



(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)



1-0041582

(51)^{2020.01} C12N 15/53; C07J 9/00; C12P 33/00;
C12N 15/54; A23L 33/11; C12N 1/13

(13) B

(21) 1-2020-02720

(22) 19/10/2018

(86) PCT/JP2018/039009 19/10/2018

(87) WO 2019/078359 A1 25/04/2019

(30) 2017-202347 19/10/2017 JP

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/09/2020 390

(73) AJINOMOTO CO., INC. (JP)

15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan

(72) SUZUKI, Shigeo (JP); KISELEVA, Evgeniya Mikhailovna (RU).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) VI SINH VẬT LABYRINTHULEA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT STEROL

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật Labyrinthulea và phương pháp sản xuất sterol. Sterol được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật Labyrinthulea có khả năng sản sinh sterol, đã được cải biến để hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza (DHCR24), 7-dehydrocholesterol reductaza (DHCR7), hoặc sterol 24-C-metyltransferaza (SMT1) được giảm xuống, và thu hồi sterol từ canh nuôi cấy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[0001]

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sterol bằng cách sử dụng vi sinh vật *Labyrinthulea*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[0002]

Các sterol là các dẫn xuất steroid được phát hiện ở nhiều sinh vật khác nhau như động vật, thực vật, và nấm. Các sterol được sản xuất bằng cách, ví dụ, chiết tách từ các nguồn sinh học như vậy chứa các sterol. Ngoài ra, một số vi sinh vật *Labyrinthulea*, là các vi sinh vật dị dưỡng, được biết là sản sinh các sterol như cholesterol (tài liệu phi sáng chế 1). Ngoài ra, đã có báo cáo về các phương pháp sản xuất các sterol bằng cách sử dụng các vi sinh vật *Labyrinthulea*.

[0003]

Ví dụ, đã có báo cáo về phương pháp sản xuất 7-dehydrocholesterol bằng cách sử dụng các vi sinh vật *Labyrinthulea* như *Aurantiochytrium limacinum* có hoạt tính 7-dehydrocholesterol reductaza (còn được gọi là “DHCR7”) giảm (tài liệu sáng chế 1).

[0004]

Ngoài ra, ví dụ, đã có báo cáo về phương pháp sản xuất 7-dehydrocholesterol bằng cách sử dụng các vi sinh vật *Labyrinthulea* như *Aurantiochytrium limacinum* có hoạt tính sterol 24-C-methyltransferaza (còn được gọi là “SMT1”) giảm (tài liệu sáng chế 2). Theo tài liệu sáng chế 2, đã chỉ ra rằng sự tích lũy 7-dehydrocholesterol được gia tăng bằng cách làm giảm hoạt tính của SMT1, nhưng ngược lại sự tích lũy cholesterol bị giảm xuống.

[0005]

SMT1 là enzyme đưa vào nhóm methyl ở vị trí C24 của các sterol (EC 2.1.1.41). SMT1 là một trong số các enzyme liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các sterol, và cụ thể, nó liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các sterol thực vật và các sterol nấm. Chưa có phương pháp nào được biết đến để sản xuất cholesterol bằng cách sử dụng

các vi sinh vật *Labyrinthulea* có hoạt tính SMT1 giảm.

[0006]

DHCR7 là enzym khử liên kết đôi ở vị trí C7 của các sterol (EC 1.3.1.21). DHCR7 là một trong số các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của các sterol, và cụ thể, nó liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các sterol động vật như cholesterol và 7-dehydrocholesterol.

[0007]

24-dehydrocholesterol reductaza (còn được gọi là “DHCR24”) là enzym khử liên kết đôi ở vị trí C24 của các sterol (EC 1.3.1.72). DHCR24 là một trong số các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của các sterol, và cụ thể, nó liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các sterol động vật như cholesterol và 7-dehydrocholesterol. Chưa có phương pháp nào được biết đến để sản xuất các sterol thực vật hoặc các sterol nấm bằng cách sử dụng các vi sinh vật *Labyrinthulea* có hoạt tính DHCR24 giảm.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế

[0008]

Tài liệu sáng chế 1: WO2015/108058

Tài liệu sáng chế 2: WO2016/056610

Tài liệu phi sáng chế

[0009]

Tài liệu phi sáng chế 1: Weete JD, et al., Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185., Lipids. 1997 Aug;32(8):839-45.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích cần đạt được bởi sáng chế

[0010]

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất sterol.

Phương tiện để đạt được mục đích này

[0011]

Để đạt được mục đích đã nêu ở trên, các tác giả sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu khác nhau. Kết quả là, họ nhận phát hiện ra rằng khả năng sản sinh sterol của vi sinh vật *Labyrinthulea* được cải thiện bằng cách cải biến vi sinh vật này để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống, và hoàn thành sáng chế.

[0012]

Do đó, sáng chế có thể được thể hiện, ví dụ, như sau.

[1] Vi sinh vật *Labyrinthulea*, trong đó vi sinh vật này:

có khả năng sản sinh sterol,

là *Aurantiochytrium* sp.1,

đã được cải biến để hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm so với chủng không được cải biến, và

trong đó sterol là ít nhất một sterol được chọn từ các sterol thực vật và các sterol nấm.

[2] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa 24-dehydrocholesterol reductaza hoặc làm xáo trộn gen này.

[3] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ trình tự axit amin của 24-dehydrocholesterol reductaza.

[4] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó sterol là stigmasterol và/hoặc brassicasterol.

[5] Vi sinh vật *Labyrinthulea*, trong đó vi sinh vật này:

có khả năng sản sinh sterol,

là *Aurantiochytrium* sp.1,

đã được cải biến để hoạt tính của 7-dehydrocholesterol reductaza được giảm so với chủng không được cải biến, và

trong đó sterol là 7-dehydrocholesterol và/hoặc ergosterol.

[6] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 7-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa 7-

dehydrocholesterol reductaza hoặc làm xáo trộn gen này.

[7] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 7-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ trình tự axit amin của 7-dehydrocholesterol reductaza.

[8] Vi sinh vật nêu ở trên, còn được cải biến để hoạt tính của sterol 24-C-methyltransferaza được giảm so với chủng không được cải biến.

[9] Vi sinh vật *Labyrinthulea*, trong đó vi sinh vật này:

có khả năng sản sinh sterol,

là *Aurantiochytrium* sp.1,

đã được cải biến để hoạt tính của sterol 24-C-methyltransferaza được giảm so với chủng không được cải biến, và

trong đó sterol là ít nhất một sterol được chọn từ các sterol động vật.

[10] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó sterol 24-C-methyltransferaza là protein được xác định trong phần (a), (b), hoặc (c) nêu dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 hoặc 56;

(b) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 hoặc 56, nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung từ 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính sterol 24-C-methyltransferaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin thể hiện độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 hoặc 56, và có hoạt tính sterol 24-C-methyltransferaza.

[11] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa 24-dehydrocholesterol reductaza hoặc làm xáo trộn gen này.

[12] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ trình tự axit amin của 24-dehydrocholesterol reductaza.

[13] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó sterol là cholesterol và/hoặc 7-dehydrocholesterol.

[14] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó sterol là cholesterol.

[15] Vi sinh vật nêu ở trên, còn có ít nhất một đặc tính được chọn từ phần (A), (B), và (C) nêu dưới đây:

(A) vi sinh vật này đã được cải biến để hoạt tính của sterol C-22 desaturaza được giảm so với chủng không được cải biến;

(B) vi sinh vật đã được cải biến để hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được tăng so với chủng không được cải biến;

(C) vi sinh vật đã được cải biến để hoạt tính của 7-dehydrocholesterol reductaza được tăng so với chủng không được cải biến.

[16] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó sterol C-22 desaturaza là protein được xác định trong phần (a), (b), hoặc (c) nêu dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42;

(b) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42, nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung từ 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính sterol C-22 desaturaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin thể hiện độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42, và có hoạt tính sterol C-22 desaturaza.

[17] Vi sinh vật nêu ở trên, 15, và 16, trong đó 24-dehydrocholesterol reductaza là protein được xác định trong phần (a), (b), hoặc (c) nêu dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40;

(b) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40, nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung từ 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính 24-dehydrocholesterol reductaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin thể hiện độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40, và có hoạt tính 24-dehydrocholesterol reductaza.

[18] Vi sinh vật nêu ở trên và 15 đến 17, trong đó 7-dehydrocholesterol reductaza là protein được xác định trong phần (a), (b), hoặc (c) nêu dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39;

(b) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39, nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung từ 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính 7-dehydrocholesterol reductaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin thể hiện độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39, và có hoạt tính 7-dehydrocholesterol reductaza.

[19] Vi sinh vật nêu ở trên, trong đó trình tự nucleotit của ADN ribosom 18S (18S Ribosomal DNA, 18S rDNA) của vi sinh vật có độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 97% với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3.

[20] Vi sinh vật nêu ở trên, là chủng cải biến được dẫn xuất từ chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 (FERM BP-22342), AJ7868 (FERM BP-22290), hoặc AJ7879 (FERM BP-22367).

[21] Phương pháp sản xuất sterol, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật nêu ở trên trong môi trường nuôi cấy; và

thu hồi sterol từ các tế bào được tạo ra bằng bước nuôi cấy này.

[22] Phương pháp nêu ở trên, trong đó sterol là sterol tự do, sterol este, steryl glucosit, axyl steryl glucosit, hoặc hỗn hợp của chúng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương thức thực hiện sáng chế

[0013]

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích một cách chi tiết.

[0014]

<1> Vi sinh vật theo sáng chế

Vi sinh vật theo sáng chế là vi sinh vật *Labyrinthulea* có khả năng sản sinh sterol, đã được cải biến để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống.

[0015]

<1-1> Vi sinh vật *Labyrinthulea*

Vi sinh vật *Labyrinthulea* được sử dụng trong sáng chế là *Aurantiochytrium* sp.1. Cụm từ “*Aurantiochytrium* sp.1” dùng để chỉ một loài cụ thể của giống *Aurantiochytrium*, và cụ thể dùng để chỉ loài mà chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 (FERM BP-22342) thuộc về. Nói cách khác, cụm từ “*Aurantiochytrium* sp.1” cụ thể dùng để chỉ nhóm của các vi sinh vật bao gồm chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và các chủng thuộc về cùng một loài như chủng này. Các ví dụ về các chủng thuộc về cùng một loài như chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 bao gồm các chủng có 18S rDNA trong đó trình tự nucleotit của nó có độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 97% với trình tự nucleotit của 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 (SEQ ID NO: 3). Các ví dụ cụ thể về *Aurantiochytrium* sp.1 bao gồm các chủng AJ7867 (FERM BP-22304), AJ7868 (FERM BP-22290), AJ7879 (FERM BP-22367), BURABG162, SKE217, và SKE218, cũng như chủng AJ7869. Ngoài ra, các chủng dẫn xuất, như các chủng cải biến, được dẫn xuất từ các chủng thuộc về *Aurantiochytrium* sp.1 đã lấy ví dụ ở trên được bao gồm trong *Aurantiochytrium* sp.1.

[0016]

Chủng AJ7869 được lưu giữ đầu tiên ở cơ quan hành chính độc lập, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia, Cơ quan lưu giữ sinh vật của bằng độc quyền sáng chế quốc tế (National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) vào tháng 8, 2017 với số đăng ký FERM P-22342, và sau đó được chuyển sang lưu giữ quốc tế theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 8 tháng 7 năm 2018, và được gán mã số truy cập FERM BP-22342.

[0017]

Chủng AJ7868 được lưu giữ đầu tiên ở cơ quan hành chính độc lập, Cơ quan lưu giữ sinh vật của bằng độc quyền sáng chế quốc tế (National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) vào ngày 5 tháng 8 năm 2015 với số đăng ký FERM P-22290, và sau đó được chuyển sang lưu giữ quốc tế theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 31 tháng 8 năm 2016, và được gán mã số truy cập FERM BP-22290.

[0018]

Chủng AJ7879 được lưu giữ đầu tiên ở cơ quan hành chính độc lập, Cơ quan lưu giữ sinh vật của bằng độc quyền sáng chế quốc tế (National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan) vào ngày 27 tháng 8 năm 2018 là lưu giữ quốc tế theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest, và được gán mã số truy cập FERM BP-22367.

[0019]

Các chủng này có thể có được từ, ví dụ, Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ (American Type Culture Collection, địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Hiệp chủng quốc Hoa Kỳ). Nghĩa là, các số đăng ký được đưa ra cho các chủng tương ứng, và các chủng này có thể được đặt bằng cách sử dụng các số đăng ký này (tham khảo <http://www.atcc.org/>). Các số đăng ký của các chủng được liệt kê trong danh mục của Trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ. Các chủng này có thể cũng nhận được từ, ví dụ, các kho tại đó các chủng này được lưu giữ.

[0020]

Vi sinh vật theo sáng chế có thể thu được bằng cách cải biến thích hợp vi sinh vật Labyrinthulea như vi sinh vật đã lấy ví dụ ở trên. Nghĩa là, vi sinh vật theo sáng chế có thể là chủng cải biến được dẫn xuất từ vi sinh vật Labyrinthulea như vi sinh vật đã lấy ví dụ ở trên. Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể là chủng cải biến được dẫn xuất từ chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869, AJ7868, hoặc AJ7879. Cụ thể hơn, vi sinh vật theo sáng chế có thể là chủng cải biến được dẫn xuất từ chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869.

[0021]

<1-2> Khả năng sản sinh sterol

Vi sinh vật theo sáng chế có khả năng sản sinh sterol. Cụm từ “vi sinh vật có khả năng sản sinh sterol” dùng để chỉ vi sinh vật có khả năng tạo ra sterol mục tiêu và tích lũy nó trong các tế bào của vi sinh vật này ở mức độ mà sterol có thể được thu hồi, khi vi sinh vật này được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy.

[0022]

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật vốn đã có khả năng sản sinh sterol hoặc có thể là vi sinh vật được cải biến để có khả năng sản sinh sterol. Ví dụ, vi sinh vật *Labyrinthulea* như vi sinh vật đã lấy ví dụ ở trên có thể được sử dụng làm vi sinh vật có khả năng sản sinh sterol, như đang tồn tại, hoặc sau khi truyền hoặc tăng cường khả năng sản sinh sterol. Các phương pháp để truyền hoặc tăng cường khả năng sản sinh sterol không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, như được mô tả dưới đây, khả năng sản sinh sterol có thể được truyền hoặc tăng cường bằng cách cải biến vi sinh vật *Labyrinthulea* để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống. Ngoài ra, ví dụ, khả năng sản sinh cholesterol có thể được truyền hoặc được tăng cường bằng cách cải biến vi sinh vật *Labyrinthulea* để sự biểu hiện enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp cholesterol được tăng cường hoặc tương tự (WO2016/056610).

[0023]

Các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của DHCR24 được giảm xuống bao gồm các sterol thực vật và các sterol nấm. Các ví dụ cụ thể về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của DHCR24 được giảm xuống bao gồm các sterol thực vật. Tổng lượng sản sinh của sterol thực vật và sterol nấm so với tổng lượng sản sinh của sterol có thể là, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 90% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 95% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 97% (trọng lượng), hoặc lớn hơn hoặc bằng 99% (trọng lượng). Các cụm từ “sterol thực vật” và “sterol nấm”, tương ứng, dùng để chỉ sterol được phát hiện ở thực vật và sterol được phát hiện ở nấm. Các ví dụ về các sterol thực vật bao gồm 7-dehydropolyferosterol, stigmasterol, 4-metyl-7,22-stigmasteradienol, β -sitosterol, brassicasterol, campesterol, diosgenin, axit oleanolic, axit betulinic, axit ursolic, hecogenin, sarsasapogenin, isofucosterol, avenasterol, Δ 7-stigmastenol, Δ 7-campestenol, fucosterol, và salgasterol. Các ví dụ cụ thể về các sterol thực vật bao gồm các sterol có nhóm methyl hoặc nhóm ethyl ở vị trí C24. Các ví dụ cụ thể hơn về các sterol thực vật bao gồm stigmasterol và brassicasterol. Các ví dụ về các sterol nấm bao gồm ergosterol và 7-dihydroergosterol. Các ví dụ cụ thể về các sterol nấm bao gồm ergosterol.

[0024]

Các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của DHCR7 được giảm xuống bao gồm các tiền vitamin D. Các ví dụ về các tiền vitamin D bao gồm 7-dehydrocholesterol (tiền vitamin D3) và ergosterol (tiền vitamin D2). Các ví dụ cụ thể về các tiền vitamin D bao gồm 7-dehydrocholesterol. Lượng sản sinh của tiền vitamin D so với tổng lượng sản sinh của sterol có thể là, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 50% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 70% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 80% (trọng lượng), hoặc lớn hơn hoặc bằng 85% (trọng lượng).

[0025]

Các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của SMT1 được giảm xuống bao gồm các sterol động vật. Lượng sản sinh của sterol động vật so với tổng lượng sản sinh của sterol có thể là, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 90% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 95% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 97% (trọng lượng), hoặc lớn hơn hoặc bằng 99% (trọng lượng). Cụm từ “sterol động vật” dùng để chỉ sterol được phát hiện ở động vật. Các ví dụ về các sterol động vật bao gồm cholesterol, 7-dehydrocholesterol, axit glycocholic, axit taurocholic, axit cholic, estradiol, estron, ethinylestradiol, estriol, dehydroepiandrosteron, metylandrostendiol, 5 β -pregnan-3 α , 20 α -diol, pregnenolon, axit chenodeoxycholic, axit dehydrocholic, dihydroxycholesterol, digitoxigenin, desmosterol, và lathosterol. Các ví dụ cụ thể về các sterol động vật bao gồm cholesterol và 7-dehydrocholesterol. Các ví dụ cụ thể hơn về các sterol động vật bao gồm cholesterol.

[0026]

Khi vi sinh vật theo sáng chế có hai hoặc nhiều sự cải biến, sterol mục tiêu có thể được chọn thích hợp theo các điều kiện khác nhau như sự phối hợp của các cải biến. Chẳng hạn, các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của DHCR7 và SMT1 được giảm xuống bao gồm 7-dehydrocholesterol (tiền vitamin D3). Ngoài ra, chẳng hạn, các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của SMT1 và sterol C-22 desaturaza được giảm xuống bao gồm các sterol động vật như cholesterol. Ngoài ra, chẳng hạn, các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của SMT1 được giảm xuống và hoạt tính của DHCR24 được gia tăng bao gồm một phần của các sterol động vật như cholesterol, lathosterol, và 7-

dehydrocholesterol. Ngoài ra, chẳng hạn, các ví dụ về sterol mục tiêu khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của SMT1 được giảm xuống và hoạt tính của DHCR7 được gia tăng bao gồm cholesterol.

[0027]

Vi sinh vật theo sáng chế có thể có khả năng sản sinh một loại sterol, hoặc hai hoặc nhiều loại sterol.

[0028]

Các sterol có thể có mặt không chỉ ở dạng tự do, mà còn ở dạng các dẫn xuất khác nhau. Do đó, cụm từ “sterol” có thể gọi chung là sterol tự do và các dẫn xuất của nó, trừ khi có quy định khác. Nghĩa là, cụm từ “sterol” có thể dùng để chỉ sterol tự do, dẫn xuất của nó, hoặc hỗn hợp của chúng. Các ví dụ về các dẫn xuất của các sterol bao gồm các sterol este, các steryl glucosit, và các axyl steryl glucosit. Nghĩa là, cụm từ “sterol” có thể dùng để chỉ, cụ thể, sterol tự do, sterol este, steryl glucosit, axyl steryl glucosit, hoặc hỗn hợp của chúng.

[0029]

Cụm từ “sterol este” dùng để chỉ axyl este của sterol tự do, nghĩa là hợp chất có cấu trúc trong đó sterol tự do và axit béo được liên kết với nhau qua liên kết este. Nói cách khác, sterol este có gốc tương ứng với sterol tự do và gốc tương ứng với axit béo, trong đó các gốc này liên kết với nhau qua liên kết este. Gốc tương ứng với sterol tự do còn được gọi là “gốc sterol”. Gốc tương ứng với axit béo còn được gọi là “axit béo gốc” hoặc “gốc axyl”. Liên kết este có thể được tạo ra, ví dụ, giữa nhóm hydroxyl ở vị trí C3 của sterol và nhóm carboxyl của axit béo. Do đó, khi sterol có mặt ở dạng ester, có thể chấp nhận rằng nhóm hydroxyl ở vị trí C3 của sterol không tồn tại. Loại của nhóm axyl không bị giới hạn cụ thể. Nghĩa là, chiều dài mạch và mức độ không no của nhóm axyl có thể thay đổi. Chiều dài mạch của nhóm axyl có thể là, ví dụ, C14-C26 (nghĩa là C14, C16, C18, C20, C22, C24, hoặc C26). Nhóm axyl có thể no hoặc không no. Nhóm axyl có thể có một hoặc nhiều (nghĩa là một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) liên kết đôi không no. Các ví dụ cụ thể về các axit béo tương ứng với nhóm axyl bao gồm, ví dụ, axit myristic (14:0), axit palmitic (16:0), axit stearic (18:0), axit arachidic (20:0), axit behenic (22:0), axit lignoxeric (24:0), axit xerotic (26:0), axit myristoleic (14:1), axit palmitoleic (16:1), axit oleic (18:1), axit linoleic (18 :2), axit linolenic

(18:3), axit arachidonic (20:4), axit eicosapentaenoic (EPA, 20:5), axit docosapentaenoic (DPA, 22:5), axit docosaheptaenoic (DHA, 22:6). Các ví dụ cụ thể về các axit béo tương ứng với nhóm axyl bao gồm axit docosaheptaenoic (DHA, 22:6), axit docosapentaenoic (DPA, 22:5), và axit palmitic (16:0).

[0030]

Cụm từ “steryl glucosit” dùng để chỉ glucosit của sterol tự do. Cụm từ “axyl steryl glucosit” dùng để chỉ glucosit của sterol este.

[0031]

<1-3> Giảm hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1

Vi sinh vật theo sáng chế đã được cải biến để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống. Vi sinh vật theo sáng chế được cải biến, cụ thể, để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm so với chủng không được cải biến. Bằng cách cải biến vi sinh vật *Labyrinthula* để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống, khả năng sản sinh sterol của vi sinh vật có thể được cải thiện, và nghĩa là, sự sản sinh sterol bởi vi sinh vật có thể được gia tăng. Các ví dụ về sự gia tăng sản sinh sterol bao gồm gia tăng lượng sản sinh sterol, gia tăng tốc độ sản sinh sterol, và gia tăng hiệu suất sterol. Các ví dụ về sự gia tăng lượng sản sinh sterol bao gồm sự gia tăng lượng sản sinh sterol trên mỗi trọng lượng của các tế bào và sự gia tăng lượng sản sinh sterol trên mỗi lượng của canh nuôi cấy. Các ví dụ về sự gia tăng sản sinh sterol cũng bao gồm sự gia tăng tỷ lệ của lượng sản sinh của sterol mục tiêu so với tổng lượng sản sinh của (các) sterol. Tỷ lệ của lượng sản sinh của sterol mục tiêu với tổng lượng sản sinh của (các) sterol có thể là, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 50% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 70% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 80% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 85% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 90% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 95% (trọng lượng), lớn hơn hoặc bằng 97% (trọng lượng), hoặc lớn hơn hoặc bằng 99% (trọng lượng). Cụ thể, việc giảm hoạt tính của DHCR24 có thể tạo ra sự gia tăng sản sinh sterol thực vật và/hoặc sterol nấm. Ngoài ra, cụ thể, việc giảm hoạt tính của DHCR7 có thể tạo ra sự gia tăng sản sinh tiền vitamin D. Ngoài ra, cụ thể, việc giảm hoạt tính của SMT1 có thể tạo ra sự gia tăng sản sinh sterol động vật.

[0032]

Hoạt tính của DHCR7 và SMT1 có thể được giảm theo cách phối hợp. Nói cách

khác, khi hoạt tính của DHCR7 được giảm xuống, hoạt tính của SMT1 có thể được giảm thêm nữa. Ngoài ra, khi hoạt tính của SMT1 được giảm xuống, hoạt tính của DHCR7 có thể được giảm thêm nữa. Ví dụ, việc giảm hoạt tính của DHCR7 và SMT1 có thể tạo ra sự gia tăng sản sinh 7-dehydrocholesterol (tiền vitamin D3).

