



(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)



1-0045882

(51)^{2020.01} C12N 9/00; C12N 15/09; C12P 21/04;
C12P 19/00; C12P 21/02; C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2020-05533

(22) 25/03/2019

(86) PCT/JP2019/012505 25/03/2019

(87) WO 2019/188980 03/10/2019

(30) 2018-057616 26/03/2018 JP

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/03/2021 396A

(73) TORAY INDUSTRIES, INC. (JP)

1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038666, Japan

(72) KAGAWA, Yusuke (JP); SAITO, Haruka (JP); HIRAMATSU, Shingo (JP);
YAMADA, Katsushige (JP).

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

(54) CHỨNG ĐỘT BIẾN TRICHODERMA REESEI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
PROTEIN SỬ DỤNG CHỦNG NÀY

(21) 1-2020-05533

(57) Sáng chế đề cập đến chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 có chức năng được giảm; và phương pháp sản xuất tăng cường protein sử dụng chủng đột biến này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng đột biến *Trichoderma reesei* có khả năng sản xuất protein được tăng cường, và phương pháp sản xuất protein sử dụng chủng đột biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trichoderma reesei được biết là có khả năng sản xuất protein cao, và các nghiên cứu trước kia đã được thực hiện liên quan đến việc sản xuất protein sử dụng loại nấm sợi này. *Trichoderma reesei* có khả năng tuyệt vời trong việc sản xuất, trong số các protein, đặc biệt là xenlulaza được phân loại là enzym đường hóa, và để tăng cường hơn nữa, ví dụ, sản lượng xenlulaza, việc biểu hiện quá hoặc xóa yếu tố điều khiển sự sản xuất xenlulaza được thực hiện. Trong tài liệu không phải sáng chế 1, chủng đột biến *Trichoderma reesei* có khả năng sản xuất xenlulaza cao thu được bằng cách làm giảm, trong số các yếu tố điều khiển sự sản xuất xenlulaza ở *Trichoderma reesei*, chức năng của Cre1 là yếu tố phiên mã kìm hãm sự sản xuất xenlulaza.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu không phải sáng chế

Tài liệu không phải sáng chế 1: Julianio P, Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 77, 2013, Issue 3, P 534-543

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Như được mô tả ở trên, yếu tố phiên mã mà là một trong số các yếu tố điều khiển sự sản xuất protein ở *Trichoderma reesei* được nhận diện, nhưng yếu tố này chỉ được xem như là một phần của cơ chế điều khiển. Do đó, mục đích của sáng chế là thu được chủng đột biến *Trichoderma reesei* có khả năng sản xuất protein được tăng cường bằng cách tiến hành tìm kiếm yếu tố mới để điều khiển sự sản xuất protein ở *Trichoderma reesei* và đề xuất phương pháp sản xuất protein sử dụng chủng đột biến *Trichoderma reesei*.

Giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế cho rằng trong trường hợp yếu tố điều khiển chưa biết trước kia đối với sự sản xuất protein ở *Trichoderma reesei* được nhận diện, sản lượng protein ở *Trichoderma reesei* có thể được tăng hơn nữa, và kết quả từ các nghiên cứu chuyên sâu là, đã phát hiện ra rằng đặc điểm sản xuất protein có thể được cải thiện bằng cách nuôi chủng đột biến *Trichoderma reesei* đã được giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Sáng chế được hoàn thành dựa trên phát hiện này.

Cụ thể hơn, sáng chế gồm các đối tượng (1) đến (5) sau đây.

- (1) Chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm.
- (2) Chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo (1), trong đó hai gốc axit amin thứ 347 và 348 trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được xóa.
- (3) Phương pháp sản xuất protein, phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo (1) hoặc (2).
- (4) Phương pháp sản xuất xenlulaza, phương pháp này bao gồm bước nuôi chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo (1) hoặc (2).
- (5) Phương pháp sản xuất đường từ sinh khối chứa xenluloza, phương pháp này bao gồm:

bước a sản xuất xenlulaza bằng cách nuôi chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm; và

bước b đường hóa sinh khối bằng cách sử dụng xenlulaza thu được ở bước a.

Hiệu quả của sáng chế

Trichoderma reesei được làm giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 có khả năng sản xuất protein được cải thiện, so với *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit không được giảm. Ngoài ra, việc sử dụng *Trichoderma reesei* theo sáng chế giúp có thể tăng cường sản xuất protein. Hơn nữa, trong trường hợp protein sản xuất ra là xenlulaza, còn thu được hiệu quả bất ngờ là

các hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza được cải thiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế khác biệt ở chỗ đột biến được đưa vào chủng *Trichoderma reesei* bố mẹ của vi sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất protein tuyệt vời và khả năng sản xuất protein nhờ đó được tăng hơn nữa. Do đó, chủng bố mẹ *Trichoderma reesei* để được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn ở chủng kiểu dại, và chủng đột biến *Trichoderma reesei* thu được từ việc biến đổi để tăng khả năng sản xuất protein cũng có thể được sử dụng thích hợp làm chủng bố mẹ. Ví dụ, đối với chủng đột biến *Trichoderma reesei*, chủng đột biến được đưa qua xử lý đột biến bằng tác nhân gây đột biến hoặc bức xạ UV, v.v. để cải thiện năng suất protein có thể được sử dụng làm chủng bố mẹ được mô tả ở trên. Ví dụ cụ thể về chủng đột biến dùng làm chủng bố mẹ bao gồm các chủng đột biến đã biết thu được từ *Trichoderma reesei*, như chủng QM6a (NBRC31326), chủng QM9414 (NBRC31329), chủng PC-3-7 (ATCC66589), chủng QM9123 (NBRC31327), chủng RutC-30 (ATCC56765), chủng CL-847 (Enzyme. Microbiol. Technol. 10, 341-346(1988)), chủng MCG77 (Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 89 (1978)), chủng MCG80 (Biotechnol. Bioeng. 12, 451-459 (1982)), và các chủng thu được từ đó. Chủng QM6a, chủng QM9414, và chủng QM9123 là có sẵn từ NBRC (NITE Biological Resource Center), và chủng PC-3-7 và chủng RutC-30 là có sẵn từ ATCC (American Type Culture Collection).

Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 là polypeptit mà *Trichoderma reesei* có, và trong Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia, nó còn được đăng ký là protein dự báo (EGR50654) mà *Trichoderma reesei* chủng QM6a có. Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 là polypeptit có chức năng chưa được biết, nhưng Conserved Domain Architecture Retrieval Tool của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia bộc lộ rằng các gốc axit amin từ thứ 95 đến thứ 277 ở phía đầu tận N có "miền giữa của miền yếu tố khởi đầu 4G sinh vật nhân chuẩn" (trong phần mô tả này, còn được gọi là miền MIF4G) và gốc axit amin từ thứ 380 đến thứ 485 ở phía đầu tận N có miền MA-3. Hai miền MIF4G và MA-3 được biết là có chức năng liên kết với ADN hoặc ARN (Biochem. 44, 12265-12272 (2005), Mol. Cell. Biol. 1, 147-156 (2007)). Từ các mô tả này, polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được ước lượng là có ít nhất là chức năng liên kết với ADN và/hoặc ARN.

Theo sáng chế, việc làm giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ ra trạng thái trong đó trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 chịu đột biến và do đó chức năng của polypeptit được giảm hoặc chức năng này được xóa bỏ. Ngoài ra, khi trình tự bazơ khác ngoài trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 chịu đột biến và do đó polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm mức biểu hiện hoặc mất sự biểu hiện, điều này cũng được bao gồm bởi việc làm giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Đột biến của trình tự bazơ được gây ra bởi sự thay thế, xóa, chèn, nhân đôi, v.v.

Ví dụ cụ thể của gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Phương pháp cụ thể để làm giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm phương pháp đưa đột biến vào để gây ra sự xóa toàn bộ miền MIF4G và/hoặc miền MA-3, xóa một phần miền MIF4G và/hoặc miền MA-3, sự thay đổi mối quan hệ cấu trúc giữa miền MIF4G và miền MA-3, hoặc xóa toàn bộ polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Việc xóa miền MIF4G và/hoặc miền MA-3 thể hiện sự mất toàn bộ hoặc một phần của miền, sự thay đổi toàn bộ hoặc một phần của miền thành (các) axit amin khác, hoặc kết hợp của chúng. Cụ thể hơn, thuật ngữ này có nghĩa là trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của miền MIF4G hoặc miền MA-3 giảm đến 80% hoặc thấp hơn, tốt hơn là đến 50% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là đến 20% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là đến 10% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là đến 5% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là đến 3% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là đến 1% hoặc thấp hơn, và tốt nhất là đến 0%.

Sự thay đổi về mối quan hệ cấu trúc giữa miền MIF4G và miền MA-3 được gây ra bởi đột biến trong đó việc xóa, thế hoặc bổ sung axit amin xảy ra trong trình tự axit amin nằm ở vị trí giữa miền MIF4G và miền MA-3. Miền MIF4G và miền MA-3 được gọi là miền protein, và miền protein cấu thành một phần của cấu trúc trình tự protein và là sự có mặt mang chức năng. Trong trường hợp có nhiều miền, cấu hình gồm nhiều miền cấu thành một phần của cấu hình protein và do đó, khi cấu trúc giữa các miền bị thay đổi, điều này dẫn đến sự thay đổi cấu hình protein và giảm chức năng

protein. Ví dụ, streptokinaza sinh ra bởi chi *Streptococcus* có tổng cộng ba loại miền, nghĩa là, miền α , miền β và miền γ , và miền α và miền β được liên kết bởi 12 gốc axit amin, và miền β và miền γ được liên kết bởi 15 gốc axit amin. Trong Biochem. Biophys. Acta. 9, 1730-1737 (2010), được nêu rằng hoạt tính streptokinaza bị giảm hoặc mất do sự xuất hiện đột biến như đột biến thế, bổ sung hoặc xóa gốc axit amin trong trình tự axit amin nằm ở vị trí giữa miền α và miền β và giữa miền β và miền γ . Việc thế trong trình tự axit amin giữa các miền được mô tả trong bảng 1 và bảng 2, và việc xóa hoặc bổ sung trong trình tự axit amin giữa các miền được mô tả trong bảng 5 và bảng 6, của cùng tài liệu.

Theo cách này, được biết rằng ngay cả khi đột biến axit amin như xóa, thế hoặc bổ sung không xuất hiện trong chính trình tự axit amin cấu thành miền, chức năng của protein cũng được giảm do sự xuất hiện của đột biến axit amin như xóa, thế hoặc bổ sung trong trình tự axit amin nằm ở vị trí giữa hai miền. Theo sáng chế, trình tự amino nằm ở vị trí giữa miền MIF4G và miền MA-3 chỉ ra vùng từ gốc axit amin thứ 278 đến thứ 379 ở phía đầu tận N trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, theo sáng chế, trình tự bazơ mã hóa trình tự amino nằm ở vị trí giữa miền MIF4G và miền MA-3 chỉ ra vùng của các trình tự bazơ từ thứ 832 đến thứ 1137 trong trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo sáng chế, ví dụ cụ thể về sự giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, mà được gây ra bởi sự xuất hiện của đột biến như đột biến xóa, thế hoặc bổ sung trong trình tự axit amin nằm ở vị trí giữa miền MIF4G và miền MA-3, bao gồm đột biến trong đó bất kỳ trong số các bazơ từ thứ 1039 đến thứ 1044 trong trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 1 được xóa. Sự xóa bazơ này là xóa hai gốc axit amin, 347 và 348, trong trình tự axit amin nằm ở vị trí giữa miền MIF4G và miền MA-3 của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Được giả định rằng do đột biến nêu trên, trình tự axit amin liên kết miền MIF4G và miền MA-3 được làm ngắn lại và do đó mối quan hệ cấu trúc ba chiều giữa miền MIF4G và miền MA-3 được thay đổi.

