



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

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

(11)



1-0039177

(51)<sup>19</sup> C12N 9/04; C12P 19/40; C12N 15/52;  
C12N 15/77

(13) B

(21) 1-2019-05357

(22) 30/09/2019

(86) PCT/KR2018/009378 16/08/2018

(87)

(30) 10-2018-0087597 27/07/2018 KR

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/05/2020 386

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) LEE, Ji Hye (KR); PARK, So-jung (KR); BAEK, MIN JI (KR); CHANG, Jin Sook (KR); YOON, Byoung Hoon (KR).

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

(54) BIẾN THỂ AXIT 5'-INOSINIC DEHYDROGENAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ AXIT 5'-INOSINIC SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, polynucleotit mã hóa biến thể này, vectơ chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp điều chế axit 5'-inosinic sử dụng biến thể này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập tới biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, polynucleotit, vector, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp điều chế axit 5'-inosinic sử dụng biến thể này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

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

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

Trong khi đó, các enzym ở trạng thái tự nhiên của chúng không phải lúc nào cũng thể hiện các tính chất tối ưu về hoạt tính, tính ổn định, tính đặc hiệu của cơ chất cho các đồng phân quang học, v.v., được yêu cầu trong các ứng dụng công nghiệp. Do đó, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện các enzym thông qua các đột biến của các trình tự axit amin của chúng, v.v., sao cho chúng trở nên phù hợp với mục đích sử dụng. Trong số đó, thiết kế hợp lý và gây đột biến định hướng điểm của các enzym đã được áp dụng để cải thiện chức năng của enzym. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp,

có nhược điểm là thông tin về cấu trúc của enzym đích không đủ hoặc mối quan hệ cấu trúc-chức năng không rõ ràng, và do đó, các phương pháp không thể được áp dụng hiệu quả. Về vấn đề này, đã có báo cáo rằng các nỗ lực cải tiến enzym đã được thực hiện bằng phương pháp tiến hóa có định hướng để sàng lọc enzym có đặc điểm mong muốn từ ngân hàng enzym đột biến được xây dựng thông qua đột biến ngẫu nhiên của gen enzym, dẫn đến cải thiện hoạt động của nó.

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

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể 5'-inosinic dehydrogenaza.

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh axit 5'-inosinic, chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza và vector.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế axit 5'-inosinic, phương pháp bao gồm các bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường nuôi cấy; và thu hồi axit 5'-inosinic từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

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

Để đạt được các mục đích trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có polypeptit có sự thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Cụ thể, sáng chế đề xuất biến thể axit 5'-inosinic

dehydrogenaza có polypeptit có sự thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, trong đó thay thế axit amin bao gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 từ đầu N- bằng isoleucin. Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza, biến thể có trình tự axit amin có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin, thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc sự kết hợp của chúng. Cụ thể, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể có sự thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, trong đó sự thay thế axit amin có thể bao gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “axit 5'-inosinic dehydrogenaza” đề cập đến protein liên quan đến sản sinh axit 5'-inosinic (5'-inosin monophosphat; IMP). Đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho inosin-5'-monophosphat dehydrogenaza, IMP dehydrogenaza, axit inosinic dehydrogenaza, IMPDH, v.v.

Trong sáng chế, SEQ ID NO: 2 đề cập đến trình tự axit amin có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza. Cụ thể, SEQ ID NO: 2 là trình tự protein có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza, được mã hóa bởi gen *guaB*. Trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 có thể được lấy từ cơ sở dữ liệu công khai của Ngân hàng Gen thuộc Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ví dụ, trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 có thể được lấy từ *Corynebacterium Stationis*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể bao gồm bất kỳ trình tự nào có hoạt tính tương tự như trình tự axit amin nêu trên mà không bị giới hạn. Ngoài ra, trình tự axit amin có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, trình tự axit amin có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Trình tự axit amin có tương đồng hoặc đồng nhất có thể không bao gồm trình tự có 100% đồng nhất từ phạm vi bên trên hoặc có thể là trình

tự có đồng nhất dưới 100%. Ngoài ra, rõ ràng là protein có trình tự axit amin bị mất, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một số axit amin cũng nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là nó có tính tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza” có thể sử dụng thay thế cho biến thể polypeptit có khả năng sản xuất IMP, biến thể polypeptit sản xuất IMP, biến thể polypeptit có khả năng sản xuất axit 5'-inosinic, biến thể polypeptit sản xuất axit 5'-inosinic, biến thể polypeptit có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, v.v. Ngoài ra, protein có thể được lấy từ chi *Corynebacterium*, cụ thể là *Corynebacterium Stationis*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể bao gồm sự biến đổi ở vị trí thứ 377 và/hoặc ở vị trí thứ 499 từ đầu N- trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác, sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác hoặc sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác và sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác, và có hoạt tính yếu hơn so với các axit amin chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc axit 5'-inosinic dehydrogenaza không biến đổi có nguồn gốc từ vi sinh vật hoang dại. Biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có nghĩa là có sự biến đổi của axit amin ở vị trí thứ 377 và/hoặc ở vị trí thứ 499 từ đầu N- trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc trong trình tự axit amin có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 2, như được mô tả bên trên.

Cụ thể, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể có axit amin ở vị trí thứ 377 được thay thế bằng threonin, axit amin ở vị trí 499 được thay thế bằng isoleucin, hoặc axit amin ở vị trí 377 được thay thế bằng threonin và axit amin ở vị trí thứ 499 được thay thế bằng isoleucin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và polypeptit có thể đã làm suy yếu hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza, so với polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Đối với các mục đích của sáng chế, vi sinh vật chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza được đặc trưng bởi lượng IMP sản xuất được tăng cường. Điều này rất

có ý nghĩa vì lượng IMP sản xuất được tăng lên nhờ biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza của sáng chế, trong khi loài *Corynebacterium* thuộc chủng hoang dại không thể tạo ra IMP hoặc, ngay cả khi nó có thể tạo ra IMP, thì chỉ có thể sản xuất lượng rất nhỏ.

Cụ thể, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza bao gồm trình tự axit amin có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác, thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác, hoặc thay thế axit amin tại vị trí thứ 377 bằng axit amin khác và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 có thể chứa ít nhất bất kỳ một loại được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Cụ thể hơn, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin, thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin, hoặc thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin và thay thế axit amin axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 có thể chứa ít nhất bất kỳ một loại được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể bao gồm ít nhất bất kỳ một loại được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Ngoài ra, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8 hoặc trình tự axit amin có tối thiểu 80% tương đồng hoặc đồng nhất, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8 và polypeptit có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8. Ngoài ra, rõ ràng protein có trình tự axit amin bị mất, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một số axit amin, ngoài axit amin ở các vị trí thứ 377 hoặc thứ 499, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là nó có tính tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein trên.

Nói cách khác, mặc dù sáng chế mô tả “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin được biểu diễn bằng SEQ ID NO cụ thể”, rõ ràng là protein có trình tự axit amin bị mất, thay đổi, thay thế, thay thế bảo thủ, hoặc bổ sung một số axit amin cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là nó có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn là protein có hoạt

tính tương đồng hoặc tương ứng với biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, không loại trừ việc bổ sung các trình tự không làm thay đổi chức năng của protein ở trước và sau trình tự axit amin, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm hoặc thay thế bảo thủ. Rõ ràng là protein có sự bổ sung hoặc đột biến trình tự như vậy cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

“Thay thế bảo thủ” có nghĩa là thay thế axit amin bằng axit amin khác có đặc điểm cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin này thường có thể được thực hiện trên cơ sở tương tự về tính phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc tính chất lưỡng cực. 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 tiroxin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tiroxin và tryptophan.

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

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

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

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

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

Tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự bằng chương trình máy tính GAP, ví dụ, Tạp chí sinh học phân tử 48: 443, Needman và các cộng sự (1970), như được bộc lộ trong Thành tựu toán ứng dụng (1981) 2: 482, Smith và Waterman. Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa tương tự là số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (nghĩa là nucleotit hoặc axit amin) tương tự nhau, chia cho tổng số các ký hiệu của trình tự ngắn hơn giữa hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có



thể bao gồm: (1) đơn vị ma trận so sánh (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh có trọng số (hoặc EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4) ma trận thay thế) của Gribskov và cộng sự (1986) Nghiên cứu axit nucleic 14: 6745, như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, bài báo, Atlas về trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353-358 (1979); (2) điểm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống và điểm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi biểu tượng trong mỗi khoảng trống (hoặc điểm phạt mở khoảng trống là 10, và điểm phạt mở rộng khoảng trống là 0,5); và (3) không điểm phạt đối với các khoảng trống cuối cùng. Theo đó, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến sự liên quan giữa các trình tự.

