



(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)



1-0047934

(51)^{2020.01} C12N 15/31; C12N 1/21; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/63; C07K 14/245

(21) 1-2021-07810

(22) 09/09/2020

(86) PCT/KR2020/012154 09/09/2020

(87) WO2021/049866 18/03/2021

(30) 10-2019-0111509 09/09/2019 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/05/2022 410A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) SEO, Chang Il (KR); KIM, Hyo Jin (KR); LEE, Ji Sun (KR); CHOI, Sol (KR).

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

(54) BIẾN THỂ PROTEIN SẢN SINH L-THREONIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
L-THREONIN SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2021-07810

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể protein sản sinh L-threonin, vi sinh vật bao gồm biến thể này, và phương pháp sản xuất L-threonin sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể protein sản sinh L-threonin và phương pháp sản xuất L-threonin bằng cách sử dụng biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-threonin (L-Thr) là axit amin thiết yếu đã được sử dụng rộng rãi như chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc tương tự, và cũng được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu thô cho các sản phẩm dược phẩm, chẳng hạn như dung dịch tiêm truyền, và nguyên liệu cho thực phẩm sức khỏe.

Hiện nay, quá trình lên men trực tiếp sử dụng các vi sinh vật chủ yếu được sử dụng để sản xuất L-threonin. Đối với các vi sinh vật được sử dụng để sản xuất L-threonin, ban đầu, các chủng được chọn lọc biểu hiện tính kháng chất tương tự thông qua đột biến hóa học hoặc vật lý chủ yếu được sử dụng, nhưng các chủng tái tổ hợp sử dụng công nghệ kỹ thuật gen chủ yếu được sử dụng do sự phát triển nhanh chóng của công nghệ tái tổ hợp gen và thiết lập các cơ chế điều chỉnh cấp độ phân tử vào những năm 1990.

Trong khi đó, sự biểu hiện của gen có khả năng sản sinh axit amin cụ thể đã góp phần làm tăng năng suất axit amin tương ứng ở các vi sinh vật. Sự tăng cường gen sản sinh L-lysine (lysE) trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sp. đã cải thiện năng suất lysine (công bố đơn quốc tế số WO 9723597 A2). Patent châu Âu số EP 1016710 B1 đã bộc lộ năng suất axit L-glutamic, L-lysine, L-threonine, L-alanine, L-histidine, L-proline, L-arginine, L-valine và L-isoleucine được cải thiện bằng cách tăng cường các gen yahN, yeaS, yfiK và yggA, trong đó các chức năng chưa được xác định ở *E. coli*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã lựa chọn rhtC đột biến để cải thiện khả năng sản sinh L-threonine của gen sản sinh L-threonine (RhtC) được mã hóa bởi rhtC, và xác minh rằng lượng sản sinh L-threonine đã được cải thiện đáng kể thông qua đột biến, do đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể sản sinh L-threonine bao gồm thay thế bằng axit amin khác ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 hoặc 62 trong trình tự axit amin

SEQ ID NO: 1, có sự tương đồng trình tự không nhỏ hơn 80% và dưới 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính sản sinh L-threonin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vector bao gồm polynucleotit.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh L-threonin, vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể sản sinh L-threonin, polynucleotit mã hóa biến thể và vector bao gồm polynucleotit.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Việc nuôi cấy vi sinh vật sản sinh L-threonin bằng cách sử dụng các biến thể sản sinh L-threonin có thể tạo ra L-threonin cao so với vi sinh vật có protein không sửa đổi hiện có.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể như sau. Mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế này cũng có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả chi tiết bên dưới.

Theo một khía cạnh của sáng chế để đạt được mục đích nêu trên, đề xuất biến thể sản sinh L-threonin bao gồm ít nhất một thay thế axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.

Cụ thể, sáng chế đề xuất biến thể protein trong đó i) axit amin thứ 53 được thay thế bằng axit amin khác và/hoặc ii) axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Thay thế axit amin có thể bao gồm i) thay thế axit amin thứ 53 bằng threonin, hoặc ii) thay thế axit amin thứ 62 bằng axit amin được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axit glutamic hoặc tryptophan.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “threonin (Thr)” đề cập đến một trong những axit amin thiết yếu không được tổng hợp trong cơ thể và chỉ có thể được cung cấp qua thức ăn, trong đó threonin tạo thành dịch nhầy như chất bảo vệ biểu mô ruột, và sự thiếu hụt của threonin có thể làm giảm sự phát triển và gây giảm cân. Threonin được sử dụng rộng rãi như chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu thô cho các sản phẩm dược phẩm như dung dịch tiêm truyền, nguyên liệu cho thực phẩm sức khỏe, và loại tương tự. Giống như các axit amin khác, threonin cũng có các đồng phân lập thể dạng D và L, và hầu hết các dạng threonin tự nhiên tồn tại dưới dạng L-threonin (L-Thr) là đồng phân lập thể dạng L. Ở đây, threonin (Thr) có thể được sử dụng thay thế cho L-threonin (L-Thr).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất sản sinh L-threonin” hoặc “protein bơm đẩy L-threonin” đề cập đến protein làm trung gian cho việc sản sinh L-threonin ra khỏi tế bào, trong đó protein được biết đến như protein màng trong có năm miền xuyên màng. Phân tích cấu trúc liên kết thực nghiệm cho thấy rằng đầu C của L-threonin có trong tế bào chất (Daley DO *et al.*, Phân tích cấu trúc liên kết toàn diện của hệ protein màng trong của *Escherichia coli*, Science 2005, ngày 27 tháng 5 năm 2005; 308 (5726): 1321–3.). Ví dụ, chất sản sinh L-threonin có thể là protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115. Protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 có thể được sử dụng thay thế cho nhau với protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 hoặc protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115. Trong sáng chế này, chất sản sinh L-threonin có thể được sử dụng thay thế cho protein RhtC hoặc RhtC.