[0033]

Vi sinh vật theo sáng chế có thể thu được bằng cách cải biến vi sinh vật *Labyrinthulea* có khả năng sản sinh sterol để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống. Vi sinh vật theo sáng chế có thể cũng thu được bằng cách cải biến vi sinh vật *Labyrinthulea* để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống, và sau đó truyền hoặc tăng cường khả năng sản sinh sterol. Vi sinh vật theo sáng chế có thể cũng là vi sinh vật có được khả năng sản sinh sterol bằng cách được cải biến để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống. Chúng trước khi được cải biến để hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 được giảm xuống có thể có khả năng sản sinh sterol khác ngoài sterol mục tiêu. Nghĩa là, ví dụ, vi sinh vật *Labyrinthulea* có khả năng sản sinh sterol động vật có thể được cải biến để hoạt tính của DHCR24 được giảm xuống. Ngoài ra, ví dụ, vi sinh vật *Labyrinthulea* có khả năng sản sinh cholesterol có thể được cải biến để hoạt tính của DHCR7 được giảm xuống. Ngoài ra, ví dụ, vi sinh vật *Labyrinthulea* có khả năng sản sinh sterol thực vật và/hoặc sterol nấm có thể được cải biến để hoạt tính của SMT1 được giảm xuống. Các sự cải biến để cấu tạo nên vi sinh vật theo sáng chế có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ.

[0034]

Sau đây, DHCR24, DHCR7, và SMT1, và các gen mã hóa chúng được mô tả. Bất ngờ là, các phần mô tả được cung cấp dưới đây có thể được áp dụng không chỉ cho DHCR24, DHCR7, và SMT1 trong đó hoạt tính của chúng được giảm ở vi sinh vật theo sáng chế, mà còn được áp dụng cho DHCR24 và DHCR7 trong đó hoạt tính của chúng được gia tăng nhờ các cải biến khác được mô tả dưới đây. DHCR24, DHCR7, và SMT1 trong đó hoạt tính của chúng được giảm ở vi sinh vật theo sáng chế là các enzym được sở hữu bởi vi sinh vật *Labyrinthulea* cần được cải biến.

[0035]

Cụm từ “24-dehydrocholesterol reductaza (DHCR24)” dùng để chỉ protein

(enzym) có hoạt tính xúc tác phản ứng khử liên kết đôi ở vị trí C24 (liên kết đôi C24-C25) của sterol (EC 1.3.1.72). Hoạt tính này còn được gọi là “hoạt tính 24-dehydrocholesterol reductaza (hoạt tính DHCR24)”. Gen mã hóa DHCR24 còn được gọi là “gen 24-dehydrocholesterol reductaza (gen DHCR24)” hoặc “gen dhcr24”. Cụm từ “vị trí C24” được đề cập ở đây dùng để chỉ cacbon tương ứng với vị trí C24 của zymosterol.

[0036]

Hoạt tính DHCR24 có thể được đo bằng cách, ví dụ, ủ enzym với cơ chất (sterol có liên kết đôi ở vị trí C24) với sự có mặt của chất cho điện tử, và đo sự tạo ra sản phẩm (sterol trong đó liên kết đôi ở vị trí C24 bị khử) phụ thuộc enzym và cơ chất. Các ví dụ về chất cho điện tử bao gồm, ví dụ, NADPH. Các ví dụ về cơ chất và sản phẩm bao gồm, ví dụ, zymosterol và 5a-cholest-8-en-3b-ol, tương ứng.

[0037]

Cụm từ “7-dehydrocholesterol reductaza (DHCR7)” dùng để chỉ protein (enzym) có hoạt tính xúc tác phản ứng khử liên kết đôi ở vị trí C7 (liên kết đôi C7-C8) của sterol (EC 1.3.1.21). Hoạt tính này còn được gọi là “hoạt tính 7-dehydrocholesterol reductaza (hoạt tính DHCR7)”. Gen mã hóa DHCR7 còn được gọi là “gen 7-dehydrocholesterol reductaza (gen DHCR7)” hoặc “gen dhcr7”. Cụm từ “vị trí C7” được đề cập ở đây dùng để chỉ cacbon tương ứng với vị trí C7 của 7-dehydrocholesterol.

[0038]

Hoạt tính DHCR7 có thể được đo bằng cách, ví dụ, ủ enzym với cơ chất (sterol có liên kết đôi ở vị trí C7) với sự có mặt của chất cho điện tử, và đo sự tạo ra sản phẩm (sterol trong đó liên kết đôi ở vị trí C7 được khử) phụ thuộc enzym và cơ chất. Các ví dụ về chất cho điện tử bao gồm, ví dụ, NADPH. Các ví dụ về cơ chất và sản phẩm bao gồm, ví dụ, 7-dehydrocholesterol và cholesterol, tương ứng.

[0039]

Cụm từ “sterol 24-C-methyltransferaza (SMT1)” dùng để chỉ protein (enzym) có hoạt tính xúc tác phản ứng đưa vào nhóm methyl ở vị trí C24 của sterol (EC 2.1.1.41). Hoạt tính này còn được gọi là “hoạt tính sterol 24-C-methyltransferaza (hoạt tính

SMT1)”. Gen mã hóa SMT1 còn được gọi là “gen sterol 24-C-methyltransferaza (gen SMT1)” hoặc “gen *smt1*”. Các ví dụ về các sterol cần được sử dụng làm cơ chất của SMT1 bao gồm các sterol có liên kết đôi ở vị trí C24 (liên kết đôi C24-C25). Việc đưa nhóm methyl vào có thể được thực hiện bằng cách khử liên kết đôi ở vị trí C24. Ngoài ra, nhóm methyl đưa vào có thể cũng còn lại sau khi chuyển hóa thành nhóm metylen. Nói cách khác, sản phẩm của SMT1 có thể cũng là sterol trong đó liên kết đôi ở vị trí C24 được khử và được đưa vào cùng với nhóm metylen ở vị trí C24. Cụm từ “vị trí C24” được đề cập ở đây dùng để chỉ cacbon tương ứng với vị trí C24 của zymosterol.

[0040]

Hoạt tính SMT1 có thể được đo bằng cách, ví dụ, ủ enzym với cơ chất (sterol) với sự có mặt của chất cho nhóm methyl, và đo sự tạo ra sản phẩm (sterol được đưa vào nhóm methyl hoặc nhóm metylen ở vị trí C24) phụ thuộc enzym và cơ chất. Các ví dụ về chất cho nhóm methyl bao gồm, ví dụ, S-adenosyl-L-methionin. Các ví dụ về cơ chất và sản phẩm bao gồm, ví dụ, zymosterol và fecosterol, tương ứng.

[0041]

Việc giảm hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể được xác nhận bằng cách đo hoạt tính của chúng hoặc tương tự như được mô tả dưới đây. Việc giảm hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể cũng được xác nhận dựa trên sự gia tăng sản sinh sterol mục tiêu dưới dạng chỉ báo. Việc giảm hoạt tính của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể cũng được xác nhận dựa trên việc giảm sự sản sinh của sterol khác ngoài sterol mục tiêu dưới dạng chỉ báo.

[0042]

Các ví dụ về DHCR24, DHCR7, và SMT1, và các gen mã hóa chúng bao gồm các gen của nhiều sinh vật khác nhau như các vi sinh vật *Labyrinthulea*. Các trình tự nucleotit của các gen DHCR24, DHCR7, và SMT1 được sở hữu bởi nhiều sinh vật khác nhau như các vi sinh vật *Labyrinthulea* và các trình tự axit amin của DHCR24, DHCR7, và SMT1 được mã hóa bằng cách đó có thể nhận được từ, ví dụ, các cơ sở dữ liệu công cộng như Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Trình tự nucleotit của gen DHCR24 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và trình tự axit amin của DHCR24 được mã hóa bởi gen này được thể hiện trong SEQ ID NOS: 29 và 40, tương ứng. Nghĩa là, gen

DHCR24 có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 29. Ngoài ra, DHCR24 có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 40. Trình tự nucleotit của gen DHCR7 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và trình tự axit amin của DHCR7 được mã hóa bởi gen được thể hiện trong SEQ ID NOS: 18 và 39, tương ứng. Nghĩa là, gen DHCR7 có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 18. Ngoài ra, DHCR7 có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 39. Trình tự nucleotit của gen SMT1 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và trình tự axit amin của SMT1 được mã hóa bởi gen được thể hiện trong SEQ ID NOS: 7 và 38, tương ứng. Trình tự nucleotit của gen SMT1 của các chủng *Aurantiochytrium* sp.1s AJ7868 và AJ7879 và trình tự axit amin của SMT1 được mã hóa bởi gen được thể hiện trong SEQ ID NOS: 55 và 56, tương ứng. Các chủng *Aurantiochytrium* sp.1s AJ7868 có hai bản sao của gen SMT1. Nghĩa là, gen SMT1 có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 7 hoặc 55. Ngoài ra, SMT1 có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 38 hoặc 56. Cụm từ “có nucleotit hoặc trình tự axit amin” dùng để chỉ các trường hợp chứa trình tự nucleotit hoặc axit amin, trừ khi có quy định khác, và cũng bao gồm các trường hợp bao gồm trình tự nucleotit hoặc axit amin.

[0043]

Gen DHCR24 có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen DHCR24 đã lấy ví dụ ở trên (như gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 29), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Tương tự, DHCR24 có thể là biến thể của DHCR24 bất kỳ trong số các DHCR24 đã lấy ví dụ ở trên (như protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 40), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Gen DHCR7 có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen DHCR7 đã lấy ví dụ ở trên (như gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 18), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Tương tự, DHCR7 có thể là biến thể của DHCR7 bất kỳ trong số các DHCR7 đã lấy ví dụ ở trên (như protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 39), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Gen SMT1 có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen SMT1 đã lấy ví dụ ở trên (như gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 7 hoặc 55), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Tương tự, SMT1

có thể là biến thể của SMT1 bất kỳ trong số các SMT1 đã lấy ví dụ ở trên (như protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 38 hoặc 56), miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Biến thể như vậy còn được gọi là “biến thể bảo toàn”. Các cụm từ “gen DHCR24”, “gen DHCR7”, và “gen SMT1” bao gồm không chỉ các gen DHCR24, các gen DHCR7, và các gen SMT1 đã lấy ví dụ ở trên, mà còn bao gồm các biến thể bảo toàn của chúng, tương ứng. Tương tự, các cụm từ “DHCR24”, “DHCR7”, và “SMT1” bao gồm không chỉ các DHCR24, các DHCR7s, và các SMT1 đã lấy ví dụ ở trên, mà còn bao gồm các biến thể bảo toàn của chúng, tương ứng. Các ví dụ về các biến thể bảo toàn bao gồm, ví dụ, các biến thể cải biến đồng đẳng và nhân tạo của các gen DHCR24, các gen DHCR7, và các gen SMT1 và các DHCR24, các DHCR7, và các SMT1 đã lấy ví dụ ở trên.

[0044]

Sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” có nghĩa là biến thể của gen hoặc protein có chức năng (như hoạt tính hoặc tính chất) tương ứng với chức năng (như hoạt tính hoặc tính chất) của gen hoặc protein ban đầu. Sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho gen có nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein mà duy trì chức năng ban đầu. Nghĩa là, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho gen DHCR24 có nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein có hoạt tính DHCR24. Ngoài ra, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho DHCR24 có nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính DHCR24. Ngoài ra, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho gen DHCR7 có nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein có hoạt tính DHCR7. Ngoài ra, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho DHCR7 có nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính DHCR7. Ngoài ra, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho gen SMT1 có nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein có hoạt tính SMT1. Ngoài ra, sự diễn đạt “chức năng ban đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho SMT1 có nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính SMT1.

[0045]

Sau đây, các ví dụ về các biến thể bảo toàn sẽ được giải thích.

[0046]

Các chất đồng đẳng của gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 và các chất đồng đẳng của DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể dễ dàng thu được từ các cơ sở dữ liệu công cộng bằng, ví dụ, tìm kiếm BLAST hoặc tìm kiếm FASTA bằng cách sử dụng trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit của các gen DHCR24, các gen DHCR7, và các gen SMT1 đã lấy ví dụ ở trên hoặc trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các DHCR24, các DHCR7s, và các SMT1 đã lấy ví dụ ở trên làm trình tự truy vấn. Ngoài ra, các chất đồng đẳng của gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể thu được bằng, ví dụ, phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction, PCR) bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của các sinh vật như các vi sinh vật *Labyrinthula* dùng làm khuôn, và các oligonucleotit được điều chế dựa trên trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit của các gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 đã biết này dưới dạng môi.

[0047]

Gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể là gen mã hóa protein có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã lấy ví dụ ở trên (như trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 40 đối với DHCR24, trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 39 đối với DHCR7, và trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 38 hoặc 56 đối với SMT1), nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc một vài vị trí, miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Ví dụ, đầu N và/hoặc đầu C của protein được mã hóa có thể được kéo dài hoặc rút ngắn. Mặc dù số lượng có nghĩa bởi thuật ngữ “một hoặc một vài” nêu ở trên có thể khác nhau phụ thuộc vào các vị trí của các gốc axit amin trong cấu trúc ba chiều của protein hoặc các loại gốc axit amin, cụ thể, đó là, ví dụ, từ 1 đến 50, từ 1 đến 40, từ 1 đến 30, tốt hơn là từ 1 đến 20, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 5, đặc biệt tốt hơn là từ 1 đến 3.

[0048]

Việc thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung đã nêu ở trên của một hoặc một vài gốc axit amin là đột biến bảo toàn duy trì chức năng bình thường của protein. Các ví dụ thông thường về sự đột biến bảo toàn là các sự thay thế bảo toàn. Sự thay thế bảo toàn là sự đột biến trong đó sự thay thế xảy ra qua lại giữa Phe, Trp, và Tyr, nếu vị trí thay thế là axit amin thơm; giữa Leu, Ile, và Val, nếu nó là axit amin kỵ nước; giữa Gln

và Asn, nếu nó là axit amin phân cực; giữa Lys, Arg, và His, nếu nó là axit amin bazơ; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Các ví dụ về sự thay thế được cho là sự thay thế bảo toàn bao gồm, cụ thể, thay thế Ser hoặc Thr cho Ala, thay thế Gln, His, hoặc Lys cho Arg, thay thế Glu, Gln, Lys, His, hoặc Asp cho Asn, thay thế Asn, Glu, hoặc Gln cho Asp, thay thế Ser hoặc Ala cho Cys, thay thế Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg cho Gln, thay thế Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp cho Glu, thay thế Pro cho Gly, thay thế Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr cho His, thay thế Leu, Met, Val, hoặc Phe cho Ile, thay thế Ile, Met, Val, hoặc Phe cho Leu, thay thế Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg cho Lys, thay thế Ile, Leu, Val, hoặc Phe cho Met, thay thế Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu cho Phe, thay thế Thr hoặc Ala cho Ser, thay thế Ser hoặc Ala cho Thr, thay thế Phe hoặc Tyr cho Trp, thay thế His, Phe, hoặc Trp cho Tyr, và thay thế Met, Ile, hoặc Leu cho Val. Ngoài ra, các sự thay thế, loại bỏ, cài hoặc bổ sung của gốc axit amin như nêu ở trên bao gồm sự đột biến xảy ra tự nhiên do sự khác biệt riêng, hoặc sự khác biệt của loài sinh vật mà từ đó gen được tạo dẫn xuất (thể đột biến hoặc biến thể).

[0049]

Gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể cũng là gen mã hóa protein có trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 50%, lớn hơn hoặc bằng 65%, lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 90%, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 95%, còn tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 97%, đặc biệt tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 99%, với toàn bộ trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã nêu ở trên, miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Trong phần mô tả này, “độ tương đồng” có nghĩa là “độ đồng nhất”.

[0050]

Gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể cũng là ADN có khả năng lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt với đoạn dò mà có thể được điều chế từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đã lấy ví dụ ở trên (như trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 29 đối với gen DHCR24, trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 18 đối với gen DHCR7, và trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 7 hoặc 55 đối với gen SMT1), như trình tự bổ sung của một phần hoặc toàn bộ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đã nêu ở trên, miễn là chức năng ban đầu của nó

được giữ nguyên. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” dùng để chỉ các điều kiện trong đó cái được gọi là sự lai hóa đặc hiệu được tạo ra, và sự lai hóa không đặc hiệu không được tạo ra. Các ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm các điều kiện trong đó các ADN có độ tương đồng cao lai hóa với nhau, ví dụ, các ADN có độ tương đồng không nhỏ hơn 50%, 65%, hoặc 80%, tốt hơn là độ tương đồng không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa là độ tương đồng không nhỏ hơn 95%, còn tốt hơn nữa là độ tương đồng không nhỏ hơn 97%, đặc biệt tốt hơn là độ tương đồng không nhỏ hơn 99%, lai hóa với nhau, và các ADN có độ tương đồng nhỏ hơn ở trên không lai hóa với nhau, hoặc các điều kiện rửa của quá trình lai hóa Southern thông thường, nghĩa là, các điều kiện rửa một lần, tốt hơn là 2 hoặc 3 lần, ở nồng độ và nhiệt độ muối tương ứng với 1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn nữa là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 68°C.

[0051]

Như được mô tả ở trên, đoạn dò cần được sử dụng cho quá trình lai hóa có thể là một phần của trình tự bổ sung của gen. Đoạn dò như vậy có thể được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng các oligonucleotit được điều chế dựa trên các trình tự nucleotit của các gen đã biết làm các đoạn mồi và mảnh ADN chứa gen đã nêu ở trên dùng làm khuôn. Để làm đoạn dò, ví dụ, mảnh ADN có chiều dài khoảng 300bp có thể được sử dụng. Trong trường hợp sử dụng mảnh ADN có chiều dài khoảng 300bp làm đoạn dò, các điều kiện rửa của quá trình lai hóa có thể là, ví dụ, 50°C, 2 x SSC và 0,1% SDS.

[0052]

Ngoài ra, gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể là gen trong đó (các) codon bất kỳ được thay bằng (các) codon tương đương tương ứng. Nghĩa là, gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen DHCR24, DHCR7, hoặc SMT1 đã lấy ví dụ ở trên do sự thoái hóa của mã di truyền.

[0053]

Tỷ lệ phần trăm của độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thuật toán. Các ví dụ không giới hạn về thuật toán như vậy bao gồm thuật toán nêu trong Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17, thuật toán độ tương đồng cục bộ nêu trong Smith et al (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, thuật toán sắp

thẳng hàng độ tương đồng nêu trong Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, phương pháp tìm kiếm độ tương đồng nêu trong Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448, và phiên bản cải biến của thuật toán nêu trong Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, như phiên bản được mô tả trong Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

[0054]

Bằng cách sử dụng chương trình dựa trên thuật toán như vậy, việc so sánh trình tự (nghĩa là xấp thẳng hàng) để xác định độ đồng nhất trình tự có thể được thực hiện. Chương trình này có thể được thực hiện thích hợp bằng máy tính. Các ví dụ về chương trình như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CLUSTAL của chương trình PC/Gene (có sẵn từ Intelligenetics, Mountain View, Calif.), chương trình ALIGN (Phiên bản 2.0), và GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, và TFASTA của Gói phần mềm di truyền Wisconsin, Phiên bản 8 (có sẵn từ Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USA). Việc xấp thẳng hàng bằng cách sử dụng các chương trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, các thông số ban đầu. Chương trình CLUSTAL được mô tả rõ trong Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244, Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153, Corpet et al. (1988) Nucleic Acides Res. 16:10881-90, Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65, và Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331.

[0055]

Để thu được sự tương đồng trình tự nucleotit với trình tự nucleotit đích, cụ thể là, ví dụ, việc tìm kiếm nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTN với điểm số 100 và chiều dài từ 12. Để thu được trình tự axit amin tương đồng với protein mục tiêu, cụ thể là, ví dụ, việc tìm kiếm protein BLAST có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTX với điểm số bằng 50 và chiều dài từ bằng 3. Xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> đối với tìm kiếm nucleotit BLAST và tìm kiếm protein BLAST. Ngoài ra, Gapped BLAST (BLAST 2.0) có thể được sử dụng để thu được sự xấp thẳng hàng bao gồm (các) khoảng trống cho mục đích so sánh. Ngoài ra, PSI-BLAST (BLAST 2.0) có thể được sử dụng để thực hiện tìm kiếm lặp lại để phát hiện các mối quan hệ xa giữa các trình tự. Xem Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 đối với Gapped BLAST và PSI-BLAST. Khi sử

dụng BLAST, Gapped BLAST, hoặc PSI-BLAST, các thông số ban đầu của mỗi chương trình (nghĩa là BLASTN đối với các trình tự nucleotit, và BLASTX đối với các trình tự axit amin) có thể được sử dụng. Việc sắp thẳng hàng có thể cũng được thực hiện bằng tay.

[0056]

Độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự được tính dưới dạng tỷ lệ của các gốc so khớp trong hai trình tự này khi sắp thẳng hàng hai trình tự này để phù hợp tối đa với nhau. Thuật ngữ “độ đồng nhất” giữa các trình tự axit amin có thể có nghĩa là độ đồng nhất được tính bằng blastp với các thông số cho điểm mặc định (nghĩa là Matrix, BLOSUM62; Gap Costs, Existence = 11, Extension = 1; Compositional Adjustments, Conditional compositional score matrix adjustment), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ “độ đồng nhất” giữa các trình tự nucleotit có thể có nghĩa là độ đồng nhất được tính bằng blastn với các thông số cho điểm mặc định (nghĩa là Match/Mismatch Scores = 1, -2; Gap Costs = Linear), trừ khi có quy định khác.

[0057]

Các phần mô tả đã nêu ở trên liên quan đến các biến thể của các gen và các protein có thể cũng được áp dụng với những sửa đổi thích hợp về chi tiết cho các protein bất kỳ và các gen mã hóa chúng.

[0058]

<1-4> Các sự cải biến khác

Vì sinh vật theo sáng chế có thể có sự cải biến khác, miễn là khả năng sản sinh sterol không bị ảnh hưởng. Các ví dụ về quá trình cải biến khác bao gồm cải biến để cải thiện khả năng sản sinh sterol. Các ví dụ cụ thể về quá trình cải biến khác bao gồm giảm hoạt tính của sterol C-22 desaturaza, gia tăng hoạt tính của DHCR24, và gia tăng hoạt tính của DHCR7. Khả năng sản sinh sterol có thể được tăng cường bởi các quá trình cải biến này. Các quá trình cải biến này có thể được chọn thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại sterol cần được sản xuất. Các quá trình cải biến này có thể được sử dụng độc lập, hoặc có thể được sử dụng phối hợp thích hợp. Nghĩa là, vì sinh vật theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều sự cải biến được chọn từ các quá trình cải biến này.

[0059]

Các quá trình cải biến này, mỗi quá trình có thể được sử dụng, ví dụ, phối hợp với việc giảm hoạt tính của SMT1. Nghĩa là, ví dụ, vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến để hoạt tính của SMT1 được giảm xuống, và có thể còn có một hoặc nhiều sự cải biến được chọn từ các quá trình cải biến này. Tuy nhiên, khi vi sinh vật theo sáng chế được cải biến để hoạt tính của SMT1 và DHCR7 được giảm xuống, sự gia tăng hoạt tính của DHCR7 sẽ không được chọn là quá trình cải biến khác.

[0060]

Do đó, vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến để hoạt tính của sterol C-22 desaturaza được giảm xuống. Vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến, cụ thể, để hoạt tính của sterol C-22 desaturaza được giảm so với chủng không được cải biến. Việc giảm hoạt tính của sterol C-22 desaturaza có thể, ví dụ, tăng sản sinh sterol động vật như cholesterol. Việc giảm hoạt tính của sterol C-22 desaturaza có thể tạo ra, cụ thể, ví dụ, sự giảm sản sinh sản phẩm phụ của sterol không no C22 (sterol có liên kết đôi ở vị trí C22), để bằng cách đó tăng sản sinh sterol động vật.

[0061]

Ngoài ra, vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến để hoạt tính của DHCR24 được gia tăng. Vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến, cụ thể, để hoạt tính của DHCR24 được tăng so với chủng không được cải biến. Sự gia tăng hoạt tính của DHCR24 có thể tạo ra, ví dụ, sự gia tăng sản sinh một phần các sterol động vật như cholesterol, lathosterol, và 7-dehydrocholesterol.

[0062]

Ngoài ra, vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến để hoạt tính của DHCR7 được gia tăng. Vi sinh vật theo sáng chế có thể được cải biến, cụ thể, để hoạt tính của DHCR7 được tăng so với chủng không được cải biến. Sự gia tăng hoạt tính của DHCR7 có thể tạo ra, ví dụ, sự gia tăng sản sinh cholesterol.