Do sự thoái biến của đơn vị mã hóa, rõ ràng là polynucleotit được dịch mã, thành polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, hoặc cũng có thể bao gồm polypeptit có tính tương đồng hoặc đồng nhất. Ví dụ, polynucleotit có thể có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5. Ngoài ra, bằng cách lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò được tạo thành từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit, trình tự polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, bao gồm trình tự axit amin có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin, hoặc thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 có thể được bao gồm mà sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza hoặc vector chứa polynucleotit.

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

Polynucleotit mã hóa biến thể 5-inosinic acid dehydrogenaza của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit nào mà không bị giới hạn, miễn là nó mã hóa biến thể polypeptit có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza. Trong sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của axit 5'-inosinic dehydrogenaza là gen *guaB*, và cụ thể,

gen này có thể được lấy từ *Corynebacterium Stationis*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, do sự thoái biến của đơn vị mã hóa hoặc bằng cách xem xét các đơn vị mã hóa được ưa tiên bởi vi sinh vật trong đó polypeptit có thể được phép biểu hiện, các sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa của polynucleotit theo sáng chế trong phạm vi không thay đổi trình tự axit amin của polypeptit. Bất kỳ trình tự polynucleotit nào cũng có thể được đưa vào mà không bị giới hạn miễn là nó mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác, thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác, hoặc thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Ví dụ, polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza theo sáng chế có thể có trình tự polynucleotit mã hóa axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, polynucleotit có thể có trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, bằng cách lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò được tạo thành từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit, trình tự mã hóa protein có hoạt tính của biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có axit amin ở vị trí thứ 377 được thay thế bằng axit amin khác, axit amin ở vị trí thứ 499 được thay thế bằng axit amin khác, hoặc axit amin ở vị trí thứ 377 được thay thế bằng axit amin khác và axit amin ở vị trí thứ 499 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 có thể được bao gồm mà không bị giới hạn. “Các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện cho phép lai hóa cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ ví dụ, J. Sambrook và cộng sự, như bên trên). Các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện theo đó các gen có tính tương đồng hoặc đồng nhất cao, có tối thiểu 40%, cụ thể là tối thiểu 90% trở lên, cụ thể hơn là tối thiểu 95%, cụ thể hơn nữa là tối thiểu 97%, cụ thể nhất là tương đồng hoặc đồng nhất tối thiểu 99% có thể lai với nhau, các điều kiện mà các gen có tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn không thể lai với nhau hoặc các điều kiện rửa phổ biến cho lai Souther, ví dụ, nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1X SSC (saline sodium citrate: salin natri xitrat), 0,1%

SDS (Sodium dodecyl sulphate: natri dodecyl sulphat), cụ thể là 60°C, 0,1X SSC, 0,1% SDS, cụ thể hơn là 68°C, 0,1X SSC, 0,1% SDS, một lần, cụ thể, hai lần hoặc ba lần.

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

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

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

Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza là gen *guaB* và mã hóa polynucleotit giống như mô tả bên trên.

Theo sáng chế, polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza cũng giống như mô tả bên trên.

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

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

Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn có thể được chèn vào nhiễm sắc thể. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách tái hợp tương đồng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Có thể còn bao gồm dấu hiệu chọn lọc để xác nhận việc chèn vector vào nhiễm sắc thể. Dấu hiệu chọn lọc được sử dụng để lựa chọn các tế bào biến nạp với vector, tức là, để xác nhận có hay không sự chèn phân tử axit nucleic mong muốn, và các dấu hiệu chọn lọc có khả năng cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc như kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào, và biểu hiện của polypeptit bề mặt có thể được sử dụng. Trong trường hợp xử lý các tác nhân chọn lọc, chỉ các tế bào có khả năng biểu hiện các dấu hiệu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các đặc điểm kiểu hình khác, và do đó các tế bào biến nạp có thể được chọn dễ dàng. Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh axit 5'-inosinic chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa biến thể này. Cụ thể, vi sinh vật chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza và/hoặc polynucleotit mã hóa biến thể này có thể là vi sinh vật được tạo thành bằng cách biến nạp với vector chứa polynucleotit, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Không quan trọng polynucleotit biến nạp được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm ở đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là polynucleotit biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit có thể chứa DNA và RNA mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới mọi hình thức, miễn là polynucleotit có

thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, có cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho biểu hiện của nó. Catxet biểu hiện có thể chứa vùng gen khởi động, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã có thể được liên kết hoạt động với polynucleotit. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện thực hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ để được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng sáng chế không bị 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 vùng gen khởi động để bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn của sáng chế.

Thuật ngữ “vi sinh vật chứa biến thể polypeptit” hoặc “vi sinh vật chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza” như được sử dụng trong sáng chế có nghĩa là vi sinh vật được tạo ra bằng cách tạo khả năng sản sinh IMP cho vi sinh vật có khả năng sản sinh IMP tự nhiên yếu hoặc chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh IMP. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có polypeptit bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, trong đó sự thay thế axit amin có thể bao gồm ít nhất một loại bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 từ đầu N- bằng isoleucin. Ngoài ra, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể polypeptit, trong đó vi sinh vật có hoạt tính axit 5'-inosinic dehydrogenaza bằng cách thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác, thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác, hoặc thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng axit amin khác và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật có thể chứa polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, hoặc có thể được biến nạp với vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza để biểu hiện biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza, và đối với các đối tượng của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật nào, miễn là nó chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza để sản sinh axit 5'-inosinic.

Theo sáng chế, vi sinh vật sản sinh 5'-inosinic có thể được sử dụng thay thế cho vi sinh vật sản sinh được 5'-inosinic hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh 5'-inosinic.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh axit 5'-inosinic” có thể là vi sinh vật trong đó có sự biến đổi gen xảy ra hoặc hoạt tính được tăng cường để tạo ra axit 5'-inosinic theo mong muốn, bao gồm tất cả các vi sinh vật hoang dại hoặc vi sinh vật trong đó xảy ra biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế bị suy yếu hoặc tăng cường cụ thể bằng cách chèn gen ngoại sinh hoặc bằng cách tăng cường hoặc bất hoạt gen nội sinh. Đối với các đối tượng của sáng chế, vi sinh vật sản sinh axit 5'-inosinic có thể khác biệt ở chỗ vi sinh vật chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza để tăng khả năng sản sinh 5'-inosinic mong muốn, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật chi *Corynebacterium*. Cụ thể, theo sáng chế, vi sinh vật sản sinh axit 5'-inosinic hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh axit 5'-inosinic có thể là vi sinh vật trong đó một phần của các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp axit 5'-inosinic được tăng cường hoặc suy yếu, hoặc một phần của các gen liên quan đến phương thức phân cắt axit 5'-inosinic được tăng cường hoặc suy yếu. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó sự biểu hiện của gen *purF* mã hóa phosphoribosyl pyrophosphat amidotransferaza được tăng cường hoặc biểu hiện của gen *purA* mã hóa adenylosuccinat synthetaza bị suy yếu, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit 5'-inosinic” đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh axit 5'-inosinic tự nhiên hoặc do đột biến. Cụ thể, như được sử dụng trong sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh axit 5'-inosinic có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* đã được cải thiện khả năng sản sinh axit 5'-inosinic bằng cách tăng cường hoặc làm suy yếu hoạt tính của gen *guaB* mã hóa axit 5'-inosinic dehydrogenaza. Cụ thể hơn, như được sử dụng trong sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh axit 5'-inosinic có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* đã được cải thiện khả năng sản sinh axit 5'-inosinic do chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa tương tự, hoặc bằng cách biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza. “Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được cải thiện khả năng sản sinh axit 5'-inosinic” có nghĩa là vi sinh

vật có khả năng sản sinh axit 5'-inosinic đã được cải thiện so với chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không được sửa đổi. “Vi sinh vật không được sửa đổi” có nghĩa là chủng hoang dại của nó hoặc vi sinh vật không chứa biến thể protein sản sinh axit 5'-inosinic hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza.