Ở đây, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115 đề cập đến mã nhận biết của trình tự axit amin có khả năng sản sinh L-threonin. Cụ thể, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 là mã nhận biết của trình tự của protein có khả năng sản sinh L-threonin được mã hóa bởi gen *rhtC*. Trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 có sẵn thông qua NCBI GenBank, là cơ sở dữ liệu đã biết. Ví dụ, SEQ ID NO: 1 có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), SEQ ID NO: 13 có thể có nguồn gốc từ *Shigella flexneri* và SEQ ID NO: 115 có thể có nguồn gốc từ *Escherichia fergusonii*, nhưng các trình tự này không bị giới hạn ở đây, và bất kỳ trình tự axit amin nào đối với protein có hoạt tính giống như các protein

bao gồm các trình tự axit amin này có thể được bao gồm nhưng không giới hạn. SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 có thể có độ tương đồng 99% với SEQ ID NO: 1, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Mặc dù protein có khả năng sản sinh L-threonin theo sáng chế được định nghĩa là protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, nó sẽ hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật rằng các protein như vậy không loại trừ đột biến có thể xảy ra do thêm trình tự vô nghĩa phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, hoặc đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cam trong đó và protein như vậy tương ứng với protein có khả năng sản sinh L-threonin theo sáng chế, miễn là protein có hoạt tính tương đương hoặc tương ứng với protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115. Cụ thể, protein có hoạt tính sản sinh L-threonin theo sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% tương đồng hoặc đồng nhất với nó. Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm vào một phần của chúng cũng có thể nằm trong phạm vi các protein theo sáng chế bị đột biến, miễn là protein có trình tự axit amin tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện tác dụng tương ứng với protein bên trên.

Tức là, mặc dù được mô tả là “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin được thể hiện bằng số trình tự cụ thể” hoặc “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng số trình tự cụ thể” trong sáng chế, protein có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm vào một phần của chúng cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là protein có hoạt tính đồng nhất hoặc tương ứng với hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin có số trình tự tương ứng. Ví dụ, rõ ràng là đối với “polypeptit bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1”, bất kỳ polypeptit nào cũng có thể nằm trong “polypeptit bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1” miễn là polypeptit có trình tự tương ứng với mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự có hoạt tính đồng nhất hoặc tương ứng với nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến protein trong đó ít nhất một axit amin ở dạng thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi khác với axit amin của trình tự nêu trên nhưng vẫn duy trì các chức năng hoặc đặc tính của nó. Biến thể khác biệt với

trình tự được xác định bởi một số thay thế, xóa hoặc thêm axit amin. Thông thường, biến thể như vậy có thể được xác định bằng cách sửa đổi một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin của protein và đánh giá các đặc tính của protein đã sửa đổi. Tức là, khả năng của biến thể có thể tăng lên, không thay đổi hoặc giảm xuống so với khả năng của protein tự nhiên của nó. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể trong đó ít nhất một phần (ví dụ, trình tự dẫn đầu đầu N hoặc miền xuyên màng) được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần của đầu N và/hoặc đầu C của protein trưởng thành được loại bỏ. Thuật ngữ “biến thể” cũng có thể được sử dụng thay thế cho “sửa đổi”, “protein sửa đổi”, “polypeptit sửa đổi”, “đột biến”, “mutein”, “phân ly” hoặc tương tự, và bất kỳ thuật ngữ nào được sử dụng theo nghĩa bị đột biến có thể được sử dụng mà không bị giới hạn. Theo mục đích của sáng chế, biến thể có thể đề cập đến những biến thể trong đó hoạt tính của protein đột biến được tăng lên so với hoạt tính của protein kiểu hoang dại tự nhiên hoặc không bị sửa đổi, nhưng biến thể không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, biến thể có thể có một hoặc nhiều sự thay thế bảo thủ trong khi vẫn giữ được một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên sự tương đồng về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc tính chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, trong số các axit amin tích điện, các axit amin (tính bazơ) tích điện dương bao gồm arginin, lysin và histidin; và các axit amin (tính axit) tích điện tích âm bao gồm axit glutamic và axit aspartic; và trong số các axit amin không tích điện, các axit amin không phân cực bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan và prolin; axit amin phân cực hoặc ưa nước bao gồm serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin và glutamin; và trong số các axit amin phân cực, các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm xóa hoặc thêm các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các đặc điểm và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc trình tự dẫn đầu) của đầu N của protein có liên quan đến việc chuyển đồng dịch mã hoặc sau dịch mã các protein. Ngoài ra, polypeptit cũng có thể được liên hợp với trình tự hoặc trình tự liên kết khác để được xác định, tinh sạch hoặc tổng hợp.

“Thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn miễn là axit amin khác với axit amin trước khi thay thế. Tức là, khi alanin là axit amin thứ 53 được thay thế bằng axit amin khác với alanin, hoặc leuxin là axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin khác với leuxin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115, sự thay thế như vậy không bị giới hạn. Như đối với cụm từ “axit amin cụ thể được thay thế” trong sáng chế, rõ ràng rằng axit amin được thay thế bằng axit amin khác với axit amin trước khi thay thế, ngay cả khi nó không được mô tả cụ thể rằng axit amin đã được thay thế bằng axit amin khác.

Biến thể có thể là biến thể trong đó ít nhất một axit amin thứ 53 hoặc axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin khác với axit amin trước khi thay thế. Ngoài ra, biến thể có thể là biến thể có axit amin không thay đổi, trong đó axit amin đã thay thế là khác với axit amin trước khi thay thế, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Cụ thể, biến thể có thể là biến thể trong đó i) axit amin thứ 53 được thay thế bằng axit amin khác hoặc ii) axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115. Việc thay thế bằng axit amin khác có thể bao gồm i) thay thế axit amin thứ 53 bằng threonin, hoặc ii) thay thế axit amin thứ 62 bằng axit amin được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axitglutamic hoặc tryptophan. Cụ thể hơn, biến thể có thể là biến thể trong đó i) axit amin thứ 53 được thay thế bằng threonin, hoặc ii) axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axitglutamic hoặc tryptophan trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115.