Do đó, phương án ưu tiên của *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm bao gồm chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó hai gốc axit amin, 347 và 348, trong trình tự axit amin được

nêu trong SEQ ID NO: 2 được xóa. Cụm từ "hai gốc axit amin, 347 và 348, được xóa" được sử dụng trong phần mô tả này có nghĩa là ít nhất hai gốc axit amin đó được xóa trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, và các phương án ưu tiên là phương án trong đó hai axit amin, 347 và 348, được xóa, và phương án trong đó ngoài việc xóa hai axit amin này, miền MIF4G và/hoặc miền MA-3 được xóa toàn bộ hoặc miền MIF4G và/hoặc miền MA-3 được xóa một phần.

Việc xóa hai gốc axit amin, 347 và 348, trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, xóa toàn bộ miền MIF4G và/hoặc miền MA-3, xóa một phần miền MIF4G và/hoặc miền MA-3, và xóa toàn bộ polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được gây ra bởi sự dịch chuyển khung hoặc đột biến bộ ba kết thúc bởi sự xóa, chèn, thế, v.v. bazơ trong trình tự gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Đối với polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, việc giảm mức biểu hiện hoặc mất biểu hiện được gây ra bởi đột biến trong vùng trình tự khởi đầu hoặc trình tự kết thúc của gen mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Nhìn chung, vùng trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc tương ứng với vùng có chiều dài gồm hàng trăm bazơ trước và sau gen tham gia vào quá trình phiên mã, và ví dụ cụ thể của trình tự bazơ chứa trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc tham gia vào quá trình phiên mã của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Để đưa vào đột biến gen, phương pháp đột biến gen hiện nay như đột biến bằng tác nhân gây đột biến hoặc bức xạ UV đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, sự tái tổ hợp gen như tái tổ hợp đồng nhất sử dụng gen đánh dấu chọn lọc, hoặc đột biến bằng transposon có thể được sử dụng.

Chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo sáng chế có khả năng sản xuất protein được tăng cường, so với *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID No: 2 không được giảm. Trong trường hợp trong đó chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo sáng chế được nuôi cấy, nồng độ protein tăng, so với dung dịch nuôi cấy *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID No: 2 không được giảm. Hơn nữa, trong trường hợp trong đó protein là enzym, hoạt tính riêng của enzym tăng. Ở đây,

tỷ lệ tăng nồng độ protein hoặc tỷ lệ tăng hoạt tính riêng của enzym không bị giới hạn cụ thể miễn là nồng độ hoặc hoạt tính riêng được tăng, nhưng tỷ lệ tăng tốt hơn là 20% hoặc cao hơn.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất protein bao gồm bước nuôi cấy *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm.

Thành phần môi trường nuôi cấy trong bước nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn nó là thành phần môi trường nuôi cấy trong đó *Trichoderma reesei* có thể sản xuất ra protein, và thành phần môi trường nuôi cấy đã biết đối với nấm sợi thuộc chi *Trichoderma* có thể được sử dụng. Làm nguồn nitơ, ví dụ, polypepton, bouillon, CSL, hoặc bánh đậu tương có thể được sử dụng. Ngoài ra, chất cảm ứng để sản xuất protein có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy.

Phương pháp nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, bởi môi trường nuôi cấy lỏng sử dụng ống ly tâm, bình tam giác, thiết bị lên men kiểu bình, thùng, v.v., hoặc môi trường nuôi cấy rắn sử dụng đĩa, v.v. *Trichoderma reesei* tốt hơn là được nuôi cấy ở điều kiện hiếu khí, và trong số các phương pháp nuôi cấy này, nuôi cấy chìm gồm việc thực hiện nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị lên men kiểu bình hoặc đồng thời sục khí và khuấy trong thùng được ưu tiên. Tỷ lệ sục khí tốt hơn là khoảng từ 0,1 vvm đến 2,0 vvm, tốt hơn nữa là từ 0,3 vvm đến 1,5 vvm, còn tốt hơn nữa là từ 0,5 vvm đến 1,0 vvm. Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C, tốt hơn nữa là từ 25°C đến 31°C. Điều kiện pH trong quá trình nuôi cấy tốt hơn là pH từ 3,0 đến 7,0, tốt hơn nữa là pH từ 4,0 đến 6,0. Đối với giai đoạn nuôi cấy, việc nuôi cấy được thực hiện ở các điều kiện cho phép sản xuất protein cho đến khi lượng thu hồi được của protein được tích lũy. Thông thường, giai đoạn nuôi cấy là khoảng từ 24 giờ đến 240 giờ, tốt hơn nữa là từ 36 giờ đến 192 giờ.

Protein sản xuất ra theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng protein tiết ra ngoài cơ thể của nấm có thể được sản xuất hiệu quả. Trong số chúng, protein tốt hơn là enzym, tốt hơn nữa là enzym đường hóa như xenlulaza, amylaza, invertaza, chitinaza, hoặc pectinaza, còn tốt hơn nữa là xenlulaza.

Xenlulaza sản xuất ra theo sáng chế chứa nhiều loại hydrolaza khác nhau và chứa enzym có hoạt tính phân hủy đối với xylan, xenluloza và hemixenluloza. Ví dụ cụ

thể của nó bao gồm xenlobiohydrolaza (EC 3.2.1.91) sản xuất ra xenlobioza bằng cách thủy phân mạch xenluloza, endoglucanaza (EC 3.2.1.4) thủy phân mạch xenluloza từ phần tâm của nó, β -glucosidaza (EC 3.2.1.21) thủy phân xenlooligosacarit hoặc xenlobioza, xylanaza (EC 3.2.1.8) tác động lên hemixenluloza hoặc cụ thể là lên xylan, và β -xylosidaza (EC 3.2.1.37) thủy phân xylooligosacarit. Như được mô tả ở trên, việc xác nhận sự tăng cường hoạt tính riêng xenlulaza để xác nhận sự tăng cường khả năng sản xuất protein của chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo sáng chế được thực hiện bằng cách xác định rằng bất kỳ trong số các hoạt tính riêng của các hydrolaza này được tăng cường.

Hoạt tính riêng β -glucosidaza được đo bằng phương pháp sau đây. Trước tiên, thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -glucopyranosit 1mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Hoạt tính riêng β -xylosidaza được đo bằng phương pháp sau đây. Trước tiên, thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -xylopyranosit 1mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza được đo bằng phương pháp sau đây. Trước tiên, thêm 10 μ L enzym dịch pha loãng vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -lactopyranosit 1mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 60 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Trong trường hợp sản xuất xenlulaza bởi sáng chế, xenluloza và/hoặc xylan có thể được bổ sung làm chất cảm ứng vào môi trường nuôi cấy. Sinh khối chứa xenluloza hoặc xylan có thể được bổ sung làm chất cảm ứng. Ví dụ cụ thể về sinh khối chứa xenluloza hoặc xylan bao gồm không chỉ thực vật như cây lấy hạt, cây không có hoa, cây rêu, tảo, và cây thủy sinh, mà còn cả các phế liệu xây dựng. Cây lấy hạt được phân loại thành cây hạt trần và cây hạt kín, và cả hai loại đều có thể được sử dụng thích hợp. Cây hạt kín được phân loại tiếp thành cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Ví dụ cụ thể về cây một lá mầm bao gồm bã mía, cỏ switchgrass, cỏ napier, Erianthus, rom ngô, lõi ngô, rom lúa, và rom lúa mỳ, và ví dụ cụ thể về cây hai lá mầm được sử dụng tốt hơn là bao gồm bột củ cải, cây khuynh diệp, cây sồi, và cây bách.

Đối với chất cảm ứng chứa xenluloza và/hoặc xylan, sản phẩm đã được xử lý sơ bộ có thể được sử dụng. Phương pháp xử lý sơ bộ không bị giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, phương pháp đã biết như xử lý bằng axit, xử lý bằng axit sulfuric, xử lý axit sulfuric loãng, xử lý bằng kiềm, xử lý thủy nhiệt, xử lý dưới tới hạn, xử lý nghiền mịn, và xử lý hơi nước có thể được sử dụng. Bột giấy có thể được sử dụng làm sinh khối chứa xenluloza và/hoặc xylan đã được xử lý sơ bộ.

Phương pháp thu hồi protein chứa trong dung dịch nuôi cấy trong đó thể đột biến *Trichoderma reesei* được nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng protein có thể được thu hồi bằng cách loại bỏ thể nấm *Trichoderma reesei* ra khỏi dung dịch nuôi cấy. Ví dụ về phương pháp loại bỏ thể nấm bao gồm ly tâm, tách màng, ép lọc, v.v.

Hơn nữa, trong trường hợp dung dịch nuôi cấy trong đó thể đột biến *Trichoderma reesei* được nuôi cấy được sử dụng làm chất lỏng hòa tan protein mà không loại bỏ thể nấm khỏi đó, dung dịch nuôi cấy tốt hơn là được xử lý sao cho thể nấm không thể phát triển trong đó. Phương pháp xử lý để ngăn thể nấm phát triển bao gồm xử lý nhiệt, xử lý hóa chất, xử lý axit/kiềm, xử lý UV, v.v.

Trong trường hợp trong đó protein là enzym, dung dịch nuôi cấy trong đó thể nấm được loại bỏ hoặc ngăn không cho phát triển có thể được sử dụng trực tiếp làm dung dịch enzym.

Hơn nữa, trong trường hợp trong đó protein là xenlulaza, đường có thể được sản xuất bằng cách đường hóa sinh khối chứa xenluloza sử dụng xenlulaza.

Làm sinh khối chứa xenluloza được dùng theo sáng chế, sinh khối tương tự

như sinh khối chứa xenluloza được mô tả ở trên ở dạng chất cảm ứng, hoặc sinh khối đã được xử lý sơ bộ có thể được sử dụng.

Xenulaza thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo sáng chế là xenulaza thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm theo sáng chế, và vì hoạt tính riêng của, cụ thể là, β -glucosidaza, v.v. là cao so với xenulaza thu được bằng cách nuôi cấy *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit không được giảm, dung dịch đường hóa có nồng độ glucoza cao có thể thu được bằng cách phân hủy hiệu quả sinh khối chứa xenluloza, và do đó lượng lớn hơn của đường có thể thu được.

Điều kiện phản ứng đường hóa không bị giới hạn cụ thể, nhưng nhiệt độ phản ứng đường hóa tốt hơn là từ 25 đến 60°C, tốt hơn nữa là từ 30 đến 55°C. Thời gian phản ứng đường hóa tốt hơn là từ 2 đến 200 giờ. pH của phản ứng đường hóa tốt hơn là pH từ 3,0 đến 7,0, tốt hơn nữa là pH từ 4,0 đến 6,0. Trong trường hợp của xenulaza thu được từ chi *Trichoderma*, pH tối ưu cho phản ứng là 5,0. Hơn nữa, vì các thay đổi pH trong quá trình thủy phân, phản ứng tốt hơn là được thực hiện trong khi bổ sung dung dịch đệm vào dung dịch phản ứng hoặc giữ pH không đổi bằng cách sử dụng axit hoặc kiềm.