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

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp để điều chế axit 5'-inosinic, bao gồm nuôi cấy vi sinh vật *Corynebacterium* sản sinh axit 5'-inosinic trong môi trường nuôi cấy; và thu hồi axit 5'-inosinic từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

Trong phương pháp, bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ-bổ sung, v.v. đã biết, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở đây. Về vấn đề này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH tối ưu (ví dụ: độ pH 5 đến độ pH 9, cụ thể là độ pH 6 đến độ pH 8, và cụ thể nhất là độ pH 6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit photphoric hoặc axit sunfuric). Điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách thêm oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở 20°C đến 45°C, và cụ thể là ở 25°C đến 40°C, và quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng 10 giờ đến khoảng 160 giờ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Axit 5'-inosinic được nuôi cấy có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể được giữ trong các tế bào.

Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy được sử dụng, nguồn cacbon, đường và cacbohydrat (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, mantoza, ri đường, tinh bột và cenluloza), 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, glycerol và etanol), axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở đây. Nguồn nitơ, hợp chất hữu

cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, canh thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và urê) 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 hydrophosphat, muối có chứa natri tương ứng của nó, v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn photpho không bị giới hạn ở đây. Môi trường nuôi cấy cũng có thể bao gồm các chất kích thích tăng trưởng cần thiết như các muối kim loại khác (ví dụ: magiê sunfat hoặc sắt sunfat), axit amin và các vitamin.

Phương pháp thu hồi axit 5'-inosinic được sản sinh trong bước nuôi cấy theo sáng chế để thu hoạch axit 5'-inosinic từ môi trường nuôi cấy bằng phương pháp thích hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng dựa theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), v.v. và axit 5'-inosinic mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp được biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh chế. Quá trình tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Vì vậy, axit 5'-inosinic được thu hồi có thể ở dạng tinh khiết hoặc dịch lên men vi sinh vật chứa axit 5'-inosinic (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 chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ thực hiện. Tuy nhiên, rõ ràng là đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

#### **Ví dụ 1: Điều chế chủng sản sinh IMP từ chủng hoang dại**

Chủng hoang dại thuộc chi *Corynebacterium* không thể sản sinh IMP hoặc có thể sản sinh IMP với lượng rất nhỏ. Do đó, chủng sản sinh IMP đã được tạo ra dựa trên *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 hoang dại. Cụ thể hơn, chủng sản sinh IMP đã được tạo ra bằng cách tăng cường hoạt tính của *PurF* mã hóa phosphoribosyl



pyrophosphat amidotransferaza, đây là enzym đầu tiên của quá trình sinh tổng hợp purin và làm suy yếu hoạt tính của *PurA* mã hóa adenylosuccinat synthetaza trong phương thức phân cắt axit 5'-inosinic.

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

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa khởi đầu của *purF* đã bị thay đổi, trước tiên vector chèn có chứa *purF* đã được điều chế. Để sao chép gen *purF* vào vector chèn, cụ thể, PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng DNA bộ gen của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các đoạn môi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 trong 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn DNA thu được từ PCR bên trên làm mạch khuôn và các đoạn môi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12 trong 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút để thu được đoạn DNA. Đoạn DNA thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn XbaI và được sao chép vào vector (pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố đơn quốc tế số 2008-033001)) đã bị cắt bởi cùng loại enzym. Vector được điều chế bằng phương pháp trên được định danh là pDZ-purF-g1a.

Bảng 1

| SEQ ID NO. | Tên đoạn môi    | Trình tự (5'–3')                       |
|------------|-----------------|----------------------------------------|
| 9          | pDZ-purF(g1a)-1 | GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC          |
| 10         | pDZ-purF(g1a)-2 | AAGTAGTGTTACCATGACGCTGATTCTACTAAGTTT   |
| 11         | pDZ-purF(g1a)-3 | AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCCCCAG |
| 12         | pDZ-purF(g1a)-4 | GCTCTAGACTGTGCGCCCCACGATATCCAG         |

Vector tái tổ hợp pDZ-purF-g1a đã được biến nạp vào *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 bằng phương pháp xung điện, và sau đó các chủng trong đó vector được chèn vào DNA bộ gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn phải trải qua sự trao đổi chéo thứ cấp, và sau đó các chủng được chọn được giải trình tự, nhờ đó chọn ra chủng mong muốn được đưa vào đột biến và chủng này được định danh là chủng ATCC6872::purF(g1a).

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

Để điều chế chủng trong đó đơn vị mã hóa khởi đầu của *purA* đã được thay đổi, trước tiên vector chèn có chứa *purA* đã được điều chế. Để sao chép gen *purA* vào vector chèn, cụ thể, PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng DNA bộ gen của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các đoạn môi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Sao chép các sản phẩm PCR được thực hiện như trong ví dụ 1-1 và vector điều chế được định danh là pDZ-*purA-alt*.

Bảng 2

| SEQ ID NO. | Tên đoạn môi             | Trình tự (5'-3')                      |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 13         | pDZ- <i>purA</i> (alt)-1 | GCTCTAGAGGCCACGATGCCCCGAGCATC         |
| 14         | pDZ- <i>purA</i> (alt)-2 | TAACGATAGCTGCCAAGGTTATTCACCTCCTAGATTT |
| 15         | pDZ- <i>purA</i> (alt)-3 | AGGAAGTGAATAACCTTGGCAGCTATCGTTATCGTCG |
| 16         | pDZ- <i>purA</i> (alt)-4 | GCTCTAGAGGTCACGAATGGGTAGGTGCC         |

Vector tái tổ hợp pDZ-*purA-alt* đã được biến nạp vào chủng ATCC6872::*purF* (gla) được điều chế trong ví dụ 1-1 bằng kỹ thuật xung điện, và sau đó các chủng trong đó vector được đưa vào DNA bộ gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp chọn phải trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và sau đó các chủng được chọn được giải trình tự, do đó chọn chủng mong muốn mà đột biến được đưa vào.

Chủng sản sinh IMP cuối cùng được lựa chọn dựa trên *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 hoang dại được định danh là CJI2331.

#### Ví dụ 1-3: Kiểm tra chuẩn độ lên men CJI2331

2 mL môi trường nuôi cấy giống được đưa vào các ống nghiệm có đường kính 18 mm và được hấp khử trùng dưới áp suất. Mỗi chủng ATCC6872 và CJI2331 được cấy chủng và ủ ở 30°C trong 24 giờ và sử dụng lắc trong nuôi cấy giống. 29 mL môi trường lên men được đưa vào bình tam giác 250 ml lắc được và được hấp khử trùng dưới áp suất ở 121°C trong 15 phút và 2 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chủng và ủ trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh ở tốc độ quay 170 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và độ pH 7,5.

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

Bảng 3

| Tên chủng | IMP (g/L) |
|-----------|-----------|
| ATCC6872  | 0         |
| CJI2331   | 1,05      |

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

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

Ví dụ 2: Điều chế biến thể suy yếu axit 5'-inosinic dehydrogenaza

Để xác định đột biến axit 5'-inosinic dehydrogenaza giúp cải thiện khả năng sản sinh IMP, thư viện đột biến của *guaB* mã hóa axit 5'-inosinic dehydrogenaza đã được điều chế.

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

Để điều chế thư viện đột biến *guaB*, trước tiên vector tái tổ hợp chứa *guaB* đã được điều chế. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng DNA bộ gen của *Corynebacterium Stationis* ATCC6872 làm mạch khuôn và các đoạn mồi SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, và sản phẩm PCR đã được sao chép vào vector *E. coli* pCR2.1 bằng cách sử dụng Kit nhân bản TOPO (E. Invitrogen) để thu được pCR-*guaB*.