Biến thể sản sinh L-threonin được đề xuất theo sáng chế có thể đề cập đến biến thể trong đó khả năng sản sinh L-threonin được tăng lên so với protein trước khi đột biến bằng cách thay thế axit amin ở vị trí cụ thể, trong số các protein có khả năng sản sinh L-threonin nêu trên.

Biến thể có i) thay thế axit amin thứ 53 bằng threonin và ii) thay thế axit amin thứ 62 bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 có thể là biến thể bao gồm bất kỳ trình tự axit amin nào SEQ ID NO:

93 đến SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 và SEQ ID NO: 116, cụ thể là chủ yếu bao gồm bất kỳ trình tự axit amin nào SEQ ID NO: 93 đến SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 và SEQ ID NO: 116, và cụ thể hơn là bao gồm bất kỳ trình tự axit amin nào SEQ ID NO: 93 đến SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 và SEQ ID NO: 116.

Biến thể có thể là biến thể bao gồm thay thế bằng axit amin khác tại vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 hoặc 62 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, hoặc dưới 100% sự tương đồng trình tự với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115, và có hoạt tính sản sinh L-threonin.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm bất kỳ trình tự axit amin nào SEQ ID NO: 93 đến SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 và SEQ ID NO: 116, hoặc trình tự axit amin trong đó ít nhất một axit amin được chọn từ axit amin thứ 53 hoặc 62 trong trình tự axit amin là cố định và có ít nhất 80% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Cụ thể, biến thể của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với bất kỳ trình tự axit amin nào SEQ ID NO: 93 đến SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114 và SEQ ID NO: 116. Rõ ràng là bất kỳ protein nào có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc thêm vào một phần của trình tự khác với các vị trí axit amin thứ 53 hoặc 62 cũng có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và thể hiện hoạt tính tương ứng với protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit nhất định và nó có thể được biểu thị bằng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit hoặc polypeptit bảo tồn có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và các hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình căn sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể thường lai với nhau dọc theo ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc toàn bộ chiều dài của các trình tự trong các điều kiện vừa phải hoặc nghiêm ngặt cao hơn. Trong phép lai, các polynucleotit có chứa (đơn vị mã hóa) thoái biến thay vì codon cũng được xem xét.

Xem xét bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán máy tính đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, chương trình “FASTA” sử dụng các tham số mặc định được giới thiệu bởi Pearson *et al.* (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444]. Ngoài ra, thuật toán Needleman-Wunsch (1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Needleman của bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu của gói EMBOSS (Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản cao hơn) có thể được sử dụng để xác định tương tự (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al.*, *Các axit nucleic Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [*ET AL.*, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); Hướng dẫn cho các máy tính lớn, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.] (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST từ cơ sở dữ liệu thông tin công nghệ sinh học trung tâm quốc gia hoặc ClustalW.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc các polypeptit có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự thông qua chương trình máy tính GAP, chẳng hạn như chương trình được giới thiệu bởi Needleman *et al.* (*J Mol Biol.* 48: 443 (1970)), như được bộc lộ bởi Smith và Waterman (*Adv. Appl. Math* (1981) 2: 482). Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất là số ký tự được căn chỉnh tương tự (tức là, các nucleotit hoặc các axit amin) được chia cho tổng số các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong hai trình tự. Các tham số mặc định đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh đơn phân (bao gồm giá trị 1 đối với đồng nhất và giá trị 0 đối với không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov *et al.*, (*Nucl. Acids Res.* 14: 6745 (1986)) như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, eds. (Bản đồ trình tự và cấu trúc protein, Quỹ nghiên cứu y sinh quốc gia, trang 353-358 (1979) hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống và hàm phạt bổ sung 0,10 đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống (hoặc hàm phạt mở khoảng trống bằng 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống bằng 0,5); và (3) không có hàm phạt đối với các khoảng trống cuối. Do đó, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” thể hiện mức độ liên quan giữa các trình tự.

Ngoài ra, xem xét bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có tương đồng,

tương tự hoặc đồng nhất hay không có thể được xác nhận bằng cách so sánh các trình tự này thông qua các thí nghiệm lai Southern được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai thích hợp cần xác định có thể được xác định trong phạm vi của cùng lĩnh vực kỹ thuật và bằng phương pháp đã biết đến với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, Nhân bản phân tử, Sổ tay hướng dẫn phòng thí nghiệm, Ấn bản lần thứ 2, Nhà xuất bản Phòng thí nghiệm Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour, New York, 1989; FM Ausubel *et al.*, Các giao thức hiện tại trong sinh học phân tử, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể của chất sản sinh L-threonin” có thể được sử dụng thay thế cho polypeptit đã sửa đổi có khả năng sản sinh L-threonin, polypeptit đã sửa đổi tạo ra L-threonin, polypeptit đã sửa đổi sản sinh L-threonin, polypeptit đã sửa đổi có hoạt tính sản sinh L-threonin, biến thể có hoạt tính sản sinh L-threonin, biến thể sản sinh L-threonin, RhtC đột biến, và biến thể RhtC, chất sản sinh L-threonin đột biến hoặc tương tự. Protein có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Biến thể sản sinh L-threonin có thể bao gồm đột biến ở vị trí thứ 53 và/hoặc thứ 62 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 hoặc bất kỳ biến thể nào có trình tự axit amin có thêm hoặc xóa axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 cũng có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là biến thể bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí tương ứng với axit amin thứ 53 và/hoặc thứ 62 từ đầu N SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115. Biến thể của chất sản sinh L-threonin có thể là biến thể trong đó axit amin thứ 53 và/hoặc thứ 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, hoặc có thể là chất sản sinh L-threonin đột biến, bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115 hoặc có hoạt tính tăng cường so với vi sinh vật hoang dại có nguồn gốc từ chất sản sinh L-threonin trước khi đột biến. Biến thể sản sinh L-threonin như vậy đề cập đến biến thể trong đó trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 hoặc 62 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115 bị đột biến.