Trong trường hợp tách và thu hồi enzym từ dung dịch đường hóa, enzym có thể được thu hồi ở phía không thấm bằng cách lọc dung dịch đường hóa qua màng siêu lọc hoặc tương tự, và nếu muốn, làm bước lọc sơ bộ, chất rắn có thể được loại bỏ ra khỏi dung dịch đường hóa. Enzym được thu hồi có thể được sử dụng lại cho phản ứng đường hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả cụ thể dưới đây bằng cách đề cập đến các ví dụ.

Ví dụ tham chiếu 1. Phương pháp đo nồng độ protein

Chất phản ứng để đo nồng độ protein (thử nghiệm protein Quick Start Bradford, do Bio-Rad sản xuất) được sử dụng. Thêm 5 μ L dung dịch nuôi cấy nấm sợi pha loãng vào 250 μ L chất phản ứng đo nồng độ protein đã quay trở lại nhiệt độ trong phòng và sau khi để yên hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, độ hấp thụ ở 595 nm được

đo sử dụng đầu đọc vi đĩa. Bằng cách sử dụng BSA làm chất chuẩn, nồng độ protein được tính dựa vào đường cong hiệu chỉnh.

Ví dụ tham chiếu 2. Phương pháp đo hoạt tính riêng của xenulaza

Phương pháp đo hoạt tính riêng của β -glucosidaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -glucopyranosit 1 mM (do Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Phương pháp đo hoạt tính riêng của β -xylosidaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -xylopyranosit 1mM (do Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Phương pháp đo hoạt tính riêng của xenlobiohydrolaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -lactopyranosit 1mM (do Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 60 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Ví dụ tham chiếu 3. Thử nghiệm đường hóa sinh khối chứa xenluloza

Làm sinh khối chứa xenluloza, Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 (do J. Rettenmaier & Sohne sản xuất) hoặc bã mía được nghiền thành bột đến đường kính hạt trung bình là 100 μ m được sử dụng. Làm dung dịch enzym, sản phẩm lọc thu được bằng cách lấy mẫu 1ml dung dịch nuôi cấy *Trichoderma reesei* hoặc chủng đột biến

Trichoderma reesei, ly tâm dung dịch nuôi cấy đã lấy mẫu, thu hồi chất nổi bề mặt sau khi loại bỏ thể nấm, và lọc chất nổi bề mặt qua dụng cụ lọc 0,22 μm , được sử dụng.

Phản ứng đường hóa

Bổ sung 100 μL đệm natri axetat 1M làm đệm cho phản ứng đường hóa, 2 μL dung dịch erythromycin 50 g/L để ngăn sự tăng sinh của vi khuẩn tạp, và 0,1 g, làm mục tiêu để đường hóa, Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 (do J. Rettenmaier & Sohne sản xuất) hoặc bã mía được nghiền thành bột đến đường kính hạt trung bình 100 μm , và sau khi bổ sung 450 μL dung dịch enzyme khi sử dụng Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 làm sinh khối chứa xenluloza hoặc bổ sung 400 μL dung dịch enzyme khi sử dụng bã mía làm sinh khối chứa xenluloza, hỗn hợp được pha loãng bằng nước vô trùng để tạo ra tổng là 1 mL và sau đó cho vào ống 2 mL. Phản ứng đường hóa được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ 50°C trong 30 giờ, chất nổi bề mặt sau khi ly tâm sản phẩm đường hóa được thu hồi dưới dạng dung dịch đường hóa, và thêm dung dịch NaOH 1N ở lượng bằng 1/10 dung dịch đường hóa được thu hồi để dừng phản ứng enzyme. Nồng độ glucoza trong dung dịch đường hóa sau khi dừng phản ứng được đo bằng UPLC được mô tả dưới đây.

Đo nồng độ glucoza

Glucoza được phân tích định lượng ở các điều kiện sau đây bằng cách sử dụng hệ ACQUITY UPLC (Waters). Phân tích định lượng được thực hiện dựa vào đường cong hiệu chỉnh thu được từ mẫu glucoza chuẩn.

Cột: Cột ACQUITY UPLC BEH Amit 1,7 μm 2,1×100 mm

Phương pháp tách: HILIC

Pha động: pha động A: axetonitril 80%, dung dịch TEA 0,2% chứa nước, và pha động B: axetonitril 30%, dung dịch TEA 0,2% chứa nước, theo gradien sau đây. Gradien là gradien tuyến tính đạt đến tỷ lệ trộn tương ứng với thời gian dưới đây.

Điều kiện bắt đầu: (A 99,90%, B 0,10%), 2 phút sau khi bắt đầu: (A 96,70%, B 3,30%), 3,5 phút sau khi bắt đầu: (A 95,00%, B 5,00%), 3,55 phút sau khi bắt đầu: (A 99,90%, B 0,10%), 6 phút sau khi bắt đầu: (A 99,90%, B 0,10%)

Phương pháp phát hiện: ELSD (bộ dò tán xạ ánh sáng bay hơi)

Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút

Nhiệt độ: 55°C

Ví dụ 1

Chuẩn bị chủng đột biến *Trichoderma reesei* QM9414 I có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm:

Chủng đột biến *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm được sản xuất bằng cách tạo ra đoạn ADN gồm trình tự gen được nêu trong SEQ ID NO: 3 làm đoạn ADN chứa gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm, và biến nạp đoạn ADN vào chủng *Trichoderma reesei* QM9414. Bằng phương pháp này, thu được chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó các bazơ từ 1039 đến 1044 được xóa trong SEQ ID NO: 1 để có polypeptit gồm trình tự axit amin trong đó hai gốc axit amin, 347 và 348, được xóa trong SEQ ID NO: 2. Gen (amdS) axetamit và axetamidaza (AmdS) có khả năng phân hủy axetamit được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc để đưa đoạn ADN vào. Để cho phép đoạn ADN gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 3 được đưa vào ngược chiều và xuôi chiều với trình tự ADN chứa amdS, plasmit để đưa đột biến vào được tạo ra để bổ sung phần đồng nhất với trình tự gen của chủng *Trichoderma reesei* QM9414.

Cụ thể, đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn ADN đã tổng hợp được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 với enzym giới hạn AflIII và KpnI được sử dụng làm đoạn ADN ngược chiều. Ngoài ra, PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen được tách theo cách thông thường từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414 và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 5 và 6, và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn khuếch đại thu được với enzym giới hạn MluI và SpeI được sử dụng làm đoạn ADN xuôi chiều. Các đoạn ADN ngược chiều và xuôi chiều được đưa vào plasmit được chèn amdS bằng cách sử dụng enzym giới hạn AflIII và KpnI và enzym giới hạn MluI và SpeI, theo thứ tự, để tạo cấu trúc cho plasmit để đưa đột biến vào. Plasmit để đưa đột biến vào sau đó được xử lý với enzym giới hạn PacI và SphI, và chủng *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC #31329) được biến nạp với đoạn ADN thu được được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3. Các thao tác liên quan đến kỹ thuật sinh học phân tử được thực hiện như được mô tả trong

Molecular cloning, laboratory manual, 1st, 2nd, 3rd (1989). Ngoài ra, việc biến nạp được tiến hành sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn, nghĩa là, phương pháp PEG tế bào trần, và cụ thể là, được thực hiện như được mô tả trong Gene, 61, 165-176 (1987). Chủng đột biến *Trichoderma reesei* thu được được sử dụng làm chủng đột biến QM9414 I trong các thử nghiệm dưới đây.

Ví dụ 2

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng đột biến QM9414 I:

Nuôi cấy trong bình tam giác

Sau khi bào tử của chủng đột biến QM9414 I được tạo ra trong Ví dụ 1 được pha loãng với nước muối sinh lý đến $1,0 \times 10^7/\text{mL}$, 0,1 mL dung dịch bào tử pha loãng được cấy vào 10 mL môi trường bình tam giác được thể hiện trong bảng 1, được đặt vào bình tam giác có vách ngăn 50 mL, và môi trường bình tam giác được ủ trong máy lắc ở điều kiện nhiệt độ 28°C và tốc độ 120 vòng/phút trong 120 giờ.

Bảng 1

Arbocel B800 (do J. Rettenmaier & Sohne sản xuất)	20 g
5× dung dịch Mandel *	200 mL
10× dung dịch Amoni tartrat **	100 mL
Dung dịch nước ngâm ngô	50 g
Dung dịch yếu tố vi lượng***	1 mL
Tween 80	0,5 mL
PE-M	1 mL
(mỗi 1 L)	

* 5× dung dịch Mandel chứa 7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, và 1,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

** 10× dung dịch amoni tartrat chứa 92 g/L amoni tartrat.

*** Dung dịch yếu tố vi lượng chứa 0,3 g/L H_3BO_3 , 1,3 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, và 10 g/L ZnCl_2 .

Gom dung dịch nuôi cấy

Sau 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy, 1 mL dung dịch nuôi cấy được gom. Dung

dịch nuôi cấy được ly tâm ở điều kiện 15.000×g và 4°C trong 10 phút để thu được chất nổi bề mặt. Chất nổi bề mặt được lọc qua dụng cụ lọc 0,22 µm, và sản phẩm lọc được sử dụng làm dung dịch xenlulaza trong các thử nghiệm dưới đây.

Đo nồng độ protein và các hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza

Nồng độ protein trong dung dịch nuôi cấy ở 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy được đo sử dụng kỹ thuật được mô tả trong Ví dụ tham chiếu 1, và sau đó, các hoạt tính riêng của xenlulaza được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ tham chiếu 2. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Ví dụ 3

Sản xuất chủng đột biến *Trichoderma reesei* QM9414 II có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm:

Chủng đột biến *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm được sản xuất bằng cách tạo ra đoạn ADN gồm trình tự gen được nêu trong SEQ ID NO: 8, và biến nạp đoạn ADN này vào chủng *Trichoderma reesei* QM9414. Bằng phương pháp này, amdS được chèn vào giữa bazơ thứ 1206 và 1207 trong SEQ ID NO: 1, và thu được chủng đột biến *Trichoderma reesei* được giảm chức năng của SEQ ID NO: 2. Để cho phép đoạn ADN gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 8 được đưa vào ngược chiều và xuôi chiều trình tự ADN chứa amdS, plasmit để đưa đột biến vào được tạo ra để bổ sung phần đồng nhất với trình tự gen của chủng *Trichoderma reesei* QM9414.

Cụ thể là, PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen được tách theo cách thông thường từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414 và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 9 và 10, và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn khuếch đại thu được với enzym giới hạn AflIII và KpnI được sử dụng làm đoạn ngược chiều. Ngoài ra, PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12, và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn khuếch đại thu được với enzym giới hạn MluI và SpeI được sử dụng làm đoạn ADN xuôi chiều. Đoạn ADN ngược chiều và xuôi chiều được đưa vào plasmit đã chèn amdS bằng cách sử dụng enzym giới hạn AflIII và KpnI và enzym giới hạn MluI và SpeI, theo thứ tự, để tạo cấu trúc cho plasmit để đưa đột biến vào. Plasmit để đưa đột biến vào sau đó được xử lý với enzym giới hạn AflIII và SpeI, và chủng *Trichoderma reesei* QM9414 được biến nạp với ADN thu được được

thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 như được mô tả trong Ví dụ 1. Chủng đột biến *Trichoderma reesei* thu được được sử dụng làm chủng đột biến QM9414 II trong các thử nghiệm sau đây.

