



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0045013

(51)^{2020.01} C07K 14/195; C12P 13/22; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/70; C12P 13/04

(21) 1-2020-01500

(22) 25/07/2019

(86) PCT/KR2019/009295 25/07/2019

(87) WO 2020/111438 04/06/2020

(30) 10-2018-0151042 29/11/2018 KR

(45) 25/04/2025 445

(43) 27/09/2021 402A

(71) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) LEE, Seok Myung (KR); CHEONG, Ki Yong (KR); SEO, Chang Il (KR); LEE, Ji Sun (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BIẾN THỂ PROTEIN THỤ THỂ CAMP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA AXIT
AMIN DẠNG L BẰNG CÁCH SỬ DỤNG BIẾN THỂ PROTEIN NÀY

(21) 1-2020-01500

(57) Sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP, vi sinh vật chứa biến thể protein này và phương pháp tạo ra axit amin dạng L bằng cách sử dụng biến thể protein này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể protein thụ thể cAMP, vi sinh vật chứa biến thể protein này và phương pháp tạo ra axit amin dạng L bằng cách sử dụng biến thể protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CRP (protein thụ thể AMP dạng vòng), còn gọi là CAP (protein hoạt hoá chất dị hoá), là chất điều hoà phiên mã phổ biến nhất ở *E. coli*. CRP được đặc trưng bởi có cơ chế điều hoà phụ thuộc nguồn cacbon, được thể hiện bởi “sự ức chế dị hoá”. Cơ chế này được khởi động bởi nồng độ nội bào của AMP dạng vòng (từ đây được gọi là “cAMP”). Khi có mặt nguồn cacbon được ưu tiên như glucoza, hoạt tính của adenylat xyclaza bị ức chế để làm giảm lượng cAMP, và tín hiệu này ức chế sự biểu hiện của các gen dị hoá. Ngược lại, hoạt tính của adenylat xyclaza được gia tăng, và kết quả là ức chế các chất kìm hãm và khởi phát sự biểu hiện của các gen dị hoá. Ngoài ra, CRP được biết là đóng nhiều vai trò khác nhau như tải nạp tín hiệu nội bào thông qua cAMP, điều hoà thẩm thấu, đáp ứng đối với các tình huống khẩn cấp của tế bào, tạo màng sinh học, cố định nito, vận chuyển sắt, v.v..

Theo báo cáo, 418 gen của *E. coli* được biết là được điều hoà bởi CRP, nhưng các cơ chế tương ứng vẫn chưa được tiết lộ rõ ràng (J Biol Eng. (2009) 24;3:13). Với phạm vi rộng các khả năng điều hoà như vậy, CRP có tiềm năng thể hiện nhiều kiểu hình khác nhau bằng đột biến. Nhờ các ưu điểm của mình, CRP đã được nghiên cứu làm đích thích hợp để thiết kế lại các chủng ở mức độ tế bào, có thể áp dụng được cho nhiều môi trường khác nhau. Gần đây, nhiều thử nghiệm khác nhau đã được tiến hành, như phương pháp làm thay đổi sự biểu hiện của gen cần điều hoà bằng cách thay đổi mức độ liên kết ADN bởi sự biến đổi axit amin của CRP được chọn lọc bởi phương pháp tin sinh học (Nucleic Acids Research, (2009) 37: 2493-2503), phương pháp chọn lọc *E. coli* chịu được nhiệt, sự thẩm thấu, và nhiệt độ thấp bằng cách sử dụng yếu tố phiên mã nhân tạo (ATF) được tạo ra bằng cách dung hợp vị trí liên kết ADN ngón tay kẽm và CRP ((Nucleic Acids Research, (2008) 36: e102), v.v.. Nói cách khác, do các thay đổi về sự biểu hiện CRP thúc đẩy nhiều thay đổi về sự biểu hiện của gen xuôi dòng, CRP có thể trở thành công

cụ tốt giúp cho việc tạo ra vi sinh vật có các tính trạng hữu dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát triển biến thể protein mới bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, và họ đã phát hiện rằng biến thể protein này có thể làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hoá biến thể protein thụ thể cAMP.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vector chứa polynucleotit này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* chứa biến thể này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra axit amin dạng L, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* trong môi trường.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sử dụng biến thể hoặc vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* chứa biến thể này trong quá trình tạo ra axit amin dạng L.

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Khi vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra axit amin dạng L, vi sinh vật chứa biến thể protein thụ thể cAMP theo sáng chế, được nuôi cấy, có thể tạo ra axit amin dạng L với hiệu suất cao. Theo đó, theo các khía cạnh công nghiệp, có thể mong đợi sự giảm bớt chi phí sản xuất, cùng với sự thuận tiện trong sản xuất.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết như sau. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong bản mô tả cũng có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác. Điều này có nghĩa là toàn bộ các kết hợp của nhiều yếu tố khác nhau

được bộc lộ trong bản mô tả nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Nhằm đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. Cụ thể, sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, trong đó các thay thế axit amin này bao gồm thay thế glutamin cho axit amin ở vị trí 196 tính từ đầu tận cùng N. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm thay thế glutamin cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1.

Thuật ngữ “protein thụ thể cAMP (CRP)” được sử dụng trong bản mô tả là chất điều hoà phiên mã phổ biến nhất ở *E. coli*, và CRP còn được gọi là “chất điều hoà kép”, do bản thân CRP có cả hai chức năng của chất hoạt hoá và chất ức chế. CRP thường liên kết với trình tự ADN đối xứng có 22 bazơ ngược dòng trên gen cấu trúc để gây gập ADN, và CRP đóng vai trò là chất hoạt hoá bằng cách cho phép vị trí hoạt động thứ nhất ở đầu tận cùng C và vị trí hoạt động thứ hai ở đầu tận cùng N tương tác với ARN polymeraza chịu trách nhiệm phiên mã, và nó đóng vai trò là chất ức chế bằng cách chiếm trước vị trí nhằm ngăn không cho protein hoạt động liên kết với vị trí hoạt động hoặc bằng cách liên kết với protein hoạt động để chuyển hoá cấu trúc thành cấu trúc mà không liên kết với vị trí hoạt động. Protein thụ thể cAMP là protein thụ thể cAMP được mã hoá bởi gen *crp*.

“Protein thụ thể cAMP (protein thụ thể AMP dạng vòng, CRP)” theo sáng chế có thể được sử dụng thay thế với protein hoạt hoá chất dị hoá (CAP), protein CRP, protein CAP, v.v..

Theo sáng chế, trình tự CRP có thể thu được từ cơ sở dữ liệu GenBank đã biết tại NCBI. Ví dụ, CRP có thể là CRP có nguồn từ chi *Escherichia* (*Escherichia* sp.), và cụ thể hơn là polypeptit/protein chứa trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, trình tự có cùng hoạt tính như trình tự axit amin nêu trên có thể được bao gồm mà không bị giới hạn. Ngoài ra, trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc đồng nhất là 80% hoặc lớn hơn so với trình tự này có thể được bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, axit amin có thể bao gồm axit amin của SEQ ID NO: 1 và axit amin có độ tương đồng hoặc

đồng nhất là ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn so với SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, mà một phần của nó được xoá, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung, có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn sao trình tự axit amin này có độ tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên và thể hiện hiệu lực tương ứng với protein nêu trên.