[0063]

Cụm từ “sterol C-22 desaturaza” dùng để chỉ protein (enzym) có hoạt tính xúc tác phản ứng đưa vào liên kết đôi ở vị trí C22 (liên kết đôi C22-C23) của sterol (EC 1.14.19.41). Hoạt tính này còn được gọi là “hoạt tính sterol C-22 desaturaza”. Gen mã

hóa sterol C-22 desaturaza còn được gọi là “gen sterol C-22 desaturaza”. Cụm từ “vị trí C22” được đề cập ở đây dùng để chỉ cacbon tương ứng với vị trí C22 của zymosterol.

[0064]

Hoạt tính sterol C-22 desaturaza có thể được đo bằng cách, ví dụ, ủ enzym với cơ chất (sterol không có liên kết đôi ở vị trí C22) với sự có mặt của chất cho điện tử và oxy, và đo sự tạo ra sản phẩm phụ thuộc enzym và cơ chất (sterol được đưa vào với liên kết đôi ở vị trí C22). Các ví dụ về chất cho điện tử bao gồm, ví dụ, NADPH. Các ví dụ về cơ chất và sản phẩm bao gồm, ví dụ, ergosta-5,7,24(28)-trien-3-beta-ol và ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-beta-ol, tương ứng. Hoạt tính sterol C-22 desaturaza có thể được đo, cụ thể, ví dụ, theo phương pháp của báo cáo trước đây (Morikawa T et al. Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in Arabidopsis and tomato. Plant Cell. 2006 Apr;18(4):1008-22.).

[0065]

Các trình tự nucleotit và các trình tự axit amin của sterol C-22 desaturaza các gen và sterol C-22 desaturaza được sở hữu bởi các vi sinh vật Labyrinthulea có thể nhận được từ, ví dụ, các cơ sở dữ liệu công cộng như NCBI. Trình tự nucleotit của gen sterol C-22 desaturaza (gen cyp710a) của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và trình tự axit amin của sterol C-22 desaturaza (CYP710A) được mã hóa bởi gen được thể hiện trong SEQ ID NOS: 41 và 42, tương ứng. Nghĩa là, gen sterol C-22 desaturaza có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 41. Ngoài ra, sterol C-22 desaturaza có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 42.

[0066]

Gen sterol C-22 desaturaza và sterol C-22 desaturaza có thể cũng là các biến thể bảo toàn của các gen sterol C-22 desaturaza và các sterol C-22 desaturaza đã lấy ví dụ ở trên (như các biến thể bảo toàn của gen có trình tự nucleotit được thể hiện như SEQ ID NO: 41 và protein có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 42), tương ứng. Các phần mô tả liên quan đến các biến thể bảo toàn của gen SMT1 và SMT1 v.v. có thể được áp dụng với những sửa đổi thích đáng về chi tiết cho các biến thể bảo toàn của gen sterol C-22 desaturaza và sterol C-22 desaturaza. Sự diễn đạt “chức năng ban

đầu được giữ nguyên” được sử dụng cho sterol C-22 desaturaza có nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính sterol C-22 desaturaza. Gen sterol C-22 desaturaza có thể là, ví dụ, gen mã hóa protein có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã lấy ví dụ ở trên, nhưng bao gồm việc thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc một vài các vị trí, miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên. Gen sterol C-22 desaturaza có thể cũng là, ví dụ, gen mã hóa protein có trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 50%, lớn hơn hoặc bằng 65%, lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 90%, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 95%, còn tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 97%, đặc biệt tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 99%, với toàn bộ trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã lấy ví dụ ở trên, miễn là chức năng ban đầu của nó được giữ nguyên.

[0067]

DHCR24 và DHCR7 là như được mô tả ở trên. DHCR24, DHCR7, và SMT1 trong đó hoạt tính của chúng được gia tăng không bị giới hạn ở DHCR24, DHCR7, và SMT1 được sở hữu bởi vi sinh vật *Labyrinthulea* cần được cải biến, và DHCR24, DHCR7, và SMT1 bất kỳ có thể được sử dụng.

[0068]

<1-5> Phương pháp làm giảm hoạt tính của protein

Sau đây, các phương pháp làm giảm hoạt tính của protein như DHCR24, DHCR7, SMT1, và sterol C-22 desaturaza sẽ được giải thích.

[0069]

Sự diễn đạt “hoạt tính của protein được giảm xuống” có nghĩa là hoạt tính của protein được giảm so với chủng không được cải biến. Cụ thể, sự diễn đạt “hoạt tính của protein được giảm xuống” có nghĩa là hoạt tính của protein trên mỗi tế bào được giảm so với hoạt tính của chủng không được cải biến. Thuật ngữ “chủng không được cải biến” được sử dụng ở đây dùng để chỉ chủng đối chứng mà không được cải biến để hoạt tính của protein mục tiêu được giảm xuống. Các ví dụ về chủng không được cải biến bao gồm chủng kiểu dại và chủng mẹ. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến bao gồm các chủng đã lấy ví dụ ở trên liên quan đến phần mô tả của các vi sinh vật *Labyrinthulea*. Nghĩa là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được

giảm so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể cũng được giảm so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7868. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể cũng được giảm so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7879. Trạng thái trong đó “hoạt tính của protein được giảm xuống” cũng bao gồm trạng thái trong đó hoạt tính của protein đã biến mất hoàn toàn. Cụ thể hơn là, sự diễn đạt “hoạt tính của protein được giảm xuống” có thể có nghĩa là số lượng của các phân tử của protein trên mỗi tế bào được giảm xuống, và/hoặc chức năng của mỗi phân tử của protein được giảm so với chức năng của chủng không được cải biến. Nghĩa là, thuật ngữ “hoạt tính” trong diễn đạt “hoạt tính của protein được giảm xuống” không bị giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, nhưng có thể cũng có nghĩa là lượng phiên mã của gen (nghĩa là lượng ARN thông tin (messenger RNA, mRNA) mã hóa protein hoặc lượng dịch mã của gen (nghĩa là lượng protein). Trạng thái trong đó “số lượng của các phân tử của protein trên mỗi tế bào được giảm xuống” cũng bao gồm trạng thái trong đó protein không tồn tại chút nào. Trạng thái trong đó “chức năng của mỗi phân tử của protein được giảm xuống” cũng bao gồm trạng thái trong đó chức năng của mỗi phân tử protein đã hoàn toàn biến mất. Mức độ giảm hoạt tính của protein không bị giới hạn cụ thể, miễn là hoạt tính được giảm so với hoạt tính của chủng không được cải biến. Hoạt tính của protein có thể được giảm đến, ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 50%, nhỏ hơn hoặc bằng 20%, nhỏ hơn hoặc bằng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng 5%, hoặc 0% hoạt tính của chủng không được cải biến.

[0070]

Quá trình cải biến để làm giảm hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví dụ, làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein này. Sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được giảm xuống” có nghĩa là sự biểu hiện của gen được giảm so với chủng không được cải biến. Cụ thể, sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được giảm xuống” có nghĩa là sự biểu hiện của gen trên mỗi tế bào được giảm so với sự biểu hiện của gen trên mỗi tế bào của chủng không được cải biến. Cụ thể hơn là, sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được giảm xuống” có thể có nghĩa là lượng phiên mã của gen (nghĩa là lượng mRNA) được giảm xuống, và/hoặc lượng dịch mã của gen (nghĩa là lượng protein được biểu hiện từ gen) được giảm xuống. Trạng thái trong đó “sự biểu hiện của gen được giảm xuống” cũng bao gồm trạng thái trong đó gen không được biểu hiện chút nào. Trạng thái trong đó “sự biểu hiện của gen được giảm xuống” còn được gọi là “sự biểu hiện

của gen bị suy giảm”. Sự biểu hiện của gen có thể được giảm đến, ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 50%, nhỏ hơn hoặc bằng 20%, nhỏ hơn hoặc bằng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng 5%, hoặc 0% sự biểu hiện của gen của chúng không được cải biến.

[0071]

Việc giảm sự biểu hiện gen có thể là do, ví dụ, sự giảm hiệu quả phiên mã, sự giảm hiệu quả dịch mã, hoặc sự phối hợp của chúng. Sự biểu hiện của gen có thể được giảm bằng cách, ví dụ, cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của gen này. Thuật ngữ “trình tự kiểm soát biểu hiện”, nói chung, dùng để chỉ các vị trí mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen, như đoạn khởi đầu. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được xác định bằng cách, ví dụ, sử dụng vectơ tìm kiếm đoạn khởi đầu hoặc phần mềm phân tích gen như GENETYX. Khi trình tự kiểm soát biểu hiện được cải biến, tốt hơn là một hoặc nhiều nucleotit, tốt hơn nữa là hai hoặc nhiều nucleotit, đặc biệt tốt hơn là ba hoặc nhiều nucleotit, của trình tự kiểm soát biểu hiện được cải biến. Hiệu quả phiên mã của gen có thể được giảm bằng cách, ví dụ, thay đoạn khởi đầu của gen trên nhiễm sắc thể bằng đoạn khởi đầu yếu hơn. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu yếu hơn” có nghĩa là đoạn khởi đầu tạo ra sự phiên mã suy yếu của gen so sánh với với đoạn khởi đầu kiểu đại vốn đã tồn tại của gen này. Các ví dụ về các đoạn khởi đầu yếu hơn bao gồm, ví dụ, đoạn khởi đầu cảm ứng. Nghĩa là, đoạn khởi đầu cảm ứng có thể có chức năng dưới dạng đoạn khởi đầu yếu hơn trong điều kiện không gây cảm ứng, như khi không có mặt tác nhân cảm ứng tương ứng. Ngoài ra, một phần hoặc toàn bộ vùng của trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được loại bỏ. Sự biểu hiện của gen có thể cũng được giảm bằng cách, ví dụ, điều khiển yếu tố chịu trách nhiệm kiểm soát biểu hiện. Các ví dụ về yếu tố chịu trách nhiệm kiểm soát biểu hiện bao gồm các phân tử thấp chịu trách nhiệm kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã (các tác nhân cảm ứng, các chất ức chế, v.v.), các protein chịu trách nhiệm kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã (các yếu tố phiên mã v.v.), các axis nucleic chịu trách nhiệm kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã (ARN can thiệp nhỏ (small interfering RNA, siRNA) v.v.), và v.v.. Ngoài ra, sự biểu hiện của gen có thể cũng được giảm bằng cách, ví dụ, đưa sự đột biến làm giảm sự biểu hiện của gen vào trong vùng mã hóa của gen này. Ví dụ, sự biểu hiện của gen có thể được giảm bằng cách thay codon trong vùng mã hóa của gen bằng codon đồng nghĩa được sử dụng ít thường xuyên hơn trong vật chủ. Ngoài ra, ví dụ, sự biểu hiện gen có thể được giảm nhờ việc làm xáo trộn gen như được mô tả sau đây.

[0072]

Sự cải biến để làm giảm hoạt tính của protein có thể cũng đạt được bằng cách, ví dụ, làm xáo trộn gen mã hóa protein. Sự diễn đạt “gen bị làm xáo trộn” có nghĩa là gen được cải biến để protein có thể có chức năng bình thường không được tạo ra. Trạng thái trong đó “protein thực hiện chức năng bình thường không được tạo ra” bao gồm trạng thái trong đó protein không được tạo ra chút nào từ gen, và trạng thái mà protein trong đó chức năng (hoạt tính hoặc tính chất) trên mỗi phân tử được giảm xuống hoặc loại bỏ được tạo ra từ gen này.

[0073]

Việc làm xáo trộn gen có thể đạt được bằng cách, ví dụ, loại bỏ gen trên nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “loại bỏ gen” dùng để chỉ việc loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa của gen này. Ngoài ra, toàn bộ gen bao gồm các trình tự ngược chiều và xuôi chiều từ vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể có thể được loại bỏ. Các trình tự ngược chiều và xuôi chiều từ vùng mã hóa của gen có thể chứa, ví dụ, trình tự kiểm soát biểu hiện của gen này. Vùng cần được loại bỏ có thể là vùng bất kỳ như vùng đầu N (vùng mã hóa vùng đầu N của protein), vùng bên trong, hoặc vùng đầu C (vùng mã hóa vùng đầu C của protein), miễn là hoạt tính của protein có thể được giảm. Việc loại bỏ một vùng dài hơn có thể thường chắc chắn làm bất hoạt gen này. Vùng cần được loại bỏ có thể là, ví dụ, vùng có chiều dài lớn hơn hoặc bằng 10%, lớn hơn hoặc bằng 20%, lớn hơn hoặc bằng 30%, lớn hơn hoặc bằng 40%, lớn hơn hoặc bằng 50%, lớn hơn hoặc bằng 60%, lớn hơn hoặc bằng 70%, lớn hơn hoặc bằng 80%, lớn hơn hoặc bằng 90%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 95% tổng chiều dài của vùng mã hóa của gen này. Ngoài ra, được ưu tiên là các khung đọc của các trình tự ngược chiều và xuôi chiều từ vùng cần được loại bỏ là không giống nhau. Tính không nhất quán của các khung đọc có thể gây ra sự dịch khung xuôi chiều của vùng cần được loại bỏ.

[0074]

Việc làm xáo trộn gen có thể cũng đạt được bằng cách, ví dụ, đưa vào sự thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa), codon kết thúc (đột biến vô nghĩa), bổ sung hoặc loại bỏ một hoặc hai gốc nucleotit (đột biến dịch khung), hoặc tương tự vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể (Journal of Biological Chemistry, 272:8611-8617 (1997); Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95 5511-5515

(1998); Journal of Biological Chemistry, 26 116, 20833-20839 (1991)).

[0075]

Việc làm xáo trộn gen có thể cũng đạt được bằng cách, ví dụ, cài một trình tự nucleotit khác vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể. Vị trí cài có thể ở trong vùng bất kỳ của gen, và việc cài trình tự nucleotit dài hơn có thể thường làm bất hoạt gen này một cách chắc chắn hơn. Được ưu tiên là các khung đọc của các trình tự ngược chiều và xuôi chiều từ vị trí cài là không giống nhau. Tính không nhất quán của các khung đọc có thể gây ra sự dịch khung xuôi chiều của vị trí cài. Trình tự nucleotit khác không bị giới hạn cụ thể miễn là trình tự làm giảm hoặc loại trừ hoạt tính của protein được mã hóa được lựa chọn, và các ví dụ của chúng bao gồm, ví dụ, gen đánh dấu như các gen kháng kháng sinh, và gen có thể được sử dụng để sản sinh chất mục tiêu.

[0076]

Cụ thể, việc làm xáo trộn gen có thể được thực hiện để trình tự axit amin của protein mã hóa được loại bỏ. Nói cách khác, việc cải biến để làm giảm hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví dụ, loại bỏ trình tự axit amin của protein, cụ thể, cải biến gen để mã hóa protein trong đó trình tự axit amin được loại bỏ. Thuật ngữ “loại bỏ trình tự axit amin của protein” dùng để chỉ việc loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của trình tự axit amin của protein. Ngoài ra, thuật ngữ “loại bỏ trình tự axit amin của protein” có nghĩa là trình tự axit amin ban đầu biến mất trong protein, và cũng bao gồm các trường hợp trong đó trình tự axit amin ban đầu được thay đổi thành một trình tự axit amin khác. Nghĩa là, ví dụ, vùng được thay đổi thành một trình tự axit amin khác bởi sự dịch khung có thể được coi là vùng bị loại bỏ. Khi trình tự axit amin của protein được loại bỏ, tổng chiều dài của protein thường bị rút ngắn lại, nhưng có thể cũng có các trường hợp trong đó tổng chiều dài của protein không bị thay đổi hoặc được kéo dài. Ví dụ, bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bởi vùng bị loại bỏ có thể được loại bỏ trong protein mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, bằng cách đưa codon kết thúc vào trong vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bằng vùng xuôi chiều của vị trí đưa vào có thể được loại bỏ trong protein mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, bằng sự dịch khung trong vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bằng vùng dịch khung vùng có thể được loại bỏ trong protein mã hóa.

Các phần mô tả đã nêu ở trên liên quan đến vị trí và chiều dài của vùng cần được loại bỏ trong quá trình loại bỏ gen có thể được áp dụng với những sửa đổi thích đáng về chi tiết cho vị trí và chiều dài của vùng cần được loại bỏ trong quá trình loại bỏ trình tự axit amin của protein.

[0077]

Sự cải biến như vậy của gen trên nhiễm sắc thể như được mô tả ở trên có thể đạt được bằng cách, ví dụ, điều chế gen kiểu làm xáo trộn được cải biến để không thể tạo ra protein có các chức năng bình thường, và biến đổi vật chủ bằng ADN tái tổ hợp chứa gen kiểu làm xáo trộn này để tạo ra sự tái tổ hợp tương đồng giữa gen kiểu làm xáo trộn và gen kiểu đại trên nhiễm sắc thể và bằng cách đó thay thế gen kiểu làm xáo trộn cho gen kiểu đại trên nhiễm sắc thể. Trong phương pháp này, nếu gen đánh dấu được chọn theo các đặc tính của vật chủ như hiện tượng dinh dưỡng thụ động được bao gồm trong ADN tái tổ hợp, thao tác này trở nên dễ dàng hơn. Các ví dụ về gen kiểu làm xáo trộn bao gồm gen trong đó một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa được loại bỏ, gen bao gồm đột biến sai nghĩa, gen bao gồm đột biến vô nghĩa, gen bao gồm đột biến dịch khung, và gen được đưa vào với trình tự cài như transposon hoặc gen đánh dấu. Protein được mã hóa bằng gen kiểu làm xáo trộn có cấu dạng khác với cấu dạng của protein kiểu đại, ngay cả khi nó được tạo ra, và do đó chức năng của chúng được giảm xuống hoặc loại bỏ. Cấu trúc của ADN tái tổ hợp sẽ được sử dụng cho sự tái tổ hợp tương đồng không bị giới hạn cụ thể miễn là nó tạo ra sự tái tổ hợp tương đồng theo cách mong muốn. Ví dụ, vật chủ có thể được biến đổi bằng ADN mạch thẳng chứa gen kiểu làm xáo trộn và còn chứa các trình tự ngược chiều và xuôi chiều của gen kiểu đại trên nhiễm sắc thể ở các đầu tương ứng, để sự tái tổ hợp tương đồng xảy ra ở mỗi trong số các phía ngược chiều và xuôi chiều của gen kiểu đại, để bằng cách đó thay gen kiểu đại bằng gen kiểu làm xáo trộn. Các phương pháp như vậy để cải biến nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng sự tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng cho sự cải biến bất kỳ trên nhiễm sắc thể, như sự cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện, cũng như để làm xáo trộn gen mục tiêu.

[0078]

Khi vật chủ có hai hoặc nhiều bản sao của gen mã hóa protein mục tiêu, tất cả hai hoặc nhiều bản sao này của gen có thể được cải biến (nghĩa là được làm xáo trộn),

hoặc chỉ một phần của hai hoặc nhiều bản sao này của gen có thể được cải biến (nghĩa là được làm xáo trộn), miễn là hoạt tính của protein được giảm xuống đến mức mong muốn.

[0079]

Việc cải biến để làm giảm hoạt tính của protein có thể cũng đạt được bằng cách, ví dụ, xử lý gây đột biến. Các ví dụ về xử lý gây đột biến bao gồm chiếu bức xạ tia X hoặc cực tím và xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), ethyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS).

[0080]

Các phương pháp như vậy làm giảm hoạt tính của protein như nêu ở trên có thể được sử dụng độc lập hoặc theo cách phối hợp thích hợp bất kỳ.

[0081]

Việc làm giảm hoạt tính của protein có thể được xác nhận bằng cách đo hoạt tính của protein.

[0082]

Việc làm giảm hoạt tính của protein có thể cũng được xác nhận bằng cách xác nhận việc giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein. Việc giảm sự biểu hiện của gen có thể được xác nhận bằng cách xác nhận việc giảm lượng phiên mã của gen hoặc việc giảm lượng protein được biểu hiện từ gen này.

[0083]

Việc làm giảm lượng phiên mã của gen có thể được xác nhận bằng cách so sánh lượng ARN thông tin (messenger RNA, mRNA) được sao chép từ gen với lượng mRNA của chúng không được cải biến. Các ví dụ về phương pháp để đánh giá lượng mRNA bao gồm phương pháp lai hóa Northern, PCR thời gian thực (real time-PCR, RT-PCR), vi mảng, xác định trình tự ARN (RNA sequencing, RNA-seq), và v.v. (Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)). Lượng mRNA (như số lượng của các phân tử của mRNA trên mỗi tế bào) có thể được giảm đến, ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 50%, nhỏ hơn hoặc bằng 20%, nhỏ hơn hoặc bằng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng 5%, hoặc 0% lượng mRNA của chúng không được cải biến.

[0084]

Việc giảm lượng protein có thể được xác nhận bằng cách thực hiện phương pháp điện di trên gel polyacrylamit-natri dodecyl-sulfat (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) và xác nhận cường độ của các dải protein tách được. Việc giảm lượng protein có thể cũng được xác nhận bằng phương pháp thấm tách Western bằng cách sử dụng các kháng thể (Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)). Lượng protein (như số lượng của các phân tử của protein trên mỗi tế bào) có thể được giảm đến, ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 50%, nhỏ hơn hoặc bằng 20%, nhỏ hơn hoặc bằng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng 5%, hoặc 0% lượng protein của chủng không được cải biến.

[0085]

Việc làm xáo trộn gen có thể được xác nhận bằng cách xác định trình tự nucleotit của một phần hoặc toàn bộ gen, bản đồ enzym giới hạn, chiều dài đầy đủ, hoặc tương tự của gen phụ thuộc vào biện pháp được sử dụng để làm xáo trộn.

[0086]

Việc biến đổi có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp thường được sử dụng để làm biến đổi các vi sinh vật *Labyrinthulea*. Các ví dụ về phương pháp như vậy bao gồm phương pháp điện di.

[0087]

Các phương pháp đã nêu ở trên làm giảm hoạt tính của protein như nêu ở trên có thể được áp dụng để làm giảm các hoạt tính của các protein bất kỳ và giảm sự biểu hiện của các gen bất kỳ.

[0088]

<1-6> Các phương pháp gia tăng hoạt tính của protein

Sau đây, các phương pháp gia tăng hoạt tính của protein như DHCR24 và DHCR7 sẽ được giải thích.

[0089]

Sự diễn đạt “hoạt tính của protein được gia tăng” có nghĩa là hoạt tính của protein được tăng so với chủng không được cải biến. Cụ thể, sự diễn đạt “hoạt tính của

protein được gia tăng” có nghĩa là hoạt tính của protein trên mỗi tế bào được tăng so với hoạt tính của protein trên mỗi tế bào của chủng không được cải biến. Thuật ngữ “chủng không được cải biến” được sử dụng ở đây dùng để chỉ chủng đối chứng mà không được cải biến để hoạt tính của protein mục tiêu được gia tăng. Các ví dụ về chủng không được cải biến bao gồm chủng kiểu dại và chủng mẹ. Các ví dụ cụ thể về chủng không được cải biến bao gồm các chủng đã lấy ví dụ ở trên liên quan đến phần mô tả của các vi sinh vật *Labyrinthula*. Nghĩa là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được tăng so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể cũng được tăng so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7868. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể cũng được tăng so với chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7879. Trạng thái trong đó “hoạt tính của protein được gia tăng” có thể cũng được diễn đạt dưới dạng “hoạt tính của protein được tăng cường”. Cụ thể hơn là, sự diễn đạt “hoạt tính của protein được gia tăng” có thể có nghĩa là số lượng của các phân tử của protein trên mỗi tế bào được gia tăng, và/hoặc chức năng của mỗi phân tử của protein được tăng so với chức năng của mỗi phân tử của protein của chủng không được cải biến. Nghĩa là, thuật ngữ “hoạt tính” trong sự diễn đạt “hoạt tính của protein được gia tăng” không bị giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, nhưng có thể cũng có nghĩa lượng phiên mã của gen (nghĩa là lượng mRNA) mã hóa protein, hoặc lượng dịch mã của gen (nghĩa là lượng protein). Ngoài ra, trạng thái trong đó “hoạt tính của protein được gia tăng” bao gồm không chỉ trạng thái trong đó hoạt tính của protein mục tiêu được gia tăng ở chủng vốn đã có hoạt tính của protein mục tiêu, mà còn trạng thái trong đó hoạt tính của protein mục tiêu được truyền cho chủng vốn đã không có hoạt tính của protein mục tiêu. Ngoài ra, miễn là hoạt tính của protein cuối cùng được gia tăng, hoạt tính của protein mục tiêu vốn đã được chứa trong vật chủ có thể bị suy giảm và/hoặc loại bỏ, và sau đó loại thích hợp của protein mục tiêu có thể được truyền cho vật chủ.