Ví dụ 4

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng đột biến QM9414 II:

Việc nuôi cấy được thực hiện bởi cùng các công đoạn và điều kiện như trong Ví dụ 2 ngoại trừ việc chủng đột biến QM9414 II được sử dụng thay cho chủng đột biến QM9414 I thu được trong Ví dụ 1, và nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy và các hoạt tính riêng khác nhau của xenulaza được đo. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Ví dụ so sánh 1

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng *Trichoderma reesei* QM9414

Việc nuôi cấy được thực hiện bởi cùng các điều kiện và công đoạn như trong Ví dụ 2 ngoại trừ việc chủng QM9414 được sử dụng thay cho chủng đột biến QM9414 I thu được trong Ví dụ 1, và nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy và các hoạt tính riêng khác nhau của xenulaza được đo. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ 2	Ví dụ 4
	Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 I	Chủng đột biến QM9414 II
Giá trị tương đối của nồng độ protein	1	1,5	1,4
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -glucosidaza	1	1,3	1,5
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -xylosidaza	1	1,5	1,5
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza	1	1,4	1,3

Kết quả từ Ví dụ 2, Ví dụ 4 và Ví dụ so sánh 1 chỉ ra rằng khi giả định nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy trong đó chủng *Trichoderma reesei* QM9414

được nuôi cấy là 1, giá trị tương đối của nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy chủng đột biến QM9414 I là 1,5 và giá trị tương đối của nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* QM9414 II là 1,4. Từ các kết quả này có thể hiểu rằng khi *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm được nuôi cấy, sản lượng protein có thể tăng so với trường hợp trong đó chức năng của polypeptit không được giảm.

Đối với các hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza, khi giả định các hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza trong dung dịch nuôi cấy trong đó chủng *Trichoderma reesei* QM9414 được nuôi cấy là 1, hoạt tính riêng β -glucosidaza là chủng đột biến QM9414 I: 1,3, và chủng đột biến QM9414 II: 1,4, hoạt tính riêng β -xylosidaza là chủng đột biến *Trichoderma reesei* QM9414 I: 1,5, và chủng đột biến QM9414 II: 1,5, và hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza là chủng đột biến QM9414 I: 1,4, và chủng đột biến QM9414 II: 1,3. Từ các kết quả này có thể hiểu rằng đối với xenlulaza thu được bằng cách nuôi cấy *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm, không chỉ lượng protein sản xuất ra được tăng mà còn thu được hiệu quả bất ngờ là các hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza được cải thiện, so với trường hợp trong đó chức năng của polypeptit không được giảm.

Ví dụ 5

Thử nghiệm phản ứng đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng đột biến QM9414 II

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ tham chiếu 3 bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy sau 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy chủng đột biến QM9414 II thu được trong Ví dụ 4. Làm sinh khối chứa xenluloza, Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 hoặc bột bã mía được sử dụng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Ví dụ so sánh 2

Thử nghiệm phản ứng đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng *Trichoderma reesei* QM9414

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được thực hiện bởi cùng công đoạn và điều kiện như trong Ví dụ 5 ngoại trừ việc sử dụng dung dịch nuôi cấy sau 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy chủng *Trichoderma reesei* QM9414 thu

được trong Ví dụ so sánh 1. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

	Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 II
Giá trị tương đối của nồng độ glucoza (đường hóa B800)	1	1,8
Giá trị tương đối của nồng độ glucoza (đường hóa bã mía)	1	1,8

Kết quả từ Ví dụ 5 và Ví dụ so sánh 2 chỉ ra rằng trong phản ứng đường hóa của Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800, khi giả định nồng độ glucoza chứa trong dung dịch đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng *Trichoderma reesei* QM9414 là 1, giá trị tương đối của nồng độ glucoza trong dung dịch đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng đột biến QM9414 II là 1,8. Hơn nữa, trong phản ứng đường hóa của bã mía, khi giả định nồng độ glucoza chứa trong dung dịch đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng *Trichoderma reesei* QM9414 là 1, giá trị tương đối của nồng độ glucoza trong dung dịch đường hóa sử dụng xenlulaza của chủng đột biến QM9414 II là 1,4. Từ các kết quả này có thể hiểu rằng khi phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được thực hiện sử dụng xenlulaza của *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm, nồng độ glucoza trong dung dịch đường hóa được tăng và lượng đường lớn hơn có thể được sản xuất, so với trường hợp sử dụng xenlulaza của *Trichoderma reesei* trong đó chức năng của polypeptit không được giảm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó sự biểu hiện của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm.
2. Chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 1, trong đó hai gốc axit amin ở vị trí thứ 347 và 348 trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được xóa.
3. Phương pháp sản xuất protein, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 1.
4. Phương pháp sản xuất protein, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 2.
5. Phương pháp sản xuất xenlulaza, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 1.
6. Phương pháp sản xuất xenlulaza, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 2.
7. Phương pháp sản xuất đường từ sinh khối chứa xenluloza, phương pháp này bao gồm các bước:

sản xuất xenlulaza bằng cách nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* trong đó sự biểu hiện của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm; và

đường hóa sinh khối bằng xenlulaza trong dung dịch nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Chúng đột biến *Trichoderma reesei* và phương pháp sản xuất protein sử dụng chủng này.

<130> 660M09391

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2580

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 1

```

atgccgcacc gcgagcgcg caagcagcga gaaggcgggc actcgtaccg cccctcgagg      60
ccagcgcggtt cagctcgcg ctcgcgatcg ccgcctcgcg cgccggtgcc cgtgcggacg     120
gaggaggaga agcaggcggc ggcaaaggcc gagtacgaga agctgctcaa catgcggtcg      180
ggcggcacgt acatcccgcc ggcgaggctg agggcgctgc aggcgcagat cacggacaag      240
agcagcaagg agtaccagcg gatggcggtg gaggcgctca agaagagcat caacggcctg      300
atcaacaagg tcaacacggc caacatcaag cacattgtgc ccgagctggt tggcgagaac      360
ctggtgcgcg gcccgggcct cttctgccgc tccatcatga aggcccaggc cgccagtttg      420
cccttcacgc ccatctacgc cgccatggcc gccattgtca acaccaagct gccgcaggtc      480
ggcgagctgc tggtaagcg cctcatcatg cagttccgca agggcttcaa gcgcaacgac      540
aaggccgtct gtctgtcgtc gaccaccttc ctcgcccacc tcatcaacca gcaggtgcag      600
cacgagatgc tggccggcca gatcctgctg ctgctgctgc acaagccgac cgacgacagc      660
gtcgagattg ccgtgggctt ctgcaaggag gttggccagt acctcgagga gatgcagcct      720
gccatttcca tggccgtctt cgaccagttc cgcaacatcc tccacgagtc cgacattgac      780
aagcgaacgc agtacatgat tgaggtgctc ttccagatca ggaaggacaa gttcaaggat      840
caccgggcca tcaaggagga gctggacttg gtggaggagg aggaccagat cagcacaag      900
gtggagcttg atggcgagat tgatgtgcag gacggactca acatcttcaa gtacgaccgc      960
gagtgggagg agcatgagga ggcatacaag aggctcaagg cgagatttct gggcgaagcc     1020
agcgatgacg aggagggcga cgaggacgag gacgaggacg agagctccga agatgaagaa     1080
aacgaagaga caaaggccat ggagatcaag gaccagtcta acgccgactt ggtcaacctta     1140
cggaggacca tctacctcac catcatgtcg agcgccgacc cagaggaagc agttcacaag     1200
ctgatgaaga tcaacctgcc cgtcggccag gaacccgagc tgccctcgat gattgtcgag     1260

```

tgttgctcgc aggagaagac gtacaccaag ttctttggct tgatcggcga gcgtttcggc 1320
 aagatcaatc ggctgtggtg cgacctcttt gagcaggcct ttgtcaagta ctacgagacg 1380
 atccaccgat acgaaaacaa caagctgcgg aacattgcc aacattgcc tgcgtgtttg ccacatgttt 1440
 gcttccgacg ctctgggctg gcaactgcctt tccgtcattc acctcaacga ggaggagacc 1500
 acgtcgagca gccgcacctt catcaagatt ctgttccagc acatttccga ggaaatcggc 1560
 ctggctaagc tccgggcacg catgactgac gagacgctgc ggcccagcct cgaaggcctc 1620
 ttccccagag agaaccctcg caacatccga ttctccatca actacttcac cagcatcggc 1680
 atgggtgtac tgaccgagga gatgcgagag cacctcatga acatgccaa gcctgcgctg 1740
 cccgcccctg ctgctcagga ccgctcggat acggactccg tctcgagcta ttcgtcttac 1800
 actcactcat catactcttc ccgctcgcgc tcacgggtccc gatctgtggg tcgtcggagc 1860
 ggcggctcag gccgatcgtt ttcccgaact ccgcctcgac gtggcgcaag gagccgatcc 1920
 tactctgacg actcacggtc accgtcgcgg tcaagatcac gatcccgtc cgattccgtc 1980
 tctactcgtg ggcgaaggcg agcgtcgtac tcggccagtc ctccccggcg tgggtggccgt 2040
 cgggttgcca gcagaagccg aagctactcg tcgggtcctt cacgggtctcc gccaccacgg 2100
 aaccgcggtc gcgcacgaag caactcgtat agttcctaca gccgctctcc atcttcttca 2160
 ccacgacgcg gcagagacgc agactcggcc agcccgcctc cgcgaagggg tcgaccgcgc 2220
 cagagcccac caggcgggtcc cgcagggtcga aggaacagct cgtctgtcgg cagcggaggg 2280
 ccccgcaaga agccccgacg ggacagccga tcgccgtctc gcgactattc gtcccgggtcc 2340
 ccgtctcggg cgccgtcag atctcgatcg cctccgcccg ctgcgcgtgg ccgaaggggc 2400
 tcttatacgc cgtcacgcag ccgcagcccg cctccgcgca gggtgaggga tggctcgccg 2460
 ggtcgtctga ggggtgggag gtcgcctagt cctcctttgc cgggtgaagag gaggcggtat 2520
 gatagcgaga gtgtttctcg gtcgccgcct cctttgaagc gcgggagaag ggataactaa 2580

<210> 2
 <211> 859
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

<400> 2

Met Pro His Arg Glu Arg Gly Lys Gln Arg Glu Gly Gly Asp Ser Tyr
 1 5 10 15

Arg Pro Ser Arg Pro Ala Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro
 20 25 30