Bảng 4

| SEQ ID NO. | Tên đoạn mồi        | Trình tự (5'-3')      |
|------------|---------------------|-----------------------|
| 17         | pCR- <i>guaB</i> -F | ACTGCATTACACGGATATGTA |
| 18         | pCR- <i>guaB</i> -R | CCTCGTGGCGTCCCCACAAAC |

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

Thư viện đột biến *guaB* đã được điều chế dựa trên vector được điều chế trong ví dụ 2-1. Thư viện đã được điều chế bằng cách sử dụng kit PCR tạo đột biến ngẫu nhiên (clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit). Dưới các điều kiện có thể xảy ra đột biến, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20. Cụ thể, dưới các điều kiện có thể xảy ra 0 đến 3 đột biến trên 1000 bp, thực hiện gia nhiệt trước ở 94°C trong 30 giây, tiếp theo là 25 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây và ở 68°C trong 1 phút 30 giây. Do đó, sản phẩm PCR thu được đã được xử lý bằng cách sử dụng đoạn mồi lớn (500 ng đến 125 ng) trong 25 chu kỳ ở 95°C trong 50 giây, ở 60°C trong 50 giây và ở 68°C trong 12 phút và sau đó được xử lý bằng DpnI, và biến nạp vào *E. coli* DH5α và phát tán trên môi trường rắn LB có chứa kanamycin (25 mg/L). 20 loại khuẩn lạc biến nạp đã được chọn và sau đó là quá trình phân tích trình tự các plasmit thu được. Kết quả là đã xác nhận rằng các đột biến đã được đưa vào tại các vị trí khác nhau với tần suất 2 đột biến/kb. Khoảng 20.000 khuẩn lạc *E. coli* biến nạp và từ đó các plasmit được chiết xuất, và được định danh là thư viện pTOPO-*guaB*.

Bảng 5

| SEQ ID NO. | Tên đoạn mồi                  | Trình tự (5'-3')      |
|------------|-------------------------------|-----------------------|
| 19         | pTOPO- <i>guaB</i> -library-F | ATTGCATGGCTTGACGTTTGA |
| 20         | pTOPT- <i>guaB</i> -library-R | ATCAATGTGCCACTGCGTGCT |

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

Thư viện pTOPO-*guaB* được điều chế trong ví dụ 2-2 đã được biến nạp vào chủng CJI2331 được điều chế trong ví dụ 1 bằng phương pháp xung điện, sau đó phát tán trên môi trường dinh dưỡng chứa 25 mg/L kanamycin để thu được 10.000 khuẩn lạc được chèn vào gen đột biến. Từng khuẩn lạc được định danh là CJI2331\_pTOPO\_*guaB*(mt)1 đến CJI2331\_pTOPO\_*guaB*(mt)10000.

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

Từng khuẩn lạc trong số 10.000 khuẩn lạc thu được được cấy trong 200 µL môi trường nuôi cấy giống được hấp khử trùng dưới áp suất, và được nuôi cấy trong đĩa sâu lòng 96 lỗ và lắc 1200 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ bằng cách sử dụng máy lắc khay vi thể (TAITEC), và sau đó được sử dụng làm môi trường nuôi cấy giống. 290

$\mu\text{L}$  môi trường lên men được hấp khử trùng dưới áp suất được đưa vào đĩa sâu lòng 96 lỗ, và cấy chủng vào từng 20  $\mu\text{L}$  môi trường nuôi cấy giống, sau đó được lắc trong cùng điều kiện như trên trong 72 giờ.

Để phân tích lượng axit 5'-inosinic sản sinh trong môi trường nuôi cấy, sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 3  $\mu\text{L}$  phần chất nổi trên bề mặt nuôi cấy được chuyển sang đĩa UV 96 lỗ, mỗi lỗ chứa 197  $\mu\text{L}$  nước cất. Tiếp theo, máy đọc khay vi thể được sử dụng để thực hiện lắc trong 30 giây và máy đo quang phổ được sử dụng để đo mật độ quang ở 25°C, 270 nm và so sánh với mật độ quang của chủng CJI2331 để chọn 50 khuẩn lạc đột biến cho thấy sự tăng tối thiểu 10% mật độ quang. Các khuẩn lạc khác cho thấy mật độ quang tương đương hoặc giảm so với chủng đối chứng.

Mật độ quang học của 50 chủng được chọn đã được đo theo cách tương tự như trên để kiểm tra lại lượng axit 5'-inosinic sản sinh. Ba chủng CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)133, CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)1209, và CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)8927, cho thấy sự cải thiện đáng kể về khả năng sản sinh axit 5'-inosinic so với chủng CJI2331 đã được chọn.

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

Để xác định các đột biến gen của các chủng đột biến, từng chủng CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)133, CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)1209, và CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)8927 đã được xử lý bằng PCR sử dụng các đoạn mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, sau đó được giải trình tự. Các gen *guaB* của chúng được so sánh với các chủng ATCC6872 hoang dại và CJI2331.

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

Cụ thể, đã xác nhận rằng chủng CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)133 có đột biến thay thế threonin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin, chủng CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)1209 có đột biến thay thế alanin ở vị trí thứ 377 bằng threonin, và chủng CJI2331\_pTOPO\_guaB(mt)8927 có đột biến thay thế alanine ở vị trí 377 thành threonin và đột biến thành thế threonin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin trong trình tự axit amin của gen *GuaB* được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, trong các ví dụ 3 và 4 bên dưới, từng đột biến ở trên đã được kiểm tra xem có hay không sự ảnh hưởng đến lượng IMP được sản sinh từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

### Ví dụ 3: Kiểm tra khả năng sản sinh IMP của CJI2331

Các đột biến được xác định trong ví dụ 2 đã được đưa vào CJI2331, đây là chủng sản sinh IMP có nguồn gốc ATCC6872 và khả năng sản sinh IMP đã được kiểm tra.

#### Ví dụ 3-1: Điều chế chủng đưa vào đột biến

Để đưa vào các đột biến được xác định trong ví dụ 2, các oligonucleotit đảo ngược có chứa các đột biến đích được thiết kế theo chiều dài tương ứng là 75-mer.

Cụ thể, 30 µg của oligonucleotit của SEQ ID NO: 23 hoặc SEQ ID NO: 24 đã được biến nạp vào chủng CJI2331 bằng phương pháp xung điện (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999,52: 541-545) và 1 mL dung dịch phức môi trường nuôi cấy được thêm vào, sau đó nuôi cấy và thực hiện lắc ở 30°C và 160 vòng/phút trong 30 phút. Sau đó, nuôi cấy trong băng trong 10 phút và ly tâm ở 4°C và 4000 vòng/phút trong 10 phút, và phần nổi phía trên được loại bỏ để thu được viên tế bào. Sau đó, 1 ml dung dịch glycerol 10% ở 4°C được thêm vào và trộn. Hỗn hợp được ly tâm ở 4°C và 4000 vòng/phút trong 10 phút. Chất nổi trên bề mặt bị loại bỏ và viên tế bào được rửa sạch. Các viên tế bào được rửa một lần nữa, và 0,1 ml dung dịch glycerol 10% ở 4°C đã được thêm vào để chuẩn bị cho các tế bào cho quá trình biến nạp tiếp theo. Sau đó, các tế bào đã được biến nạp với oligonucleotit của SEQ ID NO: 23 hoặc SEQ ID NO: 24 bằng phương pháp xung điện ở trên và quy trình này được lặp lại mười lần. Các tế bào được trải trên đĩa thạch phức để thu được các khuẩn lạc (Giao thức tự nhiên, tháng 1 năm 2014; 9 (10): 2301-16).

Phân tích trình tự các khuẩn lạc thu được đã được thực hiện. Kết quả là các đột biến đích đã được tìm thấy để đưa vào các chủng. Chủng được đưa đột biến A377T vào trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* được định danh là CJI2331\_guaB\_m1, và chủng được đưa đột biến T499I vào protein tương tự được chỉ định là CJI2331\_guaB\_m2.

Ngoài ra, để điều chế chủng đột biến bao gồm cả đột biến A377T và T499I, 30 µg oligonucleotit của SEQ ID NO: 24 đã được biến nạp vào chủng CJI2331\_guaB\_m1 và các khuẩn lạc thu được theo cách tương tự như trên (Giao thức tự nhiên, tháng 1 năm 2014; 9 (10): 2301-16). Phân tích trình tự các khuẩn lạc thu được được thực hiện và chủng được đưa vào cả hai đột biến A377T và T499I trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* đã được chọn và được định danh là CJI2331\_guaB\_m1m2.

