(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) **1-0042595**

(51)[2020.01] **C12N 15/70**; C12N 15/77; C12P 13/24; C12P 13/06; C12P 13/12; C12P 13/22; C07K 14/195; C12P 13/04

(13) **B**

(21) 1-2021-07819
(22) 29/04/2020
(86) PCT/KR2020/005674 29/04/2020
(87) WO2020/226341 12/11/2020
(30) 10-2019-0054430 09/05/2019 KR
(45) 27/01/2025 442
(43) 25/02/2022 407
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) YOO, Hye Ryun (KR); KIM, So-Yeon (KR); PARK, Hye Min (KR); LEE, Sung Gun (KR); LEE, Jin Nam (KR); KIM, Hyun Ah (KR); CHOI, Sol (KR); HUH, Lan (KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH L-AXIT AMIN, CHẾ PHẨM SẢN XUẤT L-AXIT AMIN VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT VÀ CHẾ PHẨM NÀY

(21) 1-2021-07819

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, chế phẩm sản xuất L-axit amin, và các phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bằng cách sử dụng vi sinh vật và chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, chế phẩm sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng và các phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bằng cách sử dụng vi sinh vật và chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các L-axit amin là các đơn vị cấu thành bazơ của protein đã được sử dụng làm nguyên liệu thô chính của thuốc, phụ gia thực phẩm, thức ăn gia súc, chất bổ sung dinh dưỡng, thuốc trừ sâu, chất khử trùng, và tương tự. Nghiên cứu sâu rộng đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật và các quá trình lên men để sản xuất các L-axit amin và các chất có lợi khác với sản lượng cao. Ví dụ, các phương pháp tiếp cận mục tiêu cụ thể, chẳng hạn như phương pháp tăng sự biểu hiện của gen mã hóa enzym liên quan đến sinh tổng hợp L-lysin và phương pháp loại bỏ gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp đã được sử dụng chủ yếu (patent Hàn Quốc số 10-0838038).

Trong khi đó, các chủng thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là *Corynebacterium glutamicum* là các vi sinh vật gram dương được sử dụng rộng rãi để sản xuất các L-axit amin và các chất có lợi khác. Nghiên cứu chuyên sâu đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật và các quá trình lên men để sản xuất các axit amin với sản lượng cao. Ví dụ, các phương pháp tiếp cận mục tiêu cụ thể, chẳng hạn như phương pháp tăng biểu hiện của gen mã hóa enzym liên quan đến sinh tổng hợp axit amin hoặc phương pháp loại bỏ gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp ở các chủng thuộc chi *Corynebacterium* đã được sử dụng rộng rãi (công bố patent Hàn Quốc số 10-0924065 và 10-1208480). Ngoài các phương pháp này, phương pháp loại bỏ gen không liên quan đến sản xuất các axit amin và phương pháp loại bỏ gen mà các chức năng cụ thể của chúng chưa được biết đến liên quan đến việc sản xuất các axit amin cũng đã được sử dụng. Tuy nhiên, vẫn cần nghiên cứu các phương pháp sản xuất hiệu quả các L-axit amin với sản lượng cao.

BMT cấp bằng 93 trang
ở công bố trình

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

13 YCBH (4 độc lập)

Các tác giả đã hoàn thiện sáng chế bằng nhiều nỗ lực để phát triển vi sinh vật có khả năng sản sinh các L-axit amin với sản lượng cao và nhận thấy rằng sản lượng của các L-axit amin có thể được tăng lên bằng cách đưa vào protein có nguồn gốc từ vi sinh vật khác.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó chế phẩm bao gồm vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của nó, hoặc protein.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, phương pháp bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy; và thu hồi L-axit amin hoặc tiền chất của chúng từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi sinh vật theo sáng chế sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng có thể sản sinh L-serin, L-tryptophan, L-histiđin, L-metionin, L-xystein, và/hoặc O-phosphoserin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng trong phần mô tả này để mô tả các phần mô tả và phương án khác nhau. Nói cách khác, tất cả sự kết hợp của các chi tiết khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không chỉ bị giới hạn bởi các mô tả chi tiết dưới đây.

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể nhận biết hoặc xác nhận, sử dụng các thí nghiệm thông thường, nhiều phương pháp tương đương theo các khía cạnh cụ thể của sáng chế. Các phương pháp tương đương

như vậy đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng.

Protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng có thể là protein có hoạt tính đehyđrogenaza D-3-phosphoglyxerat.

Theo sáng chế, "D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza" là enzym chủ yếu xúc tác các phản ứng hóa học dưới đây.

3-phospho-D-glyxerat + NAD^+ ↔ 3-phosphonooxypyruvat + NADH + H^+

2-hyđroxyglutarat + NAD^+ ↔ 2-oxoglutarat + NADH + H^+

Để đạt được mục đích của sáng chế, D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có thể là SerA, và trình tự của chúng có thể được xác định thông qua dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen của Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ngoài ra, bất kỳ loại protein nào khác với vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng và bao gồm cả protein nêu trên mà có hoạt tính tương đương và có nguồn gốc từ vi sinh vật cũng có thể được sử dụng mà không giới hạn ở đây. Cụ thể, protein có thể là protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và có thể được sử dụng thay thế cho nhau với protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Protein có thể có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và/hoặc ít nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ protein bổ trợ nào có trình tự axit amin bao gồm một hoặc một số axit amin được xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế, miễn là trình tự axit amin vẫn giữ được sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên và hiệu quả tương đương với hiệu quả của protein.

Ngoài ra, cũng có thể sử dụng bất kỳ polypeptit nào có hoạt tính D-3-

phosphoglyxerat đehyđrogenaza và được mã hóa bởi polynucleotit được lai hóa với đầu dò được điều chế bằng cách sử dụng các trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự nucleotit bổ sung hoàn toàn hoặc một phần cho trình tự nucleotit mã hóa polypeptit trong các điều kiện nghiêm ngặt mà không giới hạn ở đây.

Ngoài ra, để đạt được mục đích của sáng chế, protein có thể có nguồn gốc từ các vi sinh vật khác với vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng và bao gồm cả protein nêu trên, và cụ thể là protein có thể là protein có nguồn gốc từ chi *Azotobacter*, protein tương đồng với protein có nguồn gốc từ chi *Azotobacter*, hoặc bất kỳ protein nào có khả năng tăng sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, mà không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Azotobacter* có thể là *Azotobacter agilis, Azotobacter armeniacus, Azotobacter beijerinckii, Azotobacter chroococcum, Azotobacter* sp. *DCU26, Azotobacter* sp. *FA8, Azotobacter nigricans, Azotobacter paspali, Azotobacter salinestris, Azotobacter tropicalis,* hoặc *Azotobacter vinelandii*, và trong một phương án của sáng chế, có thể là vi sinh vật có nguồn gốc từ *Azotobacter vinelandii*, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "đoạn chức năng" có nghĩa là trình tự axit amin có hiệu quả tương đương với hiệu quả của protein và rõ ràng rằng bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bao gồm một hoặc một số axit amin được xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm vào và giữ được hiệu quả tương đương với hiệu quả của protein đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế và có thể được coi là đoạn chức năng để đạt được mục đích của sáng chế.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, mặc dù sử dụng các khái niệm "protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể", "protein hoặc polypeptit gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể" hoặc "protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể", rõ ràng rằng cũng có thể sử dụng trong sáng chế bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bao gồm một hoặc một số axit amin được xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ, hoặc thêm vào miễn là protein có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đương với polypeptit gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO cụ thể. Ví dụ, protein có thể có sự thêm vào trình tự vào đầu N và/hoặc đầu C của trình tự axit amin mà không tạo ra những thay đổi về các chức năng của protein, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm hoặc thay thế bảo thủ của chúng.

Thuật ngữ "thay thế bảo thủ" có nghĩa là thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin và histiđin; các axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, lysin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit" có ý nghĩa toàn diện bao gồm các phân tử ADN và ARN, và nucleotit là đơn vị cấu trúc cơ bản trong polynucleotit có thể bao gồm không chỉ nucleotit tự nhiên mà còn là chất tương tự trong đó đường hoặc bazơ được biến đổi (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)).

Polynucleotit mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể có bất kỳ trình tự nào có khả năng mã hóa protein có hoạt tính D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có nguồn gốc từ *Azotobacter vinelandii* mà không giới hạn ở đây. Ngoài ra, polynucleotit có thể có bất kỳ trình tự mã hóa protein có hoạt tính tăng sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 mà không giới hạn ở đây.

Ví dụ, polynucleotit có thể là polynucleotit mã hóa polypeptit có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ví dụ, cụ thể là, polynucleotit mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 95 hoặc polynucleotit có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 95.

Ngoài ra, rõ ràng rằng polynucleotit có thể còn là polynucleotit có thể được dịch

mã thành protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc protein có sự tương đồng hoặc đồng nhất với sự thoái biến của đơn vị mã hóa. Thay vào đó, polynucleotit có thể có trình tự nucleotit có thể được lai hóa với đầu dò được điều chế bằng cách sử dụng các trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự nucleotit bổ sung hoàn toàn hoặc một phần cho trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 70% tương đồng với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 mà không giới hạn ở đây. Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" có nghĩa là các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các giáo trình đã biết (ví dụ, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao lai với nhau, ví dụ, ít nhất 70%, 80%, tốt hơn là 85%, tốt hơn nữa là 90%, tốt hơn nữa là 95%, tốt hơn nữa là 97%, hoặc tốt nhất là 99% tương đồng hoặc đồng nhất, trong khi các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn các gen nêu trên không lai với nhau; hoặc các điều kiện trong đó việc rửa được thực hiện rửa một lần, và tốt hơn là hai đến ba lần ở điều kiện rửa thông thường của lai Southern ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS. Sự lai hóa đòi hỏi hai polynucleotit chứa các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ "bổ sung" được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của các polynucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymin, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm các đoạn nucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như trình tự nucleotit giống nhau về cơ bản.

Cụ thể, polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai nêu trên bao gồm bước lai với giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là nhiệt độ 60°C, 63°C, hoặc 65°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây và có thể được kiểm soát thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Thuật ngữ "tương đồng hoặc đồng nhất" có nghĩa là mức độ kết hợp với hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit và có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm.

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

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể lai hóa với nhau theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Trong các polynucleotit đã lai hóa, các polynucleotit bao gồm đơn vị mã hóa thoái biến thay vì đơn vị mã hóa cũng được xem xét.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất giữa các polypeptit hoặc trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng bất kỳ thuật toán đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ BLAST (tham khảo Karlin và Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, (1993)) hoặc FASTA được đưa ra bởi Pearson (tham khảo Methods Enzymol., 183, 63, 1990). Dựa trên thuật toán BLAST, các chương trình đã biết như BLASTN hoặc BLASTX đã được phát triển (tham khảo http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Ngoài ra, sự có mặt của sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất giữa các trình tự axit amin hoặc polynucleotit có thể được xác nhận bằng cách so sánh các trình tự này bằng các thí nghiệm lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai nghiêm ngặt đã xác định thuộc phạm vi của công nghệ theo sáng chế, và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "được biểu hiện/được biểu thị" đối với protein có nghĩa là trạng thái trong đó protein đích được đưa vào vi sinh vật hoặc, trong trường hợp protein có mặt trong vi sinh vật, hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó hoặc hoạt tính của nó trước khi sửa đổi.

Cụ thể, thuật ngữ "đưa vào protein" có nghĩa là cung cấp hoạt tính của protein cụ thể cho vi sinh vật, trong đó ban đầu không có sẵn protein hoặc hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa vào protein có thể có nghĩa là đưa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào nhiễm sắc thể hoặc đưa một đoạn hoặc vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào vi sinh vật, do đó có khả năng biểu hiện hoạt tính của protein. "Hoạt tính nội sinh" có nghĩa là hoạt tính của protein có sẵn ban đầu bởi chủng vi sinh vật mẹ trước khi biến đổi khi vi sinh vật được biến đổi bằng cách biến đổi gen do yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo gây ra.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "axit amin hoặc tiền chất của chúng" có nghĩa là axit amin hoặc tiền chất có thể được tạo ra bằng cách sử dụng protein và có thể bao gồm serin, tryptophan, histiđin, metionin, xystein, L-xystathionin, L-homoxystein, O-axetylhomoserin, O-succinyl homoserin, L-homoserin, và/hoặc O-phosphoserin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Theo sáng chế, axit amin có thể không chỉ là L-axit amin, cụ thể là, L-serin, L-tryptophan, L-histiđin, L-metionin, hoặc L-xystein mà còn bao gồm tất cả các L-axit amin được sản sinh bởi các vi sinh vật từ các nguồn cacbon khác nhau thông qua các quá trình trao đổi chất. Tiền chất có thể là O-axetylhomoserin hoặc O-succinylhomoserin là tiền chất được chuyển đổi thành metionin bởi O-axetylhomoserin sulfhyđrylaza (patent Hàn Quốc số 10-1048593); L-homoserin, L-homoxystein, hoặc L-xystathionin là tiền chất metionin; và axetylserin, là tiền chất L-xystein; và/hoặc O-phosphoserin là tiền chất được chuyển đổi thành xystein bởi O-phosphoserin sulfhyđrylaza, mà không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, axit amin hoặc tiền chất của chúng có thể là L-serin, L-tryptophan, L-histiđin, L-metionin, O-phosphoserin, hoặc L-xystein, mà không bị giới hạn ở đây.

Để tăng cường sinh tổng hợp của các L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, có thể sử dụng protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng theo sáng chế. Ví dụ, để tăng cường sinh tổng hợp của L-serin, L-tryptophan, L-histiđin, L-metionin L-xystein, L-homoxystein, L-xystathionin, axetylserin, O-axetylhomoserin, O-succinylhomoserin, L-homoserin, và/hoặc O-phosphoserin, vi sinh vật có thể được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng theo sáng chế. Ví dụ cụ thể, protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể được

đưa vào hoặc hoạt tính của protein có thể được tăng cường. Ngoài ra, khả năng sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng có thể còn được tăng cường bằng cách đưa vào thêm hoặc tăng cường hoạt tính của protein cụ thể hoặc làm bất hoạt hoạt tính của protein cụ thể.

Cụ thể, vi sinh vật có thể tạo ra các L-axit amin hoặc các tiền chất của chúng bằng cách bao gồm thêm i) phosphoserin phosphataza có hoạt tính suy yếu, ii) 3-phosphoserin aminotransferaza có hoạt tính tăng cường, hoặc iii) cả phosphoserin phosphataza có hoạt tính suy yếu và 3-phosphoserin aminotransferaza có hoạt tính tăng cường, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật có thể còn được biến đổi bằng cách tăng cường operon trp, bất hoạt tryptophanaza (TnaA), bất hoạt protein màng Mtr (Mtr), hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, vi sinh vật có thể còn được biến đổi bằng sự tăng cường operon trp bằng cách bất hoạt TrpR ức chế sự biểu hiện của các gen (trpEDCBA) kết hợp với sinh tổng hợp L-tryptophan liên quan đến sản xuất L-tryptophan, bằng cách bất hoạt tryptophanaza (TnaA) đóng vai trò trong việc đưa L-tryptophan ngoại bào vào tế bào, và bằng sự bất hoạt protein màng Mtr đóng vai trò phân hủy L-tryptophan nội bào và các phân tử nước thành inđol, pyruvat và amoniac (NH_3), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, để đạt được mục đích của sáng chế, vi sinh vật có thể còn được biến đổi bằng cách tăng cường operon his, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, các gen sinh tổng hợp chia tổng cộng thành 4 operon có thể được đưa vào vi sinh vật ở dạng cụm để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-histiđin, trong đó vùng gen khởi động được thay thế, và cụm sinh tổng hợp L-histiđin được chia tổng cộng thành 4 operon (hisE-hisG, hisA-impA-hisF-hisI, hisD-hisC-hisB và cg0911-hisN). Operon his có thể được tăng cường bằng cách sử dụng vectơ có thể đưa đồng thời các gen sinh tổng hợp vào vi sinh vật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, để đạt được mục đích của sáng chế, vi sinh vật có thể còn được sửa đổi bằng sự bất hoạt chất điều hòa phiên mã (McbR), sự tăng cường metionin synthaza (meth), sự tăng cường thành phần sulfit reductaza [NADPH] hemoprotein beta (cysI), hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, vi sinh vật có thể còn được sửa đổi bằng cách bất hoạt McbR là chất điều hòa dịch mã metionin/xystein, tăng cường metionin synthaza (Meth), tăng cường thành phần sulfit reductaza [NADPH] hemoprotein beta, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Việc đưa vào, tăng cường và bất hoạt hoạt tính của protein và/hoặc gen cụ thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "tăng cường" hoạt tính của protein có nghĩa là hoạt tính của protein được đưa vào hoặc tăng lên khi so sánh với hoạt tính nội sinh của nó. "Sự đưa vào" hoạt tính có nghĩa là vi sinh vật có được hoạt tính của polypeptit cụ thể mà vi sinh vật đó không có sẵn tự nhiên hoặc nhân tạo.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "tăng" hoạt tính của protein liên quan đến hoạt tính nội sinh có nghĩa là hoạt tính của protein có trong vi sinh vật được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của protein hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Thuật ngữ "hoạt tính nội sinh" có nghĩa là hoạt tính của protein có sẵn ban đầu bởi chủng vi sinh vật mẹ hoặc vi sinh vật không bị biến đổi trước khi biến đổi khi vi sinh vật được biến đổi bằng cách biến đổi gen do yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo gây ra. Hoạt tính nội sinh còn có thể được sử dụng thay cho nhau cho hoạt tính trước khi sửa đổi. Sự tăng hoạt tính có thể bao gồm cả việc đưa protein ngoại lai vào và tăng cường hoạt tính nội sinh của protein. Sự tăng/nâng cao hoạt tính của protein có thể đạt được bằng sự tăng/tăng cường biểu hiện gen.

Cụ thể, sự tăng hoạt tính của protein theo sáng chế có thể đạt được bằng một trong các phương pháp sau, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây:

(1) phương pháp tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein,

(2) phương pháp sửa đổi trình tự kiểm soát biểu hiện để tăng sự biểu hiện của polynucleotit,

(3) phương pháp sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của protein,

(4) phương pháp đưa vào polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến đổi được tối ưu hóa đơn vị mã hóa có hoạt tính của protein, hoặc

(5) phương pháp nâng cao hoạt tính bằng bất kỳ sự kết hợp nào của chúng.

Phương pháp tăng số lượng bản sao của polynucleotit được mô tả trong phương pháp (1) nêu trên không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể được thực hiện ở dạng liên kết chức năng với vectơ hoặc ở dạng tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Cụ thể, phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách đưa vào tế bào chủ vectơ sao chép và hoạt tính không phân biệt vật chủ và được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế; hoặc bằng cách đưa vào tế bào chủ vectơ chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và liên kết chức năng với polynucleotit, nhờ đó làm tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ.

Tiếp theo, phương pháp biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện để tăng sự biểu hiện của polynucleotit được mô tả trong phương pháp (2) nêu trên có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự axit nucleotit bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự kiểm soát biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động, trình tự toán tử, trình tự mã hóa vị trí liên kết với ribosom và trình tự điều chỉnh sự kết thúc của phiên mã và dịch mã tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Thay vì vùng gen khởi động nội tại, vùng gen khởi động dị hợp mạnh có thể được liên kết với phía trước của đơn vị biểu hiện polynucleotit, và các ví dụ của vùng gen khởi động mạnh có thể bao gồm các vùng gen khởi động từ CJ1 đến CJ7 (patent Hàn Quốc số 0620092 và công bố đơn quốc tế số WO 2006/065095), vùng gen khởi động lysCP1 (công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689), vùng gen khởi động EF-Tu, vùng gen khởi động groEL, vùng gen khởi động aceA, vùng gen khởi động aceB, vùng gen khởi động lac, vùng gen khởi động trp, vùng gen khởi động trc, vùng gen khởi động tac, vùng gen khởi động lambda phage PR, vùng gen khởi động P_L, vùng gen khởi động tet, vùng gen khởi động gapA, vùng gen khởi động SPL1, SPL7, hoặc SPL13 (patent Hàn Quốc số 10-1783170), hoặc vùng gen khởi động O2 (patent Hàn Quốc số 10-1632642), sáng chế không chỉ giới hạn ở đây. Ngoài ra, phương pháp sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể được mô tả trong phương pháp (3) nêu trên có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự kiểm soát biểu hiện bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng để tăng cường

thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit đã được sửa đổi để có hoạt tính mạnh hơn, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp đưa trình tự polynucleotit ngoại lai được mô tả trong phương pháp (4) nêu trên có thể được thực hiện bằng cách đưa vào vào vật chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa protein có hoạt tính tương đồng/tương tự với hoạt tính của protein, hoặc polynucleotit biến thể được tối ưu hóa đơn vị mã hóa. Polynucleotit ngoại lai có thể là bất kỳ polynucleotit nào có hoạt tính tương đồng/tương tự với hoạt tính của protein mà không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, đơn vị mã hóa tối ưu của nó có thể được đưa vào tế bào chủ để thực hiện quá trình phiên mã và dịch mã tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai đã được đưa vào tế bào chủ. Việc đưa vào có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp biến đổi nào đã biết được lựa chọn phù hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Khi polynucleotit đã được đưa vào được biểu hiện trong tế bào chủ, protein được tạo ra và hoạt tính của chúng có thể tăng lên.

