
 240
 tcctcggaac cgttgacgga aaagcaacgc aatgacttct tgaatgctga cgccagcaat
 300
 ctctgcagc tgatggttga gcagatcaaa caacacttgg agtcttctca ccagagtcaa
 360
 gcgattcacg accgtcgtca gcgaatcttt gcggatccgg atgtcgcggg acgtgcaatg
 420
 gcgttttcgca aggaacgctc acgggaaacc atggagctaa tcgctcaacg tcttcggggag
 480
 catcctgaag aacaacgcgc ccagaattg gatccgaaa cagaggcgat gctgctgagc
 540
 ggattcattc gcgaagccac ctggatggct atctcacgac ccgatcgtga ttgtgcactg
 600
 ccagtgggtg accgcatcta tcgcgcgatg gaattggtaa agaattacac gaaaggactg
 660
 gaatggtagc taaaaactcc accccaagca cggccggcca cgccagtgct cacactgcgg
 720
 aagaattccc agtggccaat gctgaaatgg caacgccttc agcaatcgac ccaaaccacg
 780

gtaaaaagac 840	cgcggaataac	gtcggcatta	tcttcgctgc	cttgatgctc	accatgctga
tgagctcttt 900	ggggcagatg	atcttcggtt	ccgctctgcc	aaccatcgtc	ggcgagctcg
gcggcgtgga 960	ccagatgagc	tgggtaattt	cagcatttat	ggtcaccatg	accattgcta
tgccactagc 1020	cggtcagctc	ggtgaccgca	tgggcccga	gtgggtctac	atctcaggta
tctccatttt 1080	cgttattggc	tcgacgctcg	gtggctttgc	caatggcatg	ggcatgctga
tcaccggacg 1140	tgcaatccag	ggcttcggtg	ccggcatcat	gatgatttcc	tcgcagtcga
ttgtggctga 1200	ggttgtctcc	gcacgtgagc	gcggaagtt	catgggtatt	atgggcggcg
tctttggcgt 1260	ctcctccgta	ctgggtccag	ttctcggtgg	ctgggtcacc	gatgggtccc
gttggcggtg 1320	gggcctgtgg	atcaacattc	cactgggtct	gctggcaatt	attgtctgcg
ctttcgtact 1380	gaagctgcgc	gtgggcgagc	aaggctttaa	gggctttgac	tggatgggtt
ttgcggccat 1440	cgcaatcacg	accagcacc	tgattctgct	caccacttgg	ggcggaagcg
aatacgagtg 1500	gacttcccca	actattttgt	ccatggctgc	cgtagtcac	gtcggcgcg
tgctcaccgt 1560	gttcattgag	tcgcgtgcat	cccagccgct	gatcccgggt	cagctattta
agaaccgcaa 1620	catggttttg	accaccctcg	ccggtactgt	tttgggtctg	gccatgatgg
gcgtgctcgg 1680	ctacatgcca	acctacctgc	agatggtgca	caccctgacg	ccaactgaag
caggcttgat 1740	gatgatccc	atgatggctg	gcatgatcgg	tgtctccact	ggtgttggct
tcatcatcgc 1800	taagaccggc	aactacaagt	actaccccat	cgcgggcctg	gccatcacgg
cgtttgcttt 1860	gtgggtggatg	tcccagatga	ccgttgagac	ttcattgacc	ggtatcggag
ttcgcttcct 1920	tgtattcggg	gtcggcttgg	gctttgtcat	gcagggtactg	gtgctgattg
ttcaaaactc	cttcctgta	tcgcaggtcg	gtactgccac	ggcggttaat	aacttcttcc