Bảng 6

| SEQ ID NO. | Đoạn mồi   | Trình tự (5'-3')                                                                |
|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 23         | mage A377T | ACAATCACGATGTCACCAGGAGCCTCCAGGGTGCCTGTGA<br>ACATCGAGCCCAGCATGACCGAGTCCGCGCCAGCA |
| 24         | mage T499I | TATTTTAAATCCTTAACGGTAGTTCGGAGCTTCTACAATTT<br>GCTGCAGGTGGTGCGGGTGCGACTCAGCCAAGCC |

Ví dụ 3-2: Kiểm tra khả năng sản sinh IMP trong các chủng được đưa đột biến vào

2 mL môi trường nuôi cấy giống được đưa vào các ống nghiệm có đường kính 18 mm và được hấp khử trùng dưới áp suất. Từng ATCC6872 và CJI2331 được cấy và ủ ở 30°C trong 24 giờ và sử dụng lắc trong nuôi cấy giống. 29 mL môi trường lên men được đưa vào bình tam giác 250 ml lắc được và được hấp khử trùng dưới áp suất ở 121°C trong 15 phút và 2 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy và ủ trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh ở tốc độ quay 170 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và độ pH 7,5.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng IMP được sản sinh được đo bằng HPLC (SHIMAZDU LC20A), và các kết quả như được thể hiện trong Bảng 7. Như được thể hiện trong các kết quả bên dưới, chủng CJI2331\_guaB\_m1 hoặc CJI2331\_guaB\_m2 có đột biến A377T hoặc đột biến T499I trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* cho thấy sự cải thiện nồng độ IMP tương ứng là 0,42 g/L (40%) hoặc 0,21 g/L (20%), so với chủng điều hòa CJI2331. Ngoài ra, chủng CJI2331\_guaB\_m1m2 có cả hai đột biến A377T và T499I cho thấy sự cải thiện nhất về nồng độ IMP là 0,58 g/L (50%), cho thấy có thể đạt được sự cải thiện hiệu quả nhất nồng độ IMP khi cả hai đột biến được đưa vào.

Bảng 7

| Chủng             | IMP (g/L) |
|-------------------|-----------|
| CJI2331           | 1,05      |
| CJI2331_guaB_m1   | 1,47      |
| CJI2331_guaB_m2   | 1,26      |
| CJI2331_guaB_m1m2 | 1,58      |

Ví dụ 4: Kiểm tra khả năng sản sinh IMP trong chủng sản sinh IMP có nguồn gốc từ ATCC6872

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 chủng ATCC6872, ATCC6872 đã được tạo huyền phù trong dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0) hoặc đệm xitrat (độ pH 5,5) ở mật độ  $10^7$  tế bào/mL đến  $10^8$  tế bào/mL, sau đó được xử lý bằng UV ở nhiệt độ phòng hoặc  $32^\circ\text{C}$  trong 20 phút đến 40 phút để gây các đột biến. Chủng được rửa bằng dung dịch muối 0,85% hai lần và phân tán trên môi trường tối thiểu chứa 1,7% agar được bổ sung chất để cung cấp đề kháng ở nồng độ thích hợp, và do đó thu được các khuẩn lạc. Từng khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng và được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy giống trong 24 giờ, sau đó được nuôi cấy trong môi trường lên men trong 3 đến 4 ngày. Kết quả là khuẩn lạc thể hiện khả năng sản sinh IMP tối ưu nhất tích lũy trong môi trường nuôi cấy đã được lựa chọn. Để điều chế chủng sản sinh IMP nồng độ cao, khuyết dưỡng adenin, loại rò rỉ guanin, nhạy cảm với lysozym, kháng 3,4-dehydroprolin, kháng streptomycin, kháng axit azetidin cacboxylic, kháng thiaprolin, kháng azaserin, kháng sulfaguanidin, kháng norvalin và kháng trimethoprim bằng cách thực hiện các quy trình tương ứng trên một cách tuần tự. Chủng CJI2335 được cung cấp có sức đề kháng trên và có khả năng sản sinh IMP tối ưu cuối cùng đã được chọn. Sức đề kháng của chủng CJI2335 và chủng ATCC6872 được so sánh và thể hiện trong bảng 8 bên dưới.

Bảng 8

| Đặc điểm                       | ATCC6872               | CJI2335                |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| 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 axit azetidin cacboxylic | 5 mg/mL                | 30 mg/mL               |
| Kháng thiaprolin               | 10 $\mu\text{g/mL}$    | 100 $\mu\text{g/mL}$   |
| Kháng azaserin                 | 25 $\mu\text{g/mL}$    | 100 $\mu\text{g/mL}$   |
| Kháng sulfaguanidin            | 50 $\mu\text{g/mL}$    | 200 $\mu\text{g/mL}$   |



|                    |           |           |
|--------------------|-----------|-----------|
| Kháng norvalin     | 0,2 mg/mL | 2 mg/mL   |
| Kháng trimethoprim | 20 µg/mL  | 100 µg/mL |

- Môi trường tối thiểu: 2% glucoza, 0,3% natri sulfat, 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,3% magiê 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 µg/L biotin, 20 mg/L adenin, 20 mg/L guanin, điều chỉnh độ pH 7,3.

Ví dụ 4-2: Kiểm tra chuẩn độ lên men của CJI2335

2 mL môi trường nuôi cấy giống được đưa vào các ống nghiệm có đường kính 18 mm và được hấp khử trùng dưới áp suất. Từng chủng ATCC6872 và CJI2335 được cấy chủng và ủ ở 30°C trong 24 giờ và sử dụng lắc trong nuôi cấy giống. 29 mL môi trường lên men được đưa vào 250 ml bình tam giác lắc và được hấp khử trùng dưới áp suất ở 121°C trong 15 phút, và 2 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chủng và ủ trong 3 ngày. Điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh ở tốc độ quay 170 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và độ pH 7,5.

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

Bảng 9

| Chủng    | IMP (g/L) |
|----------|-----------|
| ATCC6872 | 0         |
| CJI2335  | 5,4       |

Ví dụ 4-3: Điều chế vector chèn có chứa đột biến *guaB*

Để đưa các chủng có đột biến được chọn trong ví dụ 3, vector chèn đã được điều chế. Vector đưa vào đột biến *guaB* đã được chuẩn bị như sau. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng gen *guaB*(A377T) của chủng CJI2331\_pTOPO\_*guaB*(mt)1209 và gen *guaB*(T499I) của chủng CJI2331\_pTOPO\_*guaB*(mt)133 được chọn trong ví dụ 2 làm mạch khuôn và các đoạn mồi SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26. PCR được thực hiện bằng cách biến tính ở 94°C trong 5 phút, và sau đó 20 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, ở 55°C trong 30 giây, ở 72°C trong 1 phút, tiếp theo polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Các đoạn gen kết quả đã được phân tách bởi XbaI. Từng đoạn gen đã bị phân cắt

bởi enzym giới hạn XbaI đã được sao chép vào vector pDZ mạch thẳng bằng cách sử dụng enzym nối T4, và do đó pDZ-guaB (A377T) và pDZ-guaB (T499I) đã được điều chế.

Bảng 10

| SEQ ID NO. | Đoạn mồi   | Trình tự (5'-3')              |
|------------|------------|-------------------------------|
| 25         | pDZ-guaB-F | GCTCTAGAGACATGACTATCCAGGAAGTT |
| 26         | pDZ-guaB-R | GCTCTAGAATCAATGTGCCACTGCGTGCT |

Ví dụ 4-4: Đưa đột biến vào chủng CJI2335 và đánh giá

Để xác nhận trình tự nucleotit của gen *guaB* của chủng CJI2335 được chọn trong ví dụ 4-1, DNA bộ gen của CJI2335 đã được khuếch đại bằng PCR. Cụ thể, trước tiên PCR được thực hiện bằng cách sử dụng DNA nhiễm sắc thể của CJI2335 làm mạch khuôn và các đoạn mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22 trong 28 chu kỳ polyme hóa ở 94°C trong 1 phút, ở 58°C trong 30 giây và ở 72°C trong 2 phút với Taq DNA polymeraza để khuếch đại *guaB* khoảng 2,1 kb. Trình tự của chúng được thực hiện bằng cách sử dụng cùng đoạn mồi và kết quả là trình tự của nó giống với gen *guaB* của chủng ATCC6872 hoang dại, cho thấy không có đột biến gen *guaB*.