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến polypeptit, trong đó một hoặc nhiều axit amin của polypeptit này khác với trình tự được nêu ở các thay thế bảo toàn và/hoặc sửa đổi, nhưng nó giữ được các chức năng hoặc đặc tính của protein. Polypeptit biến thể khác với trình tự đã xác định ở các thay thế, mất đoạn, hoặc bổ sung một số axit amin. Các biến thể này thường có thể được xác định bằng cách sửa đổi một trong số các trình tự polypeptit nêu trên và đánh giá đặc tính của polypeptit được sửa đổi. Nói cách khác, có thể làm tăng, không làm thay đổi hoặc làm giảm khả năng của biến thể so với khả năng của protein nguyên thể. Các biến thể này thường có thể được xác định bằng cách sửa đổi một trong số các trình tự polypeptit nêu trên và đánh giá tính phản ứng của polypeptit được sửa đổi. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể mà trong đó một hoặc nhiều phần, như trình tự dẫn đầu ở đầu tận cùng N hoặc miền xuyên màng đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm biến thể mà một phần của biến thể này đã được loại bỏ khỏi đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C của protein trưởng thành.

Thuật ngữ “thay thế bảo toàn” được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có đặc tính cấu trúc và/hoặc hoá học tương tự. Biến thể có thể có, ví dụ, một hoặc nhiều thay thế bảo toàn trong khi giữ được một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Thay thế axit amin này thường có thể được thực hiện trên cơ sở tương tự về độ phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc tính lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, axit amin mang điện tích dương (có tính kiềm) bao gồm arginin, lysin, và histidin; axit amin mang điện tích âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, prolin, glyxin và tryptophan.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm mất đoạn hoặc bổ sung axit amin mà có ảnh hưởng rất nhỏ đối với đặc tính và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu tận cùng N của protein, điều

khởi quá trình chuyển dịch protein đồng thời với dịch mã và sau dịch mã. Polypeptit còn có thể được liên hợp với trình tự khác hoặc chất liên kết để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit này.

Thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” được sử dụng trong bản mô tả là biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính của protein thụ thể cAMP, trong đó thay thế axit amin này bao gồm thay thế một axit amin khác cho axit amin ở vị trí 196 tính từ đầu tận cùng N. Cụ thể, biến thể có thể bao gồm biến thể protein, trong đó một axit amin khác được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính của protein thụ thể AMP. Ví dụ, biến thể protein có thể bao gồm biến thể protein trong đó sự biến đổi xảy ra ở vị trí 196 tính từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. Cụ thể hơn, biến thể protein có thể là protein trong đó một axit amin khác được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. “Một axit amin khác” này không bị giới hạn, miễn sao nó là axit amin khác L-leuxin, là axit amin ở vị trí 196. Cụ thể, biến thể này có thể là protein trong đó axit amin ura nước được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. Axit amin ura nước có thể là một axit amin trong số L-glutamin, L-serin, L-threonin, L-tyrosin, L-xystein và L-asparagin. Cụ thể hơn, biến thể có thể là protein mà trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, biến thể nghĩa là biến thể có sự biến đổi axit amin ở vị trí 196 tính từ đầu tận cùng N trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được mô tả ở trên và/hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc đồng nhất là ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn so với SEQ ID NO: 1.

Thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” được sử dụng trong bản mô tả có thể được sử dụng thay thế với protein CRP biến thể, biến thể CRP, protein thụ thể cAMP biến thể, protein CAP biến thể, biến thể CAP, protein hoạt hoá chất dị hoá biến thể, biến thể protein hoạt hoá chất dị hoá, v.v..

Đối với các mục đích của sáng chế, vi sinh vật chứa biến thể protein thụ thể cAMP được đặc trưng bởi có khả năng sản xuất axit amin dạng L cao so với vi sinh vật không chứa biến thể protein thụ thể cAMP. Biến thể CRP được đặc trưng bởi có hoạt tính điều

hoà gen nhằm làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L so với protein thụ thể cAMP kiểu đại nguyên thể hoặc không chứa biến thể. Điều này có ý nghĩa ở chỗ khả năng sản xuất axit amin dạng L có thể được gia tăng nhờ vi sinh vật được đưa biến thể CRP vào theo sáng chế. Cụ thể, axit amin dạng L có thể là L-threonin hoặc L-tryptophan. Tuy nhiên, axit amin dạng L bất kỳ có thể được bao gồm mà không bị giới hạn, miễn sao axit amin này có thể được tạo ra bằng cách đưa vào hoặc bao gồm protein thụ thể cAMP biến thể.

Biến thể protein thụ thể cAMP có thể, ví dụ, là biến thể chứa trình tự axit amin trong đó một axit amin khác được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, biến thể này gồm SEQ ID NO: 3. Biến thể trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1 có thể gồm SEQ ID NO: 3, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, biến thể CRP có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc đồng nhất là 80% hoặc lớn hơn so với trình tự này, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, biến thể CRP theo sáng chế có thể bao gồm protein có SEQ ID NO: 3 và protein có độ tương đồng hoặc đồng nhất là ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn so với trình tự này. Ngoài ra, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, mà một phần của nó được xoá, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung, ngoài trình tự axit amin ở vị trí 196, có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn sao trình tự axit amin này có độ tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên và thể hiện hiệu lực tương ứng với protein nêu trên.

Nói cách khác, mặc dù “protein có trình tự axit amin có SEQ ID NO cụ thể” được nêu trong bản mô tả, rõ ràng là protein có trình tự axit amin, mà một phần của nó được xoá, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo toàn, hoặc bổ sung, có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn sao nó có hoạt tính giống hệt hoặc tương ứng với hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn sao protein này có hoạt tính giống hệt hoặc tương ứng với hoạt tính của protein biến thể, không loại trừ sự bổ sung trình tự mà không làm thay đổi chức năng của protein trước và sau trình tự axit amin, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm hoặc thay thế bảo toàn của chúng. Rõ ràng là mặc dù protein này có bổ sung trình tự hoặc đột biến như vậy, nó vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “độ tương đồng” hoặc “độ đồng nhất” được sử dụng trong bản mô tả

có nghĩa là mức độ thích hợp giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho, và có thể được biểu diễn dưới dạng phần trăm.

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

Độ tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit được bảo toàn có thể được xác định bằng các thuật toán xếp thẳng hàng tiêu chuẩn, và có thể được sử dụng với điểm trừ khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai trong điều kiện nghiêm ngặt vừa phải hoặc cực kỳ nghiêm ngặt sao cho độ dài đầy đủ của trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc lớn hơn của độ dài đầy đủ có thể lai. Ngoài ra, polynucleotit được dự tính là chứa codon suy biến thay cho codon trong quá trình lai.