Đột biến của axit amin thứ 53 hoặc 62 có thể là i) thay thế axit amin thứ 53 bằng threonin, hoặc ii) thay thế axit amin thứ 62 bằng axit amin được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axit glutamic hoặc tryptophan.

Cụ thể, biến thể sản sinh L-threonin có thể là biến thể trong đó trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, i) axit amin thứ 53 được thay thế bằng threonin, hoặc ii) axit amin thứ 62 được thay thế bằng axit amin được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axit glutamic, hoặc tryptophan, và có thể là biến thể có hoạt tính tăng cường so với protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115 hoặc vi sinh vật hoang dại có nguồn gốc từ chất sản sinh L-threonin trước khi đột biến.

Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật bao gồm biến thể sản sinh L-threonin cho thấy sự gia tăng lượng sản sinh L-threonin. Điều này có ý nghĩa ở chỗ, lượng sản sinh L-threonin có thể được tăng lên bởi biến thể sản sinh L-threonin theo sáng chế, trong khi vi sinh vật hoang dại không thể sản xuất L-threonin, hoặc, ngay cả khi có thể, nó chỉ có thể sản sinh một lượng rất nhỏ L-threonin.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin.

L-threonin, protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính sản sinh L-threonin, và biến thể của chúng như được mô tả bên trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến polyme của các đơn vị nucleotit được liên kết trong một loại chuỗi thông qua liên kết cộng hóa trị, và với chuỗi ADN hoặc ARN có chiều dài định trước hoặc dài hơn. Cụ thể hơn, thuật ngữ này đề cập đến đoạn polynucleotit mã hóa biến thể.

Polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin theo sáng chế có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở bất kỳ trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit đã sửa đổi có hoạt tính sản sinh L-threonin theo sáng chế. Theo sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của chất sản sinh L-threonin là gen *rhtC*, có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), *Shigella flexneri* hoặc *Escherichia fergusonii*, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Ngoài ra, gen có thể là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, và cụ thể hơn là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có thể là trình tự bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Cụ thể, polynucleotit theo sáng chế có thể được sửa đổi khác nhau trong vùng mã hóa của nó trong phạm vi mà trình tự axit amin của polypeptit không sửa đổi, xét đến sự thoái biến codon hoặc các codon được sinh vật ưa thích trong đó polypeptit được biểu hiện. Cụ thể, bất kỳ trình tự polynucleotit nào cũng có thể được bao gồm mà không giới hạn miễn là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin, trong đó axit amin thứ 53 hoặc 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115.

Ngoài ra, bất kỳ trình tự nào cũng có thể được bao gồm nhưng không giới hạn miễn là trình tự mã hóa protein có hoạt tính sản sinh L-threonin, trong đó axit amin thứ 53 hoặc 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113, hoặc SEQ ID NO: 115, bằng cách lai với đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit, trong các điều kiện nghiêm ngặt. “Điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả cụ thể trong tài liệu (tham khảo Sambrook *et al.*, supra, 9.50–9.51, 11.7–11.8). Ví dụ, các điều kiện có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao, chẳng hạn như các gen có ít nhất 40%, cụ thể là ít nhất 90%, cụ thể hơn là ít nhất 95%, cụ thể hơn nữa là ít nhất 97%, và cụ thể nhất là ít nhất 99% tương đồng hoặc đồng nhất được lai hóa với nhau, trong khi các gen có tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn của chúng không được lai hóa với nhau; hoặc các điều kiện rửa thông thường để lai hóa southern (tức là, các điều kiện để rửa một lần, và cụ thể hai hoặc ba lần dưới nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng là 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS; cụ thể 60°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS; và cụ thể hơn 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS).

Quá trình lai hóa đòi hỏi hai axit nucleic phải có trình tự bổ sung, mặc dù có thể xảy ra sự không khớp giữa các bazơ tùy thuộc vào mức độ lai hóa. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin bổ sung cho thymine, và xytosin bổ sung cho guanin. Do đó, sáng chế có thể không chỉ bao gồm các trình tự axit nucleic về cơ bản tương tự nhau, mà còn bao gồm các đoạn axit nucleic riêng biệt bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, các polynucleotit có tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện ở giá trị T_m là 55°C bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai và sử dụng 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 sáng chế không bị giới hạn ở đó và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy theo mục đích.

Mức độ nghiêm ngặt thích hợp để lai hóa các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài của polynucleotit và mức độ bổ sung của chúng, và các biến thể của chúng đã được biết đến nhiều trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Sambrook *et al.*, supra).

Theo khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất vector bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin.

L-threonin, protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính sản sinh L-threonin, và biến thể của chúng như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein đích, được liên kết chức năng với trình tự kiểm soát thích hợp để protein đích có thể được biểu hiện trên vật chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát có thể bao gồm promoter có khả năng bắt đầu phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để kiểm soát phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom của mRNA thích hợp và trình tự kiểm soát sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector được dịch mã vào trong tế bào chủ thích hợp, nó có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, và có thể được tích hợp vào trong bộ gen của nó.