Bảng 11

| SEQ ID NO. | Đoạn mồi   | Trình tự (5'-3')      |
|------------|------------|-----------------------|
| 21         | guaB-seq-F | AATGAAAGATGCCGGATCATT |
| 22         | guaB-seq-R | TCAATGTGCCACTGCGTGCT  |

CJI2335 được biến nạp với từng vector pDZ-guaB(A377T) và pDZ-guaB(T499I) được điều chế trong ví dụ 4-3 và các chủng trong đó vector được chèn vào DNA bộ gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng đã được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, các chủng sơ cấp được chọn đã được trao đổi chéo thứ cấp để chọn các chủng mà đột biến gen đích được đưa vào. Đưa đột biến gen vào các chủng biến nạp mong muốn đã được kiểm tra bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, và sau đó giải trình tự được thực hiện để xác nhận đưa đột biến vào các chủng. Cụ thể, chủng được đưa vào đột biến A377T trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* được định danh là CJI2335\_guaB\_m1, và chủng được đưa vào đột biến T499I trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* được định danh là CJI2335\_guaB\_m2. Ngoài ra, để điều chế chủng đột biến có cả đột biến A377T và

T499I, chủng CJI2335\_guaB\_m1 đã được biến nạp với vector pDZ-guaB(T499I), và các khuẩn lạc được thu được theo cách tương tự bên trên. Để phân tích giải trình tự các khuẩn lạc thu được, chủng được đưa vào cả hai đột biến A377T và T499I trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* đã được chọn và được định danh là CJI2335\_guaB\_m1m2.

Như được thể hiện trong bảng 12, chủng CJI2335\_guaB\_m1 hoặc CJI2335\_guaB\_m2 có đột biến A377T hoặc đột biến T499I trong protein được mã hóa bởi gen *guaB* cho thấy nồng độ IMP tương ứng là 2,2 g/L (40%) hoặc 1,0 g/L (18,5%), so với chủng điều hòa CJI2335. Ngoài ra, chủng CJI2331\_guaB\_m1m2 có cả đột biến A377T và T499I cho thấy sự cải thiện nồng độ IMP là 2,7 g/L (50%), cho thấy khi cả hai đột biến được đưa vào, nồng độ IMP thu được cải thiện hiệu quả nhất.

Bảng 12

| Chủng             | IMP (g/L) |
|-------------------|-----------|
| CJI2335           | 5,4       |
| CJI2335_guaB_m1   | 7,6       |
| CJI2335_guaB_m2   | 6,4       |
| CJI2335_guaB_m1m2 | 8,1       |

Những kết quả này thể hiện rằng khi biến thể of axit 5'-inosinic dehydrogenaza theo sáng chế được đưa vào các loại vi sinh vật *Corynebacterium* có khả năng sản sinh IMP, thì có thể cải thiện rất tốt khả năng sản sinh axit 5'-inosinic.

CJI2335 đã được lưu giữ Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 22 tháng 6 năm 2018, theo các quy định của Hiệp ước Budapest và được chỉ định số đăng ký là KCCM12278P. Ngoài ra, chủng CJI2335\_guaB\_m1m2 đã được điều chế, còn được gọi là CJI2347, đã được lưu giữ Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 22 tháng 6 năm 2018, theo các quy định của Hiệp ước Budapest và chỉ định số đăng ký là KCCM12279P.

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

vi và giới hạn của các yêu cầu bảo hộ, hoặc tương đương với các giới hạn và giới hạn đó sẽ được bao gồm trong các yêu cầu bảo hộ.

Tên cơ quan lưu giữ: Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số đăng ký lưu giữ: KCCM12278P

Ngày lưu giữ: 22/06/2018

Tên cơ quan lưu giữ: Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số đăng ký lưu giữ: KCCM12279P

Ngày lưu giữ: 22/06/2018

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi vi sinh vật *Corynebacterium* sản sinh axit 5'-inosinic được nuôi cấy bằng cách sử dụng biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza theo sáng chế, có thể sản sinh axit 5'- inosinic với năng suất cao.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> BIẾN THỂ AXIT 5'-INOSINIC DEHYDROGENAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTO,  
VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ AXIT 5'-INOSINIC  
SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

<130> OPA18245

<150> 10-2018-0087597

<151> 2018-07-27

<160> 26

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1521

<212> DNA

<213> Không xác định

<220>

<223> guaB NT

<400> 1

```

atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataagggtgc attgcatggc      60
ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta      120
gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgtttaggta ttcctttggc atcggctgcg      180
atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cacgccaggg tggcattggt      240
gtcttgaccc gcaacttgct ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc      300
tctgagtcgg gcatggtcac cgaccctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa      360
gttgatgacc tgtgtgcacg cttccgcata tctggtcttc ctgtgggtcaa cgaagacggc      420
accttggttg gcatttgac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgcaag      480
gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa      540
gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac      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 atggctctgc gcgtcaagaa tgacttcggc      840
tccaagattg atgttgctcg cggcaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcatgatt      900
gaggctggcg cagacgccat caagggtgggt attggtcctg gttctatctg caccacccgt      960
gtggttgctg gtgttggtgc accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct     1020

```

tctgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcggcacgc agtactccgg tgacgttgct 1080  
 aaggcttttg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcgc aggcaccctg 1140  
 gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg 1200  
 ggttcgatgg gcgctatgca aggccgtggc ctctccggcg agaagcgttc ttactccaag 1260  
 gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1320  
 ggcaaggttc cttaccgcgg cgaaattggt cagattaccc accagattgt gggcggtttg 1380  
 cgcgcgga tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1440  
 gtgcgtatta cactgctgg cttggctgag tcgcaccgc accacctgca gcaaactgta 1500  
 gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 2  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Không xác định

<220>  
 <223> guaB AA

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

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

Gln Gln Thr Val Glu Ala Pro Asn Tyr Arg  
500 505

<210> 3  
<211> 1521  
<212> DNA  
<213> Không xác định

<220>  
<223> guaB NT (A377T)

```

<400>      3
atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataaggttgc attgcatggc      60
ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttgttcc gtcggaagta      120
gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgttttaggta ttcctttggc atcggctgcg      180
atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cacgccaggg tggcattggg      240
gtcttgacc gcaacttgtc ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc      300
tctgagtccg gcatggtcac cgaccctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa      360
gttgatgacc tgtgtgcacg ctccgcacac tctggtcttc ctgtggtcaa cgaagacggc      420
accttgttgg gcatttgcac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgcaag      480
gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa      540
gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac      600
aacaagctgg tcggtctgat taccgttaaa gactttgtta agaccgaaca gttcccgaat      660
tcctccaagg atgcttcggg ccgcttgcta gtagcagcag gtattggtac cggcgaggag      720
tcttatgagc gtgcaggctt gcttgctgat gccggcgtgg acgttctcat tgctgactcc      780
gcacacgcgc acaataaccg cgtgctggaa atgggtctgc gcgtcaagaa tgacttcggc      840
tccaagattg atgttgctcg cggaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcgatgatt      900
gaggctggcg cagacgccat caaggtgggt attggtcctg gttctatctg caccaccgt      960
gtggttgctg gtggttggtg accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct      1020
tctgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcggcatgc agtactccgg tgacgttgct      1080
aaggctttgg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcac aggcaccctg      1140
gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg      1200
ggttcgatgg gcgctatgca aggccgtggc ctctccggcg agaagcgttc ttactccaag      1260
gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa      1320
ggcaaggttc ctaccgcgg cgaaattggg cagattaccc accagattgt gggcggtttg      1380
cgcgcgggcaa tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc      1440

```



gtgcgtatta ccactgctgg cttgggtgag tcgcacccgc accacctgca gcaaactgta 1500  
gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 4  
<211> 1521  
<212> DNA  
<213> Không xác định

<220>  
<223> guaB NT(T499I)