1980

gccagattgg ttccggcattg ggtgcttcca tcgtgggttc gatgttcatt cacaatatgc
2040

agaatgagat ggctaccggt ttgcctgatg cccttgcata gttgggcaag gaaggcgccg
2100

ctatttcgca gcagttccaa ggtgcagatg ccgccaaactc cttgactccg cacgcagtcg
2160

cagagcttcc cgatgtcctc cgtgacgcta tcttaaattc ctacaatgac ggtctgaccc
2220

ccgtgattgg catgatgggtg ccactggcca ttgttgcaat gctgattttg ttcccactgc
2280

gccaaagagcg cttgaaggaa accatcgaat aa 2312

<210> 4
<211> 669
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> ImpE1

<400> 4
ttgcatgctg tgcaagaagt taatgacaat gaagaagact ccctccctgg cagtgcctc
60

gggttaaggg agcagaagcg attggcaacc aagcatcgca tcgaagacgc cgcgacacgg
120

ttggttgatg aatcgagctt tgacaaagta acaattgaag aaatttgca agccgccggg
180

atttcccgac gcaccttttt taattatttc agcacgaaag aaagcgccgt tattggcgcg
240

tcctcggaac cgttgacgga aaagcaacgc aatgacttct tgaatgctga cgccagcaat
300

ctcctgcagc tgatggttga gcagatcaaa caacacttgg agtcttctca ccagagtcaa
360

gcgattcacg accgtcgtca gcgaatcttt gcggatccgg atgtcgcggt acgtgcaatg
420

gcgttttcgca aggaacgctc acgggaaacc atggagctaa tcgctcaacg tcttcgggag
480

catcctgaag aacaacgcgc cccagaattg gatccggaaa cagaggcgat gctgctgagc
540

ggattcattc gcgaagccac ctggatggct atctcacgac ccgatcgtga ttgtgcactg

600

ccagtgggtg accgcatcta tcgcgcgatg gaattggtaa agaattacac gaaaggactg
660

gaatggtag

669

<210> 5
<211> 1650
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> ImpE2

<400> 5
atggtagcta aaaactccac cccaagcacg gccggccacg ccagtgctca cactgcgga
60
gaattcccag tggccaatgc tgaaatggca acgccttcag caatcgaccc aaaccacggt
120
aaaaagaccg cggataacgt cggcattatc ttcgctgcct tgatgctcac catgctgatg
180
agctcttttg ggcagatgat tttcggttcc gctctgcaa ccatcgtcgg cgagctcggc
240
ggcgtggacc agatgagctg ggtaatttca gcatttatgg tcaccatgac cattgctatg
300
ccactagccg gtcagctcgg tgaccgcatg ggccgcaagt gggctctacat ctcaggtatc
360
tccattttcg ttattggctc gacgctcggg ggctttgcca atggcatggg catgctgatc
420
accggacgtg caatccaggg cttcgggtgcc ggcatcatga tgatttcctc gcagtcgatt
480
gtggctgagg ttgtctccgc acgtgagcgc ggcaagttca tgggtattat gggcggcgctc
540
tttggcgtct cctccgtact ggggtccagtt ctcgggtggct gggtcaccga tgggtccggg
600
tggcgttggg gcctgtggat caacattcca ctgggtctgc tggcaattat tgtctgcgct
660
ttcgtactga agctgcgcgt gggcgagcaa ggctttaagg gctttgactg gatggggtttt
720
gcggccatcg caatcacgac cagcaccctg attctgctca ccacttgggg cggaagcgaa
780
tacgagtgga cttccccaac tattttgtcc atggctgccg tagtcatcgt cggcgcgctg