Việc hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ có độ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán máy tính đã biết như chương trình “FASTA”, sử dụng, ví dụ, các tham số mặc định như theo tài liệu Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444, hoặc được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản mới hơn) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, công cụ BLAST của cơ sở dữ liệu của Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information) hoặc ClustalW có thể được sử dụng để xác định độ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất.

Độ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP như tài liệu Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443, như được bộc lộ trong tài liệu Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Ngắn gọn lại, chương

trình GAP định nghĩa độ tương tự là số lượng ký hiệu được xếp thẳng hàng (tức là, nucleotit hoặc axit amin), mà giống nhau, chia cho tổng số lượng ký hiệu ở trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh đơn phân (chứa giá trị 1 biểu thị cho sự đồng nhất và giá trị 0 biểu thị cho sự không đồng nhất) và ma trận so sánh có trọng số theo tài liệu Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, như được bộc lộ trong tài liệu Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) điểm trừ 3,0 với mỗi khoảng trống và điểm trừ thêm 0,10 với mỗi ký hiệu ở mỗi khoảng trống (hoặc điểm trừ mở khoảng trống 10, điểm trừ kéo dài khoảng trống 0,5); và (3) không có điểm trừ với khoảng trống kết thúc. Do đó, thuật ngữ “độ tương đồng” hoặc “độ đồng nhất” được sử dụng trong bản mô tả thể hiện sự phù hợp giữa các trình tự.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hoá biến thể CRP, hoặc vectơ chứa polynucleotit này.

Thuật ngữ “polynucleotit” được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến sợi ADN hoặc ARN có độ dài định trước hoặc dài hơn, là polyme chuỗi dài của các nucleotit được tạo thành bằng cách liên kết các monome nucleotit thông qua liên kết cộng hoá trị. Cụ thể hơn, polynucleotit đề cập đến đoạn polynucleotit mã hoá protein biến thể.

Polynucleotit mã hoá biến thể CRP theo sáng chế có thể bao gồm trình tự polynucleotit bất kỳ mà không bị giới hạn, miễn sao nó là trình tự polynucleotit mã hoá biến thể protein thụ thể cAMP theo sáng chế. Polynucleotit mã hoá biến thể CRP có thể bao gồm trình tự bất kỳ mà không bị giới hạn, miễn sao nó là trình tự mã hoá protein biến thể trong đó một axit amin khác được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. Cụ thể, polynucleotit có thể là trình tự polynucleotit mã hoá biến thể trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1. Ví dụ, polynucleotit mã hoá biến thể CRP theo sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hoá trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, polynucleotit có thể gồm trình tự polynucleotit có SEQ ID NO: 4, nhưng không bị giới hạn ở đó. Trên polynucleotit này, có thể thực hiện nhiều cải biến khác nhau trên vùng mã hoá với điều kiện là các cải biến này không làm thay đổi trình tự axit amin của protein, do sự suy biến codon hoặc khi xem xét về codon được ưu

tiên bởi sinh vật mà protein sẽ được biểu hiện ở sinh vật này. Do đó, rõ ràng là, do sự suy biến codon, cũng có thể bao gồm polynucleotit mà có thể được dịch mã thành polypeptit gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3 hoặc polypeptit có độ tương đồng hoặc đồng nhất so với trình tự này.

Ngoài ra, đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự nucleotit đã biết, ví dụ, trình tự lai với trình tự bổ sung đến toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hoá biến thể CRP, trong đó một axit amin khác được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 còn có thể được bao gồm mà không bị giới hạn.

Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” nghĩa là điều kiện mà cho phép việc lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện này được mô tả chi tiết trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al., supra). Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt này có thể bao gồm, ví dụ, điều kiện mà các gen có độ tương đồng hoặc đồng nhất cao, độ tương đồng hoặc đồng nhất là 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, đặc biệt cụ thể là 99% hoặc cao hơn được lai với nhau và các gen có độ tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn độ tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên không được lai với nhau, hoặc điều kiện rửa thông thường của quá trình lai Southern, tức là rửa một lần, cụ thể là, hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể là, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Mặc dù có thể xảy ra sự không hợp đôi giữa các nucleotit do sự nghiêm ngặt của quá trình lai, hai axit nucleic cần phải có trình tự bổ sung. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của nucleotit mà có thể lai với nhau. Ví dụ, xét về ADN, adenosin bổ sung với thymin và xytosin bổ sung với guanin. Theo đó, sáng chế có thể bao gồm không chỉ các trình tự axit nucleic gần như giống nhau mà còn bao gồm các đoạn axit nucleic được phân lập mà bổ sung với toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai ở giá trị T_m 55°C và các điều kiện được mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C, nhưng không bị giới hạn ở các giá trị này, và có thể được kiểm soát một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực theo các mục đích.

Sự nghiêm ngặt thích hợp đối với quá trình lai polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các biến dị đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem tài liệu Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến cấu trúc ADN mà chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hoá protein biến thể đích được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự điều hoà thích hợp để cho phép biểu hiện protein biến thể đích ở tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hoà có thể bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng khởi đầu quá trình phiên mã, trình tự gen điều khiển bất kỳ dùng cho việc điều hoà quá trình phiên mã này, trình tự mã hoá liên kết ribosom của mRNA thích hợp, và trình tự điều hoà sự kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã. Sau khi vector được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, nó có thể sao chép hoặc thực hiện chức năng một cách độc lập với bộ gen vật chủ, và bản thân nó có thể được hợp nhất vào bộ gen này.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn sao nó có thể sao chép ở tế bào chủ, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Ví dụ về các vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmid, virus và thể thực khuẩn. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng làm vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmid. Về vector plasmid, kiểu pBR, kiểu pUC, kiểu pBluescriptII, kiểu pGEM, kiểu pTZ, kiểu pCL, và kiểu pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Ví dụ, polynucleotit mã hoá protein biến thể đích ở nhiễm sắc thể có thể được thay thế bởi polynucleotit đột biến bằng cách sử dụng vector để chèn vào nhiễm sắc thể nội bào. Việc chèn vào nhiễm sắc thể của polynucleotit này có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, phương pháp tái tổ hợp tương đồng, nhưng không bị giới hạn ở đó. Cũng có thể bao gồm gen đánh dấu chọn lọc để xác nhận sự chèn vào nhiễm sắc thể. Gen đánh dấu chọn lọc sẽ chọn các tế bào được biến nạp bằng vector, tức là xác nhận sự chèn polynucleotit mong muốn, và gen đánh dấu chọn lọc này có thể bao gồm gen đánh dấu tạo ra các kiểu hình chọn lọc được, như khả năng kháng thuốc, sự dinh dưỡng thụ động, khả năng kháng tác nhân gây độc tế bào hoặc sự biểu hiện của protein sửa đổi bề mặt. Do chỉ các tế bào biểu hiện gen đánh dấu chọn lọc là có thể sống sót hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý

bằng chất chọn lọc, có thể chọn các tế bào được biến nạp. Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất vi sinh vật tạo axit amin dạng L, vi sinh vật này chứa protein biến thể hoặc polynucleotit mã hoá protein biến thể. Cụ thể, vi sinh vật chứa protein biến thể và/hoặc polynucleotit mã hoá protein biến thể có thể là vi sinh vật được tạo ra bằng cách biến nạp bằng vector chứa polynucleotit mã hoá protein biến thể, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “biến nạp” được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là đưa vector chứa polynucleotit mã hoá protein đích vào tế bào chủ theo cách mà protein được mã hoá bởi polynucleotit này được biểu hiện ở tế bào chủ. Miễn sao polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện ở tế bào chủ, nó có thể được hợp nhất vào và đặt trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, hoặc nó có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể, hoặc bất luận trường hợp nào. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hoá protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới dạng bất kỳ, miễn sao nó có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện tự chủ của nó. Thông thường, catxet biểu hiện bao gồm trình tự khởi đầu được liên kết theo cách hoạt động được với polynucleotit, tín hiệu kết thúc quá trình phiên mã, vị trí liên kết ribosom và tín hiệu kết thúc quá trình dịch mã. Catxet biểu hiện có thể có dạng vector biểu hiện tự sao chép được. Ngoài ra, polynucleotit ở dạng nguyên trạng có thể được đưa vào tế bào chủ và được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện ở tế bào chủ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “được liên kết theo cách hoạt động được” được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự polynucleotit mã hoá protein biến thể mong muốn theo sáng chế và trình tự khởi đầu mà khởi đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã trình tự polynucleotit.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* (*Escherichia* sp.) chứa biến thể protein thụ thể cAMP.

Thuật ngữ “vi sinh vật chứa biến thể CRP” được sử dụng trong bản mô tả có thể đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để biểu hiện biến thể CRP theo sáng chế. Ví dụ, vi sinh vật này đề cập đến tế bào chủ hoặc vi sinh vật mà có thể biểu hiện biến thể bằng cách chứa polynucleotit mã hoá biến thể CRP hoặc bằng cách biến nạp bằng vector chứa

polynucleotit mã hoá biến thể CRP. Xét về các mục đích của sáng chế, vi sinh vật này là vi sinh vật biểu hiện biến thể protein thụ thể cAMP bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, và vi sinh vật này có thể là vi sinh vật biểu hiện protein biến thể có hoạt tính của protein thụ thể cAMP, trong đó thay thế axit amin là thay thế glutamin cho axit amin ở vị trí 196 tính từ đầu tận cùng N, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Vi sinh vật chứa biến thể CRP có thể là vi sinh vật bất kỳ, miễn sao nó chứa biến thể CRP để biểu hiện axit amin dạng L, ví dụ, L-threonin hoặc L-tryptophan, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, vi sinh vật chứa biến thể CRP có thể là vi sinh vật tái tổ hợp đã gia tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L, được tạo ra bằng cách biểu hiện biến thể CRP ở vi sinh vật kiểu đại tự nhiên hoặc ở vi sinh vật tạo axit amin dạng L. Vi sinh vật tái tổ hợp đã gia tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L có thể là vi sinh vật đã gia tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L so với vi sinh vật kiểu đại tự nhiên hoặc vi sinh vật không sửa đổi, trong đó axit amin dạng L có thể là L-threonin hoặc L-tryptophan, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “vi sinh vật tạo axit amin dạng L” được sử dụng trong bản mô tả bao gồm vi sinh vật kiểu đại hoặc vi sinh vật mà xảy ra các sửa đổi di truyền tự nhiên hoặc nhân tạo, và nó có thể là vi sinh vật có cơ chế bị suy yếu hoặc được tăng cường cụ thể do sự chèn gen ngoại lai hoặc do sự tăng cường hoặc sự bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, ở đó xảy ra biến dị di truyền hoặc hoạt tính được tăng cường để tạo ra axit amin dạng L mong muốn. Xét về các mục đích của sáng chế, vi sinh vật tạo axit amin dạng L có thể chứa protein biến thể đã được gia tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L mong muốn. Cụ thể, vi sinh vật tạo axit amin dạng L hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin dạng L theo sáng chế có thể là vi sinh vật mà ở đó một phần gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp axit amin dạng L được tăng cường hoặc làm suy yếu, hoặc một phần gen liên quan đến con đường suy thoái axit amin dạng L được tăng cường hoặc làm suy yếu.

“Vi sinh vật không sửa đổi” đề cập đến chủng tự nhiên ở dạng nguyên trạng, hoặc vi sinh vật không chứa biến thể CRP, hoặc vi sinh vật mà không được biến nạp bằng vector chứa polynucleotit mã hoá biến thể CRP. “Vi sinh vật” có thể bao gồm bất kỳ trong số các vi sinh vật không nhân và vi sinh vật nhân chuẩn, miễn sao nó có thể tạo ra axit amin dạng L. Ví dụ, vi sinh vật này có thể bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*,

chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium* và chi *Brevibacterium*. Cụ thể, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, và cụ thể hơn là *E. coli*, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra axit amin dạng L, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra axit amin dạng L và chứa biến thể protein thụ thể cAMP trong môi trường.

Các thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” và “axit amin dạng L” là giống như được mô tả ở trên.

Theo phương pháp này, bước nuôi cấy vi sinh vật có thể, nhưng không bị giới hạn cụ thể, được thực hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy bổ sung theo mẻ, v.v.. Xét về việc này, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng độ pH tối ưu (ví dụ, độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9, cụ thể là độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và cụ thể nhất là độ pH = 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric). Ngoài ra, các điều kiện ưa khí có thể được duy trì bằng cách đưa oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào quá trình nuôi cấy tế bào. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là trong khoảng từ 25°C đến 40°C. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng 10 giờ đến khoảng 160 giờ, nhưng không bị giới hạn ở đó. Axit amin dạng L được tạo ra bởi quá trình nuôi cấy nêu trên có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể vẫn còn bên trong tế bào.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy cần được sử dụng có thể bao gồm đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, rỉ đường, tinh bột và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu lạc và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic) làm nguồn cacbon riêng lẻ hoặc theo cách kết hợp, nhưng không bị giới hạn ở đó. Về nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, phần chiết nấm men, canh thịt, phần chiết mạch nha, dịch chiết ngô ngâm, bột đậu nành và ure), hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat) có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc theo cách kết hợp, nhưng không bị giới hạn ở đó. Về nguồn phospho, dikali hydro phosphat, kali

dihydro phosphat và các muối natri tương ứng của chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc theo cách kết hợp, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường có thể bao gồm các chất kích thích tăng trưởng thiết yếu bao gồm các muối kim loại khác (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin và vitamin.

Phương pháp này còn có thể bao gồm bước thu gom axit amin dạng L từ vi sinh vật hoặc môi trường.