Cuối cùng, phương pháp tăng cường hoạt tính bằng bất kỳ sự kết hợp nào từ các phương pháp từ (1) đến (4) được mô tả trong phương pháp (5) nêu trên có thể được thực hiện bằng cách kết hợp ít nhất một trong các phương pháp tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein, biến đổi trình tự kiểm soát biểu hiện để tăng sự biểu hiện của chúng, biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể, đưa vào polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của protein hoặc polynucleotit biến thể tối ưu hóa đơn vị mã hóa của chúng.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "làm suy yếu" hoạt tính của protein là khái niệm bao gồm cả sự giảm và loại bỏ hoạt tính so với hoạt tính nội sinh.

Sự suy yếu hoạt tính của protein có thể đạt được bằng nhiều phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về phương pháp có thể bao gồm: phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ protein mã hóa gen trên nhiễm sắc thể, kể cả trường hợp loại bỏ hoạt tính; phương pháp thay thế protein mã hóa gen trên nhiễm sắc thể bằng gen bị đột biến để giảm hoạt tính của protein; phương pháp đưa một đột biến vào trình tự kiểm soát biểu hiện của protein mã hóa gen trên nhiễm sắc thể; thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của protein mã hóa gen bằng trình tự có hoạt tính yếu hơn hoặc không có hoạt

tính (ví dụ, thay thế vùng gen khởi động nội sinh của gen bằng vùng gen khởi động yếu hơn); phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ protein mã hóa gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa vào oligonucleotit antisenza (ví dụ, ARN antisenza) liên kết bổ sung với bản sao của gen trên nhiễm sắc thể để ức chế sự dịch mã từ mARN thành protein; phương pháp thêm nhân tạo trình tự bổ sung cho trình tự SD vào phần phía trước của trình tự SD của protein mã hóa gen để tạo thành cấu trúc thứ cấp, nhờ đó ức chế sự liên kết của ribosom ở đây và phương pháp kết hợp vùng gen khởi động với đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) để tạo ra phiên mã ngược (kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE)), hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ protein mã hóa gen có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể bằng polynucleotit hoặc gen đánh dấu bị xóa một phần trong trình tự axit nucleic bằng cách sử dụng vectơ cho sự chèn nhiễm sắc thể vào vi sinh vật. Ví dụ, phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, thuật ngữ "một phần" có nghĩa là từ 1 nucleotit đến 300 nucleotit, cụ thể là, từ 1 nucleotit đến 100 nucleotit, và cụ thể hơn là, từ 1 nucleotit đến 50 nucleotit mặc dù nó có thể thay đổi tùy theo loại polynucleotit và có thể được xác định thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự kiểm soát biểu hiện thông qua việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc thay thế không bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của trình tự kiểm soát biểu hiện hoặc được thực hiện bằng cách thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính yếu hơn. Trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động, trình tự vùng vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom và trình tự điều chỉnh kết thúc phiên mã và dịch mã, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự của gen trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sửa đổi thông qua việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc thay thế không bảo thủ hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của protein trong trình tự hoặc được thực hiện bằng cách thay thế trình tự của gen bằng

trình tự của gen đã được sửa đổi để có hoạt tính yếu hơn hoặc không có hoạt tính, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, cụm từ "vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng" có nghĩa là vi sinh vật có khả năng tạo ra L-axit amin hoặc tiền chất của chúng với số lượng lớn từ các nguồn cacbon chứa trong môi trường nuôi cấy so với vi sinh vật kiểu dại hoặc không bị biến đổi. Ngoài ra, vi sinh vật có thể có nghĩa là vi sinh vật có khả năng sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng một cách tự nhiên hoặc vi sinh vật được điều chế bằng cách cung cấp khả năng tạo ra L-axit amin hoặc tiền chất của chúng cho chủng bố mẹ của vi sinh vật mà không thể sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng để sản sinh hoặc tiền chất của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, "vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng" bao gồm cả vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật có sự biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, chẳng hạn như vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường thông qua việc đưa vào gen ngoại sinh, tăng cường hoặc bất hoạt gen nội sinh, v.v., và trong đó sự biến đổi gen đã xảy ra hoặc hoạt tính đã được tăng cường để sản sinh L-axit amin đích hoặc tiền chất của chúng. Cụ thể, các loại vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể, miễn là vi sinh vật có thể tạo ra L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, tuy nhiên vi sinh vật có thể thuộc giống chi *Enterobacter*, chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium,* hoặc chi *Brevibacterium*. Cụ thể hơn, vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium ammoniagenes, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Corynebacterium thermoaminogenes, Corynebacterium efficiens, Corynebacterium stationis*, hoặc tương tự, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể là *Escherichia coli*, và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Để đạt được mục đích của sáng chế, vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật nào chứa protein và do đó có khả năng tạo ra L-axit amin và tiền chất của chúng.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, cụm từ "vi sinh vật có khả năng sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng" có thể được sử dụng thay thế cho các cụm từ "vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng" và "vi sinh vật có khả năng sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng".

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó chế phẩm bao gồm vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng, hoặc protein.

Chế phẩm sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng có nghĩa là chế phẩm có khả năng tạo ra L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bởi protein theo sáng chế. Chế phẩm có thể bao gồm protein, đoạn chức năng của chúng hoặc bất kỳ thành phần nào được sử dụng để hoạt tính protein, mà không giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp còn có thể bao gồm bước thu hồi L-axit amin hoặc tiền chất của chúng từ môi trường nuôi cấy hoặc việc nuôi cấy của chúng.

Trong phương pháp nêu trên, việc nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ bổ sung hoặc phương pháp tương tự đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Đối với vấn đề này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên độ pH tối ưu (ví dụ, độ pH từ 5 đến 9, tốt hơn là độ pH từ 6 đến 8, và tốt nhất là độ pH 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hyđroxit, kali hyđroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất có tính axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric). Ngoài ra, điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách thêm oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến khoảng 160 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Axit amin được sản xuất trong quá trình nuôi cấy có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc vẫn còn trong tế bào.

Các ví dụ của nguồn cacbon chứa trong môi trường có thể bao gồm các sacarit và

các hyđrat cacbon (ví dụ, glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), các axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), các rượu (ví dụ, etanol và glyxerol), và các axit hữu cơ (axit axetic) mà có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp, v.v. nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Các ví dụ của nguồn nitơ chứa trong môi trường nuôi cấy có thể là hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, cao thịt, cao mạch nha, dịch chiết ngô, bột đậu nành và ure), và hợp chất vô cơ có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat). Đối với nguồn phospho, có thể sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp kali đihyđrogen phosphat, đikali hyđrogen phosphat, và các muối chứa natri tương ứng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các nguyên liệu thúc đẩy sự tăng trưởng cần thiết chẳng hạn như muối kim loại (ví dụ, magie sulfat và sắt sulfat), các axit amin, và các vitamin, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, có thể thu hồi axit amin sản sinh trong bước nuôi cấy bằng cách thu nhận axit amin đích từ dung dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp đã biết được chọn theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, các phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) có thể được sử dụng, và có thể thu hồi axit amin đích từ môi trường hoặc vi sinh vật được nuôi cấy bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh chế có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, axit amin được thu hồi có thể là axit amin tinh khiết hoặc môi trường lên men của vi sinh vật bao gồm axit amin (Introduction to Biotechnology và Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

Ngoài ra, để đạt được mục đích của sáng chế, trong trường hợp vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có nguồn gốc từ chi *Azotobacter*, sản lượng của các L-axit amin và các tiền chất của chúng bao gồm serin, tryptophan, histiđin, metionin và O-phosphoserin tăng lên. Điều quan trọng là vi sinh vật biến đổi làm tăng sản lượng các L-axit amin và các tiền chất của chúng, trong khi các chủng kiểu dại thuộc chi *Corynebacterium* không thể hoặc có thể sản sinh các L-

axit amin hoặc các tiền chất của chúng với lượng rất nhỏ.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bằng cách sử dụng chế phẩm, bao gồm vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng, hoặc protein.

Vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng và vi sinh vật này đã được mô tả ở trên.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng để tăng sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng.

Trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đoạn chức năng của chúng, L-axit amin, và tiền chất của chúng đã được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, những ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Trong khi đó, những vấn đề kỹ thuật không được mô tả trong phần mô tả này có thể được hiểu đầy đủ và thực hiện dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật với sáng chế hoặc lĩnh vực kỹ thuật tương tự với sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế vectơ biểu hiện quá mức D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza (serA(Avn)) có nguồn gốc từ *Azotobacter*

Để xác định liệu khả năng sản sinh serin và OPS có được cải thiện bằng cách tăng cường D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có nguồn gốc từ *Azotobacter vinelandii* (được gọi là "SerA(Avn)" trong phần mô tả sau đây), vectơ biểu hiện được điều chế.

Vectơ pCL1920 (số lưu chủng tại Ngân hàng gen (GenBank): AB236930) được sử dụng để biểu hiện gen serA(Avn) (có mã nhận biết SEQ ID NO: 1) mã hóa SerA(Avn), và vùng gen khởi động trc (Ptrc) được sử dụng như vùng gen khởi động biểu hiện, nhờ đó điều chế vectơ dưới dạng pCL-Ptrc-serA(Avn).

Vectơ bao gồm D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có nguồn gốc từ E. coli

được điều chế làm đối chứng, trong đó sự ức chế phản hồi serin được giải phóng, và được gọi là pCL-Ptrc-serA*(G336V). Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng để điều chế các vectơ được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Gen	Đoạn mồi (5'->3')	SEQ ID NO	Vectơ
Ptrc	AGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGCTTGCTG CAACTCTCT	2	pCL-Ptrc-serA(Avn), pCL-Ptrc-serA*(G336V)
	GATATCTTTCCTGTGTGA	3	
serA (Avn)	AATTTCACACAGGAAAGATATCATGAGTAA GACCTCCCTG	4	pCL-Ptrc-serA(Avn)
	GTGAATTCGAGCTCGGTACCCTCAGAACAG AACCCGTGAG	5	
serA* (G336V)	AATTTCACACAGGAAAGATATCATGGCAAA GGTATCGCTG	6	pCL-Ptrc-serA*(G336V)
	GTGAATTCGAGCTCGGTACCCTTAGTACAGC AGACGGGCG	7	

Phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain ReactionL: PCR) cho Ptrc mà được sử dụng trong điều chế cả hai vectơ được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3. Cụ thể, phương pháp PCR cho serA(Avn) ngoại lai được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 và phương pháp PCR cho serA*(G336V) được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7. Các đoạn Ptrc và serA(Avn) và serA*(G336V) đã khuếch đại của các gen tương ứng được nhân bản thành vectơ pCL1920 được xử lý tương ứng với enzym giới hạn SmaI bằng phương pháp tách dòng Gibson, nhờ đó điều chế được pCL-Ptrc-serA(Avn) và pCL-Ptrc-serA*(G336V).

Ví dụ 2: Điều chế chủng bằng cách đưa serA(Avn) có nguồn gốc *Azotobacter* vào *E. coli* kiểu dại và đánh giá khả năng sản sinh serin

Bằng cách sử dụng chủng *E. Coli* W3110 kiểu dại làm chủng gốc, các chủng được điều chế bằng cách đưa mỗi loại trong số hai loại plasmit được điều chế trong ví dụ 1 vào trong chủng W3110, và sau đó đánh giá các khả năng sản sinh serin của các chủng.

Từng chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong tủ ủ ở nhiệt độ 33°C. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường rắn LB được cấy chuyển vào môi trường độ chuẩn 25 mL như được thể hiện trong bảng 2 dưới đây và được nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 34,5°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 40 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 2

Thành phần	Nồng độ (/L)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	4 g
$(NH4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10 mg
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Bảng 3

Chủng	OD562 nm	Tiêu thụ Glucoza (g/L)	L-serin (g/L)
E. coli W3110	19,5	40,0	0,05
W3110/pCL-Ptrc-serA*(G336V)	18,2	38,2	0,08
W3110/pCL-Ptrc-serA(Avn)	18,1	37,6	0,13

Như được thể hiện trên bảng 3, chủng W3110/pCL-Ptrc-serA*(G336V) thể hiện sự tăng sản sinh serin lên 60% so với chủng kiểu dại, trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng và hoạt tính serA được tăng cường. Để so sánh, xác nhận rằng chủng W3110/pCL-Ptrc-serA(Avn) bao gồm serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* thể hiện sự tăng sản sinh serin lên 160% so với chủng W3110 kiểu dại, và còn thể hiện tăng 62,5% so với chủng W3110/pCL-Ptrc-serA*(G336V).

Ví dụ 3: Điều chế chủng trong đó hoạt tính serB được làm suy yếu và được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* ngoại lai và đánh giá khả năng sản sinh OPS của chủng

Vi sinh vật sản sinh O-phosphoserin (OPS) được điều chế bằng cách làm suy yếu phosphoserin phosphataza (SerB) nội sinh trong chủng *E. Coli* W3110 kiểu dại (còn

được gọi là CA07-0012 với số lưu chủng KCCM11212P đã được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 10-1381048 và công bố đơn patent Hoa Kỳ số 2012-0190081).

Mỗi loại trong số hai loại plasmit được điều chế trong ví dụ 1 được đưa vào CA07-0012, và đánh giá được khả năng sản sinh OPS của các chủng được điều chế.

Từng chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong tủ ủ ở nhiệt độ 33°C. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường rắn LB được cấy chuyển vào môi trường độ chuẩn 25 mL như được thể hiện trong bảng 4 dưới đây và được nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 34,5°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 40 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 4

Thành phần	Nồng độ (/L)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	4 g
$(NH_4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10 mg
L-glyxin	2,5 g
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Bảng 5

Chủng	OD562 nm	Tiêu thụ glucoza (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0012	21,1	40,0	1,4
CA07-0012/pCL-Ptrc-serA*(G336V)	20,5	38,6	2,2
CA07-0012/pCL-Ptrc-serA(Avn)	20,0	37,8	2,9

Như được thể hiện trong bảng 5 nêu trên, CA07-0012/pCL-Ptrc-serA*(G336V) thể hiện sự tăng sản sinh OPS lên 57% so với chủng kiểu dại trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng và hoạt tính serA được tăng cường. Xác nhận rằng chủng CA07-0012/pCL-Ptrc-serA(Avn) bao gồm serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* thể

hiện sự tăng sản sinh OPS lên 107% so với chủng kiểu dại, và còn thể hiện tăng 32% so với chủng CA07-0012/pCL-Ptrc-serA*(G336V).

Ví dụ 4: Điều chế vectơ cho đồng biểu hiện quá mức của serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* và serC có nguồn gốc từ *E. Coli*

Để xác định xem các khả năng sản sinh serin và OPS có được cải thiện hơn nữa hay không bằng cách đưa serA(Avn) vào chủng, trong đó 3-phosphoserin aminotransferaza (serC) có nguồn gốc từ *E. Coli* được biểu hiện quá mức, điều chế vectơ dưới dạng pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC để biểu hiện serA(Avn) và serC như các operon.

Như đối chứng dương, vectơ pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC được sử dụng để điều chế vi sinh vật biểu hiện quá mức serA*(G336V) và serC có nguồn gốc từ *E. Coli*. Các trình tự của các vùng gen khởi động được sử dụng để điều chế các vectơ được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Gen	Trình tự (5'->3')	SEQ ID NO	Vectơ
Ptrc_serA (Avn)	CCTCACCACGTTGCGTCTC GAGTCAGAACAGAACCCG TGA	8	pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC
(RBS)serC	CTCGAGACGCAACGTGGT GA	9	pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC, pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC
	AGTGAATTCGAGCTCGGT ACCCTTAACCGTGACGGC GTTC	10	
Ptrc_serA* (G336V)	CTCACCACGTTGCGTCTCG AGTTAGTACAGCAGACGG GCG	11	pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC

Phương pháp PCR cho Ptrc_serA(Avn) được thực hiện bằng cách sử dụng pCL-Ptrc-serA(Avn) được điều chế trong ví dụ 1 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 8, và phương pháp PCR cho Ptrc_serA*(G336V) được thực hiện bằng cách sử dụng pCL-Ptrc-serA*(G336V) làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 11. (RBS)serC có nguồn gốc từ *E. Coli* được sử dụng trong cả hai vectơ thu được thông qua phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN W3110 làm

mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10.

Các đoạn Ptrc_serA(Avn) và (RBS)serC đã khuếch đại và các đoạn Ptrc_serA*(G336V) và (RBS)serC được nhân bản với vectơ pCL1920 được xử lý tương ứng với enzym giới hạn SmaI bằng phương pháp tách dòng Gibson (DG Gibson et al., NATURE METHODS, tập 6, số 5, 05/2009, NEBuilder HiFi ADN Assembly Master Mix), nhờ đó điều chế được pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC và pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC.

Ví dụ 5: Điều chế chủng trong đó hoạt tính serC được tăng cường và đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* và đánh giá khả năng sản sinh serin của chủng

Để đánh giá khả năng sản sinh serin khi serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* được đưa vào chủng trong đó serC được biểu hiện quá mức, hai loại plasmit được điều chế trong ví dụ 4 được đưa tương ứng vào W3110.

Từng chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong tủ ủ ở nhiệt độ 33°C. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường rắn LB được cấy chuyển vào môi trường độ chuẩn 25 mL như được thể hiện trong bảng 7 dưới đây, và được nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 34,5°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 40 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 7

Thành phần	Nồng độ (/L)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	4 g
$(NH4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10 mg
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Bảng 8

Chủng	OD562 nm	Tiêu thụ glucoza (g/L)	L-serin (g/L)
E.coli w3110	19,5	40,0	0,05

w3110/pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC	19,0	39,2	0,21
w3110/pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC	18,1	38,1	0,29

Như được thể hiện trong bảng 8 nêu trên, xác nhận rằng chủng w3110/pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC bao gồm serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* tăng sản sinh L-serin so với chủng w3110/pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC bao gồm serA*(G336V). Tức là, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-serin còn được tăng lên bằng cách chứa serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* trong chủng trong đó khả năng sản sinh L-serin đã được tăng lên.

Chủng w3110/pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC được gọi là CA07-4383 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng KCCM12381P vào ngày 09/11/2018.

Ví dụ 6: Điều chế chủng trong đó hoạt tính serB được làm suy yếu, hoạt tính serC được tăng cường, và serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* được đưa vào và đánh giá khả năng sản sinh OPS của chủng

Để đánh giá khả năng sản sinh serin trong trường hợp serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* được đưa vào chủng trong đó hoạt tính serB được làm suy yếu và serC được biểu hiện quá mức, hai loại plasmit được điều chế trong ví dụ 4 được đưa tương ứng vào CA07-0012 và đánh giá được khả năng sản sinh OPS của các chủng này.

Từng chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong tủ ủ ở nhiệt độ 33°C. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường rắn LB được cấy chuyển vào môi trường độ chuẩn 25 mL như được thể hiện trong bảng 9 dưới đây, và được nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 34,5°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 40 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 10 dưới đây.

Bảng 9

Thành phần	Nồng độ (/L)
Glucoza	40 g
KH_2PO_4	4 g
$(NH4)_2SO_4$	17 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10 mg
L-glyxin	2,5 g
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Bảng 10

Chủng	OD562 nm	Tiêu thụ glucoza (g/L)	O-phosphoserin (g/L)
CA07-0012	21,1	40,0	1,4
CA07-0012/pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC	20,5	38,3	2,5
CA07-0012/pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC	19,8	37,5	3,3

Như được thể hiện trong bảng 10 nêu trên, xác nhận rằng chủng CA07-0012/pCL-Ptrc-serA(Avn)-(RBS)serC bao gồm serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* sản sinh OPS nhiều hơn chủng CA07-0012/pCL-Ptrc-serA*(G336V)-(RBS)serC bao gồm serA*(G336V). Tức là, xác nhận rằng khả năng sản sinh OPS đã được tăng thêm bằng cách đưa vào serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* trong chủng trong đó khả năng sản sinh OPS được tăng lên.