[0090]

Mức độ gia tăng hoạt tính của protein không bị giới hạn cụ thể, miễn là hoạt tính của protein được tăng so với chủng không được cải biến. Hoạt tính của protein có thể được gia tăng đến, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 1,5 lần, lớn hơn hoặc bằng 2 lần, hoặc lớn hơn hoặc bằng 3 lần hoạt tính của protein của chủng không được cải biến. Ngoài ra, khi chủng không được cải biến không có hoạt tính của protein mục tiêu, đủ để protein

được tạo ra do việc đưa vào gen mã hóa protein, và ví dụ, protein có thể được sản sinh đến mức độ mà hoạt tính của nó có thể được đo.

[0091]

Việc cải biến để gia tăng hoạt tính của protein có thể đạt được bằng cách, ví dụ, gia tăng biểu hiện gen mã hóa protein. Sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được gia tăng” có nghĩa là sự biểu hiện của gen được tăng so với chủng không được cải biến như chủng kiểu dại và chủng mẹ. Cụ thể, sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được gia tăng” có nghĩa là lượng biểu hiện của gen trên mỗi tế bào được tăng so với lượng biểu hiện của gen trên mỗi tế bào của chủng không được cải biến. Cụ thể hơn là, sự diễn đạt “sự biểu hiện của gen được gia tăng” có thể có nghĩa là lượng phiên mã của gen (nghĩa là lượng mRNA) được gia tăng, và/hoặc lượng dịch mã của gen (nghĩa là lượng protein được biểu hiện từ gen) được gia tăng. Trạng thái trong đó “sự biểu hiện của gen được gia tăng” có thể cũng được gọi là “sự biểu hiện của gen được tăng cường”. Sự biểu hiện của gen có thể được gia tăng đến, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 1,5 lần, lớn hơn hoặc bằng lần 2, hoặc lớn hơn hoặc bằng 3 lần sự biểu hiện của gen của chủng không được cải biến. Ngoài ra, trạng thái trong đó “sự biểu hiện của gen được gia tăng” bao gồm không chỉ trạng thái trong đó lượng biểu hiện của gen mục tiêu được gia tăng ở chủng vốn đã biểu hiện gen đích, mà còn trạng thái trong đó gen được đưa vào trong chủng vốn đã không biểu hiện gen mục tiêu, và được biểu hiện trong đó. Nghĩa là, cụm từ “sự biểu hiện của gen được gia tăng” có thể cũng có nghĩa, ví dụ, rằng gen mục tiêu được đưa vào trong chủng không có gen này, và được biểu hiện trong đó.

[0092]

Sự biểu hiện của gen có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, gia tăng số lượng bản sao của gen này.

[0093]

Số lượng bản sao của gen có thể được gia tăng bằng cách đưa gen vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ. Gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể bằng cách, ví dụ, sử dụng sự tái tổ hợp tương đồng. Cụ thể, gen đích có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ bằng cách biến đổi vật chủ bằng ADN tái tổ hợp chứa gen để bằng cách đó gây ra sự tái tổ hợp tương đồng giữa ADN tái tổ hợp và vùng đích của nhiễm sắc thể của vật chủ. Cấu trúc của ADN tái tổ hợp để được sử dụng cho sự tái tổ

hợp tương đồng không bị giới hạn cụ thể miễn là nó gây ra sự tái tổ hợp tương đồng theo cách mong muốn. Ví dụ, vật chủ có thể được biến đổi bằng ADN mạch thẳng chứa gen đích và còn chứa trình tự nucleotit tương đồng với các trình tự ngược chiều và xuôi chiều của vùng đích trên nhiễm sắc thể ở các đầu tương ứng, để sự tái tổ hợp tương đồng xảy ra ở mỗi trong số các phía ngược chiều và xuôi chiều của vùng đích, để bằng cách đó thay vùng đích bằng gen đích. ADN tái tổ hợp cần được sử dụng cho sự tái tổ hợp tương đồng có thể chứa gen đánh dấu để lựa chọn các chất làm biến đổi. Các ví dụ về gen đánh dấu bao gồm các gen kháng kháng sinh như gen kháng hygromycin (hygromycin resistance gene, HygR), gen kháng neomycin (neomycin resistance gene, NeoR), và gen kháng blastixidin (blasticidin resistance gene, BlaR). Chỉ một bản sao, hoặc hai hoặc nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào. Ví dụ, bằng cách thực hiện sự tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng trình tự nucleotit có mặt trong nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể làm đích, nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể. Các phương pháp như vậy để biến đổi nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng sự tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng cho quá trình cải biến bất kỳ trên nhiễm sắc thể, như cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện, cũng như để đưa vào gen đích.

[0094]

Việc đưa gen đích vào trong nhiễm sắc thể có thể được xác nhận bằng phương pháp lai hóa Southern bằng cách sử dụng đoạn dò có trình tự bổ sung với toàn bộ gen hoặc một phần của nó, phương pháp PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi được điều chế dựa trên trình tự của gen, hoặc tương tự.

[0095]

Ngoài ra, số lượng bản sao của gen có thể cũng được gia tăng bằng cách đưa vector chứa gen vào trong vật chủ. Ví dụ, số lượng bản sao của gen mục tiêu có thể được gia tăng bằng cách buộc mảnh ADN chứa gen mục tiêu với vector có chức năng trong vật chủ để xây dựng sự vector biểu hiện của gen, và biến đổi vật chủ bằng vector biểu hiện này. Mảnh ADN chứa gen mục tiêu có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp PCR có sử dụng ADN hệ gen của vi sinh vật có gen mục tiêu dùng làm khuôn. Để làm vector, vector có thể tự sao chép trong tế bào của vật chủ có thể được sử dụng. Vector này có thể là vector có một bản sao hoặc vector có nhiều bản sao. Vector có thể

chứa gen đánh dấu để lựa chọn các chất làm biến đổi.

[0096]

Khi gen được đưa vào, phù hợp là gen được chứa theo cách có thể biểu hiện được bởi vật chủ. Cụ thể, phù hợp là gen được chứa bởi vật chủ để nó được biểu hiện dưới sự kiểm soát bởi đoạn khởi đầu có chức năng trong vật chủ. Đoạn khởi đầu không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có chức năng trong vật chủ. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu có chức năng trong vật chủ” dùng để chỉ đoạn khởi đầu thể hiện hoạt tính đoạn khởi đầu trong vật chủ. Đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu được dẫn xuất từ vật chủ, hoặc đoạn khởi đầu dị thể. Đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu tự nhiên của gen cần được đưa vào, hoặc đoạn khởi đầu một gen khác. Các ví dụ cụ thể về đoạn khởi đầu bao gồm đoạn khởi đầu gen actin, đoạn khởi đầu gen glyxeraldehyt-3-phosphat dehydroaza, đoạn khởi đầu gen pyruvat kinaza, đoạn khởi đầu gen yếu tố kéo dài 1 α (elongation factor 1 α , EF1 α), đoạn khởi đầu ubiquitin (ubiquitin promoter, UbiP), đoạn khởi đầu virus Simian 40 (Simian Virus 40 promoter, SV40P), đoạn khởi đầu gen tubulin, và đoạn khởi đầu gen sớm ngay tức thì của virus (virus immediate-early gene promoter, Smp1P) (Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản (Kokai) số 2018-064551, Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản (Kokai) số 2006-304686, WO2016/056610, và WO02/083869). Để làm đoạn khởi đầu, ví dụ, đoạn khởi đầu mạnh hơn như được nêu dưới đây có thể cũng được sử dụng.

[0097]

Đoạn kết thúc để kết thúc của sự phiên mã gen có thể được đặt xuôi chiều của gen. Đoạn kết thúc không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có chức năng trong vật chủ. Đoạn kết thúc có thể là đoạn kết thúc được dẫn xuất từ vật chủ, hoặc đoạn kết thúc dị thể. Đoạn kết thúc có thể là đoạn kết thúc tự nhiên của gen cần được đưa vào, hoặc đoạn kết thúc của một gen khác. Các ví dụ cụ thể về đoạn kết thúc bao gồm đoạn kết thúc gen actin, đoạn kết thúc gen glyxeraldehyt-3-phosphat dehydroaza, đoạn kết thúc gen pyruvat kinaza, đoạn kết thúc gen kéo dài yếu tố 1 α (EF1 α), đoạn kết thúc ubiquitin (ubiquitin terminator, UbiT), và đoạn kết thúc virus Simian 40 (Simian Virus 40 terminator, SV40T) (Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản (Kokai) số 2018-064551, Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản (Kokai) số 2006-304686, và WO2016/056610).

[0098]

Các vector, các đoạn khởi đầu, và các đoạn kết thúc sẵn có trong nhiều vi sinh vật khác nhau được bộc lộ chi tiết trong “Fundamental Microbiology Vol. 8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987”, và chúng có thể được sử dụng.

[0099]

Ngoài ra, khi hai hoặc nhiều trong số các gen được đưa vào, phù hợp là mỗi gen trong số các gen này được chứa theo cách có thể biểu hiện được bởi vật chủ. Ví dụ, tất cả các gen có thể được mang bởi một vector biểu hiện hoặc nhiễm sắc thể duy nhất. Ngoài ra, các gen có thể được mang riêng rẽ bởi hai hoặc nhiều vector biểu hiện, hoặc được mang riêng rẽ bởi một hoặc hai hoặc nhiều vector biểu hiện và nhiễm sắc thể. Operon được tạo nên bởi hai hoặc nhiều gen có thể cũng được đưa vào.

[0100]

Gen cần được đưa vào không bị giới hạn cụ thể miễn là nó mã hóa protein có chức năng trong vật chủ. Gen cần được đưa vào có thể là gen được dẫn xuất từ vật chủ, hoặc có thể là gen dị thể. Gen cần được đưa vào có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự nucleotit của gen, và bằng cách sử dụng ADN hệ gen của sinh vật có gen, plasmit mang gen, hoặc tương tự dùng làm khuôn. Gen cần được đưa vào có thể cũng được tổng hợp hoàn toàn, ví dụ, dựa trên trình tự nucleotit của gen (Gene, 60(1), 115-127 (1987)). Gen thu được có thể được sử dụng như đang tồn tại, hoặc sau khi được cải biến nếu cần. Nghĩa là, gen có thể được cải biến để thu được biến thể của nó. Gen có thể được cải biến bằng kỹ thuật đã biết. Ví dụ, đột biến mục tiêu có thể được đưa vào trong vị trí mục tiêu của ADN bằng phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí. Nghĩa là, vùng mã hóa của gen có thể được cải biến bằng phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí để vị trí cụ thể của protein được mã hóa bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung các gốc axit amin. Các ví dụ về phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí bao gồm phương pháp sử dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)), và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn (Kramer, W. and Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)). Theo cách khác, biến thể của gen có thể được tổng hợp hoàn toàn.

[0101]

Ngoài ra, sự biểu hiện của gen có thể được gia tăng bằng cách cải thiện hiệu quả phiên mã của gen. Ngoài ra, sự biểu hiện của gen có thể cũng được gia tăng bằng cách cải thiện hiệu quả dịch mã của gen. Hiệu quả phiên mã của gen và hiệu quả dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, cải biến trình tự kiểm soát biểu hiện của gen. Thuật ngữ “trình tự kiểm soát biểu hiện”, nói chung, dùng để chỉ các vị trí ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen, như đoạn khởi đầu. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được xác định bằng cách sử dụng vector tìm kiếm đoạn khởi đầu hoặc phần mềm phân tích gen như GENETYX.

[0102]

Hiệu quả phiên mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, thay đoạn khởi đầu của gen trên nhiễm sắc thể bằng đoạn khởi đầu mạnh hơn. Thuật ngữ “đoạn khởi đầu mạnh hơn” dùng để chỉ đoạn khởi đầu tạo ra sự phiên mã gen được cải thiện so với đoạn khởi đầu kiểu đại vốn đã tồn tại của gen này. Để làm đoạn khởi đầu mạnh hơn, ví dụ, đoạn khởi đầu biểu hiện ở mức cao tự nhiên có thể được sử dụng. Ngoài ra, để làm đoạn khởi đầu mạnh hơn, ví dụ, loại hoạt động ở mức cao của đoạn khởi đầu đang tồn tại có thể cũng thu được và sử dụng. Loại hoạt động ở mức cao của đoạn khởi đầu đang tồn tại có thể thu được bằng cách, ví dụ, sử dụng các gen thông báo khác nhau.

[0103]

Hiệu quả dịch mã của gen có thể cũng được cải thiện bằng cách, ví dụ, cải biến các codon. Ví dụ, hiệu quả dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách thay codon hiếm có mặt trong gen bằng codon đồng nghĩa được sử dụng thường xuyên hơn. Nghĩa là, gen cần được đưa vào có thể được cải biến, ví dụ, để chứa các codon tối ưu theo các tần suất xuất hiện của các codon quan sát được trong vật chủ cần được sử dụng. Các codon có thể được thay bằng, ví dụ, phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí. Theo cách khác, mảnh gen trong đó các codon mục tiêu được thay có thể được tổng hợp hoàn toàn. Các tần suất xuất hiện của các codon trong nhiều sinh vật khác nhau được bộc lộ trong “Codon Usage Database” ([http://www.kazusa.or.jp/codon](http://www.kazusa.or.jp/codon;); Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)).

[0104]

Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể cũng được gia tăng bằng cách khuếch đại vùng điều hòa làm tăng sự biểu hiện gen, hoặc loại bỏ hoặc giảm vùng điều hòa làm giảm sự biểu hiện gen.

[0105]

Các phương pháp gia tăng sự biểu hiện gen như vậy như nêu ở trên có thể được sử dụng độc lập hoặc theo cách phối hợp thích hợp bất kỳ.

[0106]

Ngoài ra, việc cải biến làm gia tăng hoạt tính của protein có thể cũng đạt được bằng cách, ví dụ, tăng cường hoạt tính đặc hiệu của protein. Protein thể hiện hoạt tính đặc hiệu gia tăng có thể thu được bằng cách, ví dụ, khảo sát nhiều sinh vật khác nhau. Ngoài ra, loại hoạt động ở mức cao của protein có sẵn có thể cũng thu được bằng cách đưa đột biến vào trong protein có sẵn. Đột biến cần được đưa vào có thể là, ví dụ, thay thế, loại bỏ, cài, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc một vài vị trí của protein. Đột biến có thể được đưa vào bằng, ví dụ, phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí như nêu ở trên. Đột biến có thể cũng được đưa vào bằng cách, ví dụ, xử lý gây đột biến. Các ví dụ về xử lý gây đột biến bao gồm chiếu bức xạ tia X, chiếu bức xạ tia cực tím, và xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), ethyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS). Ngoài ra, đột biến ngẫu nhiên có thể được gây ra bằng cách xử lý trực tiếp ADN in vitro bằng hydroxylamin. Việc tăng cường hoạt tính đặc hiệu có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng theo cách phối hợp thích hợp bất kỳ với các phương pháp như vậy để tăng cường sự biểu hiện gen như nêu ở trên.

[0107]

Việc biến đổi có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp thường được sử dụng để làm biến đổi các vi sinh vật Labyrinthulea. Các ví dụ về phương pháp như vậy bao gồm phương pháp điện di.

[0108]

Sự gia tăng hoạt tính của protein có thể được xác nhận bằng cách đo hoạt tính của protein.

[0109]

Sự gia tăng hoạt tính của protein có thể cũng được xác nhận bằng cách xác nhận sự gia tăng biểu hiện gen mã hóa protein. Sự gia tăng biểu hiện gen có thể được xác nhận bằng cách xác nhận sự gia tăng lượng phiên mã của gen, hoặc bằng cách xác nhận sự gia tăng lượng protein được biểu hiện từ gen này.

[0110]

Việc gia tăng lượng phiên mã của gen có thể được xác nhận bằng cách so sánh lượng mRNA được sao chép từ gen với lượng mRNA được sao chép từ gen của chủng không được cải biến như chủng kiểu dại hoặc chủng mẹ. Các ví dụ về phương pháp đánh giá lượng mRNA bao gồm phương pháp lai hóa Northern, RT-PCR, vi mảng, RNA-seq, và v.v. (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng mRNA (như số lượng của các phân tử của mRNA trên mỗi tế bào) có thể được tăng đến, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 1,5 lần, lớn hơn hoặc bằng 2 lần, hoặc lớn hơn hoặc bằng 3 lần lượng mRNA của chủng không được cải biến.

[0111]

Sự gia tăng lượng protein có thể được xác nhận bằng phương pháp thẩm tách Western bằng cách sử dụng các kháng thể (Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)). Lượng protein (như số lượng của các phân tử của protein trên mỗi tế bào) có thể được tăng đến, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 1,5 lần, lớn hơn hoặc bằng 2 lần, hoặc lớn hơn hoặc bằng 3 lần lượng protein của chủng không được cải biến.

[0112]

Các phương pháp đã nêu ở trên để gia tăng hoạt tính của protein có thể được sử dụng để tăng cường các hoạt tính của các protein bất kỳ và tăng cường sự biểu hiện của các gen bất kỳ.

[0113]

<2> Phương pháp sản xuất sterol

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất sterol bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy, và thu hồi sterol từ các tế bào được tạo ra bằng cách nuôi cấy. Theo sáng chế, một loại sterol có thể được sản sinh,

hoặc hai hoặc nhiều loại sterol có thể được sản sinh. Các ví dụ về sự cải biến được sở hữu bởi vi sinh vật theo sáng chế và sterol cần được sản sinh là như được mô tả ở trên.

[0114]

Môi trường nuôi cấy cần được sử dụng không bị giới hạn cụ thể, miễn là vi sinh vật theo sáng chế có thể tăng sinh trong đó, và sterol có thể được sản sinh. Để làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy thông thường được sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật dị dưỡng như các vi sinh vật *Labyrinthula* có thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy có thể chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, và nguồn lưu huỳnh, cũng như các thành phần được chọn từ nhiều thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ khác nhau nếu cần. Các ví dụ cụ thể về môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường GY được điều chế bằng từ 0 đến 1 × nước biển nhân tạo.

[0115]

Các ví dụ cụ thể về nguồn cacbon bao gồm, ví dụ, các sacarit như glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, galactoza, xyloza, arabinoza, ri đường dạng nhũ tương hóa đen, các sản phẩm thủy phân của tinh bột, và các sản phẩm thủy phân của sinh khối, các axit hữu cơ như axit axetic và axit xitric, các rượu như etanol, glyxerol, và glyxerol thô, và các axit béo. Để làm nguồn cacbon, một loại nguồn cacbon có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn cacbon có thể được sử dụng phối hợp.

[0116]

Các ví dụ cụ thể về nguồn nitơ bao gồm, ví dụ, các muối amoni như amoni sulfat, amoni clorua, và amoni phosphat, các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, phần chiết nấm men, phần chiết thịt, và các sản phẩm phân hủy protein đậu nành, amoniac, và ure. Khí amoniac hoặc dung dịch nước amoniac được sử dụng để điều chỉnh độ pH có thể cũng được sử dụng làm nguồn nitơ. Để làm nguồn nitơ, một loại nguồn nitơ có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn nitơ có thể được sử dụng phối hợp.

[0117]

Các ví dụ cụ thể về nguồn phosphat bao gồm, ví dụ, muối của axit phosphoric như kali dihydrophosphat và dikali hydrophosphat, và các polyme của axit phosphoric như axit pyrophosphoric. Để làm nguồn phosphat, một loại nguồn phosphat có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn phosphat có thể được sử dụng phối hợp.

[0118]

Các ví dụ cụ thể về nguồn lưu huỳnh bao gồm, ví dụ, các hợp chất lưu huỳnh vô cơ như các sulfat, các thiosulfat, và các sulfit, và các axit amin chứa lưu huỳnh như xystein, xystin, và glutathion. Để làm nguồn lưu huỳnh, một loại nguồn lưu huỳnh có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn lưu huỳnhs có thể được sử dụng phối hợp.

[0119]

Các ví dụ cụ thể về các thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ khác nhau bao gồm, ví dụ, các muối vô cơ như natri clorua và kali clorua; các kim loại vết như sắt, mangan, magie, và canxi; các vitamin như vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, axit nicotinic, nicotinamit, và vitamin B12; các axit amin; các axit nucleic; và các thành phần hữu cơ chứa các chất như pepton, axit casamin, phần chiết nấm men, và sản phẩm phân hủy protein đậu nành. Để làm các thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ khác nhau, một loại thành phần có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại các thành phần có thể được sử dụng phối hợp.

[0120]

Các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật theo sáng chế có thể tăng sinh, và sterol có thể được sản sinh. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, trong các điều kiện thường được sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật dị dưỡng như các vi sinh vật Labyrinthulea.

[0121]

Quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường lỏng. Ở thời điểm nuôi cấy, vi sinh vật theo sáng chế được nuôi cấy trên môi trường rắn như môi trường thạch có thể được cấy trực tiếp vào trong môi trường lỏng, hoặc vi sinh vật theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường lỏng dưới dạng nuôi cấy hạt có thể được cấy vào trong môi trường lỏng để nuôi cấy chính. Nghĩa là, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện riêng rẽ dưới dạng nuôi cấy hạt và nuôi cấy chính. Trong trường hợp như vậy, các điều kiện nuôi cấy của quá trình nuôi cấy hạt và nuôi cấy chính có thể giống hoặc có thể không giống nhau. Lượng vi sinh vật theo sáng chế được chứa trong môi trường nuôi cấy ở thời điểm bắt đầu quá trình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể. Quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, cấy canh nuôi cấy hạt

vào môi trường nuôi cấy để nuôi cấy chính ở lượng từ 1 đến 50% (thể tích).

[0122]

Quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện dưới dạng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng, nuôi cấy liên tục, hoặc phối hợp của chúng. Môi trường nuôi cấy được sử dụng ở thời điểm bắt đầu quá trình nuôi cấy còn được gọi là “môi trường ban đầu”. Môi trường nuôi cấy được cung cấp cho hệ nuôi cấy (bình lên men) trong hệ nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng hoặc nuôi cấy liên tục còn được gọi là “môi trường dinh dưỡng”. Ngoài ra, để cung cấp môi trường dinh dưỡng cho hệ nuôi cấy trong nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng hoặc nuôi cấy liên tục còn được gọi là “chất dinh dưỡng”. Ngoài ra, khi quá trình nuôi cấy được thực hiện riêng rẽ dưới dạng nuôi cấy hạt và nuôi cấy chính, ví dụ, cả hai quá trình nuôi cấy hạt và quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện dưới dạng nuôi cấy theo mẻ. Theo cách khác, ví dụ, quá trình nuôi cấy hạt có thể được thực hiện dưới dạng nuôi cấy theo mẻ, và quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện dưới dạng nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng hoặc nuôi cấy liên tục.

[0123]

Quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, trong điều kiện ưa khí. Thuật ngữ “điều kiện ưa khí” dùng để chỉ điều kiện trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 0,33ppm, là giới hạn phát hiện đối với sự phát hiện bằng điện cực màng oxy, hoặc có thể tốt hơn là điều kiện trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 1,5ppm. Nồng độ oxy có thể được khống chế đến, ví dụ, từ 5 đến 50%, tốt hơn là khoảng 10%, nồng độ oxy bão hòa. Cụ thể, quá trình nuôi cấy trong điều kiện ưa khí có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy thông gió, nuôi cấy lắc, nuôi cấy khuấy trộn, hoặc phối hợp của chúng. Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3 đến 10, tốt hơn là từ 4,0 đến 9,5. Trong quá trình nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh nếu cần. Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các chất có tính kiềm và axit khác nhau như khí amoniac, dung dịch nước amoniac, natri cacbonat, natri bicacbonat, kali cacbonat, kali bicacbonat, magie cacbonat, natri hydroxit, canxi hydroxit, magie hydroxit, axit clohydric, và axit sulfuric. Nhiệt độ nuôi cấy có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 20 đến 35°C, tốt hơn là từ 25 đến 35°C. Thời

gian nuôi cấy có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10 đến 120 giờ. Quá trình nuôi cấy có thể được tiếp tục, ví dụ, cho đến khi nguồn cacbon được chứa trong môi trường nuôi cấy được tiêu thụ hết, hoặc cho tới khi vi sinh vật theo sáng chế mất hoạt tính. Bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế trong các điều kiện như được mô tả ở trên, các tế bào chứa sterol được tạo ra.