Phương pháp thu gom axit amin dạng L được tạo ra trong bước nuôi cấy theo sáng chế có thể thu gom axit amin dạng L mong muốn từ canh nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, kỹ thuật ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., có thể được sử dụng, và axit amin dạng L mong muốn có thể được thu gom từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực.

Ngoài ra, bước thu gom có thể bao gồm quá trình tinh chế, và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực. Do đó, axit amin dạng L cần được thu gom có thể ở dạng đã tinh chế hoặc canh lên men của vi sinh vật chứa axit amin dạng L (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng biến thể protein thụ thể cAMP trong quá trình tạo ra axit amin dạng L, biến thể protein thụ thể cAMP này bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* trong quá trình tạo ra axit amin dạng L, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* này chứa biến thể protein thụ thể cAMP.

Thuật ngữ “biến thể protein thụ thể cAMP” và “axit amin dạng L” là giống như được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn qua tham khảo các ví dụ. Tuy nhiên, rõ ràng là đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không được dự tính là sẽ bị giới hạn ở các

ví dụ này.

Ví dụ 1. Tạo ra vectơ tái tổ hợp pCC1BAC-*crp*

1-1. Tạo ra đoạn gen *crp*

Để thu được đoạn ADN khoảng 0,96 kb có SEQ ID NO: 5 bao gồm gen *crp* và vùng điều hoà biểu hiện, ADN bộ gen (gADN) của *E. coli* kiểu đại W3110 được chiết tách bằng cách sử dụng hệ thống Genomic-tip của Qiagen (công ty), và PCR (phản ứng chuỗi polymeraza) được thực hiện bằng cách sử dụng gADN làm khuôn mẫu và kit trộn trước PCR HL (được sản xuất bởi BIONEER Co., áp dụng tương tự từ đây). PCR để khuếch đại đoạn gen *crp* được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi có các SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 với 27 chu kỳ bao gồm bước làm biến tính ở 95°C trong 30 giây, bước ủ ở 56°C trong 30 giây, và bước kéo dài ở 72°C trong 2 phút.

Sản phẩm PCR được tiêu hóa bằng *EcoR* I, và quá trình điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được đoạn ADN 0,96 Kb (từ đây được gọi là “đoạn *crp*”).

Bảng 1

SEQ ID NO:	Tên của đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
6	<i>crp</i> -F	CACGAATTCTTTGCTACTCCACTGCGTCA
7	<i>crp</i> -R	ACACGAATTCTTAACGAGTGCCGTAAACG

1-2. Tạo ra vectơ tái tổ hợp pCC1BAC-*crp*

Vectơ pCC1BAC Copycontrol (EPICENTRE, Hoa Kỳ) được xử lý bằng *EcoR* I, và quá trình điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được sản phẩm, mà sau đó được nối với đoạn *crp* thu được ở Ví dụ 1-1, từ đó tạo ra plasmit pCC1BAC-*crp*.

Ví dụ 2. Tạo ra thư viện vectơ tái tổ hợp pCC1BAC-biến thể *crp*

2-1. Tạo ra đoạn *crp* đột biến bằng kỹ thuật PCR có xu hướng tạo lỗi (error-prone PCR)

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *E. coli* kiểu đại W3110 làm khuôn mẫu và kit gây đột biến ngẫu nhiên dựa trên PCR Diversify (diversify PCR random mutagenesis kit) (catalog #: K1830-1, Bảng III, các phản ứng gây đột biến 4) của clonotech. Một cách chi tiết, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi

có SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 như được sử dụng ở Ví dụ 1-1 với 27 chu kỳ bao gồm bước làm biến tính ở 94°C trong 30 giây và bước kéo dài ở 68°C trong 1 phút.

Sản phẩm PCR được tiêu hoá bằng *EcoR* I, và quá trình điện di trên gel agarosa 0,8% và rửa giải được thực hiện để thu được đoạn *crp* đột biến 0,96 Kb (từ đây được gọi là “đoạn *crp^m*”).

2-2. Tạo ra thư viện vector tái tổ hợp pCC1BAC-biến thể *crp*

Vector pCC1BAC được xử lý bằng enzym giới hạn *EcoR* I, và sau đó được xử lý bằng phosphatase kiềm (NEB). Vector tạo thành được nối với đoạn *crp^m* thu được ở Ví dụ 2-1, và sản phẩm nối được biến nạp vào *E. Coli* điện khả biến (Electrocompetent) TransforMax EPI300 (EPICENTRE, Hoa Kỳ) bằng kỹ thuật điện di. Chúng đã biến nạp được nuôi cấy trên môi trường rắn LB (15 ug/ml) chứa cloramphenicol để chọn lọc các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thu được từ đó được thu gom và được sử dụng để tạo ra plasmit, từ đó tạo ra thư viện pCC1BAC-*crp^m*.

Ví dụ 3. Đưa thư viện biến thể *crp* vào chủng tạo threonin và chọn lọc chủng có cải thiện về sinh trưởng

3-1. Đưa thư viện pCC1BAC-*crp^m* vào chủng tạo threonin

Thư viện pCC1BAC-*crp^m* thu được ở Ví dụ 2 được biến nạp vào tế bào điện khả biến KCCM10541, là vi sinh vật tạo threonin bằng kỹ thuật xung điện. *E. coli* KCCM10541 (Patent Hàn Quốc số 10-0576342) được sử dụng ở ví dụ này là *E. coli* được tạo ra bằng cách bất hoạt gen *galR* ở *E. coli* tạo L-threonin KFCC10718 (Patent Hàn Quốc số 10-0058286).

Là nhóm đối chứng của vi sinh vật được đưa thư viện pCC1BAC-*crp^m* vào, pCC1BAC-*crp* được biến nạp vào KCCM10541 theo cùng cách thức như trên để tạo ra KCCM10541/pCC1BAC-*crp*(WT).

3-2. So sánh tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật tái tổ hợp

Môi trường tối thiểu M9 chứa glucoza 1% và phần chiết nấm men là 0,2 g/L được phân phối vào vi đĩa giếng sâu, và sau đó thể biến nạp và chủng đối chứng được tạo ra ở Ví dụ 3-1 lần lượt được gieo vào đó. Các chủng này được nuôi cấy bằng cách sử dụng máy lắc ủ ở nhiệt độ không đổi cỡ micro (TAITEC, Nhật Bản) trong các điều kiện nhiệt độ 37°C và tốc độ 200 vòng/phút bằng phương pháp sàng lọc thông lượng cao (HTS:

High Throughput Screening) trong 20 giờ, và chúng có cải thiện về sinh trưởng được chọn. Trong số các chủng này, một loại chủng được chọn cuối cùng (Bảng 2).