Ví dụ 7: Điều chế chủng thuộc chi *Escherichia* được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* và đánh giá khả năng sản sinh tryptophan của chủng

Ví dụ 7-1: Điều chế vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* sản sinh L-tryptophan

Chủng sản sinh L-tryptophan thuộc chi *Escherichia* được phát triển từ *E. Coli* W3110 kiểu dại. Để xác định xem việc sản xuất L-tryptophan có tăng lên đáng kể hay không bằng sự biến đổi để biểu hiện protein có hoạt tính sản xuất L-tryptophan, chủng được điều chế để sản xuất L-tryptophan được sử dụng làm chủng bố mẹ. Cụ thể, sự biểu hiện của các gen sinh tổng hợp L-tryptophan (trpEDCBA) bị ức chế bởi TrpR có liên quan đến việc sản xuất L-tryptophan từ chorismat. Do đó, gen trpR mã hóa TrpR được loại bỏ. Ngoài ra, để giải phóng sự ức chế phản hồi của polypeptit TrpE theo sự sản xuất L-tryptophan được tăng lên, prolin là axit amin thứ 21 tính từ đầu N của TrpE được thay thế với serin (J. Biochem. Mol. Biol. 32, 20-24 (1999)).

Protein màng Mtr đóng vai trò trong vận chuyển L-tryptophan ngoại bào vào tế

bào, và protein TnaA đóng vai trò trong việc phân giải L-tryptophan nội bào và các phân tử nước thành indol, pyruvat, và amoniac (NH_3). Do đó, loại bỏ các gen mtr và tnaA mà ức chế sự sản xuất L-tryptophan và phân giải L-tryptophan.

Đối với việc loại bỏ các gen này, phương pháp tái tổ hợp λ-đỏ (bất hoạt một bước các gen nhiễm sắc thể trong *Escherichia coli* K-12 bằng cách sử dụng các sản phẩm PCR, Datsenko KA, Wanner BL., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jun 6;97(12):6640-5) được sử dụng. Để loại bỏ gen mtr, phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ pKD4 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO:13 để điều chế đoạn gen (1.580 bp) trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp bazơ tương đồng 50 bp bên cạnh gen mtr được gắn kết mà tại đó xảy ra tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Chỉ dấu kháng sinh kanamyxin của vectơ pKD4 được sử dụng để xác nhận việc loại bỏ gen đích và chèn gen kháng sinh, và vùng FRT đóng vai trò trong việc loại bỏ chỉ dấu kháng sinh sau khi loại bỏ gen đích. Polymeraza ADN Solg™TM Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 2 phút; 27 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 20 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 62°C trong 40 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Bảng 11

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
12	△mtr catxet - 1	TGCAATGCATAACAACGCAGTCGCACT ATTTTTCACTGGAGAGAAGCCCTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
13	△mtr catxet - 2	TGCAATGCATAACAACGCAGTCGCACT ATTTTTCACTGGAGAGAAGCCCTGTCC ATATGAATATCCTCCT

Chủng *E. Coli* W3110 đã được biến nạp với vectơ pKD46 mà biểu hiện sự tái tổ hợp λ-đỏ (gam, bet, và exo) bằng điện biến nạp và được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB chứa 50 mg/L kanamyxin. Trong chủng *E. Coli* W3110 mà đã được xác nhận để được biến nạp với vectơ pKD46, sự biểu hiện của enzym tái tổ hợp được tạo ra bằng cách thêm 10 mM L-arabinoza vào đó khi OD600 đạt khoảng 0,1 ở nhiệt độ 30°C. Khi OD600 đạt khoảng 0,6, chủng đã được điều chế như các tế bào khả biến và được biến nạp bằng điện biến nạp với đoạn gen tuyến tính thu được trong quá trình nêu trên, trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp bazơ tương đồng 50 bp bên cạnh

gen mtr được gắn kết. Đối với các khuẩn lạc sinh trưởng trong môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin, phương pháp PCR khuẩn lạc được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 và lựa chọn các khuẩn lạc tại đó có đoạn gen 782 bp đã được điều chế.

Bảng 12

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
14	Xác nhận_Catxet - 1	GGGCAGGATCTCCTGTCATC
15	Xác nhận_Δmtr - 2	AAATGTCGGATAAGGCACCG

Chủng được điều chế làm các tế bào khả biến trong đó gen mtr được loại bỏ bởi sự tái tổ hợp tương đồng để loại bỏ chỉ dấu kháng sinh kanamyxin và sau đó được biến nạp với vectơ pCP20 bằng điện biến nạp. Vectơ pCP20 để nhận biết các vị trí FRT bên cạnh chất kháng sinh kanamyxin và gắn vào đó trên nhiễm sắc thể bằng cách biểu hiện protein FLP, do đó loại bỏ chỉ dấu kháng sinh giữa các vị trí FRT. Chủng được biến nạp với vectơ pCP20 và sinh trưởng trong môi trường rắn LB chứa 100 mg/L ampixillin và 25 mg/L chloroamphenicol được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ, được nuôi cấy tiếp ở nhiệt độ 42°C trong 15 giờ, và được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB. Các khuẩn lạc sinh trưởng được nuôi cấy trong môi trường rắn LB chứa 100 mg/L ampixillin và 25 mg/L chloramphenicol, môi trường rắn LB chứa 12,5 mg/L kanamyxin, và môi trường rắn LB không chứa chất kháng sinh. Chỉ lựa chọn các khuẩn lạc sinh trưởng trong môi trường rắn LB không chứa chất kháng sinh. Việc loại bỏ gen mtr cuối cùng được xác nhận bằng giải trình tự hệ gen và chủng này được gọi là CA04-9300.

Thao tác kỹ thuật di truyền được thực hiện bằng phương pháp như được mô tả ở trên để loại bỏ gen tnaA. Phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ pKD4 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17 để điều chế đoạn gen (1.580 bp) trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp bazơ tương đồng 50 bp bên cạnh gen tnaA được gắn kết tại đó xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 2 phút; 27 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 20 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 62°C trong 40 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong

1 phút; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Bảng 13

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
16	ΔtnaA catxet – 1	TGTAATATTCACAGGGATCACTGTA ATTAAAATAAATGAAGGATTATGTA GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
17	ΔtnaA catxet – 2	TGTAGGGTAAGAGAGTGGCTAACA TCCTTATAGCCACTCTGTAGTATTA AGTCCATATGAATATCCTCCT
18	Xác nhận_ΔtnaA – 2	ACATCCTTATAGCCACTCTG

Sự biến nạp với vectơ pKD46 đã được xác nhận, và chủng CA04-9300 trong đó sự tái tổ hợp được thể hiện bằng cách thêm 10 mM L-arabinoza được biến nạp bằng điện biến nạp với đoạn gen tuyến tính trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp bazơ tương đồng 50 bp bên cạnh gen tnaA được gắn kết. Đối với các khuẩn lạc sinh trưởng trong môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin, PCR khuẩn lạc được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 18 và lựa chọn các khuẩn lạc trong đó có đoạn gen 787 bp được điều chế.

Chủng đã được điều chế như các tế bào khả biến trong đó gen tnaA được loại bỏ bằng sự tái tổ hợp tương đồng và được biến nạp với vectơ pCP20 để loại bỏ chỉ dấu kháng sinh kanamyxin, và chủng trong đó chỉ dấu kháng sinh kanamyxin đã loại bỏ được điều chế bằng sự biểu hiện của protein FLP. Việc loại bỏ gen tnaA cuối cùng được xác nhận bằng giải trình tự hệ gen và chủng này được gọi là CA04-9301.

Để loại bỏ gen trpR, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ pKD4 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20 để điều chế đoạn gen (1.580 bp) trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp tương đồng 50 bp bên cạnh gen trpR được gắn kết tại đó xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 2 phút; 27 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 20 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 62°C trong 40 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Bảng 14

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
19	△trpR catxet - 1	TACAACCGGGGGAGGCATTTTGCTT CCCCCGCTAACAATGGCGACATATT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
20	△trpR catxet - 2	GCATTCGGTGCACGATGCCTGATGC GCCACGTCTTATCAGGCCTACAAAA GTCCATATGAATATCCTCCT
21	Xác nhận_△trpR - 2	AGGACGGATAAGGCGTTCAC

Sự biến nạp với vectơ pKD46 đã được xác nhận, và chủng CA04-9301 thu được trong quá trình được mô tả ở trên trong đó sự tái tổ hợp được biểu hiện bằng cách thêm 10 mM L-arabinoza được biến nạp bằng điện biến nạp với đoạn gen tuyến tính, trong đó catxet FRT-kanamyxin-FRT và cặp bazơ tương đồng 50 bp bên cạnh gen trpR được gắn kết. Đối với các khuẩn lạc sinh trưởng trong môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin, PCR khuẩn lạc được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 21 và lựa chọn các khuẩn lạc tại đó có đoạn gen 838 bp được điều chế.

Chủng được điều chế như các tế bào khả biến trong đó gen trpR được loại bỏ bằng sự tái tổ hợp tương đồng và sau đó được biến nạp với vectơ pCP20 để loại bỏ chỉ dấu kháng sinh kanamyxin, và chủng trong đó chỉ dấu kháng sinh kanamyxin đã loại bỏ được điều chế bằng sự biểu hiện của protein FLP. Sự loại bỏ gen trpR cuối cùng được xác nhận bằng giải trình tự hệ gen và chủng này được gọi là CA04-9307.

Để tạo ra chủng CA04-9307 với đặc điểm trpE kháng phản hồi, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng gADN của *E. Coli* W3110 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 chứa vị trí enzym giới hạn *Eco*RI, nhờ đó thu được đoạn gen trpE chứa trình tự *Eco*RI (1.575 bp). Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 2 phút; 27 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 20 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 62°C trong 1 phút, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Bảng 15

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
22	trpE - 1	GAATTCATGCAAACACAAAAACCGAC
23	trpE - 2	GAATTCTCAGAAAGTCTCCTGTGCA

Gen trpE thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên và plasmit pSG76-C (JOUARNL OF BACTERIOLOGY, 07/1997, trang 4426–4428) được xử lý với enzym giới hạn *Eco*RI và được nhân bản. *E. Coli* DH5α được biến nạp với plasmit đã được nhân bản bằng điện biến nạp, và *E. Coli* DH5α được biến nạp được chọn từ đĩa cấy LB chứa 25 μg/mL chlororamphenocol để thu được plasmit pSG76-C-trpE.

Sự đột biến hướng vào vị trí (Site-directed mutagenesis) (Stratagene, USA) được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pSG76-C-trpE thu được và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25 để điều chế pSG76-C-trpE(P21S).

Bảng 16

SEQ ID NO	Tên	Đoạn mồi (5'->3')
24	trpE(P21S) - 1	CGCTTATCGCGACAATTCCACCGCGCTTTTT CACCAG
25	trpE(P21S) - 2	CTGGTGAAAAAGCGCGGTGGAATTGTCGCG ATAAGCG

Chủng CA04-9307 được biến nạp với plasmit pSG76-C-trpE(P21S) và được nuôi cấy trong môi trường LB-Cm (10 g/L dịch chiết nấm men, 5 g/L NaCl, 10 g/L trypton, và 25 μg/L chloramphenicol), và các khuẩn lạc kháng chloramphenicol được chọn. Các tế bào biến nạp được chọn là các chủng trong đó plasmit pSG76-C-trpE(P21S) được kết hợp vào vùng trpE của bộ gen bằng cách chèn lần thứ nhất. Chủng được chèn với gen trpE(P21S) thu được được biến nạp với plasmit pAScep (Journal of Bacteriology, 07/1997, trang 4426-4428), mà biểu hiện enzym giới hạn *I-SceI* cắt vùng I-SceI có trong plasmit pSG76-C, và lựa chọn chủng sinh trưởng trong môi trường LB-Ap (10 g/L dịch chiết nấm men, 5 g/L NaCl, 10 g/L trypton, và 100 μg/L ampixillin). Gen trpE được khuếch đại trong chủng đã được chọn bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, và sự thay thế với gen trpE(P21S) đã được xác nhận bằng cách giải trình tự. Chủng được điều chế được gọi là CA04-4303.

Ví dụ 7-2: Điều chế vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* trong đó serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* được đưa vào và đánh giá khả năng sản sinh tryptophan của vi sinh vật

Vectơ pCL-Ptrc-serA(Avn) được điều chế trong ví dụ 1 và vectơ pCL1920 làm đối chứng được đưa tương ứng vào CA04-4303 đã được điều chế trong ví dụ 1, để điều

chế các chủng CA04-4303/pCL1920 và CA04-4303/pCL-Ptrc-serA(Avn). Để kiểm tra sự sản sinh L-tryptophan của các chủng CA04-4303/pCL1920 và CA04-4303/pCL-Ptrc-serA(Avn), hai chủng đã được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB chứa 50 mg/L spectinomyxin trong 12 giờ. Tiếp theo, từng chủng được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất sao cho giá trị OD600 ban đầu đạt 0,01 và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 37°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Sau khi nuôi cấy được kết thúc, lượng sản sinh L-tryptophan được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

Các kết quả của sự sản sinh L-tryptophan bởi các chủng CA04-4303/pCL1920 và CA04-4303/pCL-Ptrc-serA(Avn) trong môi trường nuôi cấy được thể hiện trong bảng 17 dưới đây. Chủng CA04-4303/pCL1920 đã cho thấy sự sản sinh L-tryptophan 1,2 g/L và tích tụ inđol, là sản phẩm trung gian với lượng 37 mg/L. Tuy nhiên, chủng được đưa vào với serA(Avn) đã cho thấy sự sản sinh L-tryptophan 1,7 g/L mà không tích tụ inđol.

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

70 g glucoza, 20 g $(NH4)_2SO_4$, 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g KH_2PO_4, 2,5 g dịch chiết nấm men, 5 g Na-xitrat, 1 g NaCl, và 40 g $CaCO_3$ (trong 1 L nước cất).

Bảng 17

Xác nhận sản sinh L-tryptophan chứa serA(Avn)

Chủng	OD	L-tryptophan (g/L)	Inđol (mg/L)
CA04-4303/pCL1920	37,9	1,2	37
CA04-4303/pCL-Ptrc-serA(Avn)	38,4	1,7	0

Như có thể thấy rằng từ các kết quả nêu trên, ước tính rằng có đủ sự cung cấp L-serin bằng cách đưa vào serA(Avn), và xác nhận rằng sản lượng của L-tryptophan tăng lên mà không có tích tụ inđol là sản phẩm trung gian trong bước cuối cùng của sự sinh tổng hợp L-tryptophan.

Ví dụ 7-3: Điều chế chủng *Corynebacterium Glutamicum* sản sinh Tryptophan trong đó serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* ngoại lai được đưa vào

Để xác định hiệu quả của gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* trên chủng

thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh tryptophan, KCCM12218P (công bố đơn patent Hàn Quốc số 2018-0089329) được sử dụng như chủng thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-tryptophan.

Chủng được điều chế bằng cách thay thế gen *Corynebacterium glutamicum* serA (được gọi là serA(Cgl) trong phần mô tả sau đây) bằng gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* để được biểu hiện bằng vùng gen khởi động gapA.

Đối với thao tác kỹ thuật di truyền này, trước tiên, thu được vùng phía trước của gen khởi động và vùng phía sau của OFR của gen serA (Cgl) tại đó xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Cụ thể, đoạn gen của vùng phía trước của vùng gen khởi động thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27 và đoạn gen của vùng phía sau thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29. Ngoài ra, vùng gen khởi động gapA thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31.

Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Vùng gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng vectơ pCL-Ptrc_-serA(Avn) được điều chế trong ví dụ 1 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33.

Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 58°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Plasmit tái tổ hợp thu được thông qua việc nhân bản bằng cách sử dụng các vùng phía trước và phía sau khuếch đại cho sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể, vùng

gen khởi động gapA, gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter*, và vectơ pDZ cho sự biến nạp nhiễm sắc thể được cắt bởi enzym giới hạn *Sma*I bằng phương pháp tách dòng Gibson và được gọi là pDZ-PgapA-serA(Avn). Việc nhân bản được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số lượng mol đã được tính, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM12218P sản sinh L-tryptophan được biến nạp với vectơ pDZ-PgapA-serA(Avn) được điều chế bằng điện biến nạp và trải qua quá trình trao đổi chéo thứ hai để thu được chủng trong đó gen serA(cgl) được thay thế bằng gen serA *Azotobacter* được biểu hiện bởi vùng gen khởi động gapA. Thao tác kỹ thuật gen này đã được xác nhận bằng cách thực hiện PCR và giải trình tự hệ gen bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35 tương ứng khuếch đại các vùng bên ngoài của phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng trong đó gen được chèn, và chủng thu được được gọi là KCCM12218P-PgapA-serA(Avn).

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 18 dưới đây.

Bảng 18

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
26	SerA(Cgl)-up-F	TCGAGCTCGGTACCCGGAAGATCTAGTCG GATACG
27	SerA(Cgl)-up-R	TCGTTTTTAGGCCTCCGACTACTTTGGGCA ATCCT
28	SerA(Cgl)-down-F	TCTGTTCTGATTAGAGATCCATTTGCTTGA AC
29	SerA(Cgl)-down-R	CTCTAGAGGATCCCCTCACCCAGCTCAAA GCTGAT
30	PgapA-F	TGCCCAAAGTAGTCGGAGGCCTAAAAAC GACCGAG
31	PgapA-R	TCTTACTCATGTTGTGTCTCCTCTAAAG
32	serA(Avn)-F	GAGACACAACATGAGTAAGACCTCCCTG
33	serA(Avn)-R	GGATCTCTAATCAGAACAGAACCCGTGAG
34	Xác nhân-serA-F	ACCAAGAGTTCGAAGACCAG
35	Xác nhận-serA-R	TTCAGTGGCTTCCACATCGC

Ví dụ 7-4: Đánh giá khả năng sản sinh Tryptophan của chủng *Corynebacterium*

glutamicum trong đó serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* được đưa vào

Chủng KCCM12218P-PgapA-serA(Avn) được điều chế trong ví dụ 7-3 và chủng bố mẹ KCCM12218P được nuôi cấy theo phương pháp sau đây để xác định sự sản sinh tryptophan. Từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường nuôi cấy giống và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, sự sản sinh L-tryptophan bởi từng chủng được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4, 8 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, và 2.000 µg nicotinamit (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

30 g glucoza, 15 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 5 g dịch chiết nấm men, 900 µg biotin, 4.500 µg thiamin HCl, 4.500 µg canxi pantothenat, và 30 g $CaCO_3$ (trong 1 L nước cất)

Bảng 19

Sự xác nhận sự sản sinh tryptophan của chủng *Corynebacterium Glutamicum* được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* ngoại lai

	OD	Tiêu thụ glucoza (g/L)	Sự sản sinh tryptophan (g/L)	Inđol (mg/L)
KCCM12218P	43,6	30	2,5	59
KCCM12218P-PgapA-serA(Avn)	42,3	30	3,1	0

Các kết quả đánh giá sự sản sinh L-tryptophan của các chủng KCCM12218P và KCCM12218P-PgapA-serA(Avn) được thể hiện trong bảng 19 nêu trên.

Trong khi chủng bố mẹ KCCM12218P thể hiện sản sinh L-tryptophan là 2,5 g/L và sản phẩm trung gian của inđol được tích tụ với lượng 59 mg/L, chủng được đưa vào

với serA(Avn) thể hiện sản sinh L-tryptophan là 3,1 g/L mà không tích tụ inđol.

Dựa trên các kết quả, ước tính rằng còn có đủ sự cung cấp L-serin bằng cách đưa serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* vào *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-tryptophan, và xác nhận rằng sản lượng L-tryptophan cũng tăng lên mà không có sự tích tụ inđol là sản phẩm trung gian trong bước cuối cùng của sinh tổng hợp L-tryptophan. Do đó, có thể thấy rằng các hiệu quả hiệp đồng đối với sự sản sinh tryptophan được cải thiện đồng thời với việc sản xuất tiền chất được cải thiện.

Chủng KCCM12218P-PgapA-serA(Avn) được gọi là CM05-8935 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng số KCCM12414P vào ngày 27/11/2018.