[0124]

Sterol có thể được thu hồi từ các tế bào nếu cần. Nghĩa là, sterol có thể được chiết ra khỏi các tế bào và được thu hồi. Các tế bào có thể được chiết sterol trong lúc đang có mặt trong canh nuôi cấy, hoặc sau khi được thu hồi ra khỏi canh nuôi cấy. Các tế bào, như canh nuôi cấy chứa các tế bào và các tế bào được thu hồi từ canh nuôi cấy, có thể cũng được chiết sterol sau khi được xử lý như làm loãng, cô, làm đông khô, làm tan băng, và làm khô, nếu cần. Các quá trình xử lý này có thể được thực hiện một cách độc lập, hoặc có thể được thực hiện theo cách phối hợp thích hợp. Các quá trình xử lý này có thể được chọn thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại của các phương pháp chiết sterol.

[0125]

Các phương pháp thu hồi các tế bào từ canh nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và các phương pháp đã biết có thể được sử dụng (Grima, E. M. et al. 2003. *Biotechnol. Advances* 20: 491-515). Cụ thể, ví dụ, các tế bào có thể được thu hồi từ canh nuôi cấy bằng cách như sa lắng tự nhiên, ly tâm, và lọc. Ngoài ra, ở thời điểm này, chất keo tụ có thể được sử dụng. Các tế bào thu hồi được có thể được rửa bằng cách sử dụng môi trường thích hợp nếu cần. Các tế bào thu hồi được có thể cũng được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng môi trường thích hợp nếu cần. Các ví dụ về các môi trường có thể được sử dụng để rửa hoặc tái tạo huyền phù bao gồm, ví dụ, môi trường trong nước (các dung môi trong nước) như nước và chất đệm trong nước, môi trường hữu cơ (các dung môi hữu cơ) như metanol, và các hỗn hợp của chúng. Môi trường có thể được chọn thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại của các phương pháp chiết sterol.

[0126]

Các phương pháp chiết sterol không bị giới hạn cụ thể, và các phương pháp đã biết có thể được sử dụng. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, các phương pháp chiết các chất béo ra khỏi các tế bào của các vi sinh vật như tảo thông

thường. Các ví dụ cụ thể về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, xử lý bằng dung môi hữu cơ, xử lý siêu âm, xử lý bằng cách nghiền hạt, xử lý bằng axit, xử lý bằng kiềm, xử lý bằng enzym, xử lý thủy nhiệt, xử lý siêu tới hạn, xử lý vi sóng, xử lý bằng trường điện từ, và xử lý nén. Các quá trình xử lý này có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng theo cách phối hợp thích hợp.

[0127]

Dung môi hữu cơ cần được sử dụng cho quá trình xử lý bằng dung môi hữu cơ không bị giới hạn cụ thể, miễn là sterol có thể được chiết ra khỏi các tế bào bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ đó. Các ví dụ về dung môi hữu cơ bao gồm, ví dụ, các rượu như metanol, etanol, 2-propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, và octanol; các keton như axeton; các ete như dimetyl ete và dietyl ete; các este như metyl axetat và etyl axetat; các alkan như n-hexan; và clorofom. Các ví dụ về các phương pháp chiết các chất béo bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ bao gồm phương pháp Bligh-Dyer và phương pháp Folch. Để làm dung môi hữu cơ, một loại dung môi hữu cơ có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại các dung môi hữu cơ có thể được sử dụng phối hợp.

[0128]

Độ pH của quá trình xử lý bằng kiềm không bị giới hạn cụ thể, miễn là sterol có thể được chiết ra khỏi các tế bào ở độ pH đó. Thông thường, độ pH của quá trình xử lý bằng kiềm có thể là pH=8,5 hoặc cao hơn, tốt hơn là pH=10,5 hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là pH=11,5 hoặc cao hơn, và có thể là pH=14 hoặc thấp hơn. Thông thường, nhiệt độ của quá trình xử lý bằng kiềm có thể cao hơn hoặc bằng 30°C, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 50°C, tốt hơn nữa là cao hơn hoặc bằng 70°C. Tốt hơn là, nhiệt độ của quá trình xử lý bằng kiềm có thể thấp hơn hoặc bằng 120°C. Thông thường, thời gian của quá trình xử lý bằng kiềm có thể dài hơn hoặc bằng 10 phút, tốt hơn là dài hơn hoặc bằng 30 phút, tốt hơn nữa là dài hơn hoặc bằng 50 phút. Tốt hơn là, thời gian của quá trình xử lý bằng kiềm có thể là ngắn hơn hoặc bằng 150 phút. Để xử lý bằng kiềm, các chất kiềm như NaOH và KOH có thể được sử dụng.

[0129]

Sterol chiết được có thể được thu hồi bằng các phương pháp đã biết được sử dụng để tách và tinh chế các hợp chất. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm,

ví dụ, phương pháp nhựa trao đổi ion và phương pháp tách màng. Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng theo cách phối hợp thích hợp.

[0130]

Sterol thu hồi được có thể chứa các thành phần như các tế bào, các thành phần của môi trường nuôi cấy, ăm, các thành phần được sử dụng cho quá trình chiết, và các chất chuyển hóa sản phẩm phụ của vi sinh vật theo sáng chế, ngoài sterol. Sterol thu hồi được có thể be được tinh chế đến mức độ mong muốn. Độ tinh khiết của sterol có thể, ví dụ, cao hơn hoặc bằng 1% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 2% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 5% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 10% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 30% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 50% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 70% (trọng lượng), cao hơn hoặc bằng 90% (trọng lượng), hoặc cao hơn hoặc bằng 95% (trọng lượng).

[0131]

Loại và lượng của sterol có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết được sử dụng để phát hiện hoặc định lượng các hợp chất. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, sắc ký lỏng tính năng cao (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), sắc ký lỏng/phổ khối (Liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS), sắc ký khí/phổ khối (Gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS), và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear magnetic resonance, NMR). Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng theo cách phối hợp thích hợp.

[0132]

Sterol thu hồi được có thể là, ví dụ, sterol tự do, dẫn xuất của nó (như sterol este, steryl glucosit, và axyl steryl glucosit), hoặc hỗn hợp của chúng. Khi sterol có mặt ở dạng dẫn xuất, sterol tự do có thể cũng thu được bằng cách thủy phân. Quá trình thủy phân có thể được thực hiện theo cách thông thường. Ví dụ, quá trình thủy phân có thể được thực hiện nhờ enzym bằng cách sử dụng esteraza đối với các sterol este hoặc glycosidaza đối với các steryl glucosit và các axyl steryl glucosit.

[0133]

Sterol có thể được sử dụng cho các mục đích sử dụng khác nhau. Mục đích sử dụng của sterol không bị giới hạn cụ thể. Sterol có thể được sử dụng một mình như đang tồn tại, sau khi được trộn với một thành phần khác, hoặc dưới dạng nguyên liệu thô của một thành phần khác. Các ví dụ về mục đích sử dụng của sterol bao gồm các chất phụ gia thực phẩm, các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, các thức ăn có lợi cho sức khỏe, các dược phẩm, các hóa chất, các thành phần mỹ phẩm, và các nguyên liệu thô của chúng. Các ví dụ về thức ăn chăn nuôi bao gồm các thức ăn cho gia súc và các thức ăn thủy sinh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

[0134]

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích cụ thể hơn dựa vào các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

[0135]

Ví dụ 1

Thu nhận chủng tích lũy sterol của Labyrinthulea

Mẫu nước sông chứa lá mục rữa ở Okinawa được thu hồi. Mẫu này được bổ sung lượng thích hợp của phân hoa thông (được thu hồi ở quận Miyazaki), và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 8 ngày. Phần phân ước 100 μ l của mẫu sau khi để yên được gieo trên các đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là 0,1 $\times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế bằng 0,5 $\times$ nước biển nhân tạo, trong đó mỗi chất penixilin G canxi và streptomycin sulfat được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng bằng 50mg/l, và trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng. Mỗi đĩa trong số các đĩa này được nuôi cấy ở 28°C trong 4 ngày, và các khuẩn lạc thu được được tạo đường sọc trên cùng một môi trường để tinh chế các khuẩn lạc này. Một trong số các chủng thu được theo cách như vậy được đặt tên là chủng AJ7869 (FERM BP-22342). Ngoài ra, chủng AJ7868 (FERM BP-22290) thu được bằng phương pháp giống như vậy (WO2017/065293). Ngoài ra, chủng AJ7879 (FERM BP-22367) thu được theo phương pháp giống như vậy. Các chế phẩm gồm 1 $\times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) và 1 $\times$ nước biển nhân tạo là như dưới đây.

[0136]

<Chế phẩm 1 × môi trường bảo quản Reichmani (Nissui)>

Phần chiết nấm men 8,5g

Pepton 8,5g

Glucoza 11g

Kali dihydro phosphat 2,0g

Bột nước ép cà chua 3,7g

Polysorbat 80 1,0g

Thạch 15g

Nước siêu tinh khiết 1000ml

[0137]

Chế phẩm 1 × nước biển nhân tạo

NaCl 30g

KCl 0,7g

MgCl₂ · 6H₂O 10,8gMgSO₄ · 7H₂O 5,4gCaCl₂ · 2H₂O 1g

Nước siêu tinh khiết 1000ml

[0138]

Ví dụ 2

Phân tích 18S rDNA của các chủng tích lũy sterol

Dựa vào chủng AJ7869 đã được phân lập như được mô tả ở trên, trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA được xác định bằng cách sử dụng các đoạn môi phổ biến để khuếch đại vùng 18S rDNA (các SEQ ID NO: 1 và 2) của Labyrinthulea. Ngoài ra, trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA được xác định đối với các chủng AJ7868 và AJ7879 dựa trên việc phân tích bằng Miseq được sản xuất bởi Illumina. Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng AJ7869 được thể hiện trong SEQ ID NO: 3.

Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng AJ7868 được thể hiện trong SEQ ID NO: 43. Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng AJ7879 được thể hiện trong SEQ ID NO: 44. 18S rDNA của các chủng AJ7869, AJ7868, và AJ7879 thể hiện độ đồng nhất cao 99%, 98%, và 99% với trình tự nucleotit của 18S rDNA của *Aurantiochytrium* sp. BURABG162 (SEQ ID NO: 4), *Aurantiochytrium* sp. SKE217 (SEQ ID NO: 5), và *Aurantiochytrium* sp. SKE218 (SEQ ID NO: 6), tương ứng. Ba chủng này được báo cáo là thuộc về *Aurantiochytrium* sp.1 trong báo cáo của Ueda et al. (Mayumi Ueda, et al., Seasonal dynamics of culturable thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Stramenopile) in estuarine and coastal waters., Aquatic Microbial Ecology. 2015; 74:187-204). Kết quả là, do các chủng AJ7869, AJ7868, và AJ7879 được phát hiện là có liên quan đến *Aurantiochytrium* sp.1, các chủng này được đặt tên tương ứng là các chủng AJ7869, AJ7868, và AJ7879 của *Aurantiochytrium* sp.1.

[0139]

Ví dụ 3

Xây dựng chủng thiếu hụt gen *smt1* và đánh giá giống nuôi cấy (1)

Chủng thiếu hụt gen *smt1* (SEQ ID NO: 7) được xây dựng từ chủng AJ7869 là chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0140]

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 dùng làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8 và 9, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng ngược chiều của gen *smt1*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 dùng làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 và 11, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng xuôi chiều của gen *smt1*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng caset biểu hiện đối với gen kháng blastixidin S (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202.) và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 và 13, để khuếch đại mảnh ADN chứa gen kháng blastixidin S. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pUC19 làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14 và 15, để khuếch đại mảnh ADN mạch thẳng của pUC19. Các mảnh ADN này được buộc lẫn

nhau bằng cách sử dụng In-fusion (Takara), và plasmit tạo ra được gọi là pUC19smt1-bla. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng pUC19smt1-bla làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 và 17, để thu được mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen smt1 và gen kháng blastixidin S ở giữa. Mảnh ADN này được đưa vào trong chủng AJ7869 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng blastixidin S. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7870. Chủng này là chủng thiếu hụt gen smt1 trong đó gen smt1 đã được thay bằng gen kháng blastixidin S.

[0141]

Mỗi chủng trong số các chủng AJ7869 và AJ7870 được cấy vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là $0,2 \times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế với $0,5 \times$ nước biển nhân tạo, trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng, và được nuôi cấy ở 28,5°C trong 60 giờ. Năm vòng platin chứa các tế bào của môi trường trên đĩa được cạo ra và cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 50ml môi trường GY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo có thành phần dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120 vòng/phút (round per minute, rpm) (quay) trong 24 giờ. Phần phân ước 1,5ml của canh nuôi cấy thu được được cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 48,5ml môi trường GTY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 48 giờ.

[0142]

Thành phần của môi trường GY

Nhóm A

Glucosa 30g/l

Nhóm B

Phân chiết nấm men 10g/l

Nhóm C

Vitamin B1 2mg/l

Vitamin B2 0,01mg/l

Vitamin B12 0,01mg/l

Nhóm D

PIPES 13,6g/l

Nhóm B được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng cách sử dụng HCl và được hấp ở 120°C trong 10 phút, và nhóm A được hấp ở 120°C trong 10 phút mà không cần điều chỉnh độ pH. Nhóm D được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng cách sử dụng NaOH và lọc bằng bộ lọc, và nhóm C được lọc bằng bộ lọc mà không cần điều chỉnh độ pH. Sau khi làm nguội các nhóm A và B đến nhiệt độ trong phòng, bốn nhóm này được trộn.

[0143]

Thành phần của môi trường GTY

Nhóm A

Glucose 50g/l

Nhóm B

Trypton 10g/l

Phân chiết nấm men 5g/l

Nhóm C

Vitamin B1 2mg/l

Vitamin B2 0,01mg/l

Vitamin B12 0,01mg/l

Nhóm D

PIPES 13,6g/l

Nhóm B được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng cách sử dụng HCl và được hấp ở 120°C trong 10 phút, và nhóm A được hấp ở 120°C trong 10 phút mà không cần điều chỉnh độ pH. Nhóm D được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng cách sử dụng NaOH và

lọc bằng bộ lọc, và nhóm C được lọc bằng bộ lọc mà không cần điều chỉnh độ pH. Sau khi làm nguội các nhóm A và B đến nhiệt độ trong phòng, bốn nhóm này được trộn.

[0144]

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 0,5ml dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và các chất béo được chiết bằng phương pháp Bligh-Dyer ra khỏi chất kết tủa thu được, để thu được phần chiết chất béo. Để thủy phân các sterol este trong phần chiết chất béo, bộ kit metyl hóa axit béo (Nacalai) có khả năng thủy phân các sterol este trong lúc metyl hóa các axit béo được sử dụng. Lớp hexan thu được được chạy sắc ký khí, để định lượng mỗi sterol. Trọng lượng tế bào khô (dry cell weight, DCW) được tính bằng cách ly tâm 0,5ml dung dịch nuôi cấy, làm khô chất kết tủa thu được ở 50°C trong 3 ngày, và trừ trọng lượng của ống Eppendorf từ trọng lượng đo được. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1. Ở chủng AJ7870, lượng tích lũy stigmasterol biến mất, và lượng tích lũy cholesterol được tăng gấp khoảng 2,1 lần lượng tích lũy cholesterol của chủng AJ7869. Do đó, điều này cho thấy rằng sự thiếu hụt gen *smt1* có tác dụng tích lũy cholesterol.

[0145]

Bảng 1: Các kết quả nuôi cấy của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và chủng cải biến của nó

	Chủng AJ7869 (Chủng kiểu đại)	Chủng AJ7870 (Δ <i>smt1</i>)
DCW (g/l)	14,9	14,6
Cholesterol/DCW (%)	1,3	2,7
Stigmasterol/DCW (%)	1,2	0

[0146]

Ví dụ 4

Xây dựng các chủng thiếu hụt gen *dhcr7* và đánh giá giống nuôi cấy

Các chủng thiếu hụt gen *dhcr7* (SEQ ID NO: 18) được xây dựng từ các chủng AJ7869 và AJ7870 là các chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0147]

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 và 20, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng ngược chiều của gen dhcr7. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21 và 22, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng xuôi chiều của gen dhcr7. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng caset biểu hiện đối với gen kháng zeoxin (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202.) và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23 và 24, để khuếch đại mảnh ADN chứa gen kháng zeoxin. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pUC19 làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25 và 26, để khuếch đại mảnh ADN mạch thẳng của pUC19. Các mảnh ADN này được buộc lẫn nhau bằng cách sử dụng Infusion (Takara), và plasmit tạo ra được gọi là pUC19dhcr7-zeo. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng pUC19dhcr7-zeo làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27 và 28, để thu được mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen dhcr7 và gen kháng zeoxin ở giữa. Mảnh ADN này được đưa vào trong các chủng AJ7869 và AJ7870 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được các chủng kháng zeoxin. Các chủng thu được được đặt tên là các chủng AJ7872 và AJ7871, tương ứng. Mỗi chủng trong số các chủng này là chủng thiếu hụt gen dhcr7 trong đó gen dhcr7 đã được thay bằng gen kháng zeoxin.

[0148]

Mỗi chủng trong số các chủng AJ7869, AJ7870, AJ7872, và AJ7871 được cấy vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là 0,2 × môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế với 0,5 × nước biển nhân tạo, trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng, và được nuôi cấy ở 28,5°C trong 60 giờ. Năm vòng platin chứa các tế bào của môi trường trên đĩa được cạo ra và cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa

50ml môi trường GY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo có thành phần dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng $28,5^{\circ}\text{C}$ kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 24 giờ. Phần phân ước 1,5ml của canh nuôi cấy thu được được cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 48,5ml môi trường GTY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng $28,5^{\circ}\text{C}$ kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 48 giờ.

[0149]

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 0,5ml dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và các chất béo được chiết bằng phương pháp Bligh-Dyer ra khỏi chất kết tủa thu được, để thu được phần chiết chất béo. Để thủy phân các sterol este trong phần chiết chất béo, bộ kit metyl hóa axit béo (Nacalai) có khả năng thủy phân các sterol este trong lúc metyl hóa các axit béo được sử dụng. Lớp hexan thu được được chạy sắc ký khí, để định lượng mỗi sterol. Trọng lượng tế bào khô (DCW) được tính bằng cách ly tâm 0,5ml dung dịch nuôi cấy, làm khô chất kết tủa thu được ở 50°C trong 3 ngày, và trừ trọng lượng của ống Eppendorf từ trọng lượng đo được. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2. Ở các chủng AJ7870, AJ7872, và AJ7871, đã quan sát được sự tích lũy 7-dehydrocholesterol (tiền vitamin D3), mà không được quan sát thấy ở chủng AJ7869. Ngoài ra, ở chủng AJ7871, lượng tích lũy của 7-dehydrocholesterol được tăng so với các chủng AJ7870 và AJ7872. Do đó, điều này cho thấy rằng sự thiếu hụt gen *smt1* và sự thiếu hụt gen *dhcr7* đều có hiệu quả đối với sự tích lũy 7-dehydrocholesterol. Ngoài ra, sự tích lũy ergosterol (tiền vitamin D2) được quan sát ở chủng AJ7872, trong lúc nó không được quan sát ở chủng AJ7869. Ngoài ra, ở chủng AJ7872, lượng tích lũy tiền vitamin D6 được tăng gấp 1,4 lần lượng tích lũy tiền vitamin D6 của chủng AJ7869 (không được thể hiện trong bảng). Do đó, điều này cho thấy rằng sự thiếu hụt gen *dhcr7* có hiệu quả đối với sự tích lũy các tiền vitamin D.

[0150]

Bảng 2: Các kết quả nuôi cấy của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và các chủng cải biến của chúng

	Chủng AJ7869 (Chủng kiểu dại)	Chủng AJ7870 (Δ smt1)	Chủng AJ7872 (Δ dhr7)	Chủng AJ7871 (Δ smt1 Δ dhr7)
DCW (g/l)	16,2	15,8	15,8	16,2
7-dehydro cholesterol (g/l)	0	0,07	0,20	0,25
Cholesterol (g/l)	0,18	0,38	0	0
Ergosterol (g/l)	0	0	0,13	0

[0151]

Ví dụ 5

Xây dựng chủng thiếu hụt gen *dhr24* và đánh giá giống nuôi cấy

Chủng thiếu hụt của gen *dhr24* (SEQ ID NO: 29) được xây dựng từ chủng AJ7869 dưới dạng chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0152]

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 dùng làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30 và 31, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng ngược chiều của gen *dhr24*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32 và 33, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng xuôi chiều của gen *dhr24*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng caset biểu hiện đối với gen kháng zeoxin (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for *thraustochytrids*., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202.) và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34 và 35, để khuếch đại mảnh ADN chứa gen kháng zeoxin. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pUC19 làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36 và 37, để khuếch đại mảnh ADN mạch thẳng của pUC19. Các mảnh ADN này được tách dòng bằng

cách sử dụng In-fusion (Takara), và plasmit tạo ra được gọi là pUC19dhcr24-zeo. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng pUC19dhcr24-zeo làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30 và 33, để thu được mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen dhcr24 và gen kháng zeoxin ở giữa. Mảnh ADN này được đưa vào trong chủng AJ7869 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng zeoxin. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7873. Chủng này là chủng thiếu hụt gen dhcr24 trong đó gen dhcr24 đã được thay bằng gen kháng zeoxin.

[0153]

Mỗi chủng trong số các chủng AJ7869 và AJ7873 được cấy vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là $0,2 \times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế với $0,5 \times$ nước biển nhân tạo, trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng, và được nuôi cấy ở 28,5°C trong 60 giờ. Năm vòng platin chứa các tế bào của môi trường trên đĩa được cạo ra và cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 50ml môi trường GY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo có thành phần dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 24 giờ. Phần phân ước 1,5ml của canh nuôi cấy thu được được cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 48,5ml môi trường GTY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 48 giờ.

[0154]

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 0,5ml dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và các chất béo được chiết bằng phương pháp Bligh-Dyer ra khỏi chất kết tủa thu được, để thu được phân chiết chất béo. Để thủy phân các sterol este trong phân chiết chất béo, bộ kit methyl hóa axit béo (Nacalai) có khả năng thủy phân các sterol este trong lúc methyl hóa các axit béo được sử dụng. Lớp hexan thu được được áp dụng cho sắc ký khí, để định lượng mỗi sterol. Trọng lượng tế bào khô (DCW) được tính bằng cách ly

tâm 0,5ml dung dịch nuôi cấy, làm khô chất kết tủa thu được ở 50°C trong 3 ngày, và trừ trọng lượng của ống Eppendorf từ trọng lượng đo được. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3. Ở chủng AJ7873, lượng tích lũy cholesterol biến mất, và các lượng tích lũy của stigmasterol và brassicasterol được tăng gấp 1,4 lần và 2,2 lần lượng tích lũy của stigmasterol và brassicasterol của chủng AJ7869, tương ứng. Do đó, điều này cho thấy rằng sự thiếu hụt gen dhcr24 có hiệu quả đối với sự tích lũy các sterol có methyl hoặc etyl ở vị trí C24.

[0155]

Bảng 3: Các kết quả nuôi cấy của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 và chủng cải biến của chúng

	Chủng AJ7869 (Chủng kiểu đại)	Chủng AJ7873 ($\Delta dhcr24$)
DCW (g/l)	15,4	14
Cholesterol (g/l)	0,19	0
Stigmasterol (g/l)	0,17	0,24
Brassicasterol (g/l)	0.05	0,11

[0156]

Ví dụ 6

Xây dựng các chủng thiếu hụt gen *smt1* và đánh giá giống nuôi cấy (2)

Các chủng thiếu hụt gen *smt1* (SEQ ID NO: 55) được xây dựng từ các chủng AJ7879 và AJ7868 dưới dạng các chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0157]

Mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen *smt1* và gen kháng blastixidin S ở giữa thu được theo quy trình được mô tả trong ví dụ 3.