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

Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein sửa đổi đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế với polynucleotit sửa đổi thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể trong nội bào. Việc chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng

dụng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây. Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu lựa chọn để xác nhận nó có chèn thành công vào trong nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn được sử dụng để lựa chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận xem phân tử axit nucleic đích đã được chèn, và các chỉ dấu tạo ra các kiểu hình có thể lựa chọn, chẳng hạn như, kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào, biểu hiện của các protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong trường hợp khi các tác nhân lựa chọn được xử lý, chỉ các tế bào có khả năng biểu hiện các chỉ dấu lựa chọn có thể tồn tại hoặc biểu hiện các tính trạng kiểu hình khác, sao cho các tế bào được biến nạp có thể được lựa chọn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất vi sinh vật sản sinh L-threonin bằng cách bao gồm biến thể sản sinh L-threonin hoặc polynucleotit mã hóa biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi” hoặc “vi sinh vật bao gồm biến thể sản sinh L-threonin” đề cập đến vi sinh vật thu được bằng cách truyền khả năng sản sinh L-threonin cho vi sinh vật có khả năng sản xuất L-threonin suy giảm tự nhiên hoặc chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh L-threonin. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể sản sinh L-threonin bao gồm ít nhất một đột biến axit amin có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115, trong đó đột biến axit amin có thể bao gồm sự thay thế axit amin thứ 53 hoặc 62 từ đầu N bằng axit amin khác. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện polypeptit đã sửa đổi trong đó axit amin thứ 53 hoặc 62 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 113 hoặc SEQ ID NO: 115 và có hoạt tính sản sinh L-threonin, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

L-threonin, protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính sản sinh L-threonin, và biến thể của chúng như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được biểu hiện/biểu hiện” đối với protein đề cập đến trạng thái trong đó protein đích được đưa vào vi sinh vật hoặc protein đích được sửa đổi để được biểu hiện trong vi sinh vật. Khi protein đích là protein có trong vi sinh vật, thuật ngữ này đề cập đến trạng thái trong đó hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi của protein. Theo mục đích của sáng chế, “protein đích” có thể là biến thể protein nêu trên có khả năng sản sinh L-

threonin.

Cụ thể, thuật ngữ “đưa vào protein” chỉ ra rằng vi sinh vật biểu hiện hoạt tính của protein cụ thể vốn không được sở hữu ban đầu của nó hoặc thể hiện hoạt tính tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi protein tương ứng. Ví dụ, thuật ngữ này có thể chỉ ra rằng một polynucleotit mã hóa protein cụ thể được đưa vào nhiễm sắc thể của vi sinh vật hoặc vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein cụ thể được đưa vào vi sinh vật, do đó thể hiện hoạt tính của protein cụ thể. Thuật ngữ “tăng cường hoạt tính” chỉ ra rằng hoạt tính của protein cụ thể được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi của protein cụ thể trong vi sinh vật. “Hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể ban đầu được sở hữu bởi chúng bố mẹ trước khi sửa đổi chúng khi vi sinh vật bị biến đổi do đột biến gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo.

Cụ thể, việc tăng cường hoạt tính theo sáng chế có thể đạt được bằng một hoặc nhiều phương pháp bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: phương pháp tăng số lượng bản sao nội bào của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp đưa đột biến vào trình tự kiểm soát biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein có hoạt tính sản sinh L-threonin bằng trình tự có hoạt tính mạnh; phương pháp thay thế gen mã hóa protein tự nhiên có hoạt tính sản sinh L-threonin trên nhiễm sắc thể bằng gen mã hóa biến thể protein; phương pháp đưa thêm đột biến vào gen mã hóa protein có hoạt tính sản sinh L-threonin để tăng cường hoạt tính của biến thể protein; và phương pháp đưa biến thể protein vào vi sinh vật, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo cách trên, việc tăng số lượng bản sao của gen có thể được thực hiện theo cách mà gen đó được liên kết chức năng với vector hoặc bằng cách chèn gen vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Cụ thể, vector mà polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế được liên kết chức năng và có thể sao chép và hoạt động không phụ thuộc vào tế bào chủ, có thể được đưa vào tế bào chủ. Ngoài ra, vector mà polynucleotit được liên kết chức năng và có thể chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, có thể được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Việc đưa polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể đạt được bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng.

Tiếp theo, việc sửa đổi trình tự kiểm soát biểu hiện để tăng sự biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trình tự của axit nucleic thông qua xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp chúng để tăng cường hơn nữa hoạt động của trình tự kiểm soát biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính mạnh hơn, nhưng sáng chế không hạn chế cụ thể ở đó. Trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể bao gồm trình tự khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, các trình tự kiểm soát kết thúc phiên mã và dịch mã, và tương tự, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Promotor mạnh, thay vì promotor tự nhiên, có thể được liên kết với vùng phía trước của đơn vị biểu hiện polynucleotit, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Các ví dụ đã biết về promotor mạnh có thể bao gồm promotor cj1 đến cj7 (Patent Hàn Quốc số 10-0620092), promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor tac, promotor lambda phage PR, promotor PL, promotor tet, promotor gapA, promotor SPL7, promotor SPL13 (sm3) (Patent Hàn Quốc số 10-1783170), promotor O2 (Patent Hàn Quốc số 10-1632642), promotor tkt, promotor yccA, và tương tự, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, việc sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên trình tự kiểm soát biểu hiện thông qua xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit đã sửa đổi để có hoạt tính mạnh hơn, nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở đó.