Chủng KCCM10541 được đưa gen *crp* kiểu dại vào thể hiện sự tăng nhẹ về giá trị OD do đưa thêm *crp* vào, trong khi đó thể biến nạp có cải thiện về sinh trưởng thể hiện giá trị OD cao sau cùng một thời gian nuôi cấy so với chủng được đưa *crp* kiểu dại vào. Ngoài ra, biến thể *crp* đã chọn được thực hiện quy trình chiết tách ADN plasmit (plasmid mini-prep), sau đó là bước phân tích giải trình tự. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2. Thông tin về thể biến nạp có cải thiện về sinh trưởng sau khi đưa thư viện *crp^m* vào chủng tạo threonin

Chủng	OD600	Biến đổi
KCCM10541/pCC1BAC	2,3	-
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	2,8	-
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crp</i> TM9	3,5	L196Q

3-3. So sánh độ chuẩn threonin của vi sinh vật tái tổ hợp

Để đo độ chuẩn threonin của vi sinh vật tái tổ hợp được chọn ở Ví dụ 3-2, vi sinh vật tái tổ hợp này được nuôi cấy trong môi trường chuẩn độ threonin được điều chế theo thành phần trong Bảng 3 sau đây để kiểm tra sự cải thiện khả năng sản xuất L-threonin.

Bảng 3. Thành phần của môi trường chuẩn độ threonin

Thành phần	Nồng độ (theo lít)
Glucosa	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
Phân chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Về chi tiết, mỗi một vòng bạch kim chứa *E. coli* KCCM10541/pCC1BAC-

crp(WT) và *E. coli* KCCM10541/pCC1BAC-*crpTM9* được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 33°C lần lượt được cấy trong 25 mL môi trường chuẩn độ theo Bảng 3, và sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 33°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ để so sánh các tốc độ tiêu thụ đường và các nồng độ threonin.

Kết quả là như được mô tả trong Bảng 4 sau đây, chủng KCCM10541/pCC1BAC-*crp(WT)* làm nhóm đối chứng cho thấy mức tiêu thụ đường là 26,1 g/L tại thời điểm 24 giờ, trong khi đó chủng được đưa *crpTM9* đột biến vào cho thấy sự cải thiện về tốc độ tiêu thụ đường lần lượt khoảng 16% và 11% so với chủng gốc và chủng được đưa *crp* kiểu dại vào.

Ngoài ra, khi được nuôi cấy trong 48 giờ, chủng được đưa *crp* kiểu dại vào cho thấy khả năng sản xuất L-threonin là 29,0 g/L, trong khi đó khả năng sản xuất L-threonin của chủng đột biến thu được ở trên được tăng lên đến 30,8 g/L mặc dù tốc độ nuôi cấy được gia tăng, cho thấy sự cải thiện về nồng độ lần lượt khoảng 7% và 6% so với chủng gốc và chủng được đưa *crp* kiểu dại vào.

Do việc đưa biến thể *crp* vào làm tăng hiệu suất và tiêu thụ đường của chủng này, đây dường như là tính trạng biến thể tốt, có thể đóng góp lớn cho việc cải thiện hiệu quả sản xuất trong quá trình lên men.

Bảng 4. So sánh độ chuẩn của chủng threonin chứa biến thể *crp*

Chủng	Mức tiêu thụ đường (g/L)*	Threonin (g/L)**
KCCM10541/pCC1BAC	25,0	28,8
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crp(WT)</i>	26,1	29,0
KCCM10541/pCC1BAC- <i>crpTM9</i>	29,0	30,8

* Giá trị được đo tại 24 giờ

* Giá trị được đo tại 48 giờ

Ví dụ 4. Đưa pCC1BAC-biến thể *crpTM9* vào chủng tạo tryptophan

4-1. Đưa pCC1BAC-*crpTM9* vào chủng sàng lọc

pCC1BAC-*crpTM9* thu được ở Ví dụ 3 được biến nạp vào tế bào điện khả biến thuộc chủng tạo tryptophan KCCM11166P bằng kỹ thuật xung điện. KCCM11166P được sử dụng ở ví dụ này là *E. coli* tạo L-tryptophan trong đó gen *tebB* được xóa và hoạt

tính của NAD kinaza được tăng cường (Patent Hàn Quốc số 10-1261147).

Là nhóm đối chứng của vi sinh vật được đưa pCC1BAC-*crp*^{TM9} vào, pCC1BAC-*crp*(*WT*) được biến nạp vào KCCM11166P theo cùng cách thức như ở trên để tạo ra KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*(*WT*).

4-2. So sánh tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật tái tổ hợp

Môi trường tối thiểu M9 chứa glucoza 1% và phần chiết nấm men là 0,2 g/L được phân phối vào vi đĩa giếng sâu, và sau đó thể biến nạp và chủng đối chứng được tạo ra như ở Ví dụ 4-1 lần lượt được gieo vào đó. Các chủng này được nuôi cấy bằng cách sử dụng máy lắc ủ ở nhiệt độ không đổi cỡ micro (TAITEC, Nhật Bản) trong điều kiện 37°C và tốc độ 200 vòng/phút bằng phương pháp sàng lọc thông lượng cao (HTS) trong 16 giờ để xác nhận sự cải thiện về sinh trưởng của thể biến nạp KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*^{TM9} (Bảng 5).

Chủng KCCM11166P được đưa gen *crp* kiểu dại vào thể hiện mức OD tương đương do việc đưa *crp* bổ sung vào sau cùng một thời gian nuôi cấy, trong khi đó thể biến nạp có cải thiện về sinh trưởng thể hiện giá trị OD cao so với *crp* kiểu dại.

Bảng 5. Thông tin về thể biến nạp có cải thiện về sinh trưởng sau khi đưa *crp*^{TM9} vào chủng tạo tryptophan

Chủng	OD600	Biến đổi
KCCM11166P/pCC1BAC	3,4	-
KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> (<i>WT</i>)	3,5	-
KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> ^{TM9}	3,7	L196Q

4-3. So sánh độ chuẩn tryptophan của vi sinh vật tái tổ hợp

Để đo độ chuẩn tryptophan của vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra ở Ví dụ 4-2, vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường chuẩn độ tryptophan được điều chế như theo thành phần trong Bảng 6 sau đây để kiểm tra sự cải thiện về khả năng sản xuất L-tryptophan.

Bảng 6. Thành phần của môi trường chuẩn độ tryptophan

Thành phần	Nồng độ (theo lít)
Glucoza	60 g

K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Natri xitrat	5 g
Phản chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	40 g
Natri xitrat	5 g
Phenyl alanin	0,15 g
Tyrosin	0,1 g
Độ pH	6,8

Về chi tiết, mỗi một vòng bạch kim chứa *E. coli* KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*(WT) và *E. coli* KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*TM9 được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 37°C lần lượt được cấy trong 25 mL môi trường chuẩn độ theo Bảng 6, và sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ để so sánh các tốc độ tiêu thụ đường và các nồng độ tryptophan.

Kết quả là như được mô tả trong Bảng 7 sau đây, chủng KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*(WT) làm nhóm đối chứng cho thấy mức tiêu thụ đường là 30,2 g/L tại thời điểm 22 giờ, trong khi đó chủng được đưa *crp*TM9 đột biến vào cho thấy sự cải thiện về tốc độ tiêu thụ đường lần lượt khoảng 7% và 6% so với chủng gốc và chủng được đưa *crp* kiểu dại vào.