Arg Ala Pro Val Pro Val Arg Thr Glu Glu Glu Lys Gln Ala Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ala Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Met Arg Ser Gly Gly Thr Tyr
 50 55 60
 Ile Pro Pro Ala Arg Leu Arg Ala Leu Gln Ala Gln Ile Thr Asp Lys
 65 70 75 80
 Ser Ser Lys Glu Tyr Gln Arg Met Ala Trp Glu Ala Leu Lys Lys Ser
 85 90 95
 Ile Asn Gly Leu Ile Asn Lys Val Asn Thr Ala Asn Ile Lys His Ile
 100 105 110
 Val Pro Glu Leu Phe Gly Glu Asn Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu Phe
 115 120 125
 Cys Arg Ser Ile Met Lys Ala Gln Ala Ala Ser Leu Pro Phe Thr Pro
 130 135 140
 Ile Tyr Ala Ala Met Ala Ala Ile Val Asn Thr Lys Leu Pro Gln Val
 145 150 155 160
 Gly Glu Leu Leu Val Lys Arg Leu Ile Met Gln Phe Arg Lys Gly Phe
 165 170 175
 Lys Arg Asn Asp Lys Ala Val Cys Leu Ser Ser Thr Thr Phe Leu Ala
 180 185 190
 His Leu Ile Asn Gln Gln Val Gln His Glu Met Leu Ala Gly Gln Ile
 195 200 205
 Leu Leu Leu Leu Leu His Lys Pro Thr Asp Asp Ser Val Glu Ile Ala
 210 215 220
 Val Gly Phe Cys Lys Glu Val Gly Gln Tyr Leu Glu Glu Met Gln Pro
 225 230 235 240
 Ala Ile Ser Met Ala Val Phe Asp Gln Phe Arg Asn Ile Leu His Glu
 245 250 255
 Ser Asp Ile Asp Lys Arg Thr Gln Tyr Met Ile Glu Val Leu Phe Gln
 260 265 270

Ile Arg Lys Asp Lys Phe Lys Asp His Pro Ala Ile Lys Glu Glu Leu
 275 280 285

Asp Leu Val Glu Glu Glu Asp Gln Ile Thr His Lys Val Glu Leu Asp
 290 295 300

Gly Glu Ile Asp Val Gln Asp Gly Leu Asn Ile Phe Lys Tyr Asp Pro
 305 310 315 320

Glu Trp Glu Glu His Glu Glu Ala Tyr Lys Arg Leu Lys Ala Glu Ile
 325 330 335

Leu Gly Glu Ala Ser Asp Asp Glu Glu Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu
 340 345 350

Asp Glu Ser Ser Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Thr Lys Ala Met Glu
 355 360 365

Ile Lys Asp Gln Ser Asn Ala Asp Leu Val Asn Leu Arg Arg Thr Ile
 370 375 380

Tyr Leu Thr Ile Met Ser Ser Ala Asp Pro Glu Glu Ala Val His Lys
 385 390 395 400

Leu Met Lys Ile Asn Leu Pro Val Gly Gln Glu Pro Glu Leu Pro Ser
 405 410 415

Met Ile Val Glu Cys Cys Ser Gln Glu Lys Thr Tyr Thr Lys Phe Phe
 420 425 430

Gly Leu Ile Gly Glu Arg Phe Ala Lys Ile Asn Arg Leu Trp Cys Asp
 435 440 445

Leu Phe Glu Gln Ala Phe Val Lys Tyr Tyr Glu Thr Ile His Arg Tyr
 450 455 460

Glu Asn Asn Lys Leu Arg Asn Ile Ala Met Leu Phe Gly His Met Phe
 465 470 475 480

Ala Ser Asp Ala Leu Gly Trp His Cys Leu Ser Val Ile His Leu Asn
 485 490 495

Glu Glu Glu Thr Thr Ser Ser Ser Arg Ile Phe Ile Lys Ile Leu Phe
 500 505 510

Gln His Ile Ser Glu Glu Ile Gly Leu Ala Lys Leu Arg Ala Arg Met
515 520 525

Thr Asp Glu Thr Leu Arg Pro Ser Leu Glu Gly Leu Phe Pro Arg Glu
530 535 540

Asn Pro Arg Asn Ile Arg Phe Ser Ile Asn Tyr Phe Thr Ser Ile Gly
545 550 555 560

Met Gly Val Leu Thr Glu Glu Met Arg Glu His Leu Met Asn Met Pro
565 570 575

Lys Pro Ala Leu Pro Ala Pro Ala Ala Gln Asp Arg Ser Asp Thr Asp
580 585 590

Ser Val Ser Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr His Ser Ser Tyr Ser Ser Arg
595 600 605

Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Val Gly Arg Arg Ser Gly Gly Arg Gly
610 615 620

Arg Ser Leu Ser Arg Thr Pro Pro Arg Arg Gly Ala Arg Ser Arg Ser
625 630 635 640

Tyr Ser Asp Asp Ser Arg Ser Pro Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg
645 650 655

Ser Asp Ser Val Ser Thr Arg Gly Arg Arg Arg Ala Ser Tyr Ser Ala
660 665 670

Ser Pro Pro Arg Arg Gly Gly Arg Arg Val Ala Ser Arg Ser Arg Ser
675 680 685

Tyr Ser Ser Gly Ser Ser Arg Ser Pro Pro Pro Arg Asn Arg Gly Arg
690 695 700

Ala Arg Ser Asn Ser Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ser
705 710 715 720

Pro Arg Arg Gly Arg Asp Ala Asp Ser Ala Ser Pro Pro Pro Arg Arg
725 730 735

Gly Arg Pro Arg Gln Ser Pro Pro Gly Gly Pro Ala Gly Arg Arg Asn
740 745 750

Ser Ser Ser Val Gly Ser Gly Gly Pro Arg Lys Lys Pro Arg Arg Asp
755 760 765

Ser Arg Ser Pro Ser Arg Asp Tyr Ser Ser Arg Ser Pro Ser Arg Ser
770 775 780

Pro Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Pro Ala Ala Arg Gly Arg Arg Gly
785 790 795 800

Ser Tyr Thr Pro Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Pro Arg Arg Val Arg
805 810 815

Asp Gly Ser Pro Gly Arg Leu Arg Gly Gly Arg Ser Pro Ser Pro Pro
820 825 830

Leu Pro Val Lys Arg Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Ser Val Ser Arg Ser
835 840 845

Pro Pro Pro Leu Lys Arg Gly Arg Arg Asp Asn
850 855

<210> 3
<211> 7801
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn ADN để biến nạp

<400> 3
taacttaagg cgcggtattga gccacgctg gcatgaagtt tagagggaaa cgcgccagag 60
gtgcctttca agtgagagcg aggttagggg gggcttggat tgggctggag gtacggcgctg 120
tggcgttgca gagtacatca atttgcgcag tgacggatag ggcggggtga ggtagagctt 180
tccgggagca gaggtactgc tgcttgaagc cgggctgctg tggcgtgctg taacttggcc 240
cgtgcacgct tttgccatct ttttcctcgt ttcgttgctt cagccttagc aaaacccatc 300
cgccgccatc actcgattct gggtgacgac gacgaggcag gcgtttttta ttcttttcga 360
gcagagcatt gcctgtgtct cctctcccag ttcaaccctt tgaatccttg tcattgccgg 420
cccttgaccg cccatctcta cgactcgaac gacatataacc cttcccgtcc atccagatcg 480
cgacacacac gatggcgggc gtcgtcgaca tgccgcaccg cgagcgcggc aagcagcgag 540
aaggcggcga ctcgtaccgc ccctcgaggc cagcgcggttc acgctcgcgc tcgcgatcgc 600
cgccctcgcg cccgggtgcc gtgcggacgg aggaggagaa gcaggcgggc gcaaaggccg 660

agtacgagaa gctgctcaac atgcggtcgg gcggcacgta catcccgccg gcgaggctga 720
 gggcgctgca ggcgcagatc acggacaaga gcagcaagga gtaccagcgg atggcgctggg 780
 aggcgctcaa gaagagcatc aacggcctga tcaacaaggc caacacggcc aacatcaagc 840
 acattgtgcc cgagctgttt ggcgagaacc tggcgcggc cgcgggcctc ttctgccgct 900
 ccatcatgaa ggcccaggcc gccagtttgc ccttcacgcc catctacgcc gccatggccg 960
 ccattgtcaa caccaagctg cgcaggtcgg gcgagctgct ggtcaagcgc ctcatcatgc 1020
 agttccgcaa gggcttcaag cgcaacgaca aggccgtctg tctgtcgtcg accaccttcc 1080
 tcgcccacct catcaaccag caggtgcagc acgagatgct ggccggccag atcctgctgc 1140
 tgctgctgca caagccgacc gacgacagcg tcgagattgc cgtgggcttc tgcaaggagg 1200
 ttggccagta cctcgaggag atgcagcctg ccatttccat ggccgtcttc gaccagttcc 1260
 gcaacatcct ccacgagtcc gacattgaca agcgaacgca gtacatgatt gaggtgctct 1320
 tccagatcag gaaggacaag ttcaaggatc acccggccat caaggaggag ctggacttgg 1380
 tggaggagga ggaccagatc acgcacaagg tggagcttga tggcgagatt gatgtgcagg 1440
 acggactcaa catcttcaag tacgaccggg agtgggagga gcatgaggag gcatacaaga 1500
 ggctcaaggc ggagattctg ggcaagcca gcgatgacga ggagggcgac gaggacgagg 1560
 acgagagctc cgaagatgaa gaaaacgaag agacaaaggc catggagatc aaggaccagt 1620
 ctaacgccga cttggtcaac ctacggagga ccatctacct caccatcatg tcgagcgccg 1680
 acccagagga agcagttcac aagctgatga agatcaacct gcccgctcggc caggaacctg 1740
 agctgccctc gatgattgtc gagtgttgct cgcaggagaa gacgtacacc aagttctttg 1800
 gcttgatcgg cgagcgtttc gccaaatca atcggctgtg gtgcgacctc tttgagcagg 1860
 cctttgtcaa gtactacgag acgatccacc gatacgaaaa caacaagctg cggaacattg 1920
 ccatgctgtt tggccacatg tttgcttccg acgctctggg ctggcactgc ctttccgtca 1980
 ttcacctcaa cgaggaggag accacgtcga gcagccgcat cttcatcaag attctgttcc 2040
 agcacatttc cgaggaaatc ggcctggcta agctccgggc acgcatgact gacgagacgc 2100
 tgcggcccag cctcgaaggc ctcttcccca gagagaacct tcgcaacatc cgattctcca 2160
 tcaactactt caccagcatc ggcattgggtg tactgaccga ggagatgcga gagcacctca 2220
 tgaacatgcc caagcctgcg ctgcccggcc ctgctgctca ggaccgctcg gatacggact 2280
 ccgtctcgag ctattcgtct tacactcact catcatactc ttcccgtcgg cgctcacggc 2340
 cccgatctgt gggcgtcggg agcggcggtc gaggccgata gctttccga actccgcctc 2400
 gacgtggcgc aaggagccga tcctactctg acgactcacg gtcaccgtcg cggcgaagat 2460