Việc đưa vào và tăng cường hoạt tính của protein nói chung có thể làm tăng hoạt tính hoặc nồng độ của protein tương ứng lên ít nhất 1%, ít nhất 10%, ít nhất 25%, ít nhất 50%, ít nhất 75%, ít nhất 100%, ít nhất ít nhất 150%, ít nhất 200%, ít nhất 300%, ít nhất 400%, hoặc ít nhất 500% và lên đến 1.000% hoặc 2.000% so với hoạt tính hoặc nồng độ của protein trong chủng vi sinh vật không sửa đổi hoặc hoang dại, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật không sửa đổi” đề cập đến bản thân chủng tự nhiên, vi sinh vật không chứa biến thể sản sinh L-threonin hoặc vi sinh vật không biến nạp với vector bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể sản sinh L-threonin, và không loại trừ chủng chứa đột biến có thể xuất hiện tự nhiên trong vi sinh vật.

Theo sáng chế, vi sinh vật chứa biến thể sản sinh L-threonin hoặc biến thể mã hóa polynucleotit có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được điều chế bằng cách biến nạp với vector bao gồm polynucleotit, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” chỉ ra rằng vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích được đưa vào tế bào chủ để biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit trong tế bào chủ. Polynucleotit được biến nạp có thể là bất kỳ polypeptit nào miễn là polypeptit đó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, bất kể polynucleotit được chèn vào và nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào chủ hay nằm ngoài nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào bất kỳ hình dạng nào miễn là polynucleotit có thể được đưa vào và biểu hiện trong tế bào chủ. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen chứa tất cả các yếu tố cần thiết để tự biểu hiện. Catxet biểu hiện có thể bao gồm promotor, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã, có thể được liên kết chức năng với polynucleotit. Catxet biểu hiện có thể là vector biểu hiện cho phép tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ để được liên kết chức năng với các trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, thuật ngữ “được liên kết chức năng” đề cập đến liên kết chức năng giữa trình tự gen và trình tự promotor để khởi động và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh L-threonin” bao gồm tất cả các vi sinh vật có biến đổi gen xảy ra tự nhiên hoặc nhân tạo và đề cập đến vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do chèn gen ngoại sinh hoặc tăng cường hoặc làm bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, trong đó vi sinh vật có đột biến gen hoặc tăng cường hoạt tính để sản sinh L-threonin mong muốn. Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh L-threonin có thể chỉ ra vi sinh vật có thể tạo ra L-threonin mong muốn vượt quá từ nguồn cacbon trong môi trường, so với vi sinh vật không sửa đổi hoặc hoang dại, bằng cách chứa biến thể sản sinh L-threonin. Theo sáng chế, “vi sinh vật sản sinh L-threonin” có thể được sử dụng thay thế cho “vi sinh vật có khả năng sản sinh L-threonin” hoặc “L-threonin được sản sinh bởi vi sinh vật”.

Vi sinh vật sản sinh L-threonin có thể là vi sinh vật tái tổ hợp. Vi sinh vật tái tổ

hợp được mô tả ở trên.

Vi sinh vật sản sinh L-threonin không giới hạn cụ thể ở các loài của chúng miễn là vi sinh vật đó có thể sản sinh L-threonin. Cụ thể, vi sinh vật sản sinh L-threonin có thể bao gồm vi sinh vật thuộc *Corynebacterium* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., và *Brevibacterium* sp., và cụ thể hơn là vi sinh vật thuộc *Corynebacterium* sp. hoặc *Escherichia* sp.

Cụ thể hơn, vi sinh vật *Escherichia* sp. có thể là *Escherichia coli*; và vi sinh vật *Corynebacterium* sp. có thể *Corynebacterium glutamicum*, *ammoniogenes Corynebacterium*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *efficiens Corynebacterium*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *halotolerans Corynebacterium*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pollutisoli*, *imitans Corynebacterium*, *Corynebacterium testudinoris*, *flavescens Corynebacterium*, hoặc tương tự, và cụ thể *Corynebacterium glutamicum*. Tuy nhiên, bất kỳ vi sinh vật nào thuộc *Escherichia* sp. hoặc *Corynebacterium* sp. có thể bao gồm nhưng không giới hạn, miễn là vi sinh vật có thể tăng lượng sản sinh L-threonin thông qua việc đưa vào hoặc tăng cường protein có hoạt tính sản sinh L-threonin.

Theo sáng chế, chủng bố mẹ của vi sinh vật sản sinh L-threonin, được biến đổi để biểu hiện protein có hoạt tính sản sinh L-threonin hoặc biến thể protein không bị giới hạn cụ thể miễn là chủng bố mẹ là vi sinh vật sản sinh L-threonin. Vi sinh vật sản sinh L-threonin có thể là vi sinh vật trong đó, để tăng lượng sản sinh L-threonin, con đường sinh tổng hợp L-threonin được tăng cường, sự ức chế phản hồi đối với L-threonin bị loại bỏ, gen làm suy giảm con đường sinh tổng hợp L-threonin bị bất hoạt, hoạt động của operon L-threonin tăng lên và/hoặc khả năng chống lại chất tương tự L-threonin được truyền lại.

Cụ thể, để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-threonin, ví dụ, sự biểu hiện của gen thrC mã hóa threonin synthaza, gen ppc mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza, gen galP liên quan đến hấp thu glucoza, gen lysC mã hóa aspartokinaza 3 nhạy cảm lysin, gen hom mã hóa homoserin dehydroaza, hoặc gen pyc gây ra sự gia tăng nguồn oxaloacetat có thể được tăng cường hoặc tăng lên trong vi sinh vật.

Để loại bỏ sự ức chế phản hồi đối với L-threonin, ví dụ, đột biến gen đối với gen

lysC, gen hom, gen thrA có đặc tính chức năng kép của aspartokinaza/homoserin dehydroaza 1, hoặc tương tự có thể được đưa vào vi sinh vật.

Ví dụ, đối với việc bất hoạt gen làm suy giảm con đường sinh tổng hợp L-threonin, sự biểu hiện của gen pckA liên quan đến việc chuyển đổi oxaloacetat (OAA), chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp L-threonin, thành phosphoenolpyruvat (PEP); gen tyrR ức chế gen lysC; gen galR ức chế sự biểu hiện của gen galP liên quan đến việc hấp thụ glucoza, hoặc gen mcbR, bộ điều hòa kép phiên mã liên kết ADN, có thể bị suy giảm hoặc bất hoạt ở vi sinh vật.