Khi được nuôi cấy trong 48 giờ, chủng được đưa *crp* kiểu dại vào cho thấy khả năng sản xuất L-tryptophan là 8,4 g/L, trong khi đó khả năng sản xuất L-tryptophan của chủng đột biến thu được ở trên được tăng lên đến 9,1 g/L mặc dù tốc độ nuôi cấy được gia tăng, cho thấy sự cải thiện về nồng độ lần lượt khoảng 8% và 10% so với chủng gốc và chủng được đưa *crp* kiểu dại vào.

Do việc đưa biến thể *crp* vào làm tăng mức độ tiêu thụ đường của chủng và hiệu suất, đây dường như là tính trạng biến thể tốt, có thể đóng góp lớn cho việc cải thiện hiệu quả sản xuất trong quá trình lên men.

Bảng 7. So sánh độ chuẩn của chủng tryptophan chứa biến thể *crp*

Chủng	Mức tiêu thụ	Tryptophan
-------	--------------	------------

	đường (g/L)*	(g/L)**
KCCM11166P/pCC1BAC	29,0	8,2
KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	30,2	8,4
KCCM11166P/pCC1BAC- <i>crp</i> TM9	32,1	9,1

* Giá trị được đo tại 22 giờ

* Giá trị được đo tại 48 giờ

Ví dụ 5. Đưa vector nội sinh biến thể *crp* hữu hiệu vào *E. coli* kiểu dại

5-1. Đưa pCC1BAC-biến thể *crp* hữu hiệu vào chủng tạo threonin có nguồn từ kiểu dại

Để kiểm tra xem vector chứa biến thể *crp* được sàng lọc ở Ví dụ 3 cũng thể hiện tác dụng tương đương ở chủng kiểu dại hay không, vector pCC1BAC-*crp*(WT) hoặc pCC1BAC-*crp*TM9 lần lượt được biến nạp vào chủng có nguồn từ kiểu dại có khả năng tạo ra threonin bằng kỹ thuật xung điện. Ngoài ra, chủng được đưa pCC1BAC-*crp*(WT) vào được tạo ra làm nhóm đối chứng.

Chủng có nguồn từ kiểu dại có khả năng tạo ra threonin được sử dụng ở ví dụ này là W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC. W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC là chủng mà trong đó trình tự khởi đầu nguyên thể của gen *ppc* mã hoá phosphoenolpyruvat carboxylaza trên nhiễm sắc thể được thay thế bằng trình tự khởi đầu của gen *cysK*, và gen operon thực hiện sinh tổng hợp threonin được đưa vào dưới dạng vector nhằm làm tăng số lượng bản sao, nhờ đó gia tăng khả năng sản xuất threonin. Về chi tiết, chủng W3110::PcysK-ppc được tạo ra bằng cách sử dụng pUCpccKmxP theo cùng cách thức được mô tả trong Patent Hàn Quốc số 10-0966324, và pACYC184-thrABC (Patent Hàn Quốc số 10-1865998) được biến nạp vào chủng này bằng kỹ thuật xung điện.

Các chủng tạo ra được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm threonin được chuẩn bị theo thành phần trong Bảng 8 sau đây, và tỷ lệ sinh trưởng và khả năng sản xuất L-threonin của các chủng này được so sánh với nhau.

Bảng 8. Thành phần của môi trường thử nghiệm threonin

Thành phần	Nồng độ (theo lít)
Glucose	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g

(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
DL-methionin	0,15 g
Phần chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Về chi tiết, mỗi một vòng bạch kim chứa W3110 và chủng tương ứng được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 33°C được cấy vào 25 mL môi trường chuẩn độ theo Bảng 8 một cách tương ứng, và sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 33°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Kết quả của chúng được thể hiện trong Bảng 9 sau đây. Như được thể hiện ở các kết quả sau đây, protein biến thể được chọn theo sáng chế cũng có thể tạo ra threonin một cách hiệu quả với hiệu suất cao ở chủng kiểu dại.

Bảng 9. Kết quả thử nghiệm về sự sinh trưởng và khả năng sản xuất threonin của chủng có nguồn từ kiểu dại

Chủng	OD	Threonin (g/L)**
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC	10,8	1,5
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	11,0	1,6
W3110::PcysK-ppc/pACYC184-thrABC/pCC1BAC- <i>crp</i> TM9	13,0	2,4

5-2. Đưa pCC1BAC-biến thể *crp* hữu hiệu vào chủng tạo tryptophan có nguồn từ kiểu dại

Để kiểm tra xem vector chứa biến thể *crp* được sàng lọc ở Ví dụ 4 cũng thể hiện tác dụng tương đương ở chủng kiểu dại hay không, vector pCC1BAC-*crp*(WT) hoặc pCC1BAC-*crp*TM9 lần lượt được biến nạp vào chủng có nguồn từ kiểu dại có khả năng tạo tryptophan.

Chủng có nguồn từ kiểu dại có khả năng tạo ra tryptophan được sử dụng ở ví dụ

này là W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA. W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA là chủng được đưa vector vào trong đó cơ chế điều hoà của vùng điều hoà operon tryptophan được giải phóng và sự biểu hiện operon tryptophan được tăng cường để biểu hiện quá mức tryptophan (Patent Hàn Quốc số 10-1532129). Các chủng được đưa vector vào này được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm tryptophan được điều chế theo thành phần trong Bảng 10 sau đây, và khả năng sản xuất L-tryptophan của chúng được so sánh với nhau.

Bảng 10. Thành phần của môi trường thử nghiệm tryptophan

Thành phần	Nồng độ (theo lít)
Glucosa	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12 g
NaCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	15 mg
CuSO ₄ ·H ₂ O	3 mg
ZnSO ₄ ·H ₂ O	30 mg
Natri xitrat	1 g
Phần chiết nấm men	1 g
Phenyl alanin	0,15 g
Độ pH	6,8

Về chi tiết, mỗi một vòng bạch kim chứa chủng được nuôi cấy qua đêm trên môi trường rắn LB trong thiết bị ủ ở 37°C lần lượt được cấy vào 25 mL môi trường thử nghiệm theo Bảng 9 và sau đó được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Giá trị OD và nồng độ tryptophan được so sánh và thể hiện trong Bảng 11. Như được thể hiện ở các kết quả sau đây, protein biến thể được chọn theo sáng chế cũng có thể tạo ra tryptophan một cách hiệu quả với hiệu suất cao ở chủng kiểu dại.