cacgatcccg ctccgattcc gtctctactc gtgggcgaag gcgagcgctc tactcggcca 2520
 gtcctccccg gcgtggtggc cgtcgggttg ccagcagaag ccgaagctac tcgtcgggct 2580
 cctcacggtc tccgccacca cggaaccgcg gtcgcgcacg aagcaactcg tatagttcct 2640
 acagccgctc tccatcttct tcaccacgac gcggcagaga cgcagactcg gccagcccgc 2700
 ctccgcgaag gggtcgaccg cgccagagcc caccaggcgg tcccgcaggt cgaaggaaca 2760
 gctcgtctgt cggcagcgga gggccccgca agaagccccg acgggacagc cgatcgccgt 2820
 ctgcgcgacta ttcgtcccgg tccccgtctc ggtcgccgtc gagatctcga tcgcctccgc 2880
 cggctgcgcg tggccgaagg ggctcttata cgccgtcacg cagccgcagc ccgcctccgc 2940
 gcaggggtgag ggatggctcg ccgggtcgtc tgaggggttg gaggtcgctt agtcctcctt 3000
 tgccggtgaa gaggaggcgg tatgatagcg agagtgtttc tcggtcgccg cctcctttga 3060
 agcgcgggag aagggataac taaaccttta ccttttgaac gatgaattgt tcctcttgct 3120
 tagattgaaa cggttaagcg gagtggaatt ggggtgggatg ggaaaacgtg taatagattg 3180
 gttggtaccg cggccgccta gtcattcattg gataggcaga ttactcagcc tgaatgacat 3240
 caacatgtta cccatgatac aataggtcac acaaacaagc gctaagatgc acttggtatg 3300
 acaagcccag tagtccgttt caaaagacct agatgatgaa ctacaacatg aggtgttgcc 3360
 tcctgatcca gtccaactgc aaacgctgat gtataactcaa tcaagcctga tgtaaattgct 3420
 gcgactcgat tcgctggata tgaagatcaa agagagctct gatgggtcca atatagccgg 3480
 gttttgttag gacagtccac cacaccgata ttagaattgg tcaagcacct tatcatttca 3540
 tagagattgc ggtttctaga tctacgccag gaccgagcaa gccagatga gaaccgacgc 3600
 agatttcctt ggcacctggt gcttcagctg aatcctggca atacgagata cctgctttga 3660
 atattttgaa tagctcgccc gctggagagc atcctgaatg caagtaacaa ccgtagaggc 3720
 tgacacggca ggtgttgcta gggagcgctc tgttctacaa ggccagacgt cttcgcgggt 3780
 gatatatatg tatgtttgac tgcaggctgc tcagcgacga cagtcaagtt cgccctcgct 3840
 gcttgtgcaa taatcgcagt ggggaagcca caccgtgact cccatctttc agtaaagctc 3900
 tgttggtggt tatcagcaat acacgtaatt taaactcggt agcatggggc tgatagctta 3960
 attacggttt accagtgcg cggttctgca gctttccttg gcccgtaaaa ttcggcgaag 4020
 ccagccaatc accagctagg caccagctaa accctataat tagtctctta tcaacaccat 4080
 ccgctcccc gggtatcaatg aggagaatga ggggatgcg gggctaaaga agcctacata 4140
 accctcatgc caactcccag tttaactcgc tcgagccaac atcctgacta taagctaaca 4200
 cagaatgcct caatcctggg aagaactggc cgctgataag cgcgcccgcc tcgcaaaaac 4260

catccctgat gaatggaaag tccagacgct gcctgcggaa gacagcgta ttgatttccc 4320
aaagaaatcg ggcatacctt cagaggccga actgaagatc acagaggcct ccgctgcaga 4380
tcttgtgtcc aagctggcgg ccggagagtt gacctcggtg gaagttacgc tagcattctg 4440
taaacgggca gcaatcgccc agcagttagt agggccccct ctacctctca gggagatgta 4500
acaacgccac cttatgggac tatcaagctg acgctggcct ctgtgcagac aaactgcgcc 4560
cacgagttct tccctgacgc cgctctcgcg caggcaaggg aactcgatga atactacgca 4620
aagcacaaga gaccggttg tccactccat ggcctcccca tctctctcaa agaccagctt 4680
cgagtcaagg tacaccgttg cccctaagtc gttagatgtc cttttttgtc agctaacata 4740
tgccaccagg gctacgaaac atcaatgggc tacatctcat ggctaaaca gtacgacgaa 4800
ggggactcgg ttctgacaac catgctccgc aaagccgggtg ccgtcttcta cgtcaagacc 4860
tctgtcccg agaccctgat ggtctgcgag acagtcaaca acatcatcgg gcgcaccgtc 4920
aaccacgca acaagaactg gtcgtgcggc ggcagttctg gtggtgaggg tgcgatcgtt 4980
gggattcgtg gtggcgatc cggtgtagga acggatatcg gtggctcgat tcgagtgccg 5040
gccgcgttca acttcctgta cggctcaagg ccgagtcatg ggccgctgcc gtatgcaaag 5100
atggcgaaca gcatggaggg tcaggagacg gtgcacagcg ttgtcgggcc gattacgcac 5160
tctgttgagg gtgagtcctt cgcctcttcc ttcttttctt gctctatacc aggcctccac 5220
tgtcctcctt tcttgctttt tatactatat acgagaccgg cagtcactga tgaagtatgt 5280
tagacctccg cctcttcacc aaatccgtcc tcggtcagga gccatggaaa tacgactcca 5340
aggtcatccc catgccctgg ccgcagtcgg agtcggacat tattgcctcc aagatcaaga 5400
acggcgggct caatatcggc tactacaact tcgacggcaa tgtccttcca caccctccta 5460
tcctgcgcgg cgtggaaacc accgtcgccg cactcgccaa agccgggtcac accgtgaccc 5520
cgtggacgcc atacaagcac gatttcggcc acgatctcat ctcccatatc tacgcggctg 5580
acggcagcgc cgacgtaatg cgcatatca gtgcatccgg cgagccggcg attccaaata 5640
tcaaagacct actgaacccg aacatcaaag ctgttaacat gaacgagctc tgggacacgc 5700
atctccagaa gtggaattac cagatggagt accttgagaa atggcgggag gctgaagaaa 5760
aggccgggaa ggaactggac gccatcatcg cgccgattac gcctaccgct gcggtacggc 5820
atgaccagtt ccggtactat gggtatgcct ctgtgatcaa cctgctggat ttcacgagcg 5880
tggttggtcc ggttaccttt gcggataaga acatcgataa gaagaatgag agtttcaagg 5940
cggttagtga gcttgatgcc ctcgtcagg aagagtatga tccggaggcg taccatgggg 6000
caccggttgc agtgcaggtt atcggacgga gactcagtga agagaggacg ttggcgattg 6060

cagaggaagt ggggaagtgt ctgggaaatg tgggtgactcc atagctaata agtgtcagat 6120
 agcaattttgc acaagaaatc aataccagca actgtaaata agcgctgaag tgaccatgcc 6180
 atgctacgaa agagcagaaa aaaacctgcc gtagaaccga agagatatga cacgcttcca 6240
 tctctcaaag gaagaatccc ttcaggggttg cgtttccagt ctagacgcgt gatgggtggg 6300
 aatagggaaat atttacttgg gttatgcgtc acatagtagc accccctttt tttgcccttc 6360
 tttgatataca ttagcgattc aatacactaa ttacggacaa tcaccttggc ttctgtcatt 6420
 ctatgtgctt gtgagcgaat ctactggttt gactgctgca cggtatatgt gagatcgtgg 6480
 actgctaacc ccttctttct tcttggcaat ctatcgagga gccaaagaag aagacgcttc 6540
 aatcttcaac gacgcactgt ctgcccgaat gcaggtccac agcaactcac ccgctttcaa 6600
 agcaccceca accttgacaa gctgcttctc ccccggcaca acatcgaacc cgttgtcact 6660
 cagctccaga ccctccacct cctcgaagac gaacccttg acgggcttct ccgccgaaac 6720
 gacgacttca tcccagcgg acgaaacctc aaacgcgata ccgcggtcag acaggtcgag 6780
 gtacttgatg ggctcgggcc aagccgtgtc cgcagcgatg acggtgccag tcgcggcgtc 6840
 cgtgatggtg gcatggacca cgtacggatc gtattcggcg aggggaaagg gcttgggtgat 6900
 gtcttccggg ttggggatgg atggcgggag cgtcttgccc tggaggatgt ccgtcgcgga 6960
 gtttgcgcg gcgacgacgc gggagtgtag tatcggatcg acgacgtccc tgctgtgcg 7020
 gacggagatg aagcgcacga cgaggtccag cgcgacgggc tgggtgtcgc tgetgacgac 7080
 ccagacgtca aaggttccct cgcgagcggc aagcgtgtgg tcgacctggc cggtgacgag 7140
 gcccgagttc tcacgaccc agggccccgt ctgcgtccag tcgtgccacg tccggcagac 7200
 gccacgtcg acgcggcgca gggcccgcg gatggcgtag tacgccggct tcttgacgag 7260
 acggtagtcc accacggccc acgacatggt cggccagcag tcgttgagct gccacaccag 7320
 cgcgccgccc caccgcctgg ccccgggctt cccccactgc cgcgccagg ccttgtacgc 7380
 ggcgcgcatc gtctccgact gcacgacctg cgtcaggtgg gtgtaccgcg cgaggtcgtg 7440
 ccgcgggccc aagttgtcga cgacgtagct catcatgcgg cgctcgtggc cgatggcctt 7500
 gttgtgcgcg tcgagcacca tcgagcccgg gtacagctgg gctgggtcgc tggccatgcg 7560
 gcgcgtggtg ctgagatggg ggtatgcttc catgccgaac tcgtgacga agcggccgcc 7620
 catgttgacg gcctcttggg acttgttcat ggtcccatgc cagactgtgt ggagaggatg 7680
 gtcagtggga tgttgctgtg gagtgatattg tgtggaaatt gggggggggg gggggggggg 7740
 gcttcttact gttccactga tggatatcgc caaccgttgg atctgccgtg actagtgcac 7800
 g 7801

<210> 4
 <211> 3186
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn ADN để biến nạp

<400> 4
 cttaaggcgc ggattgagcc cacgctggca tgaagtttag agggaaacgc gccagagggtg 60
 cctttcaagt gagagcgagg ttaggggggg cttggattgg gctggaggta cggcgtgtgg 120
 cgttgcagag tacatcaatt tgcgcagtga cggatagggc ggggtgaggt agagctttcc 180
 gggagcagag gtactgctgc ttgaagccgg gctgctgtgg cgtgctgtaa cttggcccgt 240
 gcacgctttt gccatctttt tcctcgtttc gttgcttcag ccttagcaaa acccatccgc 300
 cgccatcact cgattctggg tgacgacgac gaggcaggcg ttttttattc ttttcgagca 360
 gagcattgcc tgtgtctcct ctcccagttc aaccctttga atccttgtca ttgccggccc 420
 ttgaccgccc atctctacga ctcgacgac atataccctt cccgtccatc cagatcgcgca 480
 cacacacgat ggcggccgtc gtcgacatgc cgcaccgcga gcgcggcaag cagcgagaag 540
 gcggcgactc gtaccgcccc tcgaggccag cgcgttcacg ctgcgcgtcg cgatcgccgc 600
 ctgcgcgccc ggtgcccgtg cggacggagg aggagaagca ggcggcggca aaggccgagt 660
 acgagaagct gctcaacatg cggtcgggcg gcacgtacat cccgccggcg aggctgaggg 720
 cgctgcaggc gcagatcacg gacaagagca gcaaggagta ccagcggatg gcgtgggagg 780
 cgctcaagaa gagcatcaac ggcctgatca acaaggtcaa cacggccaac atcaagcaca 840
 ttgtgcccga gctgtttggc gagaacctgg tgcgcggccg cggcctcttc tgccgctcca 900
 tcatgaaggc ccaggccgcc agtttgccct tcacgcccct ctacgccgcc atggccgcca 960
 ttgtcaacac caagctgccg caggtcggcg agctgctggt caagcgcctc atcatgcagt 1020
 tccgcaaggg cttcaagcgc aacgacaagg ccgtctgtct gtcgtcgacc accttcctcg 1080
 cccacctcat caaccagcag gtgcagcacg agatgctggc cggccagatc ctgctgctgc 1140
 tgctgcacaa gccgaccgac gacagcgctc agattgccgt gggcttctgc aaggagggtg 1200
 gccagtacct cgaggagatg cagcctgcca tttccatggc cgtcttcgac cagttccgca 1260
 acatcctcca cgagtccgac attgacaagc gaacgcagta catgattgag gtgctcttcc 1320
 agatcaggaa ggacaagttc aaggatcacc cggccatcaa ggaggagctg gacttggtgg 1380
 aggaggagga ccagatcacg cacaagggtg agcttgatgg cgagattgat gtgcaggacg 1440
 gactcaacat cttcaagtac gacccggagt gggaggagca tgaggaggca tacaagaggc 1500