Đối với sự tăng hoạt tính của operon L-threonin, plasmit bao gồm operon threonin chứa các gen mã hóa aspartokinaza, homoserin dehydroaza, homoserin kinaza và threonin synthaza (Công bố Patent Nhật Bản số 2005-227977), operon threonin có nguồn gốc từ *E. coli*, v.v., có thể là được đưa vào trong vi sinh vật (TURBA E, *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 53: 2269-2271, 1989), và nhờ đó, biểu hiện của operon threonin có thể tăng lên bên trong vi sinh vật.

Ngoài ra, vi sinh vật có thể kháng các chất tương tự L-threonin như α -amin- β -hydroxy valeric axit hoặc D,L-threonin hydroxamat.

Tuy nhiên, không giới hạn ở khả năng sản sinh L-threonin có thể được tăng cường bằng phương pháp kiểm soát biểu hiện gen đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tăng cường/tăng” là khái niệm bao gồm tất cả các hoạt động tăng hoạt tính của gen so với hoạt tính nội sinh của nó.

Việc tăng cường hoặc tăng như vậy của hoạt tính gen có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Việc tăng cường hoặc tăng có thể đạt được bằng bất kỳ một hoặc nhiều phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm: phương pháp tăng số lượng bản sao nội bào của gen; phương pháp đưa đột biến vào trình tự kiểm soát biểu hiện của gen; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen bằng trình tự có hoạt tính mạnh; phương pháp đưa thêm đột biến vào gen để tăng cường hoạt tính của gen tương ứng; và phương pháp đưa gen ngoại sinh vào vi sinh vật, và có thể đạt được bằng sự kết hợp của chúng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bất hoạt” bao gồm khái niệm gồm tất cả sự

suy giảm của hoạt tính hoặc không có hoạt tính so với hoạt tính nội sinh.

Việc bất hoạt hoạt tính gen như vậy có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm: phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể, bao gồm loại bỏ hoạt tính của gen; phương pháp thay thế gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến để giảm hoạt tính của protein; phương pháp đưa đột biến vào trình tự kiểm soát biểu hiện của gen trên nhiễm sắc thể mã hóa protein; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen mã hóa protein bằng trình tự suy giảm hoặc không hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế promotor của gen bằng promotor yếu hơn promotor nội sinh); phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể mã hóa protein; phương pháp đưa oligonucleotit antisense (ví dụ, antisense ARN) liên kết bổ sung vào phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể và ức chế sự dịch mã từ mRNA vào protein; phương pháp làm cho sự gắn vào ribosom không thể thực hiện được bằng cách thêm nhân tạo trình tự bổ sung vào trình tự SD phía trước của trình tự SD của gen mã hóa protein để tạo thành cấu trúc thứ cấp; và phương pháp kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm promotor vào đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự tương ứng để được phiên mã ngược. Sự bất hoạt của hoạt tính gen có thể đạt được bằng sự kết hợp của các phương pháp, nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở đó.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật sản sinh L-threonin trong môi trường nuôi cấy.

L-threonin, protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính sản sinh L-threonin, biến thể của nó, biểu hiện của protein và vi sinh vật được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” đề cập đến việc nuôi cấy vi sinh vật trong các điều kiện môi trường được điều chỉnh thích hợp. Quy trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo các điều kiện môi trường hoặc môi trường nuôi cấy thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Quy trình nuôi cấy như vậy có thể dễ dàng được điều chỉnh theo chủng đã chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, các ví dụ về nuôi cấy có thể bao gồm nuôi cấy hàng loạt, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy mẻ có cấp dinh dưỡng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, “môi trường” đề cập đến hỗn hợp chứa các thành phần chính là các chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình nuôi cấy vi sinh vật, trong đó môi trường cung cấp các chất dinh dưỡng, các yếu tố tăng trưởng và tương tự, bao gồm cả nước, cần thiết cho sự tồn tại và phát triển. Cụ thể, đối với môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, bất kỳ môi trường nào được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật chuẩn đều có thể được sử dụng mà không có giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, các vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí trong môi trường thông thường có chứa nguồn cacbon thích hợp, nguồn nitơ, nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, các axit amin và/hoặc các vitamin, trong khi nhiệt độ, độ pH, và điều kiện tương tự được điều chỉnh.

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm carbohydrat, chẳng hạn như glucoza, fructoza, sacaroza và mantoza; rượu đường, chẳng hạn như manitol và sorbitol; axit hữu cơ, chẳng hạn như axit pyruvic, axit lactic và axit xitric; các axit amin chẳng hạn như axit glutamic, methionin và lysin; và tương tự. Ngoài ra, có thể sử dụng các nguồn dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên, chẳng hạn như dịch thủy phân tinh bột, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, bã mía và dịch chiết ngô, và cụ thể là, carbohydrat chẳng hạn như glucoza và mật đường tiền xử lý vô trùng (tức là, mật rỉ chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng và có thể sử dụng lượng thích hợp các nguồn cacbon khác mà không bị giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp hai hoặc nhiều hơn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Với nguồn nitơ, các nguồn nitơ vô cơ chẳng hạn như amoniac, amoni sunfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat; axit amin chẳng hạn như axit glutamic, methionin và glutamin; và các nguồn nitơ hữu cơ, chẳng hạn như pepton, NZ-amin, chiết xuất thịt, chiết xuất nấm men, chiết xuất mạch nha, dịch chiết ngô, chất thủy phân casein, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, bánh đậu nành đã khử chất béo hoặc các sản phẩm phân hủy của nó, và loại tương tự có thể được sử dụng. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp hai hoặc nhiều hơn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Các nguồn phosphat có thể bao gồm kali phosphat hóa trị một, kali phosphat hóa trị hai, và các muối chứa natri tương ứng. Đối với các hợp chất vô cơ, có thể sử dụng natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sunfat, sắt sunfat, mangan sunfat, canxi cacbonat, và loại tương tự, và bên cạnh đó, có thể bao gồm axit amin, các vitamin