Ví dụ 8: Điều chế chủng *Corynebacterium Glutamicum* được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* và đánh giá khả năng sản sinh Histiđin của chủng

Ví dụ 8-1: Điều chế chủng *Corynebacterium Glutamicum* sản sinh Histiđin

Chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-histiđin được phát triển từ chủng ATCC13032 kiểu dại. Để giải phóng sự ức chế phản hồi của HisG polypeptit, là enzym thứ nhất của con đường sinh tổng hợp L-histiđin, glyxin ở vị trí thứ 233 tính từ đầu N của HisG được thay thế với histiđin và đồng thời threonin ở vị trí thứ 235 tính từ đầu N được thay thế với glutamin (có mã nhận biết SEQ ID NO: 88) (ACS Synth. Biol., 2014, 3 (1), trang 21-29). Ngoài ra, để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-histiđin, các gen sinh tổng hợp (hisD-hisC-hisB-hisN) chia tổng cộng thành 4 operon được điều chế ở dạng cụm tại đó có vùng gen khởi động được thay thế và đưa vào chủng (có mã nhận biết SEQ ID NO: 89).

Đối với thao tác kỹ thuật gen, trước tiên, thu được các vùng phía trước và phía sau của các axit amin ở các vị trí thứ 233 và 235 của hisG tại đó xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Cụ thể, đoạn gen của các vùng phía trước và phía sau của các biến thể của các axit amin ở các vị trí thứ 233 và 235 của hisG thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 37, và đoạn gen của các vùng phía trước và phía sau của các biến thể của các axit amin ở các vị trí thứ 233 và 235 của hisG thu được bằng cách

thực hiện phương pháp PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39.

Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 60°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Plasmit tái tổ hợp thu được thông qua việc nhân bản sử dụng các vùng phía trước và phía sau đã khuếch đại của các biến thể của các axit amin ở các vị trí thứ 233 và 235 của hisG và vectơ pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) cho sự biến nạp nhiễm sắc thể được cắt bởi enzym giới hạn *Sma*I bằng phương pháp tách dòng Gibson (DG Gibson et al., NATURE METHODS, tập 6, số 5, 05/2009, NEBuilder HiFi ADN Assembly Master Mix) và được gọi là pDZ-hisG(G233H, T235Q). Việc nhân bản được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số lượng mol đã được tính, sau đó được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại được biến nạp với vectơ pDZ-hisG(G233H, T235Q) được điều chế bằng điện biến nạp và trải qua quá trình trao đổi chéo thứ hai để thu được chủng có các axit amin thay thế của HisG từ glyxin bằng histiđin ở vị trí thứ 233 và từ threonin bằng glutamin ở vị trí thứ 235 trên nhiễm sắc thể (có mã nhận biết SEQ ID NO: 88). Thao tác kỹ thuật gen này đã được xác nhận bằng cách thực hiện phương pháp PCR và giải trình tự hệ gen bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 40 và SEQ ID NO: 41 khuếch đại tương ứng các vùng ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng trong đó gen được chèn và chủng thu được được gọi là CA14-0011.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 20 dưới đây.

Bảng 20

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
36	(hisG(G233H, T235Q) F-1)	TCGAGCTCGGTACCCATCGCCATCTACGTT GCTGG
37	(hisG(G233H,	GTGCCAGTGGGGATACCtgTGGGtgGGATAA

	T235Q) R-1)	GCCTGGGGTTACTG
38	(hisG(G233H, T235Q) F-2)	AACCCCAGGCTTATCCcaCCCAcaGGTATCC CCACTGGCACGCGA
39	(hisG(G233H, T235Q) R-2)	CTCTAGAGGATCCCCGGGACGTGGTTGAT GGTGGT
40	(hisG CF)	ATGGAAATCCTCGCCGAAGC
41	(hisG CR)	ATCGATGGGGAACTGATCCA

Ngoài ra, để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-histiđin, các gen sinh tổng hợp chia tổng cộng thành 4 operon được đưa vào ở dạng cụm tại đó có vùng gen khởi động được thay thế. Cụ thể, cụm sinh tổng hợp L-histiđin được chia tổng cộng thành 4 operon (hisE-hisG, hisA-impA-hisF-hisI, hisD-hisC-hisB, và cg0911-hisN), và vectơ đồng thời đưa các gen sinh tổng hợp vào vi sinh vật đã được điều chế.

Ngoài ra, genNcgl1108 mã hóa permeaza gamma-aminobutyrat (Microb Biotechnol. 2014 Jan; 7 (1): 5-25)) được sử dụng như vị trí chèn của cụm sinh tổng hợp.

Đối với thao tác kỹ thuật gen này, trước tiên, thu được các vùng phía trước và phía sau của gen Ncgl1108 tại đó xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể. Cụ thể, đoạn gen của vùng phía trước của gen Ncgl1108 thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của Corynebacterium glutamicum ATCC13032 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 42 và SEQ ID NO: 43, và đoạn gen của vùng phía sau của gen Ncgl1108 thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 44 và SEQ ID NO: 44 45.

Polymeraza ADN Solg™ Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 60°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Plasmit tái tổ hợp thu được thông qua sự nhân bản bằng cách sử dụng các vùng phía trước và phía sau đã khuếch đại của gen NCgl1108 gen và vectơ pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) cho sự biến nạp nhiễm sắc thể được cắt bởi enzym giới hạn SmaI bằng phương pháp tách dòng Gibson (DG Gibson et al., NATURE METHODS, tập 6,

số 5, 05/2009, NEBuilder HiFi ADN Assembly Master Mix) và được gọi là pDZ-ΔNcgl1108. Việc nhân bản được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và các đoạn gen theo số lượng mol đã được tính, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ.

Chủng CA14-0011 được biến nạp với vectơ pDZ-ΔNcgl1108 được điều chế điện biến nạp và trải qua quá trình trao đổi chéo thứ hai để thu được chủng trong đó gen Ncgl1108 được phá vỡ. Thao tác kỹ thuật gen này đã được xác nhận bằng cách thực hiện phương pháp PCR và giải trình tự hệ gen bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 47 khuếch đại tương ứng các vùng ngoài của phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó có gen được phá vỡ và chủng thu được được gọi là CA14-0736.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 21 dưới đây.

Bảng 21

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
42	(KO Ncgl1108 F-1)	TCGAGCTCGGTACCCATCGCCATCTACGTTGCTGG
43	(KO Ncgl1108 R-1)	GAGTCTAGAAGTACTCGAGATGCTGACCTCGTTTC
44	(KO Ncgl1108 F-2)	AGCATCTCGAGTACTTCTAGACTCGCACGAAAAAG
45	(KO Ncgl1108 R-2)	CTCTAGAGGATCCCCTTTGGGCAGAGCTCAAATTC
46	(KO hisG CF)	AGTTTCGTAACCCACCTTGC
47	(KO hisG CR)	CGCTTCTCAATCTGATGAGA

Ngoài ra, để tăng cường cụm sinh tổng hợp, thu được vùng của vùng gen khởi động cần thay thế với nhóm 4 gen operon. Thu được vùng của vùng gen khởi động lysC tăng cường (được gọi là lysCP1 trong phần mô tả sau đây, patent Hàn Quốc số 10-0930203) và vùng hisE-hisG, vùng của vùng gen khởi động gapA và vùng hisA-impA-hisF-hisI, vùng gen khởi động tổng hợp SPL13 (patent Hàn Quốc số 10-1783170) và vùng hisD-hisC-hisB, và vùng của vùng gen khởi động tổng hợp CJ7 (patent Hàn Quốc số 10-0620092 và công bố đơn quốc tế số WO 2006/065095) và vùng cg0911-hisN. Cụ thể, phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng KCCM10919P (patent Hàn Quốc số 10-0930203) làm mạch khuôn,

và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 48 và SEQ ID NO: 49. Polymeraza ADN có độ chính xác cao PfuUltraTM (Stratagene) được sử dụng như polymeraza cho phương pháp PCR, và nhờ đó các sản phẩm PCR đã khuếch đại được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR được sản xuất bởi QIAGEN để thu được vùng của vùng gen khởi động. Đoạn gen của vùng hisE-hisG thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* CA14-0011 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 50 và SEQ ID NO: 51. Đoạn gen của vùng của vùng gen khởi động gapA thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 53 và đoạn gen của vùng hisA-impA-hisF-hisI thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 55. Ngoài ra, phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vùng gen khởi động tổng hợp SPL13 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57, và đoạn gen của vùng hisD-hisC-hisB thu được bằng cách thực hiện phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* CA14-0011 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 58 và SEQ ID NO: 59. Sau đó, phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vùng gen khởi động tổng hợp CJ7 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60 và SEQ ID NO: 61, và đoạn gen của vùng cg0911-hisN thu được bằng cách thực hiện việc sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* CA14-0011 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 62 và SEQ ID NO: 63.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 22 dưới đây.

Bảng 22

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
48	(his cụm F-1)	GTCAGCATCTCGAGTGCTCCTTAGGGAGCCA TCTT
49	(his cụm R-1)	GTCAAATGTCTTCACATGTGTGCACCTTTCGA TCT
50	(his cụm F-2)	GAAAGGTGCACACATGTGAAGACATTTGACT CGCT

51	(his cụm R-2)	TCGTTTTTAGGCCTCCTAGATGCGGGCGATG CGGA
52	(his cụm F-3)	ATCGCCCGCATCTAGGAGGCCTAAAAACGAC CGAG
53	(his cụm R-3)	GACAGTTTTGGTCATGTTGTGTCTCCTCTAAA GAT
54	(his cụm F-4)	TAGAGGAGACACAACATGACCAAAACTGTC GCCCT
55	(his cụm R-4)	TGAAGCGCCGGTACCGCTTACAGCAAAACGT CATT
56	(his cụm F-5)	CGTTTTGCTGTAAGCGGTACCGGCGCTTCAT GTCA
57	(his cụm R-5)	AGTGACATTCAACATTGTTTTGATCTCCTCCA ATA
58	(his cụm F-6)	GAGGAGATCAAAACAATGTTGAATGTCACTG ACCT
59	(his cụm R-6)	CGCTGGGATGTTTCTCTAGAGCGCTCCCTTAG TGG
60	(his cụm F-7)	AAGGGAGCGCTCTAGAGAAACATCCCAGCG CTACT
61	(his cụm R-7)	AGTCATGCCTTCCATGAGTGTTTCCTTTCGTT GGG
62	(his cụm F-8)	CGAAAGGAAACACTCATGGAAGGCATGACT AATCC
63	(his cụm R-8)	CGAGTCTAGAAGTGCCTATTTTAAACGATCC AGCG

Polymeraza ADN Solg™TM Pfu-X được sử dụng như polymeraza, và phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 60°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 180 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút.

Plasmit tái tổ hợp thu được thông qua việc nhân bản bằng cách sử dụng vùng lysCP1 và vùng hisE-hisG được khuếch đại, vùng của vùng gen khởi động gapA và vùng hisA-impA-hisF-hisI, vùng của vùng gen khởi động tổng hợp SPL13 và vùng hisD-hisC-hisB, vùng của vùng gen khởi động tổng hợp CJ7 và vùng cg0911-hisN, và vectơ pDZ vectơ-△NCgl1108 cho sự biến nạp nhiễm sắc thể được cắt bởi enzym giới hạn *Sca*I bằng phương pháp tách dòng Gibson (DG Gibson et al., NATURE METHODS, tập 6, số 5, 05/2009, NEBuilder HiFi ADN Assembly Master Mix) và

được gọi là pDZ-ΔNCgl1108::lysCP1_hisEG-PgapA_hisA-impA-hisFI-SPL13_HisDCB-CJ7_cg0911-hisN. Việc nhân bản được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số lượng mol đã được tính, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ.

Chủng CA14-0011 được biến nạp với vectơ pDZ-ΔNcgl1108::PlysCm1_hisEG-PgapA_hisA-impA-hisFI-SPL13_HisDCB-CJ7_cg0911-hisN được điều chế bằng điện biến nạp và trải qua quá trình trao đổi chéo thứ hai để thu được chủng vào các gen sinh tổng hợp đã được chèn. Thao tác kỹ thuật gen này được xác nhận bằng cách thực hiện phương pháp PCR và giải trình tự hệ gen bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 47 khuếch đại tương ứng các vùng ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó có gen đã được chèn vào và chủng được biến nạp được gọi là CA14-0737.

Chủng CA14-0737 được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng số KCCM 12411P vào ngày 27/11/2018.

Ví dụ 8-2: Điều chế của chủng *Corynebacterium Glutamicum* sản sinh His được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* ngoại lai

Để xác định hiệu quả của gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* đối với sự tăng sản sinh L-histiđin, chủng CA14-0737 được sử dụng.

Chủng được điều chế bằng cách thay thế gen serA(Cgl) với gen serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* để được biểu hiện bằng vùng gen khởi động gapA sử dụng pDZ-PgapA-serA(Avn) được điều chế trong ví dụ 7-3.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* CA14-0737 sản sinh L-histiđin được biến nạp với vectơ pDZ-PgapA-serA(Avn) bằng điện biến nạp và trải qua quá trình trao đổi chéo thứ hai để thu được chủng trong đó gen serA(Cgl) được thay thế với gen serA *Azotobacter* được biểu hiện bởi vùng gen khởi động mạnh của vùng gen khởi động gapA. Thao tác kỹ thuật gen đã được xác nhận bằng cách thực hiện phương pháp PCR và giải trình tự hệ gen bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35 khuếch đại tương ứng các vùng ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó có gen đã được chèn vào và chủng thu được được gọi là CA14-0738.

Ví dụ 8-3: Đánh giá chủng *Corynebacterium Glutamicum* sản sinh L-histiđin được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter*

Các chủng CA14-0011, CA14-0736, CA14-0737, và CA14-0738 được điều chế trong các ví dụ 8-1 và 8-2 nêu trên được nuôi cấy theo phương pháp sau đây để xác định khả năng sản sinh L-histiđin. Từng chủng được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 ml môi trường nuôi cấy giống và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy được kết thúc, sự sản sinh L-histiđin được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4, 8 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, và 2.000 µg nicotinamit (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

100 g glucoza, 40 g $(NH_4)_2SO_4$, 3 g dịch chiết nấm men, 1 g KH_2PO_4, 0,4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 µg biotin, 100 µg thiamin, và 30 g $CaCO_3$ (trong 1 L nước cất)

Bảng 23

Xác nhận sản sinh L-histiđin của chủng *Corynebacterium Glutamicum* được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc *Azotobacter* ngoại lai

	OD	Tiêu thụ glucoza (g/L)	Sản sinh histiđin (g/L)
CA14-0011	113,6	100	0,51
CA14-0736	115,1	100	0,50
CA14-0737	88,9	100	4,09
CA14-0738	84,7	100	5,07

Các kết quả đánh giá sự sản sinh L-histiđin của các chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-histiđin được thể hiện trong bảng 24 bên trên.

Trong khi chủng bố mẹ CA14-0737 có khả năng sản sinh histiđin được tăng

cường thể hiện sản sinh L-histiđin là 4,09 g/L, chủng CA14-0738 được đưa vào với serA(Avn) thể hiện sản sinh L-histiđin là 5,07 g/L, thể hiện sự tăng sản sinh L-histiđin lên 20% so với chủng bố mẹ CA14-0737.

Dựa trên các kết quả, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-histiđin được tăng cường bằng cách đưa vào serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter*. Chủng CA14-0738 được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng số KCCM 12412P vào ngày 27/11/ 2018.

Ví dụ 9: Điều chế và đánh giá chủng sản sinh Metionin (Met) được đưa vào với *Azotobacter* serA

Ví dụ 9-1: Điều chế vectơ tái tổ hợp để xóa gen mcbR

Để điều chế chủng sản sinh metionin, chủng ATCC13032 được sử dụng để điều chế vectơ để bất hoạt gen mcbR mã hóa chất điều hòa phiên mã metionin/xystein (J. Biotechnol. 103:51–65, 2003).

Cụ thể, để xóa gen mcbR từ nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, vectơ plasmit tái tổ hợp được điều chế theo phương pháp sau đây. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (U.S. National Institutes of Health GenBank: NIH), thu được gen mcbR và các trình tự bên cạnh của *Corynebacterium glutamicum* (có mã nhận biết SEQ ID NO: 91).

Để thu được gen mcbR đã được xóa, phương pháp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, và các đoạn mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 và SEQ ID NO: 67. Phương pháp PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Do đó, thu được các đoạn ADN 700 bp, tương ứng.

Vectơ pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) không thể tái tạo trong *Corynebacterium glutamicum* và các đoạn gen mcbR đã khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn *Sma*I để đưa vào nhiễm sắc thể và liên kết bằng cách sử dụng ligaza

ADN. *E. Coli* DH5α được biến nạp với vectơ và được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin. Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vectơ trong đó đoạn có việc xóa gen đích đã được chèn vào. Sau đó, plasmit thu được bằng phương pháp tách chiết plasmit và được gọi là pDZ-ΔmcbR.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 24 dưới đây.

Bảng 24

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
64		TCGAGCTCGGTACCCCTGCCTGGTTTGTCTTGTA
65		CGGAAAATGAAGAAAGTTCGGCCACGTCCTTTCGG
66		AGGACGTGGCCGAACTTTCTTCATTTTCCGAAGGG
67		CTCTAGAGGATCCCCGTTTCGATGCCCACTGAGCA

Ví dụ 9-2: Điều chế vectơ tái tổ hợp trong đó metH và cysI được tăng cường đồng thời

Để điều chế chủng sản sinh metionin, chủng ATCC13032 được sử dụng để điều chế vectơ trong đó cả gen metH (Ncgl1450) mã hóa metionin synthaza và gen cysI (Ncgl2718) mã hóa sulfit reductaza đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật đã được tăng cường.

Cụ thể, để chèn thêm các gen metH và cysI vào nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, vectơ plasmit tái tổ hợp được điều chế theo phương pháp sau đây. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng Gen của Viện sức khỏe Hoa kỳ (NIH GenBank), thu được gen metH và các trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 92) và gen cysI và các trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 93) của *Corynebacterium glutamicum*.

Trước tiên, vectơ để loại bỏ Ncgl1021 (transposaza) được điều chế để chèn các gen này. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng Gen của Viện sức khỏe Hoa kỳ (NIH GenBank), thu được Ncgl1021 và các trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 94) của *Corynebacterium glutamicum*. Để thu được gen Ncgl1021 đã được xóa, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể ADN của *Corynebacterium glutamicum ATCC13032* làm mạch khuôn, và các đoạn mồi có

các mã nhận biết SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, và SEQ ID NO: 71. PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Do đó, thu được các đoạn ADN. Vectơ pDZ không thể tái tạo trong *Corynebacterium glutamicum* (patent Hàn Quốc số 10-0924065) và các đoạn gen Ncgl1021 đã khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn xbaI để đưa vào nhiễm sắc thể và được nhân bản bằng phương pháp tách dòng Gibson. E. Coli DH5α được biến nạp với vectơ này và được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin. Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vectơ trong đó chèn đoạn có việc xóa gen đích. Sau đó, thu được plasmit bằng phương pháp tách chiết plasmit và được gọi là pDZ-ΔNcgl1021.

Tiếp theo, để thu được các gen metH và cysI, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, và các đoạn mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, và SEQ ID NO: 75. Ngoài ra, vùng gen khởi động Pcj7 được sử dụng để tăng cường biểu hiện của gen metH và vùng gen khởi động Pspl1 được sử dụng để tăng cường biểu hiện của gen cysI. Nhằm mục đích thu được các gen này, trước tiên, vùng gen khởi động Pcj7 thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng nhiễm sắc thể ADN của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 76 và SEQ ID NO: 77, và vùng gen khởi động Pspl1 thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN của vectơ spl1-GFP đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (patent Hàn Quốc số 10-1783170) làm mạch khuôn, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 78 và SEQ ID NO: 79. PCR được thực hiện trong các điều kiện khuếch đại sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Do đó, thu được các đoạn ADN của gen metH, gen cysI, vùng gen khởi động Pcj7, và vùng gen khởi động Pspl1.

Sau khi vectơ pDZ-ΔNcgl1021 không thể thay thế trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzym giới hạn ScaI và 4 đoạn ADN được xử lý với enzym giới hạn ScaI và được nhân bản bằng phương pháp tách dòng Gibson. *E. Coli* DH5α

được biến nạp với vectơ này và được cấy chuyển trên đĩa môi trường rắn LB chứa 25 mg/L kanamyxin. Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vectơ trong đó chèn đoạn có sự xóa gen đích. Sau đó, thu được plasmit bằng phương pháp tách chiết plasmit và được gọi là pDZ-ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 25 dưới đây.