<400> 4  
atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataagggttg attgcatggc 60  
ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta 120  
gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgttttaggta ttcctttggc atcgggtgcg 180  
atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cacgccaggg tggcattggt 240  
gtcttgacc gcaacttgct ctcgcaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc 300  
tctgagtccg gcatggtcac cgacctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa 360  
gttgatgacc tgtgtgcacg ctccgcac tctggtcttc ctgtggtcaa cgaagacggc 420  
accttggttg gcatttgac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgcaag 480  
gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa 540  
gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac 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 caagggtggg attggtcctg gttctatctg caccaccgt 960  
gtggttgctg gtgttggtgc accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct 1020  
tctgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcgcatgc agtactccgg tgacgttgct 1080  
aaggcttttg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcgc aggcaccctg 1140  
gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg 1200  
ggttcgatgg gcgctatgca aggcctggc ctctccggcg agaagcgctt ttactccaag 1260  
gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1320  
ggcaaggctt cttaccgcgg cgaaattggt cagattaccc accagattgt gggcggtttg 1380

cgcgcgga tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1440  
 gtgcgtatta ccaactgctgg cttggctgag tgcacccgc accacctgca gcaaattgta 1500  
 gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 5  
 <211> 1521  
 <212> DNA  
 <213> Không xác định

<220>  
 <223> guaB NT (A377T, T499I)

<400> 5  
 atgaccgaaa atcgtgtttc tacgggtgga gatgacccaa ataagggtgc attgcatggc 60  
 ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta 120  
 gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgttttaggta ttcctttggc atcggctgcg 180  
 atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cagccaggg tggcattggc 240  
 gtcttgacc gcaacttgct ctgcgaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc 300  
 tctgagtcgg gcatggtcac cgacctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa 360  
 gttgatgacc tgtgtgcacg ctccgcacg tctggtcttc ctgtggtcaa cgaagacggc 420  
 acctgtttgg gcatttgac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta tccccgcaag 480  
 gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgctg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa 540  
 gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac 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 atgggtctgc gcgtcaagaa tgacttcggc 840  
 tccaagattg atgttgctgg cggcaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcgatgatt 900  
 gaggtctggc cagacgccat caaggtgggt attggtcctg gttctatctg caccaccgt 960  
 gtggttgctg gtgttggtgc accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct 1020  
 tctgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcggcatgc agtactccgg tgacgttgct 1080  
 aaggctttgg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcac aggcacctg 1140  
 gaggtcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgtc ccgcggcatg 1200  
 ggttcgatgg gcgctatgca aggcctggc ctctccggcg agaagcgttc ttactccaag 1260  
 gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1320

ggcaagggttc cttaccgcgg cgaaattggt cagattaccc accagattgt gggcggtttg 1380  
 cgcgcgggcaa tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1440  
 gtgcgtatta ccactgctgg cttgggtgag tcgcaccgc accacctgca gcaaattgta 1500  
 gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 6  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Không xác định

<220>  
 <223> GuaB (A377T) -AA

<400> 6  
 Met Thr Glu Asn Arg Val Ser Thr Gly Gly Asp Asp Pro Asn Lys Val  
 1 5 10 15  
 Ala Leu His Gly Leu Thr Phe Asp Asp Val Leu Leu Leu Pro Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Val Val Pro Ser Glu Val Asp Thr Ser Ala Gln Phe Thr Arg  
 35 40 45  
 Asn Thr Arg Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ser Ala Ala Met Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Thr Glu Ala Arg Met Ala Ile Ala Met Ala Arg Gln Gly Gly Ile Gly  
 65 70 75 80  
 Val Leu His Arg Asn Leu Ser Ser Gln Glu Gln Ala Glu Gln Val Glu  
 85 90 95  
 Ile Val Lys Arg Ser Glu Ser Gly Met Val Thr Asp Pro Val Thr Ala  
 100 105 110  
 Asn Pro Asp Met Thr Ile Gln Glu Val Asp Asp Leu Cys Ala Arg Phe  
 115 120 125  
 Arg Ile Ser Gly Leu Pro Val Val Asn Glu Asp Gly Thr Leu Leu Gly  
 130 135 140  
 Ile Cys Thr Asn Arg Asp Met Arg Phe Glu Arg Asp Tyr Ser Arg Lys  
 145 150 155 160  
 Val Ser Asp Ile Met Thr Ala Met Pro Leu Val Val Ala Lys Glu Gly  
 165 170 175  
 Val Ser Lys Glu Glu Ala Leu Asp Leu Leu Ser Thr Asn Lys Val Glu  
 180 185 190  
 Lys Leu Pro Ile Val Asp Lys Asn Asn Lys Leu Val Gly Leu Ile Thr  
 195 200 205  
 Val Lys Asp Phe Val Lys Thr Glu Gln Phe Pro Asn Ser Ser Lys Asp  
 210 215 220

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

<210> 7  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Không xác định

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; GuaB(T499I)-AA

&lt;400&gt; 7

Met Thr Glu Asn Arg Val Ser Thr Gly Gly Asp Asp Pro Asn Lys Val  
 1 5 10 15

Ala Leu His Gly Leu Thr Phe Asp Asp Val Leu Leu Leu Pro Ala Glu  
 20 25 30

Ser Asn Val Val Pro Ser Glu Val Asp Thr Ser Ala Gln Phe Thr Arg  
 35 40 45

Asn Thr Arg Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ser Ala Ala Met Asp Thr Val  
 50 55 60

Thr Glu Ala Arg Met Ala Ile Ala Met Ala Arg Gln Gly Gly Ile Gly  
 65 70 75 80

Val Leu His Arg Asn Leu Ser Ser Gln Glu Gln Ala Glu Gln Val Glu  
 85 90 95

Ile Val Lys Arg Ser Glu Ser Gly Met Val Thr Asp Pro Val Thr Ala  
 100 105 110

Asn Pro Asp Met Thr Ile Gln Glu Val Asp Asp Leu Cys Ala Arg Phe  
 115 120 125

Arg Ile Ser Gly Leu Pro Val Val Asn Glu Asp Gly Thr Leu Leu Gly  
 130 135 140

Ile Cys Thr Asn Arg Asp Met Arg Phe Glu Arg Asp Tyr Ser Arg Lys  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Ile Met Thr Ala Met Pro Leu Val Val Ala Lys Glu Gly  
 165 170 175

Val Ser Lys Glu Glu Ala Leu Asp Leu Leu Ser Thr Asn Lys Val Glu  
 180 185 190

Lys Leu Pro Ile Val Asp Lys Asn Asn Lys Leu Val Gly Leu Ile Thr  
 195 200 205

Val Lys Asp Phe Val Lys Thr Glu Gln Phe Pro Asn Ser Ser Lys Asp  
 210 215 220

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

Ser Tyr Glu Arg Ala Gly Leu Leu Val Asp Ala Gly Val Asp Val Leu  
 245 250 255

Ile Val Asp Ser Ala His Ala His Asn Asn Arg Val Leu Glu Met Val  
 260 265 270

Ser Arg Val Lys Asn Asp Phe Gly Ser Lys Ile Asp Val Val Gly Gly  
 275 280 285

Asn Leu Ala Thr Arg Ser Ala Ala Lys Ala Met Ile Glu Ala Gly Ala  
 290 295 300

Asp Ala Ile Lys Val Gly Ile Gly Pro Gly Ser Ile Cys Thr Thr Arg  
 305 310 315 320  
 Val Val Ala Gly Val Gly Ala Pro Gln Ile Thr Ala Ile Met Glu Ala  
 325 330 335  
 Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Ile Ala Asp Gly Gly  
 340 345 350  
 Met Gln Tyr Ser Gly Asp Val Ala Lys Ala Leu Ala Ala Gly Ala Asp  
 355 360 365  
 Ser Val Met Leu Gly Ser Met Phe Ala Gly Thr Leu Glu Ala Pro Gly  
 370 375 380  
 Asp Ile Val Ile Val Gly Gly Lys Gln Tyr Lys Arg Tyr Arg Gly Met  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Met Gly Ala Met Gln Gly Arg Gly Leu Ser Gly Glu Lys Arg  
 405 410 415  
 Ser Tyr Ser Lys Asp Arg Tyr Phe Gln Ala Asp Val Arg Ser Glu Asp  
 420 425 430  
 Lys Leu Val Pro Glu Gly Val Glu Gly Lys Val Pro Tyr Arg Gly Glu  
 435 440 445  
 Ile Gly Gln Ile Thr His Gln Ile Val Gly Gly Leu Arg Ala Ala Met  
 450 455 460  
 Gly Tyr Thr Gly Ser Ala Thr Ile Glu Glu Leu Lys Thr Lys Gln Phe  
 465 470 475 480  
 Val Arg Ile Thr Thr Ala Gly Leu Ala Glu Ser His Pro His His Leu  
 485 490 495  
 Gln Gln Ile Val Glu Ala Pro Asn Tyr Arg  
 500 505  
  