tcaaggcgga gattctgggc gaagccagcg atgacgagga gggcgacgag gacgaggacg 1560
agagctccga agatgaagaa aacgaagaga caaaggccat ggagatcaag gaccagtcta 1620
acgccgactt ggtcaaccta cggaggacca tctacctcac catcatgtcg agcgccgacc 1680
cagaggaagc agttcacaag ctgatgaaga tcaacctgcc cgtcggccag gaacccgagc 1740
tgccctcgat gattgtcgag tgttgctcgc aggagaagac gtacaccaag ttctttggct 1800
tgatcggcga gcgtttcgcc aagatcaatc ggctgtggtg cgacctcttt gagcaggcct 1860
ttgtcaagta ctacgagacg atccaccgat acgaaaacaa caagctgcgg aacattgcc 1920
tgctgtttgg ccacatgttt gcttcgcgacg ctctgggctg gcactgcctt tccgtcattc 1980
acctcaacga ggaggagacc acgtcgagca gccgcattct catcaagatt ctgttccagc 2040
acatttccga ggaaatcggc ctggctaagc tccgggcacg catgactgac gagacgtgc 2100
ggcccagcct cgaaggcctc ttccccagag agaaccctcg caacatccga ttctccatca 2160
actacttcac cagcatcggc atgggtgtac tgaccgagga gatgcgagag cacctcatga 2220
acatgcccga gcctgcgctg cccgcccctg ctgctcagga ccgctcggat acggactccg 2280
tctcgagcta ttcgtcttac actcactcat catactcttc ccgctcgcgc tcacgggtccc 2340
gatctgtggg tcgtcggagc ggcggtcgag gccgatcgct ttcccgaact ccgcctcgac 2400
gtggcgcaag gagccgatcc tactctgacg actcacggtc accgtcgcgg tcaagatcac 2460
gatcccgcgc cgattccgtc tctactcgtg ggcgaaaggcg agcgtcgtac tcggccagtc 2520
ctccccggcg tgggtggccgt cgggttgcca gcagaagccg aagctactcg tcgggctcct 2580
cacggtctcc gccaccacgg aaccgcggtc gcgcacgaag caactcgtat agttcctaca 2640
gccgctctcc atcttcttca ccacgacgcg gcagagacgc agactcggcc agcccgcctc 2700
cgcgaaaggg tcgaccgcgc cagagcccac caggcggtcc cgcaggtcga aggaacagct 2760
cgtctgtcgg cagcggaggg ccccgcaaga agccccgacg ggacagccga tcgccgtctc 2820
gcgactattc gtcccgttcc ccgtctcggc cgccgtcgag atctcgatcg cctccgccgg 2880
ctgcgcgtgg ccgaaggggc tcttatacgc cgtcacgcag ccgcagcccg cctccgcgca 2940
gggtgagggg tggctcgccg ggtcgtctga ggggtgggag gtcgcctagt cctcctttgc 3000
cgggtgaagag gaggcggtat gatagcgaga gtgtttctcg gtcgccgcct cctttgaagc 3060
gcggggagaag ggataactaa acctttacct tttgaacgat gaattgttcc tcttgcttag 3120
attgaaacgg ttaagcggag tggaattggg tgggatggga aaacgtgtaa tagattgggt 3180
ggtacc 3186

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

 <220>
 <223> Oligo ADN dùng cho PCR

 <400> 5
 atacgcgtga tgggtgggaa tagggaatat tta 33

 <210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligo ADN dùng cho PCR

 <400> 6
 atactagtca cggcagatcc aacggttggc gat 33

 <210> 7
 <211> 3516
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

 <400> 7
 agagaagaat cggcgatcga atgggcgtct ttggttcgtt gtttaaagga gcgtgggcgg 60
 cgattctgga gttgattcaa gtaatagtga agaggtggaa gcttggattg ggtgaggcgc 120
 ggattgagcc cacgctggca tgaagttag agggaaacgc gccagagggtg cctttcaagt 180
 gagagcgagg ttaggggggg cttggattgg gctggaggta cggcgtgtgg cgttgcagag 240
 tacatcaatt tgcgcagtga cggatagggc ggggtgaggt agagctttcc gggagcagag 300
 gtactgctgc ttgaagccgg gctgctgtgg cgtgctgtaa cttggcccgt gcacgctttt 360
 gccatctttt tcctcgtttc gttgcttcag ccttagcaaa acccatccgc cgccatcact 420
 cgattctggg tgacgacgac gaggcaggcg ttttttattc ttttcgagca gagcattgcc 480
 tgtgtctcct ctcccagttc aaccctttga atccttgtca ttgccggccc ttgaccgccc 540
 atctctacga ctcgacgac atataccctt cccgtccatc cagatcgcca cacacacgat 600
 ggcggccgtc gtcgacatgc cgcaccgcca gcgcggcaag cagcgagaag gcggcgactc 660
 gtaccgcccc tcgaggccag cgcgttcacg ctgcgcgtcg cgatcgccgc ctgcgcgccc 720
 ggtgcccgtg cggacggagg aggagaagca ggcggcgcca aaggccgagt acgagaagct 780
 gctcaacatg cggtcggggc gcacgtacat cccgccggcg aggctgaggg cgctgcaggc 840
 gcagatcacg gacaagagca gcaaggagta ccagcggatg gcgtgggagg cgctcaagaa 900
 gagcatcaac ggctgatca acaaggtcaa cacggccaac atcaagcaca ttgtgcccga 960

gctgtttggc gagaacctgg tgcgcggcgg cggcctcttc tgccgctcca tcatgaaggc 1020
 ccaggccgcc agtttgccct tcacgcccat ctacgccgcc atggccgcca ttgtcaacac 1080
 caagctgccg caggtcggcg agctgctggt caagcgcttc atcatgcagt tccgcaaggg 1140
 cttcaagcgc aacgacaagg cegtctgtct gtcgtcgacc accttcctcg cccacctcat 1200
 caaccagcag gtgcagcacg agatgctggc cggccagatc ctgctgctgc tgctgcacaa 1260
 gccgaccgac gacagcgtcg agattgccgt gggcttctgc aaggagggtg gccagtacct 1320
 cgaggagatg cagcctgcc a tttccatggc cgtcttcgac cagttccgca acatcctcca 1380
 cgagtccgac attgacaagc gaacgcagta catgattgag gtgctcttcc agatcaggaa 1440
 ggacaagttc aaggatcacc cggccatcaa ggaggagctg gacttggtgg aggaggagga 1500
 ccagatcacg cacaaggtgg agcttgatgg cgagattgat gtgcaggacg gactcaacat 1560
 cttcaagtac gacccggagt gggaggagca tgaggaggca tacaagaggc tcaaggcgga 1620
 gattctgggc gaagccagcg atgacgagga gggcgacgag gacgaggacg aggacgagag 1680
 ctccgaagat gaagaaaacg aagagacaaa ggccatggag atcaaggacc agtctaacgc 1740
 cgacttggtc aacctacgga ggaccatcta cctcaccatc atgtcgagcg ccgaccaga 1800
 ggaagcagtt cacaagctga tgaagatcaa cctgcccgtc ggccaggaa ccgagctgcc 1860
 ctcgatgatt gtcgagtgtt gctcgagga gaagacgtac accaagttct ttggcttgat 1920
 cggcgagcgt ttcgccaaga tcaatcggct gtggtgcgac ctctttgagc aggcctttgt 1980
 caagtactac gagacgatcc accgatacga aaacaacaag ctgcggaaca ttgccatgct 2040
 gtttggccac atgtttgctt ccgacgctct gggctggcac tgcccttccg tcattcacct 2100
 caacgaggag gagaccacgt cgagcagccg catcttcac aagattctgt tccagcacat 2160
 ttccgaggaa atcggcctgg ctaagctccg ggcacgcatg actgacgaga cgctgcggcc 2220
 cagcctcgaa ggcctcttcc ccagagagaa ccctcgcaac atccgattct ccatcaacta 2280
 cttcaccagc atcggcatgg gtgtactgac cgaggagatg cgagagcacc tcatgaacat 2340
 gcccaagcct gcgctgcccg cccctgctgc tcaggaccgc tcggatacgg actccgtctc 2400
 gagctattcg tcttactc actcatcata ctcttccgc tcgcgctcac ggtcccgatc 2460
 tgtgggtcgt cggagcggcg gtcgaggccg atcgctttcc cgaactccgc ctgcacgtgg 2520
 cgcaaggagc cgatcctact ctgacgactc acggtcaccg tcgcggtcaa gatcacgatc 2580
 ccgctccgat tccgtctcta ctcgtagggc aaggcgagcg tcgtactcgg ccagtcctcc 2640
 ccggcgtggt ggccgtcggg ttgccagcag aagccgaagc tactcgtcgg gtcctcacg 2700
 gtctccgcca ccacggaacc gcggtcgcgc acgaagcaac tcgtatagtt cctacagccg 2760

ctctccatct tcttcaccac gacgcggcag agacgcagac tcggccagcc cgcctccgcg 2820
 aaggggtcga ccgcgccaga gccaccagg cgggtcccgca ggtcgaagga acagctcgtc 2880
 tgtcggcagc ggagggcccc gcaagaagcc ccgacgggac agccgatcgc cgtctcgcga 2940
 ctattcgtcc cgggtccccgt ctcgggtcgcc gtcgagatct cgatcgcctc cgccgggtgc 3000
 gcgtggccga aggggctctt atacgccgtc acgcagccgc agcccgcctc cgcgccaggg 3060
 gagggatggc tcgccgggtc gtctgagggg tgggaggtcg cctagtcctc ctttgccgg 3120
 gaagaggagg cggtatgata gcgagagtgt ttctcggtcg ccgcctcctt tgaagcgcgg 3180
 gagaagggat aactaaacct ttaccttttg aacgatgaat tgttcctctt gcttagattg 3240
 aaacggttaa gcggagtgga attgggtggg atgggaaaac gtgtaataga ttggttgatg 3300
 ggtgggaata gggaatatct acttgggtta tgcgtcacat agtagcacc cctttttttg 3360
 cccttctttg atatcattag cgattcaata cactaattac ggacaatcac cttggcttct 3420
 gtcattctat gtgcttgtga gcgaatctac tggtttgact gctgcacggg atatgtgaga 3480
 tcgtggactg ctaaccctt ctttcttctt ggcaat 3516