Bảng 25

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
68		ACCCGGGGATCCTCTAGAATGTTTGTGATGCGCAG
69		GTCAGAGAGTACTTACGCTGATCGGGAGGGAAAGC
70		ATCAGCGTAAGTACTCTCTGACTAGCGTCACCCTC
71		CTGCAGGTCGACTCTAGAAAAGGGATTGGAGTGTT
72		CAACGAAAGGAAACAATGTCTACTTCAGTTACTTC
73		TCGAGCTCGGTACCCCTGCGACAGCATGGAACTC
74		ATCAAAACAGATATCATGACAACAACCACCGGAAG
75		CGCTAGTCAGAGAGTTCACACCAAATCTTCCTCAG
76		CCGATCAGCGTAAGTAGAAACATCCCAGCGCTACT
77		AACTGAAGTAGACATTGTTTCCTTTCGTTGGGTAC
78		TACTTTAACGTCTAAGGTACCGGCGCTTCATGTCA
79		GGTGGTTGTTGTCATGATATCTGTTTTGATCTCCT

Ví dụ 9-3: Sự phát triển của chủng sản sinh L-metionin và sự sản sinh L-metionin bằng cách sử dụng chủng

Chủng ATCC13032 được biến nạp với từng vectơ pDC-ΔmcBR, pDZ-ΔNcgl1021, và pDZ-ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI đã được điều chế như được mô tả ở trên bằng điện biến nạp thông qua sự tái tổ hợp tương đồng nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Sau đó, sự tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Sau khi sự tái tổ hợp lần thứ hai kết thúc, xác định được chủng *Corynebacterium glutamicum* được biến nạp có sự xóa gen mcBR bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 81, và chủng được biến nạp có sự xóa gen Ncgl1021 và xác định được có sự chèn gen Pcj7-metH-Pspl1cysI vào vị trí Ncgl1021 bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 82 và SEQ ID NO: 83.

Từng chủng tái tổ hợp được gọi là *Corynebacterium glutamicum* 13032/ΔmcbR, 13032/ΔNcgl1021, và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI.

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 26 dưới đây.

Bảng 26

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
80		AATCTGGATTTCCGCCAGGT
81		CTTCCTAACTCCTGAGGAAG
82		ATCCCCATCGGCATCTTTAT
83		CGATCACACTGGGCTGATCT

Để đánh giá khả năng sản sinh L-metionin của các chủng 13032/ΔmcbR, 13032/ΔNcgl1021, và CJP13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI đã được điều chế, các chủng này và chủng bố mẹ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 được nuôi cấy theo phương pháp sau đây.

Từng chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và các chủng *Corynebacterium glutamicum 13032/ΔmcbR*, 13032/ΔNcgl1021, và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI theo sáng chế được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 ml môi trường nuôi cấy giống dưới đây và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 24 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các thành phần của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4, 8 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, và 2.000 µg nicotinamit (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

50 g glucoza, 12 g $(NH_4)_2S_2O_3$, 5 g dịch chiết nấm men, 1 g KH_2PO_4, 1,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, 3.000 µg nicotinamit, và 30 g $CaCO_3$ (trong 1 L nước cất).

Thu được các nồng độ của L-metionin có trong môi trường nuôi cấy bằng cách nuôi cấy các chủng theo phương pháp được mô tả ở trên được phân tích và thể hiện ở bảng 27 dưới đây.

Bảng 27

Đánh giá các chủng được điều chế

Chủng	L-metionin (g/L)
Corynebacterium glutamicum ATCC13032 (kiểu dại)	0,00
13032/ΔmcbR	0,12
13032/ΔNcgl1021	0,00
13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI	0,18

Do đó, xác nhận rằng chủng trong đó chỉ có gen mcbR đã được xóa thể hiện tăng sản sinh L-metionin là 0,12 g/L so với chủng đối chứng. Ngoài ra, chủng trong đó các gen metH và cysI được biểu hiện quá mức mà không có sự xóa mcBR thể hiện tăng sản sinh L-metionin là 0,18 g/L so với chủng đối chứng.

Ví dụ 9-4: Điều chế vectơ biểu hiện quá mức D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza (serA(Avn)) có nguồn gốc từ *Azotobacter*

Vectơ biểu hiện được điều chế để xem khả năng sản sinh metionin có được cải thiện hay không bằng cách tăng cường D-3-phosphoglyxerat đehyđrogenaza có nguồn gốc từ *Azotobacter* (được gọi là serA(Avn)trong phần mô tả sau đây).

Để biểu hiện gen serA(Avn) (có mã nhận biết SEQ ID NO: 1) mã hóa SerA(Avn), sử dụng vectơ con thoi pECCG117 (Biotechnology letters vol 13, No.10, trang 721-726 1991 hoặc công bố patent Hàn Quốc số 92-7401) có sẵn trong sự biến nạp của *Corynebacterium glutamicum*. Như vùng gen khởi động biểu hiện, vùng gen khởi động spl1 (được gọi là Pspl1trong phần mô tả sau đây) được sử dụng để điều chế vectơ pECCG117-Pspl1-serA(Avn). Phương pháp PCR đối với Pspl1 được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 84 và SEQ ID NO: 85 và PCR đối với serA(Avn) ngoại lai được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 86 và SEQ ID NO: 87. Các đoạn gen Pspl1 và serA(Avn) đã khuếch đại được nhân bản bằng phương pháp tách dòng Gibson sử dụng vectơ pECCG117 được xử lý với enzym giới hạn EcoRV, nhờ đó điều chế pECCG117-Pspl1-serA(Avn).

Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 28 dưới đây.

Bảng 28

SEQ ID NO	Đoạn mồi	Trình tự (5'->3')
84		ATCGATAAGCTTGATGGTACCGGCGCTTCATGTCA
85		GGAGGTCTTACTCATGATATCTGTTTTGATCTCCT
86		ATCAAAACAGATATCATGAGTAAGACCTCCCTGGA
87		CTGCAGGAATTCGATTCAGAACAGAACCCGTGAGC

Ví dụ 9-5: Điều chế chủng sản sinh L-metionin được đưa vào với serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter* bằng cách sử dụng chủng *E. Coli* kiểu dại và đánh giá khả năng sản sinh L-metionin

Các chủng 13032/ΔmcbR và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI được biến nạp tương ứng với vectơ pECCG117-Pspl1-serA(Avn) được mô tả ở trên bằng điện biến nạp (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng tái tổ hợp tương ứng được gọi là *Corynebacterium glutamicum 13032/ΔmcbR* (pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI (pECCG117-Pspl1-serA(Avn)).

Để đánh giá khả năng sản sinh L-metionin của các chủng tái tổ hợp 13032/ΔmcbR (pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI (pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) đã điều chế, các chủng này và các chủng bố mẹ (13032/ΔmcbR và 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI) được nuôi cấy theo phương pháp sau đây.

Từng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và các chủng *Corynebacterium glutamicum 13032/ΔmcbR, 13032/ΔNcgl1021, 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI* đã điều chế theo sáng chế được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 ml môi trường nuôi cấy giống dưới đây và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 ml môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 24 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Cụ thể, các chủng trong đó có vectơ được nuôi cấy sau khi thêm vào kanamyxin (25 mg/l). Các thành phần của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như

sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4, 8 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, và 2.000 µg nicotinamit (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

50 g glucoza, 12 g $(NH_4)_2S_2O_3$, 5 g dịch chiết nấm men, 1 g KH_2PO_4, 1,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 µg biotin, 1.000 µg thiamin HCl, 2.000 µg canxi pantothenat, 3.000 µg nicotinamit, và 30 g $CaCO_3$ (trong 1 L nước cất).

Các nồng độ của L-metionin có trong môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy các chủng theo phương pháp được mô tả ở trên được phân tích và thể hiện ở bảng 29 dưới đây.

Bảng 29

Đánh giá các chủng được điều chế

Chủng	L-metionin (g/L)
13032/ΔmcbR	0,12
13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI	0,18
13032/ΔmcbR (pECCG117-Pspl1-serA(Avn))	0,22
13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI (pECCG117-Pspl1-serA(Avn))	0,32

Do đó, xác nhận rằng cả hai chủng được biến nạp với pECCG117-Pspl1-serA(Avn) thể hiện sự tăng sản sinh L-metionin so với chủng đối chứng. Ngoài ra, chủng 13032/ΔmcbR (pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) thể hiện sự tăng sản sinh L-metionin lên 83% so với chủng đối chứng và chủng 13032/ΔNcgl1021-Pcj7metH-Pspl1cysI pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) thể hiện sự tăng sản sinh L-metionin lên 78% so với chủng đối chứng. Do đó, theo ví dụ này, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-metionin của các vi sinh vật được cải thiện bằng cách đưa vào serA(Avn) có nguồn gốc từ *Azotobacter*.

Chủng 13032/ΔmcbR được gọi là CM02-0618 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng số KCCM12425P vào ngày 04/01/2019. Ngoài ra, chủng 13032/ΔmcbR

(pECCG117-Pspl1-serA(Avn)) được gọi là CM02-0693 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng số KCCM12413P vào ngày 27/11/2018.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả tham chiếu đến các phương án được minh họa cụ thể, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả ở trên được coi là minh họa cho tất cả khía cạnh và không bị giới ở đây. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế nên được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo mà không phải là mô tả chi tiết, và cần hiểu rằng tất cả các sửa đổi hoặc biến thể xuất phát từ nguyên lý kỹ thuật và phạm vi của sáng chế và phương án tương đương của chúng đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản sinh L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1,

trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*.

2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó protein có nguồn gốc từ *Azotobacter vinelandii*.

3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật còn có i) hoạt tính phosphoserin phosphataza được làm suy yếu, ii) hoạt tính 3-phosphoserin aminotransferaza được tăng cường, hoặc iii) cả hoạt tính phosphoserin phosphataza được làm suy yếu và hoạt tính 3-phosphoserin aminotransferaza được tăng cường.

4. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật còn được biến đổi bằng sự tăng cường operon trp, bất hoạt tryptophanaza (TnaA), bất hoạt protein màng Mtr (Mtr), hoặc sự kết hợp của chúng.

5. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật còn có operon his được tăng cường.

6. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật còn được biến đổi bằng cách bất hoạt McbR (chất điều hòa phiên mã; mcbR), tăng cường metionin synthaza (meth), tăng cường sulfit reductaza [NADPH] hemoprotein beta-component (cysI), hoặc sự kết hợp của chúng.

7. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Escherichia coli*.

8. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó L-axit amin hoặc tiền chất của chúng được chọn từ nhóm bao gồm L-serin, L-tryptophan, L-histiđin, L-metionin, L-xystein, O-suxinylhomoserin, O-axetylhomoserin, L-homoserin, axetylserin, L-xystathionin, L-homoxystein, và O-phosphoserin.

9. Phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật theo bất kỳ điểm từ 1 đến 8 trong môi trường nuôi cấy.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp còn bao gồm bước thu hồi L-axit amin hoặc tiền chất của chúng từ vi sinh vật nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó L-axit amin hoặc tiền chất của chúng được chọn từ nhóm bao gồm serin, tryptophan, histiđin, metionin, L-xystein, O-suxinylhomoserin, O-axetylhomoserin, L-homoserin, axetylserin, L-xystathionin, L-homoxystein, và O-phosphoserin.

12. Chế phẩm sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng, trong đó chế phẩm bao gồm vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc protein,

trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*.

13. Phương pháp sản xuất L-axit amin hoặc tiền chất của chúng bằng cách sử dụng chế phẩm theo điểm 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT SẢN SINH L-AXIT AMIN, CHẾ PHẨM SẢN XUẤT L-AXIT AMIN VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT VÀ CHẾ PHẨM NÀY

<130> OPA19298

<150> KR 10-2019-0054430
<151> 2019-05-09

<160> 95

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 409
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> polypeptit

<400> 1
Met Ser Lys Thr Ser Leu Asp Lys Ser Lys Ile Arg Phe Leu Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gly Val His Gln Thr Ala Leu Asp Thr Leu Lys Ala Ala Gly Tyr
20 25 30

Thr Asn Ile Glu Tyr Leu Thr Gly Ser Leu Pro Glu Glu Gln Leu Lys
35 40 45

Glu Lys Ile Ala Asp Ala His Phe Ile Gly Ile Arg Ser Arg Thr Gln
50 55 60

Leu Thr Glu Glu Val Phe Asp Arg Ala Lys Lys Leu Val Ala Val Gly
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Glu Ala Ala Arg Glu
85 90 95

Arg Gly Ile Ala Val Phe Asn Ala Pro Tyr Ser Asn Thr Arg Ser Val
100 105 110

Ala Glu Leu Val Leu Ala Glu Ala Ile Leu Leu Leu Arg Gly Ile Pro
115 120 125

Glu Lys Asn Ala Ala Ser His Arg Gly Gly Trp Leu Lys Ser Ala Ser
130 135 140

Asn Ser Tyr Glu Ile Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145 150 155 160

Ser Ile Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Gln
165 170 175

Val Leu Phe Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Ala
180 185 190

Gln Val Gly Asn Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Gln Ala Asp Ile Val Thr

195 200 205

Leu His Val Pro Glu Thr Ala Ala Thr Lys Trp Met Ile Gly Glu Lys
210 215 220

Glu Ile Arg Ala Met Lys Lys Gly Ala Ile Leu Leu Asn Ala Ala Arg
225 230 235 240

Gly Thr Val Val Asp Ile Asp Ala Leu Ala Ala Ala Leu Arg Asp Lys
245 250 255

His Leu Asn Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Val Glu Pro Arg Ser
260 265 270

Asn Asn Asp Glu Phe Val Ser Pro Leu Arg Glu Phe Asp Asn Val Ile
275 280 285

Leu Thr Pro His Val Gly Gly Ser Thr Met Glu Ala Gln Ala Asn Ile
290 295 300

Gly Ser Glu Val Ala Glu Lys Leu Val Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Thr
305 310 315 320

Ser Val Ser Ser Val Asn Phe Pro Glu Val Ala Leu Pro Ser His Pro
325 330 335

Gly Lys His Arg Leu Leu His Ile His Lys Asn Ile Pro Gly Val Met
340 345 350

Ser Glu Ile Asn Lys Val Phe Ala Glu Asn Gly Ile Asn Ile Ser Gly
355 360 365

Gln Phe Leu Gln Thr Asn Glu Thr Val Gly Tyr Val Val Ile Asp Val
370 375 380

Asp Ala Glu Tyr Ser Glu Met Ala Leu Glu Lys Leu Gln Gln Val Asn
385 390 395 400

Gly Thr Ile Arg Ser Arg Val Leu Phe
405

<210> 2
<211> 40
<212> ADN
<213> Polypeptit

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 2
aggtcgactc tagaggatcc cccgcttgct gcaactctct 40

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 3
gatatctttc ctgtgtga 18

<210> 4
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 4
aatttcacac aggaaagata tcatgagtaa gacctccctg 40

<210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 5
gtgaattcga gctcggtacc ctcagaacag aacccgtgag 40

<210> 6
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 6
aatttcacac aggaaagata tcatggcaaa ggtatcgctg 40

<210> 7
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 7
gtgaattcga gctcggtacc cttagtacag cagacgggcg 40

<210> 8
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 8
cctcaccacg ttgcgtctcg agtcagaaca gaacccgtga 40

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 9
ctcgagacgc aacgtggtga 20

<210> 10
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 10
agtgaattcg agctcggtac ccttaaccgt gacggcgttc 40

<210> 11
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 11
ctcaccacgt tgcgtctcga gttagtacag cagacgggcg 40

<210> 12
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 12
tgcaatgcat aacaacgcag tcgcactatt tttcactgga gagaagccct gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 13
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 13
tgcaatgcat aacaacgcag tcgcactatt tttcactgga gagaagccct gtccatatga 60

atatcctcct 70

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 14
gggcaggatc tcctgtcatc 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 15
aaatgtcgga taaggcaccg 20

<210> 16
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 16
tgtaatattc acagggatca ctgtaattaa ataaaatgaa ggattatgta gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 17
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 17
tgtagggtaa gagagtggct aacatcctta tagccactct gtagtattaa gtccatatga 60

atatcctcct 70

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 18
acatccttat agccactctg 20

<210> 19
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 19
tacaaccggg ggaggcattt tgcttccccc gctaacaatg gcgacatatt gtgtaggctg 60
gagctgcttc 70

<210> 20
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 20
gcattcggtg cacgatgcct gatgcgccac gtcttatcag gcctacaaaa gtccatatga 60
atatcctcct 70

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 21
aggacggata aggcgttcac 20

<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 22
gaattcatgc aaacacaaaa accgac 26

<210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 23
gaattctcag aaagtctcct gtgca 25

<210> 24
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 24
cgcttatcgc gacaattcca ccgcgctttt tcaccag 37

<210> 25
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 25
ctggtgaaaa agcgcggtgg aattgtcgcg ataagcg 37

<210> 26
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 26
tcgagctcgg tacccggaag atctagtcgg atacg 35

<210> 27
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 27
tcgtttttag gcctccgact actttgggca atcct 35

<210> 28
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 28
tctgttctga ttagagatcc atttgcttga ac 32

<210> 29
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 29
ctctagagga tcccctcacc cagctcaaag ctgat 35

<210> 30
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 30
tgcccaaagt agtcggaggc ctaaaaacga ccgag 35

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 31
tcttactcat gttgtgtctc ctctaaag 28

<210> 32
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 32
gagacacaac atgagtaaga cctccctg 28

<210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 33
ggatctctaa tcagaacaga acccgtgag 29

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 34
accaagagtt cgaagaccag 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 35
ttcagtggct tccacatcgc 20

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 36
tcgagctcgg tacccatcgc catctacgtt gctgg 35

<210> 37
<211> 45
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 37
gtgccagtgg ggatacctgt gggtgggata agcctggggt tactg 45

<210> 38
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 38
aaccccaggc ttatcccacc cacaggtatc cccactggca cgcga 45

<210> 39
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 39
ctctagagga tccccgggac gtggttgatg gtggt 35

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 40
atggaaatcc tcgccgaagc 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 41
atcgatgggg aactgatcca 20

<210> 42
<211> 35

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 42
tcgagctcgg tacccatcgc catctacgtt gctgg 35

<210> 43
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 43
gagtctagaa gtactcgaga tgctgacctc gtttc 35

<210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 44
agcatctcga gtacttctag actcgcacga aaaag 35

<210> 45
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 45
ctctagagga tccccttttgg gcagagctca aattc 35

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 46
agtttcgtaa cccaccttgc 20

<210> 47

<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 47
cgcttctcaa tctgatgaga 20

<210> 48
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 48
gtcagcatct cgagtgctcc ttagggagcc atctt 35

<210> 49
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 49
gtcaaatgtc ttcacatgtg tgcacctttc gatct 35

<210> 50
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 50
gaaaggtgca cacatgtgaa gacatttgac tcgct 35

<210> 51
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 51
tcgtttttag gcctcctaga tgcgggcgat gcgga 35

<210> 52
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 52
atcgcccgca tctaggaggc ctaaaaacga ccgag 35

<210> 53
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 53
gacagttttg gtcatgttgt gtctcctcta aagat 35

<210> 54
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 54
tagaggagac acaacatgac caaaactgtc gccct 35

<210> 55
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 55
tgaagcgccg gtaccgctta cagcaaaacg tcatt 35

<210> 56
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 56
cgttttgctg taagcggtac cggcgcttca tgtca 35

<210> 57
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 57
agtgacattc aacattgttt tgatctcctc caata 35

<210> 58
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 58
gaggagatca aaacaatgtt gaatgtcact gacct 35

<210> 59
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 59
cgctgggatg tttctctaga gcgctccctt agtgg 35

<210> 60
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 60
aagggagcgc tctagagaaa catcccagcg ctact 35

<210> 61
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 61
agtcatgcct tccatgagtg tttcctttcg ttggg 35

<210> 62
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 62
cgaaaggaaa cactcatgga aggcatgact aatcc 35

<210> 63
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 63
cgagtctaga agtgcctatt ttaaacgatc cagcg 35

<210> 64
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 64
tcgagctcgg taccctgcc tggtttgtct tgta 34

<210> 65
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 65
cggaaaatga agaaagttcg gccacgtcct ttcgg 35

<210> 66
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 66

aggacgtggc cgaactttct tcattttccg aaggg 35

<210> 67
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 67
ctctagagga tccccgtttc gatgcccact gagca 35

<210> 68
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 68
acccggggat cctctagaat gtttgtgatg cgcag 35

<210> 69
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 69
gtcagagagt acttacgctg atcgggaggg aaagc 35

<210> 70
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 70
atcagcgtaa gtactctctg actagcgtca ccctc 35

<210> 71
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 71
ctgcaggtcg actctagaaa agggattgga gtgtt 35

<210> 72
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 72
caacgaaagg aaacaatgtc tacttcagtt acttc 35

<210> 73
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 73
tcgagctcgg taccctgcg acagcatgga actc 34