Bảng 11. Kết quả thử nghiệm về sự sinh trưởng và khả năng sản xuất tryptophan của chủng có nguồn từ kiểu dại

Chủng	OD	Tryptophan (g/L)**
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC	10,8	0,5
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC- <i>crp</i> (WT)	11,0	0,6
W3110 trp Δ 2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA/pCC1BAC- <i>crp</i> TM9	12,3	0,8

Các tác giả sáng chế chỉ định chủng dựa trên KCCM11166P, được đưa pCC1BAC-*crp*TM9 vào có khả năng sản xuất tryptophan và tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện (KCCM11166P/pCC1BAC-*crp*TM9) là “CA04-2808”, và sau đó nộp lưu chủng này ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) là cơ quan có thẩm quyền nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest ngày 07/11/2018 với số đăng ký KCCM12374P.

Các kết quả này chỉ ra rằng tốc độ tiêu thụ đường đã được cải thiện và khả năng sản xuất axit amin dạng L được gia tăng ở vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* được đưa biến thể *crp* vào theo sáng chế, và kết quả là khả năng sản xuất axit amin dạng L được gia tăng so với chủng không sửa đổi.

Dựa vào phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện theo một dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi ý đồ kỹ thuật hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, cần phải hiểu rằng phương án nêu trên không mang tính giới hạn, mà mang tính minh họa theo tất cả các khía cạnh. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ đi kèm thay vì bằng phần mô tả trước đó, và do đó tất cả các thay đổi và cải biến mà nằm trong giới hạn và phạm vi của các yêu cầu bảo hộ này, hoặc tương đương của giới hạn và phạm vi như vậy được dự tính là được bao hàm bởi các yêu cầu bảo hộ này.

Số đăng ký

Tên cơ quan nộp lưu: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms) (Cơ quan có thẩm quyền nộp lưu quốc tế)

Số nộp lưu: KCCM12374P

Ngày nộp lưu: 07/11/2018

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể protein thụ thể cAMP, trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1.
2. Polynucleotit mã hoá biến thể protein thụ thể cAMP theo điểm 1.
3. Vector chứa polynucleotit mã hoá biến thể protein thụ thể cAMP theo điểm 1.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* (*Escherichia* sp.) chứa biến thể protein thụ thể cAMP, trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1.
5. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* này là *E. coli*.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* này tạo ra axit amin dạng L.
7. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 6, trong đó axit amin dạng L là L-threonin hoặc L-tryptophan.
8. Phương pháp tạo ra axit amin dạng L, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* trong môi trường, vi sinh vật này chứa biến thể protein thụ thể cAMP, trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu gom axit amin dạng L từ vi sinh vật hoặc môi trường.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó axit amin dạng L là L-threonin hoặc L-tryptophan.
11. Phương pháp sử dụng biến thể protein thụ thể cAMP, trong đó glutamin được thay thế cho axit amin ở vị trí 196 trên trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, hoặc vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* chứa biến thể trong quá trình tạo ra axit amin dạng L.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Biến thể protein thụ thể cAMP và phương pháp tạo ra axit amin dạng L bằng cách sử dụng biến thể protein thụ thể này

<130> OPA19121-PCT

<150> KR 10-2018-0151042

<151> 2018-11-29

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 210

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> CRP

<400> 1

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

115 120 125
 Ser Glu Lys Val Gly Asn Leu Ala Phe Leu Asp Val Thr Gly Arg Ile
 130 135 140
 Ala Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Lys Gln Pro Asp Ala Met Thr His
 145 150 155 160
 Pro Asp Gly Met Gln Ile Lys Ile Thr Arg Gln Glu Ile Gly Gln Ile
 165 170 175
 Val Gly Cys Ser Arg Glu Thr Val Gly Arg Ile Leu Lys Met Leu Glu
 180 185 190
 Asp Gln Asn Leu Ile Ser Ala His Gly Lys Thr Ile Val Val Tyr Gly
 195 200 205

Thr Arg

210

<210> 2

<211> 633

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> crp

<400> 2

atgggtgcttg gcaaaccgca aacagaccog actctcgaat gggtcttggtc tcattgccac 60
 attcataagt acccatccaa gagcaagctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg 120
 tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg 180
 atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaaac tgggcctggt tgaagagggc 240
 caggaacgta ggcgatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac 300
 aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac ccggacattc tgatgcgttt gtctgcacag 360
 atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggt cctcgacgtg 420
 acgggcccga ttgcacagac tctgtgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac 480
 ccggacggta tgcaaatcaa aattaccogt caggaaattg gtcagattgt cggctgttct 540
 cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac 600
 ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa 633

<210> 3

<211> 210

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> CRP được sửa đổi

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 633

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> crp được sửa đổi

<400> 4

```

atgggtgcttg gcaaaccgca aacagaccog actctcgaat ggttcttgtc tcattgccac      60
attcataagt accatccaa gagcaagctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg      120

```

tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg 180
 atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaac tgggcctggt tgaagagggc 240
 caggaacgta ggcgatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac 300
 aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac cgggacattc tgatgcgttt gtctgcacag 360
 atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggt cctcgacgtg 420
 acggggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac 480
 ccggacggta tgcaaatcaa aattaccctg caggaaattg gtcagattgt cggctgttct 540
 cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaaccagat ctccgcacac 600
 ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa 633

<210> 5

<211> 933

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> crp và vùng điều khiển biểu hiện

<400> 5

tttctactc cactgcgtca attttcctga cagagtacgc gtactaacca aatcgcgcaa 60
 cggaaggcga cctgggtcat gctgaagcga gacaccagga gacacaaagc gaaagctatg 120
 ctaaaacagt caggatgcta cagtaataca ttgatgtact gcatgtatgc aaaggacgtc 180
 acattaccgt gcagtacagt tgatagcccc ttcccaggta gcgggaagca tatttcggca 240
 atccagagac agcggcggtta tctggctctg gagaaagctt ataacagagg ataaccgcgc 300
 atggtgcttg gcaaaccgca aacagaccctg actctcgaat ggttcttgto tcattgccac 360
 attcataagt acccatccaa gagcaagctt attcaccagg gtgaaaaagc ggaaacgctg 420
 tactacatcg ttaaaggctc tgtggcagtg ctgatcaaag acgaagaggg taaagaaatg 480
 atcctctcct atctgaatca ggggtgatttt attggcgaac tgggcctggt tgaagagggc 540
 caggaacgta ggcgatgggt acgtgcgaaa accgcctgtg aagtggctga aatttcgtac 600
 aaaaaatttc gccaatgat tcaggtaaac cgggacattc tgatgcgttt gtctgcacag 660
 atggcgcgtc gtctgcaagt cacttcagag aaagtgggca acctggcggt cctcgacgtg 720
 acggggccgca ttgcacagac tctgctgaat ctggcaaaac aaccagacgc tatgactcac 780
 ccggacggta tgcaaatcaa aattaccctg caggaaattg gtcagattgt cggctgttct 840
 cgtgaaaccg tgggacgcat tctgaagatg ctggaagatc agaacctgat ctccgcacac 900
 ggtaaaacca tcgtcgttta cggcactcgt taa 933

<210> 6

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> crp-F
<400> 6
cacgaattct ttgctactcc actgcbtca 29
<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> crp-R
<400> 7
acacgaattc ttaacgagtg ccgtaaacg 29