[0158]

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 dùng làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8 và 9, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng ngược chiều của gen *smt1*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự

nêu trong SEQ ID NO: 10 và 11, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng xuôi chiều của gen *smt1*. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng caset biểu hiện đối với gen kháng neomycin (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202.) và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 và 13, để khuếch đại mảnh ADN chứa gen kháng neomycin. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pUC19 làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14 và 15, để khuếch đại mảnh ADN mạch thẳng của pUC19. Các mảnh ADN này được buộc lẫn nhau bằng cách sử dụng In-fusion (Takara), và plasmit tạo ra được gọi là pUC19smt1-neo. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng pUC19smt1-neo làm khuôn và các đoạn môi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 và 17, để thu được mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen *smt1* và gen kháng neomycin ở giữa.

[0159]

Mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen *SMT1* và gen kháng blastixidin S ở giữa được đưa vào trong chủng AJ7879 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng blastixidin S. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7880. Chủng này là chủng thiếu hụt gen *smt1* trong đó gen *smt1* đã được thay bằng gen kháng blastixidin S.

[0160]

Mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen *smt1* và gen kháng blastixidin S ở giữa được đưa vào trong chủng AJ7868 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng blastixidin S. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7868 kháng blastixidin S. Chủng này là chủng thiếu hụt gen *smt1* trong đó một trong số hai gen *smt1* có mặt trên nhiễm sắc thể đã được thay bằng gen kháng blastixidin S. Chủng này còn được đưa vào cùng với mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen *smt1* và gen kháng

neomycin ở giữa bằng phương pháp điện di, để thu được chủng kháng neomycin. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7878. Chủng này là chủng thiếu hụt gen *smt1* trong đó hai gen *smt1* có mặt trên nhiễm sắc thể đã được thay tương ứng bằng gen kháng blastixidin S và gen kháng neomycin.

[0161]

Mỗi chủng trong số các chủng AJ7879, AJ7880, AJ7868, và AJ7878 được cấy vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là $0,2 \times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế với $0,5 \times$ nước biển nhân tạo, trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng, và được nuôi cấy ở 28,5°C trong 60 giờ. Năm vòng platin chứa các tế bào của môi trường trên đĩa được cạo ra và cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 50ml môi trường GY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo có thành phần dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 24 giờ. Phần phân ước 1,5ml của canh nuôi cấy thu được được cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 48,5ml môi trường GTY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 48 giờ.

[0162]

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 0,5ml dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và các chất béo được chiết bằng phương pháp Bligh-Dyer ra khỏi chất kết tủa thu được, để thu được phần chiết chất béo. Để thủy phân các sterol este trong phần chiết chất béo, bộ kit metyl hóa axit béo (Nacalai) có khả năng thủy phân các sterol este trong lúc metyl hóa các axit béo được sử dụng. Lớp hexan thu được được chạy sắc ký khí, để định lượng mỗi sterol. Trọng lượng tế bào khô (DCW) được tính bằng cách ly tâm 0,5ml dung dịch nuôi cấy, làm khô chất kết tủa thu được ở 50°C trong 3 ngày, và trừ trọng lượng của ống Eppendorf từ trọng lượng đo được. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4. Ở chủng AJ7880, lượng tích lũy stigmasterol biến mất, và lượng tích lũy cholesterol được tăng gấp khoảng 1,9 lần lượng tích lũy cholesterol của chủng AJ7879. Ngoài ra, ở chủng AJ7878, lượng tích lũy stigmasterol biến mất, và lượng tích lũy cholesterol được tăng gấp khoảng 2,2 lần lượng tích lũy cholesterol của chủng AJ7868.

Do đó, điều đó cho thấy rằng, cũng đối với các chủng *Aurantiochytrium* sp.1 khác, sự thiếu hụt gen *smt1* có tác dụng tích lũy cholesterol.

[0163]

Bảng 4: Các kết quả nuôi cấy của các chủng *Aurantiochytrium* sp.1 kiểu dại và các chủng cải biến của chúng

	Chủng AJ7879 (Chủng kiểu dại)	Chủng AJ7880 (Δ smt1)	Chủng AJ7868 (Chủng kiểu dại)	Chủng AJ7878 (Δ smt1)
DCW (g/l)	17,5	17,3	16,0	16,5
Cholesterol /DCW (%)	1,2	2,3	1,3	2,8
Stigmasterol /DCW (%)	1,1	0	1,3	0

[0164]

Ví dụ 7

Xây dựng chủng tăng cường biểu hiện kép của các gen *dhcr24* và *dhcr7* và đánh giá giống nuôi cấy

Chủng tăng cường biểu hiện kép của gen *dhcr24* (SEQ ID NO: 29) và gen *dhcr7* (SEQ ID NO: 18) được xây dựng từ chủng AJ7870 dưới dạng chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0165]

PCR được thực hiện các đoạn mỗi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 và 48, phối hợp với plasmit chứa caset biểu hiện đối với gen kháng neomycin-gen *dhcr7* (SEQ ID NO: 45), để khuếch đại mảnh ADN chứa caset biểu hiện đối với gen kháng neomycin-gen *dhcr7*, và phối hợp với plasmit chứa caset biểu hiện đối với gen kháng zeoxin-gen *dhcr24* (SEQ ID NO: 46), để khuếch đại mảnh ADN chứa caset biểu hiện đối với gen kháng neomycin-gen *dhcr24*. Các mảnh ADN này được đưa vào trong chủng AJ7870 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for *thraustochytrids*., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng cả hai neomycin và zeoxin. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7882. Chủng này là chủng tăng cường biểu hiện kép của

các gen dhcr24 và dhcr7 trong đó các gen dhcr24 và dhcr7 ngẫu nhiên được đưa vào trong nhiễm sắc thể.

[0166]

Ví dụ 8

Xây dựng chủng thiếu hụt gen cyp710a và đánh giá giống nuôi cấy

Chủng thiếu hụt gen cyp710a (SEQ ID NO: 41) mã hóa sterol C-22 desaturaza được xây dựng từ chủng AJ7882 (chủng tăng cường biểu hiện kép của các gen dhcr24 và dhcr7) dưới dạng chủng mẹ bằng phương pháp dưới đây.

[0167]

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49 và 50, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng ngược chiều của gen cyp710a. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng caset biểu hiện đối với gen kháng hygromycin (pUC19 pUBI-HygR-SV40; Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012 ;78(9):3193-3202.) và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51 và 52, để khuếch đại mảnh ADN chứa gen kháng blastixidin S. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen của chủng AJ7869 dùng làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53 và 54, để khuếch đại mảnh ADN chứa vùng xuôi chiều của gen cyp710a. PCR trao đổi chéo được thực hiện bằng cách sử dụng các mảnh ADN này làm khuôn và các đoạn mồi có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49 và 54, để thu được mảnh ADN chứa các vùng ngược chiều và xuôi chiều của gen cyp710a và gen kháng hygromycin ở giữa. Mảnh ADN này được đưa vào trong chủng AJ7882 bằng phương pháp điện di (Keishi Sakaguchi, et al., Versatile Transformation system that is Applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for thraustochytrids., Applied and Environmental Microbiology. 2012;78(9):3193-3202), để thu được chủng kháng hygromycin. Chủng thu được được gọi là chủng AJ7881. Chủng này là chủng thiếu hụt gen cyp710a trong đó gen cyp710a đã được thay bằng gen kháng hygromycin.

[0168]

Mỗi chủng trong số các chủng AJ7870, AJ7881, và AJ7882 được cấy vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy, trong đó môi trường nuôi cấy là $0,2 \times$ môi trường bảo quản Reichmani (Nissui) được điều chế với $0,5 \times$ nước biển nhân tạo, trong đó vitamin B1 (Nacalai), vitamin B2 (Nacalai), và vitamin B12 (Nacalai) được thêm vào đến nồng độ cuối cùng bằng 2mg/l, 0,01mg/l, và 0,01mg/l, tương ứng, và được nuôi cấy ở 28,5°C trong 60 giờ. Năm vòng platin chứa các tế bào của môi trường trên đĩa được cạo ra và cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 50ml môi trường GY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo có thành phần dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 24 giờ. Phần phân ước 1,5ml của canh nuôi cấy thu được được cấy vào trong bình Erlenmeyer dung tích 500ml với tấm chắn chứa 48,5ml môi trường GTY được điều chế với $0,25 \times$ nước biển nhân tạo, và được nuôi cấy ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 28,5°C kết hợp khuấy trộn ở 120rpm (quay) trong 48 giờ.

[0169]

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, 0,5ml dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và các chất béo được chiết bằng phương pháp Bligh-Dyer ra khỏi chất kết tủa thu được, để thu được phần chiết chất béo. Để thủy phân các sterol este trong phần chiết chất béo, bộ kit metyl hóa axit béo (Nacalai) có khả năng thủy phân các sterol este trong lúc metyl hóa các axit béo được sử dụng. Lốp hexan thu được được chạy sắc ký khí, để định lượng mỗi sterol. Trọng lượng tế bào khô (DCW) được tính bằng cách ly tâm 0,5ml dung dịch nuôi cấy, làm khô chất kết tủa thu được ở 50°C trong 3 ngày, và trừ trọng lượng của ống Eppendorf từ trọng lượng đo được. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5. Ở chủng AJ7882 (chủng tăng cường biểu hiện kép $\Delta\text{smt1}/\text{dhcr24}+\text{dhcr7}$), lượng tích lũy cholesterol được tăng gấp khoảng 1,3 lần lượng tích lũy cholesterol của chủng AJ7870 (Δsmt1). Ngoài ra, ở chủng AJ7881 (chủng tăng cường biểu hiện kép $\Delta\text{smt1}\Delta\text{cyp710a}/\text{dhcr24}+\text{dhcr7}$), lượng tích lũy cholesterol được tăng gấp khoảng 1,2 lần lượng tích lũy cholesterol của chủng AJ7882 (chủng tăng cường biểu hiện kép $\Delta\text{smt1}/\text{dhcr24}+\text{dhcr7}$). Do đó, điều đó đã cho thấy rằng việc gia tăng con đường sinh tổng hợp cholesterol như dhcr7 và dhcr24 và ngăn chặn sự sản sinh sản phẩm phụ của các sterol không no C22 các bằng cách làm xáo trộn gen cyp710a có tác dụng đối với sự tích lũy cholesterol ở chủng thiếu hụt gen smt1.

[0170]

Bảng 5: Các kết quả nuôi cấy của các chủng cải biến của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

	Chủng AJ7870 (Δ smt1)	Chủng AJ7882 (chủng tăng cường biểu hiện kép Δ smt1/dhcr24+dhcr7)	Chủng AJ7881 (chủng tăng cường biểu hiện kép Δ smt1 Δ cyp710a /dhcr24+dhcr7)
DCW (g/l)	16,6	15,7	15
Cholesterol (g/l)	0,34	0,41	0,46
Cholesterol /DCW (%)	2,0	2,6	3,1

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

[0171]

Theo sáng chế, khả năng sản sinh sterol của vi sinh vật *Labyrinthulea* có thể được cải thiện, và sterol có thể được sản sinh một cách có hiệu quả.

[0172]

Giải thích danh mục trình tự

Các trình tự SEQ ID NO:

1-2: Các đoạn mồi

3: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

4: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 BURABG162

5: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 SKE217

6: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 SKE218

7: Trình tự nucleotit của gen SMT1 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

8-17: Các đoạn mồi

18: Trình tự nucleotit của gen DHCR7 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

19-28: Các đoạn mồi

29: Trình tự nucleotit của gen DHCR24 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

30-37: Các đoạn môi

38: Trình tự axit amin của SMT1 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

39: Trình tự axit amin của DHCR7 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

40: Trình tự axit amin của DHCR24 của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

41: Trình tự nucleotit của gen *cyp710a* của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

42: Trình tự axit amin của CYP710A của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869

43: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7868

44: Trình tự nucleotit của vùng 18S rDNA của chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7879

45: Trình tự nucleotit của caset biểu hiện đối với gen kháng neomycin-gen *dhcr7*

46: Trình tự nucleotit của caset biểu hiện đối với gen kháng zeoxin-gen *dhcr24*

47-54: Các đoạn môi

55: Trình tự nucleotit của gen SMT1 của các chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7868 và AJ7879

56: Trình tự axit amin của SMT1 của các chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7868 và AJ7879

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật *Labyrinthulea*, trong đó vi sinh vật này:

có khả năng sản sinh sterol,

là *Aurantiochytrium* sp.1,

đã được cải biến để hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm so với chủng không được cải biến bằng cách làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa 24-dehydrocholesterol reductaza hoặc làm xáo trộn gen này, và

trong đó sterol là stigmasterol và/hoặc brassicasterol.

2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó hoạt tính của 24-dehydrocholesterol reductaza được giảm xuống bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ trình tự axit amin của 24-dehydrocholesterol reductaza.

3. Vi sinh vật theo điểm 1 hoặc 2, trong đó 24-dehydrocholesterol reductaza là protein được xác định trong phần (a), (b), hoặc (c) nêu dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40;

(b) protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40, nhưng bao gồm sự thay thế, loại bỏ, cài, và/hoặc bổ sung từ 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính 24-dehydrocholesterol reductaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin thể hiện độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40, và có hoạt tính 24-dehydrocholesterol reductaza.

4. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó trình tự nucleotit của 18S rDNA của vi sinh vật này có độ đồng nhất cao hơn hoặc bằng 97% với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3.

5. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, là chủng cải biến được dẫn xuất từ chủng *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 (FERM BP-22342), AJ7868 (FERM BP-22290), hoặc AJ7879 (FERM BP-22367).

6. Phương pháp sản xuất sterol, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 trong môi trường nuôi cấy; và

thu hồi sterol từ các tế bào được tạo ra bằng bước nuôi cấy này, trong đó

sterol là stigmasterol và/hoặc brassicasterol.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sterol là sterol tự do, sterol este, steryl glucosit, axyl steryl glucosit, hoặc hỗn hợp của chúng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> VI SINH VẬT LABYRINTHULEA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT STEROL

<130> E042-18346

<150> JP2017-202347

<151> 2017-10-19

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 1

aacctggttg atcctgccag t

21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 2

tgatccttct gcaggttcac c

21

<210> 3

<211> 1761

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 3

cagtagccct acgctcgtct caaagactaa gccatgcatg tgtaagtata agcgaattat	60
actgtgaaac tgcgaacggc tcattatatc agttataatc ccttcggtag ttcctttaga	120
cggatacctg cagtaattct ggaattaata cgtgctgtac gggcccgact ttcggggagg	180
gccgcactta ttaggtctaa gccaacgttc ttggtgagtc atgataattg agcagatcgc	240
ttttcggagc gatgaatcgt ttgagtttct gccccatcag ttgtcgacgg tagggattg	300
gcctacggtg actataacgg gtgacgggga gttagggctc gactccggag agggagcctg	360
agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattacccaa tgtggactcc	420
acgaggtagt gacgagaaat atcaatgcgg ggcgcttcgc gtcttgctat tggaatgaga	480
gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccgcgg	540
taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgagcgt taaaaagctc gtagttgaat	600
ttctggtgtg ggagcccagg cctcggtgcg aatgcgcctt gtattgcctt gcggctcctt	660
tgccatcctc gtttttcttt tgaagaacgt cattcactgt aatcaaagca gtagttcca	720
agcaggccgt agggccggtg tggttattat gggatgatca gataggactc ggggtgctatt	780
ttgttggttt gcacatctga gtaatgatta ataggaacag tcgggggtat ccgtatttag	840
gagctagagg tgaaattctt ggatttccga aagacgaact acagcgaagg catttaccaa	900

```

gcatgttttc attaatcaag aacgaaagtc tggggatcga agatgattag ataccatcgt 960
agtctagacc gtaaacgatg ccgacttgcg attgcgggtg gcttgattg ggcctccgca 1020
gcagcacatg agaaatcaaa gtctttgggt tccgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa 1080
cttaaaggaa ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcggctta atttgactca 1140
acacgggaaa acttaccagg tccagacata ggtaggattg acagattgag agctctttct 1200
tgattctatg ggtgggtggg catggccgtt cttagttggg ggagtgattt gtctgggttaa 1260
ttccgttaac gaacgagacc tcggcctact aaatagccgg gcgtatggcg acatatgtgt 1320
ttgtggcttc ttagagggac atgttcgggt tacgagcagg aagttcgagg caataacagg 1380
tctgtgatgc ccttagatgt tctgggccgc acgcgcgcta cactgatggg ttcagcgggt 1440
ctttgttgtg tttactcaca gcgttgcttt gtcggaaggc atggctaata ctttgaacgc 1500
ccatcgtgct ggggctagat ttttgcaatt attaatctcc aacgaggaat tcctagtaaa 1560
cgcaagtcac cagcttgcac tgaatacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgcac 1620
ctaccgattg aacgggtccga tgaaaccatg ggactacctt ttgagcgttt gttcgcgatg 1680
gagggtgggaa ctcggtgaa tcttattgtt tagaggaagg tgaagtcgta acaaggtttc 1740
cgtaggtgaa cctgcggaag g 1761

```

<210> 4

<211> 1731

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 4

```

tcgctcgtct caaagactaa gccatgcatg tgtaagtata agcgaattat actgtgaaac 60
tgcaaacggc tcattatata agttataatc ctttcggtag ttcctttaga cggatacctg 120
cagtaattct ggaattaata cgtgctgtac gggcccgact ttcggggagg gccgcactta 180
ttaggtctaa gccaacgttc ttggtgagtc atgataattg agcagatcgc ttttcggagc 240
gatgaatcgt ttgagtttct gccccatcag ttgtcgacgg tagggattg gcctacgggtg 300
actataacgg gtgacgggga gttagggctc gactccggag agggagcctg agagacggct 360
accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattaccaa tgtggactcc acgaggtagt 420

```

```

gacgagaaat atcaatgcgg ggcgccttcgc gtcttgctat tggaatgaga gcaatgtaaa 480
accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctgggtgcca gcagccgcgg taattccagc 540
tccagaagcg tatgctaaag ttgttgagcgt taaaaagctc gtagttgaat ttctgggtgtg 600
ggagcccagg cctcgggtgcg aatgcgcctt gtcttgccctt gcggctcctt tgccatcctc 660
gtttttcttt tgaaggacgt cattcactgt aatcaaagca gagtgttcca agcaggccgt 720
agggccggta tgtttattat gggatgatca gataggactc ggggtgctatt ttgttggttt 780
gcacatctga gtaatgatta ataggaacag tcgggggtat ccgtatttag gagctagagg 840
tgaaattctt ggatttccga aagacgaact acagcgaagg catttaccaa gcatgttttc 900
attaatcaag aacgaaagtc tggggatcga agatgattag ataccatcgt agtctagacc 960
gtaaacgatg ccgacttgcg attgcgggtg gcttgatttg ggcctccgca gcagcacatg 1020
agaaatcaaa gtctttgggt tccgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa 1080
ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcggctta atttgactca acacgggaaa 1140
acttaccagg tccagacata ggtaggattg acagattgag agctctttct tgattctatg 1200
ggtaggtggtg catggccgtt cttagttggt ggagtgattt gtctgggtta ttccgttaac 1260
gaacgagacc tcggcctact aaatagccgg gcgtatggcg acatatgtgt ttgtggcttc 1320
ttagagggac atgttcgggt tacgagcagg aagttcgagg caataacagg tctgtgatgc 1380
ccttagatgt tctgggccgc acgcgcgcta cactgatggg ttcagcgggt gatttatggg 1440
tttttactg aagttgcttt gtcggaaggc atggctaata ctttgaacgc ccatcgtgct 1500
ggggctagat ttttgcaatt attaatctcc aacgaggaat tcctagtaaa cgcaagtcac 1560
cagcttgcac tgaatacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgac ctaccgattg 1620
aacggtccga tgaaaccatg ggactacctt ttgagcgttt gttcgcgatg gaggtgggaa 1680
ctcgggtgaa tcttattggt tagaggaagg tgaagtcgta acaaggtttc c 1731

```

<210> 5

<211> 1764

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<220>

<221> misc_feature

<222> (532)..(532)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (535)..(535)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (630)..(630)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (687)..(687)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1000)..(1001)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1397)..(1397)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1722)..(1722)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1751)..(1751)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1755)..(1755)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1762)..(1762)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 5

ccagtagccc tacgctcgtc tcaaagacta agccatgcat gtgtaagtat aagcgaatta	60
tactgtgaaa ctgcgaacgg ctcatatat cagttataat cccttcggta gttcctttac	120
acggatacct gcagtaattc tggaattaat acgtgctgta cgggcccgcac tttcggggag	180
ggccgcactt attaggtcta agccaacgtt cttggtgagt catgataatt gagcagatcg	240
cttttcggag cgatgaatcg tttgagtttc tgcccatca gttgtcgacg gtaggggtatt	300
ggcctacggg gactataacg ggtgacgggg agttagggct cgactccgga gagggagcct	360
gagagacggc taccacatcc aaggaaggca gcaggcgcgt aaattaccca atgtggactc	420
cacgaggtag tgacgagaaa tatcaatgcg gggcgcttcg cgtcttgcta ttggaatgag	480
agcaatgtaa aaccctcatc gaggatcaac tggagggcaa gtctggtgcc ancancgcg	540

```

gtaattccag ctccagaagc gtatgctaaa gttgttgacag ttaaaaagct cgtagttgaa 600
tttctggtgt gggagcccag gcctcggtn gaatgagcct tgtattgcct tgcggctccc 660
ttgccatcct cgtttttctt ttgaagnacg tcattcactg taatcaaagc agagtgttcc 720
aagcaggccg tagggccggt atgtttatta tgggatgac agataggact cgggtgctat 780
tttgttggtt tgcacatctg agtaatgatt aataggaaca gtcgggggta tccgtattta 840
ggagctagag gtgaaattct tggatttccg aaagacgaac tacagcgaag gcatttacca 900
agcatgtttt cattaatcaa gaacgaagt ctggggatcg aagatgatta gataccatcg 960
tagtctagac cgtaaagcat gccgacttgc gattgagcgn ngcttgatt gggcttccgc 1020
agcagcacat gagaaatcaa agtctttggg ttccgggggg agtatggcga caaggctgaa 1080
acttaaagga attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgagcgtt aatttgactc 1140
aacacgggaa aacttaccag gtccagacat aggtaggatt gacagattga gagctctttc 1200
ttgattctat ggggtggtgt gcatggccgt tcttagttgg tggagtgatt tgtctggtta 1260
attccgttaa cgaacgagac ctccgacctac taaatagccg ggcgtatggc gacatatgtg 1320
tttgtggctt cttagaggga catgttcggt ttacgagcag gaagtgcgag gcaataacag 1380
gtctgtgatg cccttanatg ttctgggccg cagcgcgct aactgatgg gttcagcggg 1440
tctttgttgt gtttactcac agcgttgctt tgtcgaagg catggctaata cctttgaacg 1500
cccacgtgc tggggctaaa tttttgcaat tattaatctc caacgaggaa ttcctagtaa 1560
acgcaagtca tcagcttgca ttgaatacgt ccctgccctt tgtacacacc gcccgctgca 1620
cctaccgatt gaacggtccg atgaaacat gggactacct tttgagcgtt tgttcccaat 1680
ggagggggga actcgggtga atcttattgt ttaaaggaag gngaagtcgt aacaaggttt 1740
ccgtaggtga ncctngcgga angg 1764

```

<210> 6

<211> 1711

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1451)..(1451)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 6

```

ctgccagtag ccctacgctc gtctcaaaga ctaagccatg catgtgtaag tataagcgaa      60
ttatactgtg aaactgcgaa cggctcatta tatcagttat aatcccttcg gtagttcctt     120
tacacggata cctgcagtaa ttctggaatt aatacgtgct gtacggggcc gactttcggg     180
gagggccgca cttattaggt ctaagccaac gttcttggtg agtcatgata attgagcaga     240
tcgcttttcg gagcgatgaa tcgtttgagt ttctgcccca tcagttgtcg acggtagggt     300
attggcctac ggtgactata acgggtgacg gggagttagg gctcgactcc ggagagggag     360
cctgagagac ggctaccaca tccaaggaag gcagcaggcg cgtaaattac ccaatgtgga     420
ctccacgagg tagtgacgag aaatatcaat gcggggcgct tcgctgtctg ctattggaat     480
gagagcaatg taaaaccctc atcgaggatc aactggaggg caagtctggt gccagcagcc     540
gcggtaatc cagctccaga agcgtatgct aaagttgttg cagttaaaaa gctcgtagtt     600
gaattttctg tgtgggagcc caggcctcgg tgcgaatgcg ctttgtattg ctttgcggct     660
cctttgccat cctcgttttt cttttgaaga acgtcattca ctgtaatcaa agcagagtgt     720
tccaagcagg ccgtagggcc ggtatgttta ttatgggatg atcagatagg actcgggtgc     780
tattttgttg gtttgcacat ctgagtaatg attaatagga acagtcgggg gtatccgtat     840
ttaggagcta gaggtgaaat tcttggaatt ccgaaagacg aactacagcg aaggcattta     900
ccaagcatgt tttcattaat caagaacgaa agtctgggga tcgaagatga ttagatacca     960
tcgtagtcta gaccgtaaac gatgccgact tgcgattgcg ggtggcttgt attgggcttc    1020
cgcagcagca catgagaaat caaagtcttt gggttccggg gggagtatgg tcgcaaggct    1080
gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc accaggagtg gagcctgcgg cttaatTTga    1140
ctcaacacgg gaaaacttac caggTccaga cataggtagg atgacagatg agagctcttt    1200
cttgattcta tgggtggttg tgcatggccg ttcttagttg gtggagtgat ttgtctggtt    1260
aattccgtta acgaacgaga cctcggccta ctaaatagcc gggcgtatgg cgacatatgt    1320
gtttgtggct tcttagaggg acatgttcgg ttTacagca ggaagttcga ggcaataaca    1380
ggtctgtgat gcccttaaTt gttctgggcc gcacgcgcgc tacactgatg ggttcagcgg    1440
gtctttgttg ngtttactca cagcgTtgct ttgtcggaag gcatggctaa tcctttgaac    1500