<210> 74
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 74
atcaaaacag atatcatgac aacaaccacc ggaag 35

<210> 75
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 75
cgctagtcag agagttcaca ccaaatcttc ctcag 35

<210> 76
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 76
ccgatcagcg taagtagaaa catcccagcg ctact 35

<210> 77
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 77
aactgaagta gacattgttt cctttcgttg ggtac 35

<210> 78
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 78
tactttaacg tctaaggtac cggcgcttca tgtca 35

<210> 79
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 79
ggtggttgtt gtcatgatat ctgttttgat ctcct 35

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 80
aatctggatt tccgccaggt 20

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 81
cttcctaact cctgaggaag 20

<210> 82
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 82
atccccatcg gcatctttat 20

<210> 83
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 83
cgatcacact gggctgatct 20

<210> 84
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 84
atcgataagc ttgatggtac cggcgcttca tgtca 35

<210> 85
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 85
ggaggtctta ctcatgatat ctgttttgat ctcct 35

<210> 86
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 86
atcaaaacag atatcatgag taagacctcc ctgga 35

<210> 87
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 87
ctgcaggaat tcgattcaga acagaacccg tgagc 35

<210> 88
<211> 281
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> polypeptit

<400> 88
Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala
1 5 10 15

Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys
20 25 30

Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu
35 40 45

Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His
65 70 75 80

Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala
85 90 95

Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile
100 105 110

Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly
115 120 125

Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile
130 135 140

Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg
145 150 155 160

Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr
165 170 175

Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu

180 185 190

Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn
195 200 205

Phe Leu Met Leu Asp Tyr Asn Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala
210 215 220

Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser His Pro Gln Val Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala
245 250 255

Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu
260 265 270

Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile
275 280

<210> 89
<211> 10676
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 89
gctccttagg gagccatctt ttggggtgcg gagcgcgatc cggtgtctga ccacggtgcc 60

ccatgcgatt gttaatgccg atgctagggc gaaaagcacg gcgagcagat tgctttgcac 120

ttgattcagg gtagttgact aaagagttgc tcgcgaagta gcacctgtca cttttgtctc 180

aaatattaaa tcgaatatca atatatggtc tgtttattgg aacgcgtccc agtggctgag 240

acgcatccgc taaagcccca ggaaccctgt gcagaaagaa aacactcctc tggctaggta 300

gacacagttt attgtggtag agttgagcgg gtaactgtca gcacgtagat cgaaaggtgc 360

acacatgtga agacatttga ctcgctgtac gaagaacttc ttaaccgtgc tcagacccgc 420

cctgaagggt ctggaaccgt ggccgccttg gataaaggca tccatcatct aggtaagaag 480

gtcatcgaag aagccggaga ggtctggatt gcagccgagt atgagaccga tgaagagcta 540

gccggagaaa tctcccagct catttattgg acccaggtca tcatggttgc tcgcggcctg 600

aagccagaag atatctacaa gaacctgtag gagttttaaa gcaatcatgt tgaaaatcgc 660

tgtcccaaac aaaggctcgc tgtccgagcg cgccatggaa atcctcgccg aagcaggcta 720

cgcaggccgt ggagattcca aatccctcaa cgtttttgat gaagcaaaca acgttgaatt 780

cttcttcctt cgccctaaag atatcgccat ctacgttgct ggtggccagc tcgatttggg 840

tatcaccggc cgcgaccttg ctcgcgattc ccaggctgat gtccacgaag ttctttccct 900

cggcttcggt tcctccactt tccgttacgc agcaccagct gatgaagagt ggagcatcga 960

aaagctcgac ggcaagcgca tcgctacctc ttaccccaac cttgttcgcg atgacctcgc 1020

agcacgtggg ctttccgctg aggtgctccg cctcgacggt gcagtagagg tatccatcaa 1080

gcttggtgtc gcagatgcca tcgccgatgt tgtatccacc ggccgcacgc tgcgtcagca 1140

aggtcttgca cctttcggcg aggttctgtg cacctctgag gctgtcattg ttggccgcaa 1200

ggatgaaaag gtcaccccag agcagcagat cctgcttcgc cgcatccagg gaattttgca 1260

cgcgcagaac ttcctcatgc tggattacaa cgtcgaccgc gacaacctgg acgctgccac 1320

tgcagtaacc ccaggcttat cccacccaca ggtatcccca ctggcacgcg acaactgggt 1380

tgctgtacgc gccatggtgc cacgcaggtc agctaacgcc atcatggata agcttgctgg 1440

actcggcgct gaagccatcc tggcttctga aatccgcatc gcccgcatct aggaggccta 1500

aaaacgaccg agcctattgg gattaccatt gaagccagtg tgagttgcat cacattggct 1560

tcaaatctga gactttaatt tgtggattca cgggggtgta atgtagttca taattaaccc 1620

cattcggggg agcagatcgt agtgcgaacg atttcaggtt cgttccctgc aaaaactatt 1680

tagcgcaagt gttggaaatg cccccgtttg gggtcaatgt ccatttttga atgtgtctgt 1740

atgattttgc atctgctgcg aaatctttgt ttccccgcta aagttgagga caggttgaca 1800

cggagttgac tcgacgaatt atccaatgtg agtaggtttg gtgcgtgagt tggaaaaatt 1860

cgccatactc gcccttgggt tctgtcagct caagaattct tgagtgaccg atgctctgat 1920

tgacctaact gcttgacaca ttgcatttcc tacaatcttt agaggagaca caacatgacc 1980

aaaactgtcg cccttctcga ctacggatct ggaaaccttc gttctgctca acgcgcacta 2040

gagcgtgccg gtgcagaagt tatcgtgagc tccgatccag aagtttgcac caacgctgat 2100

ggcctcctag ttcctggagt gggcgcattt gatgcctgca tgaagggttt gaaaaacgtc 2160

ttcggacatc gcattatcgg acagcgtctt gctggtggac gtccagtgat gggtatttgt 2220

gtgggcatgc agatcctgtt cgatgaaggc gatgagcacg gcattaagtc agctggttgc 2280

ggcgagtggc ctggcaaagt ggaacgcctc caagcggaga tcctgcctca catggggtgg 2340

aacacacttg aaatgcctac caactcacca atgtttgagg gaatttcacc tgatgagcgt 2400

ttctacttcg tgcactccta tggtgtgcgc aagtggacgt tggaaaccga cgatctgacc 2460

acgcctccag aggttgtgtg ggcgaagcac gaaaatgatc gttttgtggc agctgtggaa 2520

aacggcacgc tgtgggctac tcaattccac ccagaaaaat caggtgacgc aggcgcacag 2580

ctactgcgaa actggatcaa ctacatctaa cagataggat caatattcat gaccttcact 2640

attcttcctg cagtcgatgt agttaacgga caagcagttc gcctagatca gggcgaggcc 2700

ggcactgaaa agtcttatgg cacccctttg gaatccgcac tgaagtggca ggagcagggt 2760

gcaaagtggt tgcactttgt ggacctggac gcagcgttca accgtggttc caaccatgag 2820

atgatggcgg aaattgtcgg caagctcgat gttgatgtgg agctcactgg cggtatccgt 2880

gatgatgagt ctctggagcg cgcgctggca accggtgcac gtcgtgtaaa cattggtacc 2940

gctgctctgg agaagccaga gtggattgct tctgcgattc aacgctatgg cgagaagatt 3000

gctgtcgata tcgctgtgcg tttggaagat ggtgaatggc gcacccgtgg aaacggttgg 3060

gtctccgatg gtggcgatct gtgggaagtt ctcgagcgtt tggattccca aggttgtgca 3120

cgtttcgtgg ttaccgatgt gtccaaggac ggcaccttga gtggtccaaa tgttgagctg 3180

ctgcgtgagg ttgctgcagc tacagacgca cctatcgtgg catctggtgg aatttctgtt 3240

ttggaagatg ttttggaact agccaagtac caggatgagg gcattgattc cgtcatcatt 3300

ggcaaggcac tttatgagca caagttcacc ctcgaagagg ctttggctgc agtagaaaag 3360

ctcggttaat acatggatgc tcgtgggatg ttggccattg cggaggccgt tgtagatgat 3420

gccgaagccc tcttcatgca gggcttcgga gctgcacctg cccatatgaa atccccgggg 3480

gattttgcca cggaagtgga tatggccatc gaatcccata tgcgttcgat gctgaacatg 3540

atgacaggca ttgctgtcat cggtgaagaa ggtggcggtg cgacctccgg cacgcgctgg 3600

gtgattgatc ccatcgacgg caccgccaac ttcgcggcgt ccaacccgat gagcgcgatc 3660

ctggtgtctt tgcttgtcga cgaccagccc gtcctgggta ttacctccat gcccatgctg 3720

ggtaaacgcc tcaccgcttt tgaaggttca ccgctgatga tcaacggtga acctcaggaa 3780

ccattgcaag aacaatccag tttggtatcc cacattggtt ttagttccat ggcctccccg 3840

cgcaatacag cgtttcctgt ggagttgcgt cgggatcttc tgaccgagct cacggaatcg 3900

tatcttcgtc cccgcattac aggttcggtg ggtgttgatc tcgcgttcac tgcgcagggc 3960

atttttggag catgcgtatc gtttagtcct catgtttggg acaattccgc aggcgtgatg 4020

ttgatgcgcg ctgctggtgc acaagttact gacaccgaag gccatccgtg ggcaccaggt 4080

aggggagtcg tggccggaac aaaaagggct cacgatgtgc tgttaagtaa gattgaaaaa 4140

gttcggttga tgcatgcaga tgcaggtaat gaccagtcgt taaatgagga gtacaagtaa 4200

aatgggcgtg gcaattcgag ttattccttg cctggacgtg gacaacggcc gggttgttaa 4260

aggcgtgaac tttgaaaacc tccgcgatgc tggcgatcct gtggagttgg caaagcgcta 4320

tgacgaggaa ggggcagatg agctgacctt cctggatgtc accgcctcga agcatggtcg 4380

cggcaccatg ctggatgttg ttcgacgcac cgctgatcag gtgttcatcc ctctgactgt 4440

cggtggcggc gtgcgcagcg aagaagatgt tgatcaattg ctgcgcgctg gcgccgacaa 4500

ggtttcggtg aacacgtctg cgattgcccg tccagaactg ctgtcagagc tgtccaagcg 4560

ttttggtgct cagtgcatcg tgttgtctgt ggatgccagg cgcgttcctg aaggtggaac 4620

tcctcagcca tctggttttg aagtcaccac ccacggcggt tccaagtccg cagaacttga 4680

tgcaatcgag tgggcaaagc gcggcgaaga gctgggcgtt ggcgaaattc tgctcaactc 4740

catggacggc gacggcacca aaaacggctt tgacctagag ctgctggaaa aagttcgcgc 4800

agccgtatcc attcctgtaa tcgcctccgg cggcgctggc aaggcggagc atttcccacc 4860

agctgttgca gctggcgcca acgcagtgct tgccgcgacc attttccact tccgcgaagt 4920

aaccatcgcc gaagtaaagg gagccattaa agatgcagga tttgaggtgc ggaaatgagt 4980

gacaatccac aagagtatga gctggattgg gacgtcgaaa agcgattaaa gcttaacgac 5040

gccggcctgg tgccggcaat cgtccaggcc gacgggacca acgaggtcct catgatggcc 5100

tggatggata cccacgcgct agcctatact ttggcgaccc gccgtggaac ctatttttct 5160

aggtcccgca acgagtactg gatcaagggc ctgacctctg gaaacgtcca agaagtcacc 5220

ggacttgccc tcgactgcga cggcgacacc gtccttctga ccgtgaaaca aaccggcggt 5280

gcgtgccaca ctggtgccca cacatgtttc gacaatgacg ttttgctgta agcggtaccg 5340

gcgcttcatg tcaacaatct ttaacgtttt caagttcaca agtcgtgttc aaatggtgac 5400

aagattggac actgtgctga attggcacca agccctcata aatgatagat ctaaatcgaa 5460

tatcaatata tggtctgttt attggaacgc gtcccagtgg ctgagacgca tccgctaaag 5520

ccccaggaac cctgtgcaga aagaacaaat aatcgtgaat tttggcagca acagcggggc 5580

ctggtataat tgaaaacgtg caaaagcata gattattgga ggagatcaaa acaatgttga 5640

atgtcactga cctgcgaggt caaacaccat ccaagagcga catccgacgt gctttgccac 5700

gtggtggcac tgacgtgtgg tctgtgcttc ccatagtgca gcctgttgta gaagatgtcc 5760

aaaaccgcgg cgctgaagct gctttggatt acggcgagaa gttcgaccat attcgccccg 5820

cctcggtgcg ggtgccagct gaggttattg ctgcagcaga aaacacctta gatccgttgg 5880

tgcgtgaatc gattgaagag tcgattcgtc gcgtccgcaa ggttcacgct gagcaaaagc 5940

catccgagca caccactgaa ctttcaccag gtggcaccgt cactgagcgt ttcatgccga 6000

ttgatcgcgt gggactgtac gttccaggcg gcaatgcggt gtacccatca agcgtgatta 6060

tgaatactgt cccagctcaa gaggctggtg tgaactccct tgtggttgcg tcgcctcctc 6120

aggctgagca cggtggctgg cctcacccca ccattttggc ggcgtgttcc atcttgggtg 6180

ttgatgaggt gtgggctgtc ggcggcggtc aggccgtggc gttgctggct tatggtgatg 6240

acgctgcagg tctcgagcct gtggatatga tcactggacc tggcaatatc tttgtcaccg 6300

ctgcgaagcg cctggtcagg ggagtggtag gtactgattc tgaggctggc cctacagaaa 6360

tcgctgtgct tgctgatgcc tctgccaacg ccgtcaacgt tgcctacgat ctgatcagcc 6420

aagcagaaca cgatgtcatg gctgcgtccg tgctcatcac tgactccgag cagcttgcca 6480

aggacgtaaa cagggaaatc gaggcgcgtt actcaatcac gcgcaacgcc gagcgcgtcg 6540

cagaagcttt gcgcggggcc cagagtggca tcgtgcttgt cgacgacatt tccgtgggta 6600

tccaagtagc cgatcaatac gcagcggaac acctggaaat ccacactgag aacgcgcgcg 6660

ccgtagcaga gcagatcacc aacgcgggtg cgatcttcgt gggcgatttc tcaccagtac 6720

cactgggtga ttactccgca ggatccaacc acgtgctgcc aacctctgga tccgctcgtt 6780

tctccgcagg tctatccacg cacacgttcc ttcgcccagt caacctcatt gaatacgatg 6840

aggctgctct gaaggacgtc tcgcaggttg tcatcaactt tgccaacgcc gaagatcttc 6900

cagcgcacgg cgaagcaatc cgtgcacgct ttgaaaacct ccccaccacc gacgaggcct 6960

aagaaaaatg accaaaatta ctttgagcga tttgccattg cgtgaagaac tgcgcggtga 7020

gcacgcttac ggcgcacccc agctcaacgt tgatattcgc ctcaacacca acgaaaaccc 7080

ttacccaccg tcagaggcat tggtcgctga cttggttgcc accgtggata agatcgccac 7140

cgagctgaac cgctacccag agcgcgatgc tgtggaactg cgtgatgagt tggctgcgta 7200

catcaccaag caaaccggcg tggctgtcac cagggataac ctgtgggctg ccaatggttc 7260

caatgaaatt ctgcagcagc tgctgcaggc ttttggtgga cctggacgca ccgcgttggg 7320

attccaaccc agctattcca tgcacccaat tttggctaaa ggcacccaca ctgaattcat 7380

tgcggtgtcc cgaggtgctg atttccgcat cgatatggat gtggcgctgg aagaaattcg 7440

tgcaaagcag cctgacattg tttttgtcac caccccgaac aacccgaccg gtgatgtgac 7500

ctcgctggac gatgttgagc gcatcatcaa cgttgcccca ggcatcgtga tcgtggatga 7560

agcttatgcg gaattctccc catcaccttc agcaaccact cttctggaga agtacccaac 7620

caagctggtg gtgtcccgca ccatgagtaa ggcttttgat ttcgcaggtg gacgcctcgg 7680

ctacttcgtg gccaacccag cgtttatcga cgccgtgatg ctagtccgcc ttccgtatca 7740

tctttcagcg ctgagccaag cagccgcaat cgtagcgctg cgtcactccg ctgacacgct 7800

gggaaccgtc gaaaagctct ctgtagagcg tgttcgcgtg gcagcacgct tggaggaact 7860

gggctacgct gtggttccaa gtgagtccaa ctttgtgttc tttggagatt tctccgatca 7920

gcacgcggca tggcaggcat ttttggatag gggagtgctc atccgcgatg tgggaatcgc 7980

tgggcacttg cgcactacca ttggtgtgcc tgaggaaaat gatgcgtttt tggacgcagc 8040

tgcagagatc atcaagctga acctgtaaga gagaagaatt tttcatgact gtcgcaccaa 8100

gaattggtac cgcaacccgc accaccagcg aatccgacat caccgtcgag atcaacctgg 8160

acggcaccgg caaagtagat atcgataccg gcctgccatt tttcgaccac atgctcactg 8220

cattcggcgt gcacggcagt tttgatctga aagtccatgc caagggcgac atcgagatcg 8280

acgcacacca caccgtggaa gataccgcca tcgtgctcgg ccaagcactc cttgacgcta 8340

ttggcgacaa gaaaggcatc cgccgtttcg catcctgcca gctgcccatg gatgaggcat 8400

tagtggagtc cgtggtggat atctccggtc gcccatactt cgtgatctcc ggcgaaccag 8460

accacatgat cacctccgtg atcggtggac actacgcaac cgtgatcaac gagcacttct 8520

ttgaaaccct cgcgctcaac tcccgaatca ccctccacgt gatctgccac tacggccgcg 8580

accctcacca catcaccgaa gcagagtaca aggctgttgc ccgtgcgctg cgcggtgccg 8640

tagagatgga tcctcgtcaa acaggaatcc catccactaa gggagcgctc tagagaaaca 8700

tcccagcgct actaataggg agcgttgacc ttccttccac ggaccggtaa tcggagtgcc 8760

taaaaccgca tgcggcttag gctccaagat aggttctgcg cggccgggta atgcatcttc 8820

tttagcaaca agttgagggg taggtgcaaa taagaacgac atagaaatcg tctcctttct 8880

gtttttaatc aacatacacc accacctaaa aattccccga ccagcaagtt cacagtattc 8940

gggcacaata tcgttgccaa aatattgttt cggaatatca tgggatacgt acccaacgaa 9000

aggaaacact catggaaggc atgactaatc cagagcagac acatcccgct gcaagcctcg 9060

aagacatgat caaaaccatc acaaagacct tcgtgattgc tcacgatcag gattctgatg 9120

agcatcttgc gcaggcactg gtgtacaacg ctggacgttt ggcatggcgc atgcgcgaaa 9180

acggtgtgga tacggattac aagacttctg tgtctgatgt ggtcacggat gccgatcgtg 9240

cggccgaggc cttcgtcgca ggcgttcttg aagcgttgcg gcctgaggac ggcgtgcttg 9300

gcgaggaagg cgcggaccgg gcgtcgaaaa gcggaaaaac ctgggtcatc gacccggttg 9360

atggcaccta caacttcacc cagggctcag attattggtg ctcggcgctc gcgctggtcg 9420

agggcgatcc atccgcgcca tcgcgcgtgc ttttcggcgc cgtacaccgc ccagccatgg 9480

gttatacgtg gttcggtggc ccgggaatcc gcaccacgct cgacggcaag gagctagatt 9540

tgcttgtcga cgccccctc aatcaaatct ccctggccac ctacatccac ccgtcacgca 9600

tcgcggaacc tgatattcaa aaggcgtgga tgagcgttgc cacccaccct gcaacgctgc 9660

gcatgttcgg cgccggctcc atcgatttgg ccaacatcgc cgacggcagc atcggcgcat 9720

gggtgcagca cagcgtcgca gattgggact ggctacccgg ccgcgcactc atcgaaggcg 9780

tcggcggagc atgcatcaaa gtgaccgccg gcggcgtcga atggtccgtt gcaggaaacg 9840

cggaagcagt tagtgagatc tccgaaactt taagcgcact agactaacaa cacatgagca 9900

aatatgcaga cgatttagcc ttagccctcg aacttgccga acttgccgat tccatcaccc 9960

tcgaccgctt cgaagcctct gacctggaag tatcctccaa gccagacatg actcccgtca 10020

gcgatgccga cctggcgacc gaagaagcac tccgtgagaa aatcgccacc gcccgccccg 10080

ccgactccat cctcggtgaa gaattcggtg gcgacgtaga attcagcggc cgccagtgga 10140

tcatcgaccc catcgacggc accaaaaact acgtccgcgg cgtccccgta tgggcaaccc 10200

tgatcgcgct gctcgacaac ggcaaacccg tcgcaggtgt catctccgca cccgcactgg 10260

ctaggcgttg gtgggcatcc gaaggggccg gcgcatggcg caccttcaac ggcagctccc 10320

cacgcaaact gtccgtgtcc caggtgtcca agcttgacga cgcctccctc tccttctcct 10380

ccctctccgg ctgggccgaa cgagatttgc gcgatcagtt cgtctcccta actgatacca 10440

cctggcgact ccgcggctac ggcgacttct tctcctactg cctcgtcgcc gaaggtgccg 10500

tcgatatcgc cgctgaacca gaagtcagcc tctgggatct tgctcccctg tccatcctgg 10560

tcaccgaagc cggaggaaag ttcacctcac tggctggcgt cgatggacca cacggtggcg 10620

atgcagtagc caccaacggc atcctgcacg atgagacgct ggatcgttta aaatag 10676

<210> 90
<211> 281
<212> PRT
<213> Chua biết

<220>
<223> polypeptit

<400> 90

Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala
1 5 10 15

Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys
20 25 30

Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu
35 40 45

Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His
65 70 75 80

Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala
85 90 95

Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile
100 105 110

Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly
115 120 125

Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile
130 135 140

Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg
145 150 155 160

Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr
165 170 175

Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu
180 185 190

Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn
195 200 205

Phe Leu Met Leu Asp Tyr Arg Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala
210 215 220

Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser His Pro Gln Val Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala
245 250 255

Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu
260 265 270

Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile
275 280

<210> 91
<211> 2642
<212> ADN
<213> Chua biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 91
ctcccgcgca ctgctgcaat ccgcaccgtg cccaatgatg gtggttcgcc cacctgagaa 60

gattaagaag tagtttcttt taagtttcga tgccccggtt tcctgatttt gtgcagggag 120

gccggggcat tggtgtttgc gggttagttc gggccattcg aaagggagaa accaagggca 180

gccagacaga cgtgccaaga atctggattt ccgccaggtt ttggcacgcc cgtctggttt 240

aggcaatgag ataccgaaca cacgtgccaa aagttcggct ttttcgccga tcttgtcacg 300

cctgcctggt ttgtcttgta aagagtgatt tcatggccga gactcctaaa agtttgacct 360

cacaggattg cttctaaggg cctctccaat ctccactgag gtacttaatc cttccgggga 420

attcgggcgc ttaaatcgag aaattaggcc atcacctttt aataacaata caatgaataa 480

ttggaatagg tcgacacctt tggagcggag ccggttaaaa ttggcagcat tcaccgaaag 540

aaaaggagaa ccacatgctt gccctaggtt ggattacatg gatcattatt ggtggtctag 600

ctggttggat tgcctccaag attaaaggca ctgatgctca gcaaggaatt ttgctgaaca 660

tagtcgtcgg tattatcggt ggtttgttag gcggctggct gcttggaatc ttcggagtgg 720

atgttgccgg tggcggcttg atcttcagct tcatcacatg tctgattggt gctgtcattt 780

tgctgacgat cgtgcagttc ttcactcgga agaagtaatc tgctttaaat ccgtagggcc 840

tgttgatatt tcgatatcaa caggcctttt ggtcattttg gggtggaaaa agcgctagac 900

ttgcctgtgg attaaaacta tacgaaccgg tttgtctata ttggtgttag acagttcgtc 960

gtatcttgaa acagaccaac ccgaaaggac gtggccgaac gtggctgcta gcgcttcagg 1020

caagagtaaa acaagtgccg gggcaaaccg tcgtcgcaat cgaccaagcc cccgacagcg 1080

tctcctcgat agcgcaacca acctttcac cacagaaggt attcgcgtca tcggtattga 1140

tcgtatcctc cgtgaagctg acgtggcgaa ggcgagcctc tattcccttt tcggatcgaa 1200

ggacgccttg gttattgcat acctggagaa cctcgatcag ctgtggcgtg aagcgtggcg 1260

tgagcgcacc gtcggtatga aggatccgga agataaaatc atcgcgttct ttgatcagtg 1320

cattgaggaa gaaccagaaa aagatttccg cggctcgcac tttcagaatg cggctagtga 1380

gtaccctcgc cccgaaactg atagcgaaaa gggcattgtt gcagcagtgt tagagcaccg 1440

cgagtggtgt cataagactc tgactgattt gctcactgag aagaacggct acccaggcac 1500

cacccaggcg aatcagctgt tggtgttcct tgatggtgga cttgctggat ctcgattggt 1560

ccacaacatc agtcctcttg agacggctcg cgatttggct cggcagttgt tgtcggctcc 1620

acctgcggac tactcaattt agtttcttca ttttccgaag gggtatcttc gttgggggag 1680

gcgtcgataa gccccttctt tttagcttta acctcagcgc gacgctgctt taagcgctgc 1740

atggcggcgc ggttcatttc acgttgcgtt tcgcgcctct tgttcgcgat ttctttgcgg 1800

gcctgttttg cttcgttgat ttcggcagta cgggttttgg tgagttccac gtttgttgcg 1860

tgaagcgttg aggcgttcca tggggtgaga atcatcaggg cgcggttttt gcgtcgtgtc 1920

cacaggaaga tgcgcttttc tttttgtttt gcgcggtaga tgtcgcgctg ctctaggtgg 1980

tgcactttga aatcgtcggt aagtgggtat ttgcgttcca aaatgaccat catgatgatt 2040

gtttggagga gcgtccacag gttgttgctg acccaataga gtgcgattgc tgtggggaat 2100

ggtcctgtga ggccaaggga cagtgggaag atcggcgcga ggatcgacat cacgatcatg 2160

aacttcagca tgccgttaga gaatccggat gcgtaatcgt tggtttggaa gctgcggtac 2220

atggacatcg ccatgttgat tgcggtgagg attgcggctg tgatgaacag tggcaaaacg 2280

aaactaagaa cttccgcctg cgtggtgctc aaatatttta gctgctcagt gggcatcgaa 2340

acataagcgg gcagaggcac attgctcacg cgaccagcga ggaaagattc cacttcctca 2400

ggagttagga agccgatcga ctggaagacg ggattttcca aaccaccttc agggcgagcc 2460

atgcggagaa gtgcccagta aagaccaagg acaatcggta tctggatcag cccaggcaca 2520

caacctgcca gcgggttaat gccgtattcc ttattcaaat cattctggcg cttctgcaac 2580

tcccgaatgg acgcttcatc gtactttccc ttgtattctt cccggagcgc agcgcggtga 2640

gg 2642

<210> 92
<211> 5666
<212> ADN
<213> Chua biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 92
tgtcatgctt ccggaggtgc gcagggctcg agactccgga aagctatttg ccactccgat 60

gtttgggtca ctcgacgaga tacgtgctga tcacctaatt tggtgcacag ggtttcggcc 120

ggcgattagg ccagttcgtc aacttctcaa acacggacaa ccaaaggttc ctggtcttta 180

tttagtaggc tacggagatt ggacgggacc tgggtctgcg actatcacag gggtcgggct 240

ttatgccaag cgagcagcca aagagattgc cgcgtcagtc ggcaaagtcg ttaaatagtt 300

tgaaggctaa gaacttaatg ttaaagcgaa aattgttttg acacctcaac taatgcagcg 360

atgcgttctt tccagaatgc tttcatgaca gggatgctgt cttgatcagg caggcgtctg 420

tgctggatgc cgaagctgga tttattgtcg cctttggagg tgaagttgac gctcactcga 480

gaatcatcgg ccaaccattt ggcattgaat gttctaggtt cggaggcgga ggttttctca 540

attagtgcgg gatcgagcca ctgcgcccgc aggtcatcgt ctccgaagag cttccacact 600

ttttcgaccg gcaggttaag ggttttggag gcattggccg cgaacccatc gctggtcatc 660

ccgggtttgc gcatgccacg ttcgtattca taaccaatcg cgatgccttg agcccaccag 720

ccactgacat caaagttgtc cacgatgtgc tttgcgatgt gggtgtgagt ccaagaggtg 780

gcttttacgt cgtcaagcaa ttttagccac tcttcccacg gctttccggt gccgttgagg 840

atagcttcag gggacatgcc tggtgttgag ccttgcggag tggagtcagt catgcgaccg 900

agactagtgg cgctttgcct gtgttgctta ggcggcgttg aaaatgaact acgaatgaaa 960

agttcgggaa ttgtctaatc cgtactaagc tgtctacaca atgtctactt cagttacttc 1020

accagcccac aacaacgcac attcctccga atttttggat gcgttggcaa accatgtgtt 1080

gatcggcgac ggcgccatgg gcacccagct ccaaggcttt gacctggacg tggaaaagga 1140

tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac acccgccctg atgtgttgag 1200

gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg gttgagacca atacttttgg 1260

ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat cgttgccgtg agcttgccta 1320

caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg gggccgggcc gaaacggcat 1380

gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag cttccatcgc tgggccatgc 1440

accgtatgca gatttgcgtg ggcactacaa ggaagcagcg cttggcatca tcgacggtgg 1500

tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt caggtcaagg ctgcggttca 1560

cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg cccattattt gccacgtcac 1620

cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc ggtgccgcgt tgacagcgct 1680

gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc accggcccag atgagatgag 1740

cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct gtgtcggtga tgcctaacgc 1800

aggtcttcct gtcctgggta aaaacggtgc agaataccca cttgaggctg aggatttggc 1860

gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc atggtgggtg gttgttgtgg 1920

caccacacct gagcacatcc gtgcggtccg cgatgcggtg gttggtgttc cagagcagga 1980

aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag caggcctccc gcgaggtgga 2040

gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctcggtgcca ttgtcccagg aaaccggcat 2100

ttccatgatc ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag gcattccgtg aggcaatgct 2160

gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag caaacccgcg atggtgcaca 2220

catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc accgccgata tggcgacctt 2280

ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg attgactcca ccgagccaga 2340

ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc atcgttaact ccgtcaactt 2400

tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcatc atgaaactgg taaagcagca 2460

cggtgcggcc gtggttgcgc tgaccattga tgaggaaggc caggcacgta ccgctgagca 2520

caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc ggcagctacg gcctggatat 2580

caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct actggccagg aagaaaccag 2640

gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg aagaagctct acccagaaat 2700

ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg aaccctgctg cacgccaggt 2760

tcttaactct gtgttcctca atgagtgcat tgaggctggt ctggactctg cgattgcgca 2820

cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc cagcgcgaag tggcgttgga 2880

tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg caggaattca tgcagctgtt 2940

tgagggcgtt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct gaacagctgg ccgctatgcc 3000

tttgtttgag cgtttggcac agcgcatcat cgacggcgat aagaatggcc ttgaggatga 3060

tctggaagca ggcatgaagg agaagtctcc tattgcgatc atcaacgagg accttctcaa 3120

cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag atgcagctgc cattcgtgct 3180

gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg gaaccgttca tggaagagga 3240

agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc aaaatcgtcg tggccaccgt 3300

caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac atcattttgt ccaacaacgg 3360

ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc gccatgttgg aagcagcgga 3420

agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt gtgaagtcca ccgtggtgat 3480

gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc aattacccag tcattttggg 3540

tggcgctgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc aacgaggtgt acaccggtga 3600

ggtgtactac gcccgtgatg ctttcgaggg cctgcgcctg atggatgagg tgatggcaga 3660

aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct attgagcagg cgaagaagaa 3720

ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt gccgcggagc gtaaagctaa 3780

tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc accgatactc caaccgcggc 3840

accaccgttc tggggaaccc gcattgtcaa gggtctgccc ttggcggagt tcttgggcaa 3900

ccttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggtctg aaatccaccc gcggcaacga 3960

gggtccaagc tatgaggatt tggtggaaac tgaaggccga ccacgcctgc gctactggct 4020

ggatcgcctg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc ttggtgtatg gctacttccc 4080

agcggtcgcg gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc ccggatccac acgcagccga 4140

acgcatgcgc tttagcttcc cacgccagca gcgcggcagg ttcttgtgca tcgcggattt 4200

cattcgccca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg gacgtcatgc cattccagct 4260

ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag ttgttcgcag ccaatgaata 4320

ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc accgaagcat tggccgagta 4380

ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac ggtggatctg tcgctgattt 4440

tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac cgcggcgccc gcttctcctt 4500

tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag ctggtggaat tgctcgagcc 4560

aggccgtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg cacccagagc agtccacaga 4620

cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac gtctaacacc tttgagaggg 4680

aaaactttcc cgcacattgc agatcgtgcc actttaacta aggttgacgg catgattaag 4740

gcgattttct gggacatgga cggcacgatg gtggactctg agccacagtg gggcattgct 4800

acctacgagc tcagcgaagc catgggccgc cgcctcaccc cggagctccg ggaactcacc 4860

gtcggctcga gcctgccgcg caccatgcgc ttatgcgcag agcacgcagg cattacattg 4920

agcgacgcgg actacgagcg ctaccgggct ggcatgttcg cccgggtcca tgagcttttc 4980

gacgaatccc tcgtcccaaa tccaggcgtc accgaactcc tgacagagtt gaaggccctc 5040

gagatcccca tgttggtcac caccaacaca gagcgcgatc tcgcgacccg ttcagtcgca 5100

gccgtgggaa atgagttctt catcggttct atcgctggtg atgaagtccc aacagcaaag 5160

ccagcccccg acatgtacct cgaagcagca cgacgtgtgg gctttgaccc atcagagtgc 5220

ctcgtgttcg aagattccta caacggcatg ctgggcgctg ttactgcagg ttgccgcgtc 5280

attggtctgc acccagaaga agtccaagcg ccagaaggtg tagtgccttt gcgttccctc 5340

cacggtaaaa actctttcga aggtgtcacc gctgagatgg tcactgcctg gtaccaccag 5400

atcgagccgg caggtgtcgc aaaataaaac caggtggggg agtgaaatta ttcgactaat 5460

atcctccccc aaacacacat tgataactgt tgtgtggaag aatgtaccga gtgaagacat 5520

ttgactcgct gtacgaagaa cttcttaacc gtgctcagac ccgccctgaa gggtctggaa 5580

ccgtggccgc cttggataaa ggcatccatc atctaggtaa gaaggtcatc gaagaagccg 5640

gagaggtctg gattgcagcc gagtat 5666

<210> 93
<211> 11332
<212> ADN
<213> Chua biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 93
tgtcatgctt ccggaggtgc gcagggctcg agactccgga aagctatttg ccactccgat 60

gtttgggtca ctcgacgaga tacgtgctga tcacctaatt tggtgcacag ggtttcggcc 120

ggcgattagg ccagttcgtc aacttctcaa acacggacaa ccaaaggttc ctggtcttta 180

tttagtaggc tacggagatt ggacgggacc tgggtctgcg actatcacag gggtcgggct 240

ttatgccaag cgagcagcca aagagattgc cgcgtcagtc ggcaaagtcg ttaaatagtt 300

tgaaggctaa gaacttaatg ttaaagcgaa aattgttttg acacctcaac taatgcagcg 360

atgcgttctt tccagaatgc tttcatgaca gggatgctgt cttgatcagg caggcgtctg 420

tgctggatgc cgaagctgga tttattgtcg cctttggagg tgaagttgac gctcactcga 480

gaatcatcgg ccaaccattt ggcattgaat gttctaggtt cggaggcgga ggttttctca 540

attagtgcgg gatcgagcca ctgcgcccgc aggtcatcgt ctccgaagag cttccacact 600

ttttcgaccg gcaggttaag ggttttggag gcattggccg cgaacccatc gctggtcatc 660

ccgggtttgc gcatgccacg ttcgtattca taaccaatcg cgatgccttg agcccaccag 720

ccactgacat caaagttgtc cacgatgtgc tttgcgatgt gggtgtgagt ccaagaggtg 780

gcttttacgt cgtcaagcaa ttttagccac tcttcccacg gctttccggt gccgttgagg 840

atagcttcag gggacatgcc tggtgttgag ccttgcggag tggagtcagt catgcgaccg 900

agactagtgg cgctttgcct gtgttgctta ggcggcgttg aaaatgaact acgaatgaaa 960

agttcgggaa ttgtctaatc cgtactaagc tgtctacaca atgtctactt cagttacttc 1020

accagcccac aacaacgcac attcctccga atttttggat gcgttggcaa accatgtgtt 1080

gatcggcgac ggcgccatgg gcacccagct ccaaggcttt gacctggacg tggaaaagga 1140

tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac acccgccctg atgtgttgag 1200

gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg gttgagacca atacttttgg 1260

ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat cgttgccgtg agcttgccta 1320

caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg gggccgggcc gaaacggcat 1380

gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag cttccatcgc tgggccatgc 1440

accgtatgca gatttgcgtg ggcactacaa ggaagcagcg cttggcatca tcgacggtgg 1500

tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt caggtcaagg ctgcggttca 1560

cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg cccattattt gccacgtcac 1620

cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc ggtgccgcgt tgacagcgct 1680

gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc accggcccag atgagatgag 1740

cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct gtgtcggtga tgcctaacgc 1800

aggtcttcct gtcctgggta aaaacggtgc agaataccca cttgaggctg aggatttggc 1860

gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc atggtgggtg gttgttgtgg 1920

caccacacct gagcacatcc gtgcggtccg cgatgcggtg gttggtgttc cagagcagga 1980

aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag caggcctccc gcgaggtgga 2040

gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctcggtgcca ttgtcccagg aaaccggcat 2100

ttccatgatc ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag gcattccgtg aggcaatgct 2160

gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag caaacccgcg atggtgcaca 2220

catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc accgccgata tggcgacctt 2280

ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg attgactcca ccgagccaga 2340

ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc atcgttaact ccgtcaactt 2400

tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcatc atgaaactgg taaagcagca 2460

cggtgcggcc gtggttgcgc tgaccattga tgaggaaggc caggcacgta ccgctgagca 2520

caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc ggcagctacg gcctggatat 2580

caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct actggccagg aagaaaccag 2640

gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg aagaagctct acccagaaat 2700

ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg aaccctgctg cacgccaggt 2760

tcttaactct gtgttcctca atgagtgcat tgaggctggt ctggactctg cgattgcgca 2820

cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc cagcgcgaag tggcgttgga 2880

tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg caggaattca tgcagctgtt 2940

tgagggcgtt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct gaacagctgg ccgctatgcc 3000

tttgtttgag cgtttggcac agcgcatcat cgacggcgat aagaatggcc ttgaggatga 3060

tctggaagca ggcatgaagg agaagtctcc tattgcgatc atcaacgagg accttctcaa 3120

cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag atgcagctgc cattcgtgct 3180

gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg gaaccgttca tggaagagga 3240

agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc aaaatcgtcg tggccaccgt 3300

caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac atcattttgt ccaacaacgg 3360

ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc gccatgttgg aagcagcgga 3420

agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt gtgaagtcca ccgtggtgat 3480

gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc aattacccag tcattttggg 3540

tggcgctgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc aacgaggtgt acaccggtga 3600

ggtgtactac gcccgtgatg ctttcgaggg cctgcgcctg atggatgagg tgatggcaga 3660

aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct attgagcagg cgaagaagaa 3720

ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt gccgcggagc gtaaagctaa 3780

tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc accgatactc caaccgcggc 3840

accaccgttc tggggaaccc gcattgtcaa gggtctgccc ttggcggagt tcttgggcaa 3900

ccttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggtctg aaatccaccc gcggcaacga 3960

gggtccaagc tatgaggatt tggtggaaac tgaaggccga ccacgcctgc gctactggct 4020

ggatcgcctg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc ttggtgtatg gctacttccc 4080

agcggtcgcg gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc ccggatccac acgcagccga 4140

acgcatgcgc tttagcttcc cacgccagca gcgcggcagg ttcttgtgca tcgcggattt 4200

cattcgccca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg gacgtcatgc cattccagct 4260

ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag ttgttcgcag ccaatgaata 4320

ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc accgaagcat tggccgagta 4380

ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac ggtggatctg tcgctgattt 4440

tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac cgcggcgccc gcttctcctt 4500

tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag ctggtggaat tgctcgagcc 4560

aggccgtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg cacccagagc agtccacaga 4620

cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac gtctaacacc tttgagaggg 4680

aaaactttcc cgcacattgc agatcgtgcc actttaacta aggttgacgg catgattaag 4740

gcgattttct gggacatgga cggcacgatg gtggactctg agccacagtg gggcattgct 4800

acctacgagc tcagcgaagc catgggccgc cgcctcaccc cggagctccg ggaactcacc 4860

gtcggctcga gcctgccgcg caccatgcgc ttatgcgcag agcacgcagg cattacattg 4920

agcgacgcgg actacgagcg ctaccgggct ggcatgttcg cccgggtcca tgagcttttc 4980

gacgaatccc tcgtcccaaa tccaggcgtc accgaactcc tgacagagtt gaaggccctc 5040

gagatcccca tgttggtcac caccaacaca gagcgcgatc tcgcgacccg ttcagtcgca 5100

gccgtgggaa atgagttctt catcggttct atcgctggtg atgaagtccc aacagcaaag 5160

ccagcccccg acatgtacct cgaagcagca cgacgtgtgg gctttgaccc atcagagtgc 5220

ctcgtgttcg aagattccta caacggcatg ctgggcgctg ttactgcagg ttgccgcgtc 5280

attggtctgc acccagaaga agtccaagcg ccagaaggtg tagtgccttt gcgttccctc 5340

cacggtaaaa actctttcga aggtgtcacc gctgagatgg tcactgcctg gtaccaccag 5400

atcgagccgg caggtgtcgc aaaataaaac caggtggggg agtgaaatta ttcgactaat 5460

atcctccccc aaacacacat tgataactgt tgtgtggaag aatgtaccga gtgaagacat 5520

ttgactcgct gtacgaagaa cttcttaacc gtgctcagac ccgccctgaa gggtctggaa 5580

ccgtggccgc cttggataaa ggcatccatc atctaggtaa gaaggtcatc gaagaagccg 5640

gagaggtctg gattgcagcc gagtattgtc atgcttccgg aggtgcgcag ggctcgagac 5700

tccggaaagc tatttgccac tccgatgttt gggtcactcg acgagatacg tgctgatcac 5760

ctaatttggt gcacagggtt tcggccggcg attaggccag ttcgtcaact tctcaaacac 5820

ggacaaccaa aggttcctgg tctttattta gtaggctacg gagattggac gggacctggg 5880

tctgcgacta tcacaggggt cgggctttat gccaagcgag cagccaaaga gattgccgcg 5940

tcagtcggca aagtcgttaa atagtttgaa ggctaagaac ttaatgttaa agcgaaaatt 6000

gttttgacac ctcaactaat gcagcgatgc gttctttcca gaatgctttc atgacaggga 6060

tgctgtcttg atcaggcagg cgtctgtgct ggatgccgaa gctggattta ttgtcgcctt 6120

tggaggtgaa gttgacgctc actcgagaat catcggccaa ccatttggca ttgaatgttc 6180

taggttcgga ggcggaggtt ttctcaatta gtgcgggatc gagccactgc gcccgcaggt 6240

catcgtctcc gaagagcttc cacacttttt cgaccggcag gttaagggtt ttggaggcat 6300

tggccgcgaa cccatcgctg gtcatcccgg gtttgcgcat gccacgttcg tattcataac 6360

caatcgcgat gccttgagcc caccagccac tgacatcaaa gttgtccacg atgtgctttg 6420

cgatgtgggt gtgagtccaa gaggtggctt ttacgtcgtc aagcaatttt agccactctt 6480

cccacggctt tccggtgccg ttgaggatag cttcagggga catgcctggt gttgagcctt 6540

gcggagtgga gtcagtcatg cgaccgagac tagtggcgct ttgcctgtgt tgcttaggcg 6600

gcgttgaaaa tgaactacga atgaaaagtt cgggaattgt ctaatccgta ctaagctgtc 6660

tacacaatgt ctacttcagt tacttcacca gcccacaaca acgcacattc ctccgaattt 6720

ttggatgcgt tggcaaacca tgtgttgatc ggcgacggcg ccatgggcac ccagctccaa 6780

ggctttgacc tggacgtgga aaaggatttc cttgatctgg aggggtgtaa tgagattctc 6840

aacgacaccc gccctgatgt gttgaggcag attcaccgcg cctactttga ggcgggagct 6900

gacttggttg agaccaatac ttttggttgc aacctgccga acttggcgga ttatgacatc 6960

gctgatcgtt gccgtgagct tgcctacaag ggcactgcag tggctaggga agtggctgat 7020

gagatggggc cgggccgaaa cggcatgcgg cgtttcgtgg ttggttccct gggacctgga 7080

acgaagcttc catcgctggg ccatgcaccg tatgcagatt tgcgtgggca ctacaaggaa 7140

gcagcgcttg gcatcatcga cggtggtggc gatgcctttt tgattgagac tgctcaggac 7200

ttgcttcagg tcaaggctgc ggttcacggc gttcaagatg ccatggctga acttgataca 7260

ttcttgccca ttatttgcca cgtcaccgta gagaccaccg gcaccatgct catgggttct 7320

gagatcggtg ccgcgttgac agcgctgcag ccactgggta tcgacatgat tggtctgaac 7380

tgcgccaccg gcccagatga gatgagcgag cacctgcgtt acctgtccaa gcacgccgat 7440

attcctgtgt cggtgatgcc taacgcaggt cttcctgtcc tgggtaaaaa cggtgcagaa 7500

tacccacttg aggctgagga tttggcgcag gcgctggctg gattcgtctc cgaatatggc 7560

ctgtccatgg tgggtggttg ttgtggcacc acacctgagc acatccgtgc ggtccgcgat 7620

gcggtggttg gtgttccaga gcaggaaacc tccacactga ccaagatccc tgcaggccct 7680

gttgagcagg cctcccgcga ggtggagaaa gaggactccg tcgcgtcgct gtacacctcg 7740

gtgccattgt cccaggaaac cggcatttcc atgatcggtg agcgcaccaa ctccaacggt 7800

tccaaggcat tccgtgaggc aatgctgtct ggcgattggg aaaagtgtgt ggatattgcc 7860

aagcagcaaa cccgcgatgg tgcacacatg ctggatcttt gtgtggatta cgtgggacga 7920

gacggcaccg ccgatatggc gaccttggca gcacttcttg ctaccagctc cactttgcca 7980

atcatgattg actccaccga gccagaggtt attcgcacag gccttgagca cttgggtgga 8040

cgaagcatcg ttaactccgt caactttgaa gacggcgatg gccctgagtc ccgctaccag 8100

cgcatcatga aactggtaaa gcagcacggt gcggccgtgg ttgcgctgac cattgatgag 8160

gaaggccagg cacgtaccgc tgagcacaag gtgcgcattg ctaaacgact gattgacgat 8220

atcaccggca gctacggcct ggatatcaaa gacatcgttg tggactgcct gaccttcccg 8280

atctctactg gccaggaaga aaccaggcga gatggcattg aaaccatcga agccatccgc 8340

gagctgaaga agctctaccc agaaatccac accaccctgg gtctgtccaa tatttccttc 8400

ggcctgaacc ctgctgcacg ccaggttctt aactctgtgt tcctcaatga gtgcattgag 8460

gctggtctgg actctgcgat tgcgcacagc tccaagattt tgccgatgaa ccgcattgat 8520

gatcgccagc gcgaagtggc gttggatatg gtctatgatc gccgcaccga ggattacgat 8580

ccgctgcagg aattcatgca gctgtttgag ggcgtttctg ctgccgatgc caaggatgct 8640

cgcgctgaac agctggccgc tatgcctttg tttgagcgtt tggcacagcg catcatcgac 8700

ggcgataaga atggccttga ggatgatctg gaagcaggca tgaaggagaa gtctcctatt 8760

gcgatcatca acgaggacct tctcaacggc atgaagaccg tgggtgagct gtttggttcc 8820

ggacagatgc agctgccatt cgtgctgcaa tcggcagaaa ccatgaaaac tgcggtggcc 8880

tatttggaac cgttcatgga agaggaagca gaagctaccg gatctgcgca ggcagagggc 8940

aagggcaaaa tcgtcgtggc caccgtcaag ggtgacgtgc acgatatcgg caagaacttg 9000

gtggacatca ttttgtccaa caacggttac gacgtggtga acttgggcat caagcagcca 9060

ctgtccgcca tgttggaagc agcggaagaa cacaaagcag acgtcatcgg catgtcggga 9120

cttcttgtga agtccaccgt ggtgatgaag gaaaaccttg aggagatgaa caacgccggc 9180

gcatccaatt acccagtcat tttgggtggc gctgcgctga cgcgtaccta cgtggaaaac 9240

gatctcaacg aggtgtacac cggtgaggtg tactacgccc gtgatgcttt cgagggcctg 9300

cgcctgatgg atgaggtgat ggcagaaaag cgtggtgaag gacttgatcc caactcacca 9360

gaagctattg agcaggcgaa gaagaaggcg gaacgtaagg ctcgtaatga gcgttcccgc 9420

aagattgccg cggagcgtaa agctaatgcg gctcccgtga ttgttccgga gcgttctgat 9480

gtctccaccg atactccaac cgcggcacca ccgttctggg gaacccgcat tgtcaagggt 9540

ctgcccttgg cggagttctt gggcaacctt gatgagcgcg ccttgttcat ggggcagtgg 9600

ggtctgaaat ccacccgcgg caacgagggt ccaagctatg aggatttggt ggaaactgaa 9660

ggccgaccac gcctgcgcta ctggctggat cgcctgaagt ctgagggcat tttggaccac 9720

gtggccttgg tgtatggcta cttcccagcg gtcgcggaag gcgatgacgt ggtgatcttg 9780

gaatccccgg atccacacgc agccgaacgc atgcgcttta gcttcccacg ccagcagcgc 9840

ggcaggttct tgtgcatcgc ggatttcatt cgcccacgcg agcaagctgt caaggacggc 9900

caagtggacg tcatgccatt ccagctggtc accatgggta atcctattgc tgatttcgcc 9960

aacgagttgt tcgcagccaa tgaataccgc gagtacttgg aagttcacgg catcggcgtg 10020

cagctcaccg aagcattggc cgagtactgg cactcccgag tgcgcagcga actcaagctg 10080

aacgacggtg gatctgtcgc tgattttgat ccagaagaca agaccaagtt cttcgacctg 10140

gattaccgcg gcgcccgctt ctcctttggt tacggttctt gccctgatct ggaagaccgc 10200

gcaaagctgg tggaattgct cgagccaggc cgtatcggcg tggagttgtc cgaggaactc 10260

cagctgcacc cagagcagtc cacagacgcg tttgtgctct accacccaga ggcaaagtac 10320

tttaacgtct aacacctttg agagggaaaa ctttcccgca cattgcagat cgtgccactt 10380

taactaaggt tgacggcatg attaaggcga ttttctggga catggacggc acgatggtgg 10440

actctgagcc acagtggggc attgctacct acgagctcag cgaagccatg ggccgccgcc 10500

tcaccccgga gctccgggaa ctcaccgtcg gctcgagcct gccgcgcacc atgcgcttat 10560

gcgcagagca cgcaggcatt acattgagcg acgcggacta cgagcgctac cgggctggca 10620

tgttcgcccg ggtccatgag cttttcgacg aatccctcgt cccaaatcca ggcgtcaccg 10680

aactcctgac agagttgaag gccctcgaga tccccatgtt ggtcaccacc aacacagagc 10740

gcgatctcgc gacccgttca gtcgcagccg tgggaaatga gttcttcatc ggttctatcg 10800

ctggtgatga agtcccaaca gcaaagccag cccccgacat gtacctcgaa gcagcacgac 10860

gtgtgggctt tgacccatca gagtgcctcg tgttcgaaga ttcctacaac ggcatgctgg 10920

gcgctgttac tgcaggttgc cgcgtcattg gtctgcaccc agaagaagtc caagcgccag 10980

aaggtgtagt gcctttgcgt tccctccacg gtaaaaactc tttcgaaggt gtcaccgctg 11040

agatggtcac tgcctggtac caccagatcg agccggcagg tgtcgcaaaa taaaaccagg 11100

tgggggagtg aaattattcg actaatatcc tcccccaaac acacattgat aactgttgtg 11160

tggaagaatg taccgagtga agacatttga ctcgctgtac gaagaacttc ttaaccgtgc 11220

tcagacccgc cctgaagggt ctggaaccgt ggccgccttg gataaaggca tccatcatct 11280

aggtaagaag gtcatcgaag aagccggaga ggtctggatt gcagccgagt at 11332

<210> 94
<211> 3311
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 94
ctcattccag cgtcacgacg ttccgaaggt actggttacc tggcattggg cactaccgtt 60

tctgcagcac ttggaccagc cctagcactt tttgtcctag gaacatttga ttacgacatg 120

ctgtttatcg tggtcttggc aacctcggtc atctctttga tcgccgtcgt gttcatgtac 180

tttaagacca gcgaccctga gccttctggg gaaccagcca agttcagctt caaatctatt 240

atgaacccaa agatcatccc catcggcatc tttatcttgc ttatttgctt tgcttactct 300

ggcgtcattg cctacatcaa cgcatttgct gaagaacgcg atctgattac gggtgctgga 360

ttgttcttca ttgcctacgc agtatcaatg tttgtgatgc gcagcttcct tggcaaactg 420

caggaccgtc gcggagacaa cgtcgttatt tactttggat tgttcttctt cgttatttcc 480

ttgacgattt tgtcctttgc cacttccaac tggcacgttg tgttgtccgg agtcattgca 540

ggtctgggat acggcacttt gatgccagca gtgcagtcca tcgctgttgg tgtagtagac 600

aaaaccgaat tcggtacggc cttctccact ttgttcctgt ttgtggactt aggttttggc 660

tttggaccta ttatcctggg agcagtttct gcggcaattg gtttcggacc tatgtatgca 720

gcactggcag gtgtgggtgt gattgccgga atcttctacc tgttcacaca cgctcgcacc 780

gatcgagcta agaatggctt tgttaaacac ccagagcctg tcgctttagt tagctagttc 840

tttcagcttt ccctcccgat cagcgtaaac cggcccttcc ggttttgggg tacatcacag 900

aacctgggct agcggtgtag acccgaaaat aaacgagcct tttgtcaggg ttaaggttta 960

ggtatctaag ctaaccaaac accaacaaaa ggctctaccc atgaagtcta ccggcaacat 1020

catcgctgac accatctgcc gcactgcgga actaggactc accatcaccg gcgcttccga 1080

tgcaggtgat tacaccctga tcgaagcaga cgcactcgac tacacctcca cctgcccaga 1140

atgctcccaa cctggggtgt ttcgtcatca cacccaccgg atgctcattg atttacccat 1200

cgtcgggttt cccaccaaac tgtttatccg tctacctcgc taccgctgca ccaaccccac 1260

atgtaagcaa aagtatttcc aagcagaact aagctgcgct gaccacggta aaaaggtcac 1320

ccaccgggtc acccgctgga ttttacaacg ccttgctatt gaccggatga gtgttcacgc 1380

aaccgcgaaa gcacttgggc tagggtggga tttaacctgc caactagccc tcgatatgtg 1440

ccgtgagctg gtctataacg atcctcacca tcttgatgga gtgtatgtca ttggggtgga 1500

tgagcataag tggtcacata atagggctaa gcatggtgat gggtttgtca ccgtgattgt 1560

cgatatgacc gggcatcggt atgactcacg gtgtcctgcc cggttattag atgtcgtccc 1620

aggtcgtagt gctgatgctt tacggtcctg gcttggctcc cgcggtgaac agttccgcaa 1680

tcagatacgg atcgtgtcca tggatggatt ccaaggctac gccacagcaa gtaaagaact 1740

cattccttct gctcgtcgcg tgatggatcc attccatgtt gtgcggcttg ctggtgacaa 1800

gctcaccgcc tgccggcaac gcctccagcg ggagaaatac cagcgtcgtg gtttaagcca 1860

ggatccgttg tataaaaacc ggaagacctt gttgaccacg cacaagtggt tgagtcctcg 1920

tcagcaagaa agcttggagc agttgtgggc gtatgacaaa gactacgggg cgttaaagct 1980

tgcgtggctt gcgtatcagg cgattattga ttgttatcag atgggtaata agcgtgaagc 2040

gaagaagaaa atgcggacca ttattgatca gcttcgggtg ttgaaggggc cgaataagga 2100

actcgcgcag ttgggtcgta gtttgtttaa acgacttggt gatgtgttgg cgtatttcga 2160

tgttggtgtc tccaacggtc cggtcgaagc gatcaacgga cggttggagc atttgcgtgg 2220

gattgctcta ggtttccgta atttgaacca ctacattctg cggtgcctta tccattcagg 2280

gcagttggtc cataagatca atgcactcta aaacaggaag agcccgtaaa cctctgacta 2340

gcgtcaccct ctgattaagg cgaccgcgga tttaagagca gaggctgcca cgagcgcatc 2400

ttcacggctg tgtgttgtac taaaagtaca gcgcacagcc gttcgtgctt gatcctcctc 2460

aagccccaac gccagcaaca catgggatac ctctccggaa ccacaggcag aaccagggga 2520

gcacacaatg ccttggcgtt ccaattccag aagaacagtt tcagatccta tgctgtcgaa 2580

gagaaaagat gcgtgtccat caatgcgcat cctaggatgt ccagtcaggt gtgctcccgg 2640

gatagtgaga acttcctcga tgaattcgcc aagatctgga taggattccg ccctggccaa 2700

ttccaaggca gtggcaaagg cgatagcccc cgcaacgttt tccgtgccac tacgccgccc 2760

tttttcctgg ccgccgccat ggattaccgg ctccagggga agctttgacc ataacactcc 2820

aatcccttta ggcgcaccga atttatgacc cgacaaactt aacgcgtcaa ctcccaagtc 2880

aaaggttaaa tgtgcagctt gcactgcatc ggtgtgaaaa ggcgtactgc ttaccgccgc 2940

caactcagct atcggctgaa tggttcccac ctcattgttg gcataaccaa tgctgatcaa 3000

tgtggtgtcc ggcctgactg ctttgcggag accctccggg gagatcagcc cagtgtgatc 3060

gggggatagg taggtgatct cgaaatcatg aaacctttca agataagcag cagtttctag 3120

gacactgtca tgctcgatcg gggtggtgat gaggtgccgg ccacgaggat tagctaagca 3180

cgctcctttg atagcgaggt tgttggcttc tgatccaccc gacgtaaacg tcacctgtgt 3240

ggggcgtcct ccgataatgc gggccacccg agttcgagca tcctccagcc ccgcagaggc 3300

gagtcttccc a 3311

<210> 95
<211> 1230
<212> ADN
<213> Chua biết

<220>
<223> polynucleotit

<400> 95
atgagcaaga cctctctcga caagagcaag atccgcttcc ttctgctgga aggcgtccac 60

cagaccgcac tggatacgct caaggctgcc ggctacacca acatcgagta cctgaccggc 120

tcgctgcccg aggaacagtt gaaagagaag atcgccgacg cccacttcat cggcatccgc 180

tcgcgcaccc aactgaccga ggaggtcttc gaccgcgcga agaagctggt cgcggtcggc 240

tgtttctgca tcggcaccaa ccaggtcgac ctggaggccg ctcgcgagcg cggcatcgcg 300

gtgttcaacg ccccctactc gaacacccgc tcggtggccg agctggtgct cgccgaggcg 360

atcctgctgc tgcgcggcat tcccgagaag aacgcggcca gccaccgcgg cggctggctg 420

aagagcgcca gcaactccta cgagatccgc ggcaagaagc tcggcatcat cggctatggc 480

tcgatcggta cccagctctc ggtgctggcc gaaagcctgg gcatgcaggt gctgttctac 540

gacgtggtga ccaagctgcc gctgggcaac gccgcccagg tgggcaacct ctacgacttg 600

ctcggccagg ccgacatcgt caccctgcac gtgccggaaa ccgccgcgac caagtggatg 660

atcggcgaga aggaaatccg cgccatgaag aaaggcgcca tcctgctcaa cgccgcccgc 720

ggcaccgtgg tggacatcga cgcgctggcc gccgccctcc gcgacaagca cctcaacggc 780

gcggccatcg acgtgttccc ggtggaaccg cgctccaaca acgacgagtt cgtcagcccg 840

ctgcgcgagt tcgacaacgt catcctcacc ccgcacgtcg gcggctcgac catggaggcc 900

caggccaaca tcggttcgga agtggccgag aagctggtca agtacagcga caacggcacc 960

tcggtgtcct cggtcaactt cccggaagtg gccctgccct cccacccggg caagcaccgc 1020

ctgctgcaca tccacaagaa catccccgga gtgatgagcg agatcaacaa ggtcttcgcc 1080

gagaacggca tcaacatttc cggccagttc ctgcagacca acgagacggt cggctacgtg 1140

gtgatcgatg tcgatgccga gtactcggaa atggccctgg agaaactgca gcaggtgaac 1200

ggcaccatcc gcagccgcgt gctgttctga 1230