840

ctcaccgtgt tcattgagtc gcgtgcatcc cagccgctga tcccggttca gctattttaag
900

aaccgcaaca tggtttttgac caccctcgcc ggtactgttt tgggtctggc catgatgggc
960

gtgctcggct acatgccaac ctacctgcag atgggtgcaca ccctgacgcc aactgaagca
1020

ggcttgatga tgatcccgat gatggtcggc atgatcggtg tctccactgg tgttggcttc
1080

atcatcgcta agaccggcaa ctacaagtac taccocatcg cgggcctggc catcacggcg
1140

tttgctttgt ggtggatgtc ccagatgacc gttgagactt cattgaccgg tatcggagtt
1200

cgcttccttg tattcgggtgt cggcttgggc tttgtcatgc aggtactggg gctgattgtt
1260

caaaactcct tccctgtatc gcaggtcggg actgccacgg cggctaataa cttcttccgc
1320

cagattgggt cggcattggg tgcttccatc gtgggttcga tgttcattca caatatgcag
1380

aatgagatgg ctaccggttt gcctgatgcc cttgcatcgt tgggcaagga aggcgccgct
1440

atttcgcagc agttccaagg tgcagatgcc gccaaactcct tgactccgca cgcagtcgca
1500

gagcttcccg atgtcctccg tgacgctatc ttaaattcct acaatgacgg tctgaccccc
1560

gtgattggca tgatggtgcc actggccatt gttgcaatgc tgattttgtt cccactgcgc
1620

caagagcgct tgaaggaaac catcgaataa 1650

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

<220>
<223> impE1 kop-1

<400> 6
gctctagacg agaaagctaa agccggtga

29

<210> 7

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

<220>
 <223> impE1 kop-2

<400> 7
 gtttttagct accattgtta caccocgtgc aagttt

36

<210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 kop-3

<400> 8
 gcacggggtg taacaatggt agctaaaaac tccacc

36

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

<220>
 <223> impE1 kop-4

<400> 9
 gctctagaaa tagttgggga agtccactc

29

<210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 kop-1

<400> 10
 gctctagact tggatgacct ggtggaaaa

29

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

<220>
 <223> impE2 kop-2

<400> 11
 cttggagaaaa atttcctacc attccagtcc tttcgt 36

<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 kop-3

<400> 12
 ggactggaat ggtaggaaat tttctccaag ggaaat 36

<210> 13
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 kop-4

<400> 13
 ggactagtgg attgtgttga cgcacgatg 29

<210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1E2 kop-2

<400> 14
 cttggagaaaa atttctgtta caccctgtgc aagttt 36

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1E2 kop-3

<400> 15
 gcacggggtg taacagaaat tttctccaag ggaaat 36

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 2-1

<400> 16
 gctctagaga acggagtcac ctcctttgc

29

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 2-2

<400> 17
 gggctagag aagcgccgc ctaccattcc agtcctttcg t

41

<210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 2-3

<400> 18
 aaggaaaaaa gcggccgcga acggagtcac ctcctttgc

39

<210> 19
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 2-4

<400> 19
 aaggaaaaaa gcggccgcct accattccag tcctttcgt

39

<210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>

<223> impE1E2 2-2

<400> 20

gggtctagag aagcggccgc ccaaacgctc tgcaagaaac tg

42

<210> 21

<211> 38

<212> ADN

<213> Tình tự nhân tạo

<220>

<223> impE1E2 2-4

<400> 21

ataagaatgc ggccgcccac acgctctgca agaaactg

38

<210> 22

<211> 29

<212> ADN

<213> Tình tự nhân tạo

<220>

<223> impE1 Pcj7-1

<400> 22

gctctagagg tgagcgcgaa ggggacgcg

29

<210> 23

<211> 34

<212> ADN

<213> Tình tự nhân tạo

<220>

<223> impE1 Pcj7-2

<400> 23

ggaattccat atgtgttaca ccccgtagca gttt

34

<210> 24

<211> 31

<212> ADN

<213> Tình tự nhân tạo

<220>

<223> impE1 Pcj7-3

<400> 24

ggaattccat atgcatgctg tgcaagaagt t

31

<210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE1 Pcj7-4

<400> 25
 gctctagatt cagcattggc cactgggaa

29

<210> 26
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 Pcj7-1

<400> 26
 gctctagatt gcatgctgtg caagaagtt

29

<210> 27
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 Pcj7-2

<400> 27
 ggaattccat atgctacat tccagtcctt tcgt

34

<210> 28
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 Pcj7-3

<400> 28
 ggaattccat atggtagcta aaaactccac c

31

<210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> impE2 Pcj7-4

<400> 29
 gctctagaaa tagttgggga agtccactc

29

<210> 30
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> Pcj7 F

<400> 30
 ggaattccat atgtcccagc gctactaata gg

32

<210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Tình tự nhân tạo

<220>
 <223> Pcj7 R

<400> 31
 ggaattccat atggagtgtt tcctttcgtt ggg

33