```

gccccatcgtg ctggggctag atttttgcaa ttattaatct ccaacgagga attcctagta 1560
 aacgcaagtc atcagcttgc attgaatacg tccctgccct ttgtacacac cgcccgtcgc 1620
 acctaccgat tgaacggtcc gatgaaacca tgggactacc ttttgagcgt ttgttcgcga 1680
 tggaggtggg aactcgggtg aatcttattg t 1711

<210> 7

<211> 1011

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 7

atggtcgttc tctgggagaa gggcgagaac cactcgtcgg accagttcgt tggcgccatc 60
 aaccatgcc aagaacac cgtggacaac gaggacaagg acaagaacta cgccccgtg 120
 gtcaagagct tctacgcctc ggtcgccacc agcctctacg agtacggctg gggcaagtcc 180
 ttccacttcg ccccgcgcaa caagggcgag ggcttcaagg agtccctcct ccgccaggag 240
 cactggctcg ccgccagct cggcatccgc cccggccagg atgtctgtga cctcggctgc 300
 ggtgtctgcg gccccctcgt caacatcgcc aagtctctcc gcgccaacat caccggcgtg 360
 accatctccg acttcagat cgcccgcggc aacgcctgga tcgccagaa cggcctctcc 420
 aaccgctgca aggcgtcga gggtagcttc cagagctcc ctttcgagga caactccttc 480
 gactgcggct acgactgcga ggccaccgcc cactccacca agctcaacac cttcttcgcc 540
 gaggtcgagc gcgtcctccg ccccgcggt gtcttcgccg gcttcgcctg ggtcacccctc 600
 cccaagcaca acccgaggga ccccgaggag gtcaagattc tcgaggacct tgcctttggc 660
 aacgccattg ccgtcctcca cagctttgac gactacgtca acgcatcaa ggccaacccc 720
 ggtctcgagc tcgtcgaggc ctacgacgcc aacaagctcg gcgacgacat ggagtggcac 780
 gagccccca agcctggctt ctctatcgac ggcacacctca tgccttgggc tggccgccag 840
 ctcaccgca acctcgccg cgtcaccgag gccatcgcc ttgccccaa gggcacctac 900
 aacgcctccc aggtcctcga ggttctgcc cgctccctcg tcgacgccgg cgaccgcggt 960
 atctacacc ccactacta ctacaaggtc cgcaaggctc ccaagaacta a 1011

<210> 8

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 8

ttgggtaacg ccaggggagg ctgcctgcgc tggaatgcga

40

<210> 9

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 9

cgtgactggg aaaacttgtc ctcgttgtcc acggtgttct tca

43

<210> 10

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 10

catagctgtt tcctgacaag aactacgcac ccgtggtcaa g

41

<210> 11

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 11

gataacaatt tcacattagt tcttggcgac cttgcggacc t

41

<210> 12

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 12

gttttcccag tcacgac

17

<210> 13

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 13

caggaaacag ctatgac

17

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 14

cctggcggtta cccaacttaa tcgcc

25

<210> 15

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 15

tgtgaaattg ttatccgctc acaattcc

28

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 16

ggaggctgcc tgcgctggaa tgcga

25

<210> 17

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 17

ttagttcttg gcgaccttgc ggacct

26

<210> 18

<211> 1671

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 18

```

ttgtacgagg cgcggtgccc gggcagaagg cgcaagcagg caggcaaacg cgatctccga      60
ccgcgtgcgc atcgtgcgtg cgagcgtggg cgcgagagac ctcttcgccg ggccggcaaat      120
ccgcaacgag gccagccccg agcagcgagg gcagcagcga gggagggagg agcagcggcg      180
acggagagac agccagagaa acagacgaga aagcagacgc ggaaggcacg cgcgcgaagc      240
aggatggcgg ccggaaagca gggaggcgcc aaggccaagg gcctcgcgcc cgccggcagc      300
gccgcagcag ccgccaagaa gaagtcggaa atgtggagcg gagcgtccac ctccgagagc      360
gtgggcatcg gccccgaggc cctgcgcgcc acgctcatgc cggttctgct cgtactttcc      420
acgccgtca ccagcatcat cctgagccga agtgtcgtca ccaccaagca cgactcctcg      480
ttcctcgaaa atgcatggga cgtcatcgag gagatcctcg aaaagggcag cgtctacacg      540
tacaccgcg acgccttcaa ccccttcgtg tggaagatga tcggcaccta catggtcgtc      600
cagctcctgc tcatgcatg catgcccga cccacgtacg agggcccga aagccccatg      660
ggcaaccgcc ccatctacaa ggacaactgc tttgcctgct acgtggcctc ctttgccctc      720
tacgggctcg gcgtgtactc tggcctcttc aacgggtggc tcgcctttga ctactttcag      780
gaattcattg cctccatgaa catcttcgcc ctcatctttg tggctatcct ctacgtcaag      840
ggcgccgtgg ctccctccag ctccgactcg ggcctctcgg gtaacatcg ctttgactac      900
tactggggca ccgagctgta cccgcgcac ctcggctggg acgtcaaggt ctttaccac      960
tgccgctatg gcatgactgg ctgggccctg ctctgcacct cgttcgccta cgcgcagtac     1020
gagcgctttg gcgaggtcag caactcaatc ctcatcgcc ccgctctcca ggtcatctac     1080
ctggccaagt tccacatttg ggagcgtggc tacatgttca ccattgacat catgcacgac     1140
cgcgccggct actacatttg ctggggctgc ctctgtctgg tccccagcct ctacgccga      1200
cccacggcct ttctcgtgct ccaccgtac aactttccca cttgggccgc cgcggcgag      1260
ttcgtctttt gcctgtctc catcttcctc aactacgacg tcgaccgtca gcgccaggaa      1320
tttcgcgcca aggacggcaa gatgaagatc tggggcaagg acgccgagta cctcgtcgcc      1380

```

gagtacacga cgagcgacgg caagaagcac tcctccatgc ttttgcactc gggctggtgg 1440
 ggtcaggctc gcaagatcaa ctactttttc gagctttgcg ctgccttttc ctggtctgtc 1500
 attgttgccc acccctttca ccttctggca tgggtctact ttgcctttct ctttattctc 1560
 ctcacgacc gtgcctggcg tgacgacgcg cgctgtgcat ccaagtatgg cgaaaagtgg 1620
 gacgagtaca aggtcaaggt cccctacctg atcatcccgg gtgtctacta a 1671

<210> 19

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 19

ttgggtaacg ccaggggtgc gccgggccgc tgttcttc 38

<210> 20

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 20

cgtgactggg aaaacgaagg cgtcgcgggt gtacgtgta 39

<210> 21

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 21

catagctgtt tcctgggtatt gtgtctagaa ttttcactcg gt

42

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 22

gataacaatt tcacaggcgc aaagatgcgg tcatcatgt

39

<210> 23

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 23

gttttcccag tcacgac

17

<210> 24

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 24

caggaaacag ctatgac

17

<210> 25

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 25

cctggcgtta cccaacttaa tcgcc

25

<210> 26

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 26

tgtgaaattg ttatccgctc acaattcc

28

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 27

ggtgcgccgg gccgctgttc ttc

23

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 28

ggcgcaaaga tgcggtcattc atgt

24

<210> 29

<211> 1572

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 29

atgacggagc agcggggcat cttcgtgaca gtcttcctga tgcccgtgag cgtgggtctgg	60
gacatcatgt tcgcactgcg ctcgtggctc atcatggcgc tgtactccgc gccagagctg	120
cacaaacagc gtgtgcagga agcctccgct cagggtccgtg acgccacgac caacgccccg	180
cccgccacca agctgtgcac cgcgcgcggg ggggtggctct ccatctcgct cagtctgcgg	240
ccgtacaaaa aggtggccac caacatctcc attaacatgt acgacatcct cgagcttaac	300
gaaaccgaaa gctatgtcca tgtcgagccc atgggtcaaca tgggccagct tagccactac	360
ctcatccctc gcggtctacac catcccgggtg ctccccgaaa tggacgacct caccgtcgga	420
ggtctcttca tgggcaccgg catcgaggcc agctcgcaca aatttggtct ctttgacgag	480
ttcgtcatcg aggccgaggt catcctcgcc tccggcgagg tcgtcacttg cagcaagacc	540
cagaaccgag acctcttcga cgcgctcccc tgggtcgtacg gcacgctcgg cttcctcgtc	600
tcctgcaaga tcaaggtcat cccttgcaag ccctttatcc gcatcgagta ccgagggtgc	660
cacaacaaaa agcagggcct cgagcttttc accaaggcct cctgcatgga catcccgccc	720
gactttgtcg agtgcacgc ctactcatcc gagacaatgg tagttatgac ctccgatatg	780
gtcgacgaag atgccgtcga aaaggacaag atcaacaaga tcggccgctg gtacaaaccc	840
tgggtacttca agcacgtcga gaagatgctc gagatctcct cggccgaaaa gccccacgtc	900
gagtacatcc ccatccgcca gttcttccac cgctggacct cggccatctt ctgggagctc	960
gagcagatca tcccctttgg caaccatccg ctctaccgag ctctcctcgg atggttcaca	1020

ccttcggtcg ccctgcttaa actcacgcag acggaggcca ttcgcaagac ctacgaggag 1080
 cagcacattg tccaggacat gctcgtgcct atctcaaaga cctccgaggc gctcgatgtc 1140
 tttagacacgc actaccaaatt ttaccccctc tggatctgcc cctaccgcca gtacgactac 1200
 agcgacgcca ccacggagca ccgccacttt cttcgcaagc ccaacaagcc caacaaggag 1260
 ggctacgaga tgtatgtcga tctcggcgcc tacgggtgtcc cgcgcccctg cctcgagaag 1320
 aagccttttg atgttatcaa gtcctctcgc gctgtcgaaa agtatgtcac cgaagccaat 1380
 ggtagccaga tgctctacgc caccagctac ctgagccgag atgagttcag ggagatgttc 1440
 aaccatgcac actacgacaa gatgaagcaa aaggttgacc ccaacgactt ctttcctcag 1500
 gtctacgaga aggtctgcaa gggcgccatg aacttttggc aggcaaaaagc tggtgacaag 1560
 aagcttgact ga 1572

<210> 30

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 30

ttgggtaacg ccaggggact gctgcagctg caag 34

<210> 31

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 31

cgtgactggg aaaacatgaa gttcaccgcc atgtc

35

<210> 32

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 32

catagctgtt tcctgtgcat cgcctactca tccg

34

<210> 33

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 33

gataacaatt tcacagaaca aattgagacg agttacgag

39

<210> 34

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 34

gttttcccag tcacgac

17

<210> 35

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 35

caggaaacag ctatgac

17

<210> 36

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 36

cctggcggtta cccaacttaa tcgcc

25

<210> 37

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 37

tgtgaaattg ttatccgctc acaattcc

28

<210> 38

<211> 336

<212> PRT

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 38

Met Val Val Leu Trp Glu Lys Gly Glu Asn His Ser Ser Asp Gln Phe

1 5 10 15

Val Gly Ala Ile Asn His Ala Met Lys Asn Thr Val Asp Asn Glu Asp

20 25 30

Lys Asp Lys Asn Tyr Ala Pro Val Val Lys Ser Phe Tyr Ala Ser Val

35 40 45

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

Thr Glu Ala Ile Gly Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Asn Ala Ser Gln
 290 295 300
 Val Leu Glu Val Ala Ala Arg Ser Leu Val Asp Ala Gly Asp Arg Gly
 305 310 315 320
 Ile Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Tyr Lys Val Arg Lys Val Ala Lys Asn
 325 330 335

<210> 39

<211> 556

<212> PRT

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 39

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

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

Arg Gly Tyr Met Phe Thr Ile Asp Ile Met His Asp Arg Ala Gly Tyr
 370 375 380
 Tyr Ile Cys Trp Gly Cys Leu Val Trp Val Pro Ser Leu Tyr Ala Ala
 385 390 395 400
 Pro Thr Ala Phe Leu Val Leu His Pro Tyr Asn Phe Pro Thr Trp Ala
 405 410 415
 Ala Ala Ala Gln Phe Val Phe Cys Leu Leu Ser Ile Phe Leu Asn Tyr
 420 425 430
 Asp Val Asp Arg Gln Arg Gln Glu Phe Arg Ala Lys Asp Gly Lys Met
 435 440 445
 Lys Ile Trp Gly Lys Asp Ala Glu Tyr Leu Val Ala Glu Tyr Thr Thr
 450 455 460
 Ser Asp Gly Lys Lys His Ser Ser Met Leu Leu His Ser Gly Trp Trp
 465 470 475 480
 Gly Gln Ala Arg Lys Ile Asn Tyr Phe Phe Glu Leu Cys Ala Ala Phe
 485 490 495
 Ser Trp Ser Val Ile Val Ala His Pro Phe His Leu Leu Ala Trp Val
 500 505 510
 Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Ile Leu Leu Ile Asp Arg Ala Trp Arg Asp
 515 520 525
 Asp Ala Arg Cys Ala Ser Lys Tyr Gly Glu Lys Trp Asp Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Val Lys Val Pro Tyr Leu Ile Ile Pro Gly Val Tyr
 545 550 555

<210> 40

<211> 523

<212> PRT

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 40

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

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

Leu Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Ser Arg Asp Glu Phe Arg Glu Met Phe
 465 470 475 480
 Asn His Ala His Tyr Asp Lys Met Lys Gln Lys Val Asp Pro Asn Asp
 485 490 495
 Phe Phe Pro Gln Val Tyr Glu Lys Val Cys Lys Gly Ala Met Asn Phe
 500 505 510
 Trp Gln Ala Lys Ala Gly Asp Lys Lys Leu Asp
 515 520

<210> 41

<211> 1479

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 41

atggccgccg catccaccgc cgccgccgtc acaccggcgc gctcgatctt tcgcaaggctc 60
 gccgtcgtga tcgtccttct gatggccctc gacatgatcc gctaccactt taagcgcattg 120
 aagatgaagg cacgggcaag gtggttctcg ctccccttcc tcggagactt tcctaccatc 180
 gtggccgacc ccaccaaatt ctgggataac ctgatcgccc ttgccccgaa cggatatctcg 240
 gcctttaaga tcctcacgca ggctgccatc ttcgtgacga accccaagtt cgccaagcag 300
 atttttgacg accaggaaaa ctttactctt tttgtgcacc cgaactcgcc caagctgctc 360
 ggccaagaca acctcgtgta catgtctcgc gaggacctcg ttcgctggcg ccgcgccatg 420
 gtgccaacc tcaaaaaggc cgaagtcctg catgccgccg cctacactgc cgtcaatagc 480
 tgctcgaaca tgcttcgcaa gatcgccgct cgctcgcccc ctgagcaggc cgaaaacgac 540
 gttcgctacg acatccgcct catgaacgcc cacctgtcac tcaaggtctt cctcggaggc 600
 tacttgcaaa agggcgaggc agagtggatc gctgacgacc tcatcgttgt cactaacggc 660
 ttcacgcgag ccccggttga cttcccttc actgacctcg gcaagggcaa ggctgctagc 720
 cagcgcattc tgaaggtgct tcaccgcatc tcggacgagt gcttcgccg catgaagaac 780
 aacgaggagc ctctctgcgt tcttgaccgc atcacggact cgtgcataaa ggcaggaatc 840

```

aagggttacg gccgcacccc ggagatatt gccacgctg gcctcgactt ttgctttgcg      900
gccaggatg ccaccacctc cgccctttgc tggatcatcc actcgatgga gaagcaccca      960
gaggtcgccg acaagattcg cgaggagctt gaccgctcc ttgacaagga cgtcgacttc     1020
accgaggctc ttccccgtgc ctacaacgcc aacaagcttc cctaccttcg cgccgccgcc     1080
attaaccagc tgcagtaccg cccacccgtg cccatgggtc cgcatattgc gcgccatgac     1140
actgagcttg gcgaccacaa gattgaaaag ggcaccattg ctttcgcctc tgtcatgggc     1200
tccaaggcca acattgaggg cgctgaccgt ttcgagcctg atccggataa catgcttgac     1260
cctgccttca agaaggttct ctgctttggc ggcgccccc acatgtgccc gggtcgcttt     1320
tacgccagca aactgtttgc tctgttcatg gccacgcttg tccacggcta cgacgttgac     1380
cgcacccgca agcctggcgg cgaggacatc atctacctgc ccacactcta cccgcgtgat     1440
tcgctttacg tcatgaagtc tcgcgccgag gccgcatga                             1479

```

<210> 42

<211> 492

<212> PRT

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 42

```

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

```

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

```

          325          330          335
Asp Val Asp Phe Thr Glu Ala Leu Pro Arg Ala Tyr Asn Ala Asn Lys
          340          345          350
Leu Pro Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Ile Asn Gln Leu Gln Tyr Arg Pro
          355          360          365
Pro Val Pro Met Val Pro His Ile Ala Arg His Asp Thr Glu Leu Gly
          370          375          380
Asp His Lys Ile Glu Lys Gly Thr Ile Ala Phe Ala Ser Val Met Gly
385          390          395          400
Ser Lys Ala Asn Ile Glu Gly Ala Asp Arg Phe Glu Pro Asp Pro Asp
          405          410          415
Asn Met Leu Asp Pro Ala Phe Lys Lys Val Leu Cys Phe Gly Gly Gly
          420          425          430
Pro His Met Cys Pro Gly Arg Phe Tyr Ala Ser Asn Thr Val Ala Leu
          435          440          445
Phe Met Ala Thr Leu Val His Gly Tyr Asp Val Asp Arg Ile Arg Lys
          450          455          460
Pro Gly Gly Glu Asp Ile Ile Tyr Leu Pro Thr Leu Tyr Pro Arg Asp
465          470          475          480
Ser Leu Tyr Val Met Lys Ser Arg Ala Glu Ala Ala
          485          490

```

<210> 43

<211> 1782

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 43

aacctggttg atcctgccag tagccctacg ctcgtctcaa agactaagcc atgcatgtgt

60


```

aagtataagc gaattataact gtgaaactgc gaacggctca ttatatcagt tataatccct 120
tcggtagttc ctttagacgg atacctgcag taattctgga attaatacgt gctgtacggg 180
cccgactttc ggggagggcc gcacttatta ggtctaagcc aacgttcttg gtgagtcag 240
ataattgagc agatcgcttt tcggagcgat gaatcgtttg agtttctgcc ccatcagttg 300
tcgacggtag ggtattggcc tacggtgact ataacgggtg acggggagtt agggctcgac 360
tccggagagg gagcctgaga gacggctacc acatccaagg aaggcagcag gcgcgtaaat 420
tacccaatgt ggactccacg aggtagtgac gagaaatatc aatgcggggc gcttcgcgtc 480
ttgctattgg aatgagagca atgtaaaacc ctcatcgagg atcaactgga gggcaagtct 540
ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc agaagcgtat gctaaagttg ttgcagttaa 600
aaagctcgta gttgaatttc tgggtgtggga gcccaggcct cgggtgcgaat gcgccttgta 660
ttgccttgcg gctcctttgc catcctcgtt tttctttaga aggacgtcat tcaactgtaat 720
caaagcagag tgttccaagc aggccgtagg gccggtatgt ttattatggg atgatcagat 780
aggactcggg tgctattttg ttggtttgca catctgagta atgattaata ggaacagtcg 840
ggggtatccg tatttaggag ctagaggtga aattccttga tttccgagag acgaactaca 900
gcgaaggcat ttaccaagca tgttttcatt aatcaagaac gaaagtctgg ggatcgaaga 960
tgattagata ccatcgtagt ctagaccgta aacgatgccg acttgcgatt gcgggcagct 1020
tgtattgggc ttccgcagca gcacatgaga aatcaaagtc tttgggttcc ggggggagta 1080
tggtcgcaag gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg 1140
cggcttaatt tgactcaaca cgggaaaact taccagggtc agacataggt aggattgaca 1200
gattgagagc tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga 1260
gtgatttgtc tggttaattc cgttaacgaa cgagacctcg gcctactaaa tagccgggcg 1320
tatggcgaca tatgtgtttg tggcttctta gagggacatg ttcggtttac gagcaggaag 1380
ttcgaggtaa taacaggtct gtgatgccct tagatgttct gggccgcacg cgcgctacac 1440
tgatgggttc agcgggtctt tgttgtgtt actcacagcg ttgctttgtc ggaaggcatg 1500
gctaatcctt tgaacgcca tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac 1560
gaggaattcc tagtaaagc aagtcacag cttgcattga atacgtccct gccctttgta 1620
cacaccgccc gtcgcaccta ccgattgaac ggtccgatga aaccatggga ctacctttg 1680
agcgtttgtt cgcgatggag gtgggaactc ggggtgaatct tattgtttag aggaagggtga 1740
agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcagaaggat ca 1782

```

<210> 44

<211> 1761

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 44

```

ccttccgcag gttcacctac ggaaaccttg ttacgacttc accttcctct aaacaataag      60
attcacccga gttcccacct ccatcgcgaa caaacgctca aaaggtagtc ccatgggtttc     120
atcggaccgt tcaatcggtg ggtgacgacgg gcggtgtgta caaagggcag ggacgtattc     180
aatgcaagct gatgacttgc gtttactagg aattcctcgt tggagattaa taattgcaaa     240
aatctagccc cagcacgatg ggcggttcaaa ggattagcca tgccttccga caaagcaacg     300
ctgtgagtaa acacaacaaa gacccgctga acccatcagt gtagcgcgcg tgcggcccag     360
aacatctaag ggcatcacag acctgttatt gcctcgaact tcctgctcgt aaaccgaaca     420
tgtccctcta agaagccaca aacacatatg tcgccatacg cccggctatt tagtaggccg     480
aggctctcgtt cgtaaacgga attaaccaga caaatcactc caccaactaa gaacggccat     540
gcaccaccac ccatagaatc aagaaagagc tctcaatctg tcaatcctac ctatgtctgg     600
acctggtgtaag ttttcccggtg ttgagtcaaa ttaagccgca ggctccactc ctgggtggtgc     660
ccttccgtca attcctttta gtttcagcct tgcgaccata ctccccccgg aacccaaaga     720
ctttgatttc tcatgtgctg ctgcggaggc ccaatacaag ccacccgcaa tcgcaagtcg     780
gcatcgttta cggctctagac tacgatggta tctaatactc ttcgatcccc agactttcgt     840
tcttgattaa tgaaaacatg cttggtaaatt gccttcgctg tagttcgtct ttcggaaatc     900
caagaatttc acctctagct cctaaatacg gatacccccg actgttccta ttaatcatta     960
ctcagatgtg caaaccaaca aaatagcacc cgagtcctat ctgatcatcc cataataaac    1020
ataccggccc tacggcctgc ttggaacact ctgctttgat tacagtgaat gacgttcttc    1080
aaaagaaaaa cgaggatggc aaaggagccg caaggcaata caaggcgcat tcgcaccgag    1140
gcctgggctc ccacaccaga aattcaacta cgagcttttt aactgcaaca acttttagcat    1200
acgcttctgg agctggaatt accgaggctg ctggcaccag acttgccctc cagttgatcc    1260
tcgatgaggg ttttacattg ctctattcc aatagcaaga cgcgaagcgc cccgcattga    1320
tatttctcgt cactacctcg tggagtccac attgggtaat ttacgcgcct gctgccttcc    1380