 <210> 8  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Không xác định  
  
 <220>  
 <223> GuaB(A377T,T499I)-AA  
  
 <400> 8  
 Met Thr Glu Asn Arg Val Ser Thr Gly Gly Asp Asp Pro Asn Lys Val  
 1 5 10 15  
 Ala Leu His Gly Leu Thr Phe Asp Asp Val Leu Leu Leu Pro Ala Glu  
 20 25 30  
 Ser Asn Val Val Pro Ser Glu Val Asp Thr Ser Ala Gln Phe Thr Arg  
 35 40 45  
 Asn Thr Arg Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ser Ala Ala Met Asp Thr Val

| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Glu | Ala | Arg | Met | Ala | Ile | Ala | Met | Ala | Arg | Gln | Gly | Gly | Ile | Gly |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Val | Leu | His | Arg | Asn | Leu | Ser | Ser | Gln | Glu | Gln | Ala | Glu | Gln | Val | Glu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ile | Val | Lys | Arg | Ser | Glu | Ser | Gly | Met | Val | Thr | Asp | Pro | Val | Thr | Ala |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Asn | Pro | Asp | Met | Thr | Ile | Gln | Glu | Val | Asp | Asp | Leu | Cys | Ala | Arg | Phe |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Arg | Ile | Ser | Gly | Leu | Pro | Val | Val | Asn | Glu | Asp | Gly | Thr | Leu | Leu | Gly |
|     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ile | Cys | Thr | Asn | Arg | Asp | Met | Arg | Phe | Glu | Arg | Asp | Tyr | Ser | Arg | Lys |
|     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |
| Val | Ser | Asp | Ile | Met | Thr | Ala | Met | Pro | Leu | Val | Val | Ala | Lys | Glu | Gly |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Ser | Lys | Glu | Glu | Ala | Leu | Asp | Leu | Leu | Ser | Thr | Asn | Lys | Val | Glu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Lys | Leu | Pro | Ile | Val | Asp | Lys | Asn | Asn | Lys | Leu | Val | Gly | Leu | Ile | Thr |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Phe | Val | Lys | Thr | Glu | Gln | Phe | Pro | Asn | Ser | Ser | Lys | Asp |
|     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Gly | Arg | Leu | Leu | Val | Ala | Ala | Gly | Ile | Gly | Thr | Gly | Glu | Glu |
|     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     | 240 |
| Ser | Tyr | Glu | Arg | Ala | Gly | Leu | Leu | Val | Asp | Ala | Gly | Val | Asp | Val | Leu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Val | Asp | Ser | Ala | His | Ala | His | Asn | Asn | Arg | Val | Leu | Glu | Met | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ser | Arg | Val | Lys | Asn | Asp | Phe | Gly | Ser | Lys | Ile | Asp | Val | Val | Gly | Gly |
|     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Leu | Ala | Thr | Arg | Ser | Ala | Ala | Lys | Ala | Met | Ile | Glu | Ala | Gly | Ala |
|     |     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Asp | Ala | Ile | Lys | Val | Gly | Ile | Gly | Pro | Gly | Ser | Ile | Cys | Thr | Thr | Arg |
|     |     |     | 305 |     |     | 310 |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Val | Val | Ala | Gly | Val | Gly | Ala | Pro | Gln | Ile | Thr | Ala | Ile | Met | Glu | Ala |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |
| Ala | Thr | Val | Ala | Ser | Ala | Ala | Gly | Val | Pro | Leu | Ile | Ala | Asp | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Met | Gln | Tyr | Ser | Gly | Asp | Val | Ala | Lys | Ala | Leu | Ala | Ala | Gly | Ala | Asp |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ser | Val | Met | Leu | Gly | Ser | Met | Phe | Thr | Gly | Thr | Leu | Glu | Ala | Pro | Gly |
|     |     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |

Asp Ile Val Ile Val Gly Gly Lys Gln Tyr Lys Arg Tyr Arg Gly Met  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Met Gly Ala Met Gln Gly Arg Gly Leu Ser Gly Glu Lys Arg  
 405 410 415  
 Ser Tyr Ser Lys Asp Arg Tyr Phe Gln Ala Asp Val Arg Ser Glu Asp  
 420 425 430  
 Lys Leu Val Pro Glu Gly Val Glu Gly Lys Val Pro Tyr Arg Gly Glu  
 435 440 445  
 Ile Gly Gln Ile Thr His Gln Ile Val Gly Gly Leu Arg Ala Ala Met  
 450 455 460  
 Gly Tyr Thr Gly Ser Ala Thr Ile Glu Glu Leu Lys Thr Lys Gln Phe  
 465 470 475 480  
 Val Arg Ile Thr Thr Ala Gly Leu Ala Glu Ser His Pro His His Leu  
 485 490 495  
 Gln Gln Ile Val Glu Ala Pro Asn Tyr Arg  
 500 505

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

<220>  
 <223> pDZ-purF(gla)-1

<400> 9  
 gctctagacc actctaagac gcggccacc

29

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

<220>  
 <223> pDZ-purF(gla)-2

<400> 10  
 aagtagtggt caccatgacg ctgattctac taagttt

37

<210> 11  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pDZ-purF(gla)-3



<400> 11  
agtagaatca gcggtcatggt gaacactact ttccccag

38

<210> 12  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> pDZ-purF(gla)-4

<400> 12  
gctctagact gtgcgcccac gatatccag

29

<210> 13  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> pDZ-purA(alt)-1

<400> 13  
gctctagagg ccacgatgcc cggagcatc

29

<210> 14  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> pDZ-purA(alt)-2

<400> 14  
taacgatagc tgccaagggtt attcacttcc tagatatt

37

<210> 15  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> pDZ-purA(alt)-3

<400> 15  
aggaagtga taaccttggc agctatcggt atcgctcg

37

<210> 16  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pDZ-purA(alt)-4

<400> 16  
 gctctagagg tcacgaatgg gtaggtgcc

29

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pCR-guaB-F

<400> 17  
 actgcattac acggatatgt a

21

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pCR-guaB-R

<400> 18  
 cctcgtggcg tccccacaaa c

21

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pTOPO-guaB-library-F

<400> 19  
 attgcatggc ttgacgtttg a

21

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pTOPT-guaB-library-R

<400> 20  
 atcaatgtgc cactgcgtgc t

21

<210> 21

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> guaB seq F

<400> 21  
 aatgaaagat gccggatcat t 21

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> guaB seq R

<400> 22  
 acgcccgaat cacgaacctg a 21

<210> 23  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> mage A337T

<400> 23  
 acaatcacga tgtcaccagg agcctccagg gtgcctgtga acatcgagcc cagcatgacc 60  
 gagtccgcgc cagca 75

<210> 24  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> mage T499I

<400> 24  
 tatttttaat ccttaacggt agttcggagc ttctacaatt tgctgcaggt ggtgcgggtg 60  
 cgactcagcc aagcc 75

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-guaB-F

<400> 25  
gctctagaga catgactatc caggaagtt

29

<210> 26  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> pDZ-guaB-R

<400> 26  
gctctagaca gtggtgtaat ccaccacgc

29

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza có i) sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin, ii) sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin, hoặc iii) sự thay thế axit amin ở vị trí thứ 377 bằng threonin và thay thế axit amin ở vị trí thứ 499 bằng isoleucin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.
2. Polynucleotit mã hóa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza theo điểm 1.
3. Vectors chứa polynucleotit theo điểm 2.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit 5'-inosinic, trong đó vi sinh vật chứa biến thể axit 5'-inosinic dehydrogenaza theo điểm 1, polynucleotit theo điểm 2, hoặc vector 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 axit 5'-inosinic, bao gồm:
  - nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 4 trong môi trường nuôi cấy; và
  - thu hồi axit 5'-inosinic 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*.