<210> 8
 <211> 5714
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn ADN để biến nạp

<400> 8
 cttaagcgac tcgaacgaca tatacccttc cgtccatcc agatcgcgac acacacgatg 60
 gcggccgtcg tcgacatgcc gcaccgcgag cgcggaagc agcgagaagg cggcgactcg 120
 taccgcccct cgaggccagc gcgttcacgc tcgcgtcgc gatcgccgcc tcgcgcgcgcg 180
 gtgcccgtgc ggacggagga ggagaagcag gcggcggcaa aggccgagta cgagaagctg 240
 ctcaacatgc ggtcggggcg caggtacatc ccgccggcga ggctgagggc gctgcaggcg 300
 cagatcacgg acaagagcag caaggagtac cagcggtatg cgtgggaggc gctcaagaag 360
 agcatcaacg gcctgatcaa caagggtcaac acggccaaca tcaagcacat tgtgcccag 420
 ctgtttggcg agaacctggg gcgcggccgc ggctcttct gccgctccat catgaaggcc 480
 caggccgcca gtttgccctt cagccccatc tacgccgcca tggccgcat tgtcaacacc 540
 aagctgccgc aggtcggcga gctgctggc aagcgctca tcatgcagtt ccgcaagggc 600
 ttcaagcgca acgacaaggc cgtctgtctg tcgtcgacca ccttcctcgc ccacctcatc 660
 aaccagcagg tgcagcacga gatgctggcc ggccagatcc tgctgctgct gctgcacaag 720

ccgaccgacg acagcgtcga gattgccgtg ggcttctgca aggagggttg ccagtacctc 780
 gaggagatgc agcctgccat ttccatggcc gtcttcgacc agttccgcaa catcctccac 840
 gagtccgaca ttgacaagcg aacgcagtac atgattgagg tgctcttcca gatcaggaag 900
 gacaagttca aggatcaccc ggccatcaag gaggagctgg acttggtgga ggaggaggac 960
 cagatcacgc acaaggtgga gcttgatggc gagattgatg tgcaggacgg actcaacatc 1020
 ttcaagtacg acccggagtg ggaggagcat gaggaggcat acaagaggct caaggcggag 1080
 attctgggcg aagccagcga tgacgaggag ggcgacgagg acgaggacga ggacgagagc 1140
 tccgaagatg aagaaaacga agagacaaag gccatggaga tcaaggacca gtctaacgcc 1200
 gacttgggtca acctacggag gaccatctac ctcaccatca tgtcgagcgc cgacccagag 1260
 gaagcagttc acaagctgat gggtagccgc gccgcctagt catcattgga taggcagatt 1320
 actcagcctg aatgacatca acatgttacc catgatacaa taggtcacac aaacaagcgc 1380
 taagatgcac ttggtatgac aagcccagta gtccgtttca aaagacctag atgatgaact 1440
 acaacatgag gtgttgccctc ctgatccagt ccaactgcaa acgctgatgt atactcaatc 1500
 aagcctgatg taaatgctgc gactcgattc gctggatatg aagatcaaag agagctctga 1560
 tgggtccaat atagccgggt tttgttagga cagtccacca caccgatatt agaattggtc 1620
 aagcacctta tcatttcata gagattgcgg tttctagatc tacgccagga ccgagcaagc 1680
 ccagatgaga accgacgcag atttccttgg cacctgttgc ttcagctgaa tcctggcaat 1740
 acgagatacc tgctttgaat attttgaata gctcgcccg ctgagagcat cctgaatgca 1800
 agtaacaacc gtagaggctg acacggcagg tgttgctagg gagcgtcgtg ttctacaagg 1860
 ccagacgtct tcgcggttga tatatatgta tgtttgactg caggctgctc agcgacgaca 1920
 gtcaagttcg ccctcgctgc ttgtgcaata atcgcagtgg ggaagccaca ccgtgactcc 1980
 catctttcag taaagctctg ttggtgttta tcagcaatac acgtaattta aactcgttag 2040
 catggggctg atagcttaat taccgtttac cagtgccgcg gttctgcagc tttccttggc 2100
 ccgtaaaatt cggcgaagcc agccaatcac cagctaggca ccagctaaac cctataatta 2160
 gtctcttate aacaccatcc gctcccccg gatcaatgag gagaatgagg gggatgcggg 2220
 gctaaagaag cctacataac cctcatgcca actcccagtt tacactcgtc gagccaacat 2280
 cctgactata agctaacaca gaatgcctca atcctgggaa gaactggccg ctgataagcg 2340
 cgcccgcctc gcaaaaacca tccctgatga atggaaagtc cagacgctgc ctgcggaaga 2400
 cagcgttatt gatttcccaa agaaatcggg catcctttca gaggccgaac tgaagatcac 2460
 agaggcctcc gctgcagatc ttgtgtccaa gctggcggcc ggagagttga cctcgggtgga 2520

agttacgcta gcattctgta aacgggcagc aatcgcccag cagttagtag ggtcccctct 2580
 acctctcagg gagatgtaac aacgccacct tatgggacta tcaagctgac gctggcttct 2640
 gtgcagacaa actgcgcca cgagttcttc cctgacgccg ctctcgcgca ggcaaggga 2700
 ctcgatgaat actacgcaa gcacaagaga cccgttggtc cactccatgg cctccccatc 2760
 tctctcaaag accagcttcg agtcaaggta caccgttgcc cctaagtcgt tagatgtccc 2820
 tttttgtcag ctaacatatg ccaccagggc tacgaaacat caatgggcta catctcatgg 2880
 ctaaacaagt acgacgaagg ggactcgggt ctgacaacca tgctccgcaa agccgggtgcc 2940
 gtctttctacg tcaagacctc tgtcccgcag accctgatgg tctgcgagac agtcaacaac 3000
 atcatcgggc gcaccgtcaa cccacgcaac aagaactggc cgtgcggcgg cagttctggt 3060
 ggtgaggggtg cgatcgttg gattcgtggt ggcgtcatcg gtgtaggaac ggatatcgg 3120
 ggctcgattc gagtgcggc cgcggtcaac ttcctgtacg gtctaaggcc gagtcatggg 3180
 cggctgccgt atgcaaagat ggcgaacagc atggaggggc aggagacggg gcacagcgtt 3240
 gtcggggccga ttacgcactc tgttgagggg gagtccctcg cctcttcctt cttttcctgc 3300
 tctataccag gcctccactg tcctcctttc ttgcttttta tactatatac gagaccggca 3360
 gtcactgatg aagtatgtta gacctccgc tcttcaccaa atccgtcctc ggtcaggagc 3420
 catggaaata cgactccaag gtcattccca tgccctggcg ccagtccgag tcggacatta 3480
 ttgcctccaa gatcaagaac ggcgggctca atatcggtca ctacaacttc gacggcaatg 3540
 tccttccaca ccctcctatc ctgcgcggcg tggaaaccac cgtcgccgca ctgcctaaag 3600
 ccgggtcacac cgtgaccccg tggacgccat acaagcacga tttcggccac gatctcatct 3660
 cccatatcta cgcggtgac ggcagcgccg acgtaatgcg cgatatcagt gcatccggcg 3720
 agccggcgat tccaaatatc aaagacctac tgaaccgaa catcaaagct gttaacatga 3780
 acgagctctg ggacacgcat ctccagaagt ggaattacca gatggagtag cttgagaaat 3840
 ggcgggaggc tgaagaaaag gccgggaagg aactggacgc catcatcgcg ccgattacgc 3900
 ctaccgctgc ggtacggcat gaccagttcc ggtactatgg gtatgcctct gtgatcaacc 3960
 tgctggatth cacgagcgtg gttgttccgg ttacctttgc ggataagaac atcgataaga 4020
 agaatgagag tttcaaggcg gttagttagc ttgatgccct cgtgcaggaa gagtatgatc 4080
 cgaggcgta ccatggggca ccggttgtag tgcaggttat cggacggaga ctcagtgaag 4140
 agaggacgtt ggcgattgca gaggaagtgg ggaagttgct gggaaatgtg gtgactccat 4200
 agctaataag tgtcagatag caatttgac aagaaatcaa taccagcaac tgtaaataag 4260
 cgctgaagtg accatgccat gctacgaaag agcagaaaaa aacctgccgt agaaccgaag 4320

```

agatatgaca cgcttccatc tctcaaagga agaatccctt caggggttgcg tttccagtct 4380
agacgcgttg tcaagtacta cgagacgata caccgatacg aaaacaacaa gctgcggaac 4440
attgccatgc tgtttggcca catgtttgct tccgacgctc tgggctggca ctgcctttcc 4500
gtcattcacc tcaacgagga ggagaccacg tcgagcagcc gcatcttcat caagattctg 4560
ttccagcaca tttccgagga aatcggcctg gctaagctcc gggcacgcat gactgacgag 4620
acgctgcggc ccagcctcga aggcctcttc ccagagaga accctcgcaa catccgattc 4680
tccatcaact acttcaccag catcggcatg ggtgtactga ccgaggagat gcgagagcac 4740
ctcatgaaca tgccaagcc tgcgctgccc gccctgctg ctcaggaccg ctcggatacg 4800
gactccgtct cgagctattc gtcttacact cactcatcat actcttcccg ctcgcgctca 4860
cggccccgat ctgtgggtcg tcggagcggc ggtcgaggcc gatcgctttc ccgaactccg 4920
cctcgacgtg gcgcaaggag ccgatacctac tctgacgact cacggtcacc gtcgcggtca 4980
agatcacgat cccgctccga ttccgtctct actcgtgggc gaaggcgagc gtcgtactcg 5040
gccagtcctc cccggcgtgg tggccgtcgg gttgccagca gaagccgaag ctactcgtcg 5100
ggctcctcac ggtctccgcc accacggaac cgcggtcgcg cacgaagcaa ctcgatatag 5160
tcctacagcc gctctccatc ttcttcacca cgacgcggca gagacgcaga ctcggccagc 5220
ccgcctccgc gaaggggtcg accgcgccag agcccaccag gcggtccgc aggtcgaagg 5280
aacagctcgt ctgtcggcag cggagggccc cgcaagaagc cccgacggga cagccgatcg 5340
ccgtctcgcg actattcgtc cgggtccccg tctcggtcgc cgtcgagatc tcgatcgcct 5400
ccgcgggctg cgcgtggccg aaggggctct tatacgccgt cacgcagccg cagcccgcct 5460
ccgcgcaggg tgagggatgg ctgccgggt cgtctgaggg gtgggaggtc gcctagtcct 5520
cctttgccgg tgaagaggag gcggtatgat agcgagagtg tttctcggtc gccgcctcct 5580
ttgaagcgcg ggagaaggga taactaaacc ttacctttt gaacgatgaa ttgttcctct 5640
tgcttagatt gaaacggtta agcggagtgg aattgggtgg gatgggaaaa cgtgtaatag 5700
attggttgac tagt 5714

```

<210> 9
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligo ADN dùng cho PCR

<400> 9
 atgcatctta agcgactcga acgacatata cccttcc

37

<210> 10
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN dùng cho PCR

<400> 10
atggtaccca tcagcttgatg aactgcttcc tct 33

<210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN dùng cho PCR

<400> 11
atacgcgttg tcaagtacta cgagacgatc cac 33

<210> 12
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN dùng cho PCR

<400> 12
atactagtca accaatctat tacacgtttt ccc 33