```

```

ttggatgtgg tagccgtctc tcaggctccc tctccggagt cgagccctaa ctccccgtca 1440
cccgttatag tcaccgtagg ccaataccct accgtcgaca actgatgggg cagaaactca 1500
aacgattcat cgctccgaaa agcgatctgc tcaattatca tgactcacca agaacgttgg 1560
cttagacctata ataagtgcgg ccctccccga aagtcggggc cgtacagcac gtattaattc 1620
cagaattact gcaggatatcc gtctaaagga actaccgaag ggattataac tgatataatg 1680
agccgttcgc agtttcacag tataattcgc ttatacttac acatgcatgg cttagtcttt 1740
gagacgagcg tagggctact g 1761

```

<210> 45

<211> 8109

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 45

```

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggftaa tgtcatgata ataatggfff 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgfffffff 120
tctaaatata ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctfff 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gaggataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

```

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380
 ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1740
 atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
 gggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
 ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
 cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
 cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
 acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcaccca ggctttacac tttatgcttc 2160
 cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
 accatgatta cgccaagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagaggatcc caaaaaaagc 2280
 cgttactcac atcaggccgc cactcatccg ggcgaaagct tcgcgcattc gtcctcgtca 2340
 cctcgggtcc cctgtgtcgg gacggaaagt gcgacgagac gcggccgcag cagagagccc 2400
 cgggggcccg cgtcacgggg ggcttgccgg cagtcctcct taagccaaac cgagggttag 2460
 ggctccaggc tgttcggcgg ggtcgcgggc gaggtggaag cacggggccg cctagcacct 2520
 cctagcgcgc gactaccagg atagccccg cgagcgcgca gggcgggtctg cggggcgagg 2580
 gcggcccagc agcgcggcgc ggcgggcggg tgcggctgcg taagggtggcg gcgggcgcgg 2640
 gcggttaggt tgggttaggt cgcggcgggg ctgtgttctg ggaatccgcc ttacggcggc 2700

gcaatggttg gctgggaggg ggtttgcggg gttagatagg cggccaaggt gagccgcgtt 2760
gggcgataa atccgtggag gcgctcgtgg acggcgcggc agagacggaa cgcggagcaa 2820
cacgaagtaa caagcaggag tagcaggagt agcaagcagc ggcaaaggaa ggctagtgtg 2880
acgaggcgcg tgcccggggc agaaggcgca agcaggcagg caaacgcgat ctccgaccgc 2940
gtgcgcatcg tgcgtgcgag cgtgggcgcg agagacctcc tcgccgggcg gcaaattccg 3000
aacgaggcca gccccgagca gcgaggggcag cagcgaggga gggaggagca gcggcgacgg 3060
agagacagcc agagaaacag acgagaaagc agacgcggaa ggacgcgcg cgaagcagga 3120
tggcggccgg aaagcaggga ggcgccaagg ccaagggcct cgcgcccgcg ggcagcgccg 3180
cagcagccgc caagaagaag tcggaaatgt ggagcggagc gtccacctcc gagagcgtgg 3240
gcatcgcccc cgaggccctg cgcgccacgc tcatgccggt tctgctcgta ctttccacgc 3300
cgctcaccag catcatcctg agccgaagtg tcgtcaccac caagcacgac tcctcgttcc 3360
tcgaaaatgc atgggacgtc atcgaggaga tcctcgaaaa gggcatcgtc tacacgtaca 3420
cccgcgacgc cttcaacccc ttctgttgga agatgatcgg cacctacatg gtcgtccagc 3480
tcctgctcat gcgattcatg cccggacca cgtacgaggg cccgcaaagc cccatgggca 3540
accgccccat ctacaaggac aactgctttg cctgctacgt ggcctccttt gccctctacg 3600
ggctcggcgt gtactctggc ctcttcaacg gtggcatcgc ctttgactac tttcaggaat 3660
tcattgcctc catgaacatc ttgcacctca tctttgtggc tatcctctac gtcaagggag 3720
ccgtggctcc ctccagctcc gactcgggac tctcgggtaa catcgctttt gactactact 3780
ggggcaccga gctgtacccg cgcattcctg gctgggacgt caaggtcttt accaactgcc 3840
gctatggcat gactggctgg gccctgctct gcacctcgtt cgcctacgcg cagtacgagc 3900
gctttggcga ggtcagcaac tcaatcctca ttgccgccgc tctccaggtc atctacctgg 3960
ccaagtcca cttttgggag cgtggctaca tgttcaccat tgacatcatg cacgaccgcg 4020
ccggctacta cttttgctgg ggctgcctcg tctgggtccc cagcctctac gccgcaccca 4080
cggcctttct cgtgctccac ccgtacaact ttcccacttg ggccgccgcg gcgcagttcg 4140
tcttttgcct gctctccatc ttctcaact acgacgtcga ccgtcagcgc caggaatttc 4200
gcgccaagga cggcaagatg aagatctggg gcaaggacgc cgagtacctc gtcgccgagt 4260
acacgacgag cgacggcaag aagcactcct ccatgctttt gcaactcggg tggtggggtc 4320
aggctcgcaa gatcaactac ttttctgagc ttgctgctgc cttttcctgg tctgtcattg 4380
ttgccacccc ctttcacctt ctggcatggg tctactttgc ctttctcttt atttctctca 4440
tcgaccgtgc ctggcgtgac gacgcgcgct gtgcatccaa gtatggcgaa aagtgggacg 4500

```

agtacaaggt caaggtcccc tacctgatca tcccgggtgt ctactaagat ccgcgccggc 4560
tatgcgcccc tgctcgaccg ccacactgcc cacattgcct gcaagttcgc tgagctccag 4620
aacaagatgg accgccgctc gggcaagatt ctcgaggaga cccccaagtt catcaagtcg 4680
ggcgactctg ccatgggtcaa gatgatcccc tccaagcgca tgtgcgtcga gtccttcacc 4740
gagtacccgc cgctcggccg ctttgccgtg cgcgacatgc gcgtcaccgt cgctgtcggc 4800
gtcatcaagt ccgtcaccaa gggcgacaaa taaattctac gaaagatfff tttcctcaag 4860
aagcgcccta aagttgaccc cttgcagcga cgactgtgtg tgccgttatg agtcgagttg 4920
cgatgtcgtg cagcgcccgt cgcgccccat gctcgcgcgc gactccgtct ctgcttttga 4980
tctcagtcaa gagtgggaag ttcccttgct ttatcccact ttttagaggt cgctcacggc 5040
tgctggtttc tcgttgcatg tagcacagcc tcgtccatcg cagcctgcac caccctgctc 5100
gcctgggaaa atgcgctcag cggattcgca ctggcactcc tctcctcgga caggtgcgat 5160
gtggaagcgg tcacatcctc ggcgccctcg gccacgccag catctgcgca atcgctctcc 5220
tcgttctcag ccgcagccgc aggcaggccg acgtcgttta cctcggaatc caccgagcat 5280
ttcgagccca gcgcgtggc gtccacctcg atcatacctt ctccatcgcc gtccgctgcg 5340
gcttccgatt cttctgctgc cgcaaccgcg acgtcgcccc ccgtctcctc cgttctttcc 5400
gatgccggcg cagtggccgc gccctctgct cgaaccggct cgtgttcagc gtcagggcct 5460
gcgctgagct cgggcggctc ttccgagtga tccggccccg cgaggcaagg aatcggcggc 5520
tctggagtgt cggggcagcc gctctcctgc cggcttttgg ctggctgtct gtcctgcctc 5580
gcgttggcct ttgcttttgc cttggctttc gccttgggtg cggcgtttgc ctgctgcggc 5640
gacttggcgc ggccgcagaa tagcgctca aagtctgct cgaggcgccc cagctctgac 5700
ttgatttgcg aggtcccggg ggcatgagct ccgctgccct cgtccttacg gcccgctttt 5760
cgctgcaggt cgactctaga ggatccccgg gtacccgtta gaacgcgtaa tacgactcac 5820
tatagggaga gtcgactgag cacaactctg ctgcgagcga gcctcgagag cgtttgttcc 5880
gagccgcgga gcaaggggga tggatcgctc atgcggctgt gcggccctcg gtcacccggg 5940
gggtcctgca ctgacgcata tgttctgata agacacacga acgaacaaac cgaggagccg 6000
cagcgcctgg tgcacccgcc gggcgttgtt gtgtgctctt cttgcctccg agagagagag 6060
cggagcggat gcataggaaa tcgggccacg cgggagggcc atgcgttcgc cccacacgcc 6120
actttccacg cccgctctct ctccggccgg caggcagcgc ataactctcc gacgctggca 6180
ggctggtagc aactggcagg gacaactcgc gcgcgggtcc cggtcgttcg atgtgccaac 6240
ccgagggaat ccagccagca gggcgggttg cctcatcgcc cacctgctat ggtgcagcga 6300

```

accaaactccc gaagctgccg gttctgcgat tccctcttct gaattctgaa ttctgaactg	6360
attccggagg agaaccctct ggaagcgcgg gttgcctctc cagttctgcc gaactagaca	6420
ggggagtgag cagagagtga ccctgacgcg gagcgagctg gttgctggaa aagtcgcgaa	6480
cgctgggctg tgtcacgcgt ccacttcggg cagaccccaa acgacaagca gaacaagcaa	6540
caccagcagc agcaagcgat ctaagcaaca ctagccaaca tgattgaaca ggacggcctt	6600
cacgctggct cgcccgtgc ttgggtggaa cggctgttcg gctacgactg ggctcagcag	6660
acgatcggct gctcggacgc ggccgtgttc cgccttagcg cgaggggccg gccggtcctg	6720
tttgtcaaga ccgaccttag cggcgccctc aacgagctcc aggacgaagc tgcccgcctc	6780
agctggcttg ccacgacggg ggttccgtgc gccgctgtgc tcgacgtcgt caccgaagcc	6840
ggccgcgact ggctgctcct cggggaagtg cccggccagg acctcctcag cagccacctc	6900
gcgcccgtg agaaggtgtc catcatggcc gacgccatgc gccgcctgca caccctcgac	6960
cccgccacct gcccttcga ccaccaggcg aagcacagga tcgaacgcgc ccgcacgcgg	7020
atggaggctg gcctcgtcga ccaagacgac ctgcagagg agcaccaggg cctcgcgccg	7080
gcggaactgt tcgccaggct taaggctagg atgccggacg gcgaggacct cgtggtcacg	7140
cacggcgacg cctgcctccc caacatcatg gtcgagaacg gccgcttctc gggctttatc	7200
gactgcgggc gcctggggct ggcggaaccg taccaagaca tcgcgctcgc cacgcgggac	7260
atcgccgagg agcttggcgg cgagtgggcc gaccgctttc tcgtgctcta cggcatcgcc	7320
gccccggaca gccagaggat tgcgttctac cgcctcctgg acgagttctt ttgagatccg	7380
cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc	7440
cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca	7500
gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa	7560
tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttactgca	7620
ttctagtgtg ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac	7680
ctctagctag atctcacatt aattgcgtga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg	7740
actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccttgc agcacatccc ctttcgccca	7800
gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga	7860
atggcgaatg gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc	7920
gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	7980
acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca	8040
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga	8100

aacgcgcgga

8109

<210> 46

<211> 5404

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 46

tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag	60
cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg	120
cttccggctc gtatgttggtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc	180
tatgaccatg attacgccaa gcttgcatgc ctgcaggtcg actctagagg atccccaaaa	240
aagccgttac tcacatcagg ccgccactca tccgggcgaa agcttcgcgc attcgtcctc	300
gtcacctcgg gtcccctgtg tcgggacgga aagtgcgacg agacgcggcc gcagcagaga	360
gccccggggg cccgcgtcac ggggggcctg gcggcagtc tcttaagcc aaaccgaggg	420
ttagggctcc aggctgttcg gcggggctgc gggcgagggt gaagcacggg gccgcctagc	480
acctcctagc gcgcgactac caggatagcc cccgcgagcg cgcagggcgg tctgcggggc	540
gagggcggcc cagcagcgcg gcgcggcggg cgggtgcggc tgcgtaaggt ggcggcgggc	600
gcgggcgggtt aggttgggtt aggtcgcggc ggggctgtgt tctgggaatc cgccttacgg	660
ggcgcaatg gttggctggg aggcggtttg cggggttaga taggcggcca aggtgagccg	720
cgttgggcgg ataaatccgt ggaggcgctc gtggacggcg cggcagagac ggaacgcgga	780
gcaacacgaa gtaacaagca ggagtagcag gagtagcaag cagcggcaaa ggaaggctag	840
atgacggagc agcggggcat cttcgtgaca gtcttcctga tgcccgtgag cgtggtctgg	900
gacatcatgt tcgcactgcg ctcgtggctc atcatggcgc tgtactccgc gccagagctg	960
cacaaacagc gtgtgcagga agcctccgct caggctccgt acgccacgac caacgccccg	1020
cccggcacca agctgtgcac cgcgcgcggg ggggtggctct ccatctcgct cagtctgcgg	1080
ccgtacaaaa aggtggccac caacatctcc attaacatgt acgacatcct cgagcttaac	1140
gaaaccgaaa gctatgtcca tgtcgagccc atgggtcaaca tgggccagct tagccactac	1200
ctcatccctc gcggctacac catcccgggt ctccccgaaa tggacgacct caccgtcgga	1260

ggtctcttca tgggcaccgg catcgaggcc agctcgaca aatttggtct ctttgacgag 1320
 ttctgcatcg aggccgaggt catcctcgcc tccggcgagg tcgtcacttg cagcaagacc 1380
 cagaaccgcg acctcttcga cgcgctcccc tggctgtacg gcacgctcgg cttcctcgtc 1440
 tcctgcaaga tcaaggatcat cccttgcaag ccctttatcc gcatcgagta ccgaggctgc 1500
 cacaacaaaa agcagggcct cgagcttttc accaaggcct cctgcatgga catcccgccc 1560
 gactttgtcg agtgcacgct ctactcatcc gagacaatgg tagttatgac ctccgatatg 1620
 gtcgacgaag atgccgtcga aaaggacaag atcaacaaga tcggccgctg gtacaaaccc 1680
 tgggtacttca agcacgtcga gaagatgctc gagatctcct cgcccgaaaa gcccacgctc 1740
 gagtacatcc ccatccgcca gttcttccac cgctggacct cggccatctt ctgggagctc 1800
 gagcagatca tcccccttgg caaccatccg ctctaccgcg ctctcctcgg atggttcaca 1860
 ccttcggctc ccctgcttaa actcacgcag acggaggcca ttcgcaagac ctacgaggag 1920
 cagcacattg tccaggacat gctcgtgcct atctcaaaga cctccgaggc gctcgatgtc 1980
 tttgacacgc actaccaaact ttacccctc tggatctgcc cctaccgcca gtacgactac 2040
 agcgacgcca ccacggagca ccgccacttt cttcgcaagc ccaacaagcc caacaaggag 2100
 ggctacgaga tgtatgtcga tctcggcgcc tacgggtgtcc cgcgcccctg cctcgagaag 2160
 aagccttttg atgttatcaa gtcctctcgc gctgtcgaaa agtatgtcac cgaagccaat 2220
 ggtagccaga tgctctacgc caccagctac ctacgcccgc atgagttcag ggagatgttc 2280
 aaccatgcac actacgacaa gatgaagcaa aagggtgacc ccaacgactt ctttcctcag 2340
 gtctacgaga aggtctgcaa gggcgccatg aacttttggc aggcaaaagc tggtgacaag 2400
 aagcttgact gagatccgcg ccggctatgc gcccggtcgc gaccgccaca ctgcccacat 2460
 tgcctgcaag ttcgctgagc tccagaacaa gatggaccgc cgctcgggca agattctcga 2520
 ggagaccccc aagttcatca agtcgggcga ctctgccatg gtcaagatga tcccctcaa 2580
 gcgcatgtgc gtcgagtcct tcaccgagta cccgccgctc ggccgctttg ccgtgcgcga 2640
 catgcgctc accgtcgtcgc tcggcgtcat caagtccgtc accaaggcg acaaataaat 2700
 tctacgaaag atttttttcc tcaagaagcg ccctaaagt gacccttgc agcgacgact 2760
 gtgtgtgccg ttatgagtcg agttgcgatg tcgtgcagcg cccgtcgcgt cccatgctcg 2820
 cgcgcgactc cgtctctgct tttgatctca gtcaagagt ggaagttccc ttgctttatc 2880
 ccacttttta gaggtcgtc acggctgctg gttcctcgtt gcatgtagca cagcctcgtc 2940
 catcgcagcc tgcaccaccc tgctcgcctg ggaaaatgcg ctacgaggat tcgcactggc 3000
 actcctctcc tcggacaggt gcgatgtgga agcggtcaca tcctcggcgc cctcggccac 3060

gccagcatct gcgcaatcgc tctcctcggt ctcagccgca gccgcaggca ggccgacgtc 3120
 gtttacctcg gaatccaccg agcatttcga gcccagcgcg ctggcgtcca cctcgatcat 3180
 accttctcca tcgccgtccg ctgcggcttc cgattcttct gctgccgcaa ccgcgacgtc 3240
 ggcccccgtc tcctccgttc tttccgatgc cggcgcagtg gccgcgccct ctgctcgaac 3300
 cggctcgtgt tcagcgtcag ggcttgcgt gagctcgggc ggctcttccg agtgatccgg 3360
 ccccgcgagg caaggaatcg gcggctctgg agtgctgggg cagccgctct cctgccggtc 3420
 tttggctggc tgtctgtcct gcctcgcgtt ggcttttgct ttgacctgg ctttcgcctt 3480
 ggtggcggcg tttgcctgct gcggcgactt ggcgcgccg cagaatagcg cctcaaagtc 3540
 ctgctcgagg cgccccagct ctgacttgat ttgcgaggtc ccggtggcat gagctccgct 3600
 gccctcgtcc ttacggcccc tctttcgtg caggtcgact ctagaggatc cccgggtacc 3660
 cgtagaacg cgtaatacga ctactatag ggagagtcga ctgagcaca ctctgctgcg 3720
 agcgagcctc gagagcggtt gcttcgagcc gcggagcaag ggggatggat cgctcatgcg 3780
 gtcgtgcggc cctcggtcac ccggtgggtc ctgcactgac gcatctgttc tgatcagaca 3840
 cacgaacgaa caaacgagg agccgcagcg cctgggtcac ccgccggcg ttgttgtgtg 3900
 ctcttcttgc ctccgagaga gagagcggag cggatgcata ggaaatcggg ccacgcggga 3960
 gggccatgcg ttgccccac acgccacttt ccacgccgc tctctctccg gccggcaggc 4020
 agcgcataac tctccgacgc tggcaggctg gtagcaactg gcagggacaa ctgcgcgcgcg 4080
 ggtcccggtc gttcgatgtg ccaacccgag ggaatccagc cagcagggcg gttggcctca 4140
 tcgcccacct gctatggtgc agcgaaccaa ctcccgaagc tgccggttct gcgattccct 4200
 cttctgaatt ctgaattctg aactgattcc ggaggagaac cctctggaag gcggggttgc 4260
 ctctccagtt ctgccgaact agacagggga gtgagcagag agtgaccctg acgcggagcg 4320
 agctggttgc tggaaaagtc gcgaacgtg ggctgtgtca cgcgtccact tcgggcagac 4380
 cccaaacgac aagcagaaca agcaacacca gcagcagcaa gcgatctaag caacactagc 4440
 caacatggcc aagttgacca gtgccgttcc ggtgtcacc gcgcgcgacg tcgccggagc 4500
 ggtcgagtgc tggaccgacc ggctcgggtt ctcccgggac ttctgtggagg acgacttcgc 4560
 cgggtgtgtc cgggacgacg tgaccctgtt catcagcgcg gtccaggacc aggtggtgcc 4620
 ggacaacacc ctggcctggg tgtgggtgcg cggcctggac gagctgtacg ccgagtgtgc 4680
 ggaggtcgtg tccacgaact tccgggacgc ctccgggccg gccatgaccg agatcggcga 4740
 gcagccgtgg gggcgggagt tcgccctgcg cgaccggcc ggcaactgcg tgcacttcgt 4800
 ggccgaggag caggactgag atccgcgaaa tgaccgacca agcgacgcc aacctgccat 4860

cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggtt gggcttcgga atcgttttcc 4920
 gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttgcccacc 4980
 ccaacttggtt tattgcagct tataatgggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca 5040
 caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaactc atcaatgtat 5100
 cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta gctagatctc acattaattg cgtgaattca 5160
 ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc 5220
 cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 5280
 ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt 5340
 acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat 5400
 gccg 5404

<210> 47

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 47

cggcatcaga gcagattgta

20

<210> 48

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 48

tggccgattc attaatgcag

20

<210> 49

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 49

actgcagcgc acaccatgat g

21

<210> 50

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 50

gacctctagc tagatctcac attaatgacg tgaattcact ggccgctcgtt ttacaacgac

60

gtgactggga aaactttcac caaagtacta gagcgttgac

100

<210> 51

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 51

aactcgctag ctagcaaagt agctgcaaat tccaaataga tacgtcgagg gacgcaacgc	60
aacgctctag tactttggtg aaagttttcc cagtcacgac	100

<210> 52

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 52

tttatgtcct caaagagctt gcgtacatcg tgcggcaagt tgtgaagaaa agtgactgac	60
ggtgatgcgc acgtagaccc ttccaggaaa cagctatgac	100

<210> 53

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 53

caggcgctgc ggcggatcct ctagagtcga cctgcaggca tgcaagcttg gcgtaatcat	60
ggtcatagct gtttcctgga agggctctacg tgcgcatcac	100

<210> 54

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 54

ggagcgctac tgccccacac	20
-----------------------	----

<210> 55

<211> 1011

<212> ADN

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 55

atggtcgttc tctgggagaa gggcgagaac cactcgtcgg accagttcgt tggcgccatc	60
aaccatgcc aagaagaacac cgtggacaac gaggacaagg acaagaacta cgcacccgtg	120

```

gtcaagagct tctacgcctc ggtcgccacc agcctctacg agtacggctg gggcaagtcc 180
ttccacttcg ccccgcgcaa caagggcgag ggctttaagg agtccctcct ccgccaggag 240
cactggctcg ccgccagct cggcatccgc cccggccagg atgtctgtga cctcggctgc 300
ggtgtctgcg gccccctcgt caacatcgcc aagttctccc gcgccaacat caccggcgtg 360
accatctccg acttccagat cggcgcggc aacgcctgga tcgcccagaa cggcctctcc 420
aaccgctgca aggccgtcga gggtgacttc cacgagctcc cttcgagga caactccttc 480
gactgcggct acgactgcga ggccaccgcc cactccacca agtcaaacac cttcttcgcc 540
gaggtcgagc gcgtcctccg ccccggtggg gtcttcgccg gcttcgcctg ggtcaccctc 600
cccaagcaca acccgaggga ccccgaggag gtcaagattc tcgaggacct tgcctttggc 660
aacgccattg ccgtcctcca cagctttgac gactacgtca acgccatcaa ggctaacccc 720
ggtctcgagc tcgtcgaggc ctacgacgcc aacaagctcg gcgacgacat ggagtggcac 780
gagccccctca agcctggctt ctctctcgac ggcatcctca tgtcctgggc tggccgccag 840
ctcaccgcga acctcgcccg cgtcaccgag gccatcggcc ttgcccccaa gggcacctac 900
aacgcctccc aggtcctcga gggttgctgcc cgctccctcg tcgacgccgg cgaccgcggt 960
atctacaccc ccatctacta ctacaaggtc cgcaaggtcg ccaagaacta a 1011

```

<210> 56

<211> 336

<212> PRT

<213> Aurantiochytrium sp.1

<400> 56

Met Val Val Leu Trp Glu Lys Gly Glu Asn His Ser Ser Asp Gln Phe

1 5 10 15

Val Gly Ala Ile Asn His Ala Met Lys Asn Thr Val Asp Asn Glu Asp

20 25 30

Lys Asp Lys Asn Tyr Ala Pro Val Val Lys Ser Phe Tyr Ala Ser Val

35 40 45

Ala Thr Ser Leu Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Lys Ser Phe His Phe Ala

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

290						295						300					
Val	Leu	Glu	Val	Ala	Ala	Arg	Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Gly	Asp	Arg	Gly		
305						310					315				320		
Ile	Tyr	Thr	Pro	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Val	Arg	Lys	Val	Ala	Lys	Asn		
				325					330					335			