và/hoặc các tiền chất phù hợp. Các nguồn hoặc tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường theo mẻ hoặc liên tục. Tuy nhiên, môi trường của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng cách thêm các hợp chất, chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric, vào môi trường theo cách thích hợp trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật. Ngoài ra, có thể thêm chất khử bọt chẳng hạn như este polyglycol axit béo, để ngăn chặn sự hình thành bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường, hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon đioxit hoặc không khí có thể được bơm vào để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc không hiếu khí của môi trường, nhưng môi trường không bị giới hạn ở đó.

Nhiệt độ của môi trường có thể là 20°C đến 50°C, và cụ thể là 30°C đến 37°C, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Thời gian nuôi cấy có thể tiếp tục cho đến khi thu được lượng mong muốn của chất hữu ích được tạo ra, và cụ thể có thể là 10 đến 100 giờ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

L-threonin được tạo ra bởi quá trình nuôi cấy có thể được giải phóng vào môi trường hoặc có thể ở lại trong tế bào mà không được giải phóng.

Phương pháp sản xuất L-threonin có thể bao gồm bước thu hồi L-threonin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

Việc thu hồi L-threonin được tạo ra trong bước nuôi cấy có thể thu gom L-threonin mong muốn từ quá trình nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, có thể sử dụng ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, và các phương pháp tương tự, và L-threonin mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh chế và có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, L-threonin thu hồi có thể ở dạng tinh khiết hoặc ở dạng môi trường lên men vi sinh vật có chứa L-threonin (Giới thiệu về Công nghệ sinh học và Kỹ thuật di truyền, A. J. Nair, 2008).

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết với sự tham chiếu đến các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Xây dựng các thư viện đột biến của chất sản sinh L-threonin và các plasmid

Để điều chế mạch khuôn cần sử dụng trong PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, các đoạn trình tự nucleotit thu được từ ADN bộ gen của *Escherichia coli* W3110 bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44.

SEQ ID NO: 43 (rhtC F)

GTCGACTCTAGAGGATCCCCGCTGATTCGTGCGCATGTTG

SEQ ID NO: 44 (rhtC R)

TGAATTCGAGCTCGGTACCCTCACCGCGAAATAATCAAAT

PCL1920 được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI (*Nucleic Acids Research*, 18, (1990) 4631) và các đoạn ADN thu được được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson để thu được pCL1920-Pn_rhtC như plasmid tái tổ hợp. Nhân dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol đã tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ.

PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thực hiện trên rhtC hoang dại mã hóa chất sản sinh L-threonin cho hệ thống gây đột biến ngẫu nhiên, và trong PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, bộ kit gây đột biến ngẫu nhiên PCR đa dạng hóa (Takara) đã được sử dụng. Đối với việc lựa chọn các điều kiện tỷ lệ đột biến, PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thực hiện theo nồng độ MnSO₄ trong hai điều kiện như dưới đây. PCL1920-Pn_rhtC nói trên được sử dụng làm mạch khuôn ADN để tạo đột biến. Thành phần của chế phẩm đối với PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thể hiện trong bảng 1. Các điều kiện cho PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 30 phút, 25 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 phút, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 68°C trong 30 giây, và kéo dài ở 68°C trong 60 giây. SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44 được sử dụng cho cặp mồi.

Bảng 1

Trường hợp #	1 (μL)	2 (μL)
Dung dịch đệm taq titan 10X	5	5
MnSO ₄ (8 mM)	1	2

dGTP (2 mM)	1	1
Hỗn hợp 50 X dNTP	1	1
Polymeraza Taq Titan	1	1
Đoạn mồi xuôi (5 pmol)	2	2
Đoạn mồi ngược (5 pmol)	2	2
Mạch khuôn ADN	1	1
dH ₂ O	36	35
Tổng cộng	50	50

Thư viện plasmit đột biến tái tổ hợp thu được thông qua phương pháp tách dòng Gibson sử dụng ADN, từ đó plasmit mạch khuôn được loại bỏ bằng cách đưa các sản phẩm của phản ứng PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thực hiện trong các điều kiện của bảng 1, để xử lý DpnI, và pCL1920 được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI. Thư viện đột biến pCL1920-Pn_rhtC và pCL1920 thu được thông qua các phương pháp nêu trên được biến nạp vào các tế bào *Escherichia coli* K12, và các tế bào được cấy chuyển trên đĩa môi trường LB chứa 50 µg/L spectinomycin. Năm mươi khuẩn lạc được chọn từ K12 được biến nạp với thư viện đột biến, và giải trình tự được thực hiện để xác định tỷ lệ đột biến và sự xuất hiện hoặc không xuất hiện của đột biến ở các vị trí khác nhau. Theo kết quả của giải trình tự, tỷ lệ đột biến là 1,2 kb⁻¹ trong điều kiện trường hợp 1 và 2,0 kb⁻¹ trong điều kiện trường hợp 2. Cả hai trường hợp 1 và 2 đều được xác định là thỏa mãn tỷ lệ đột biến phù hợp để đảm bảo thư viện đột biến, và do đó việc lựa chọn đột biến hiệu quả được thực hiện bằng cách sử dụng thư viện được điều chế trong các điều kiện nêu trên. Sau khi 300 µL môi trường tối thiểu M9 có chứa 60 g/L L-threonin được phân phối trên đĩa 96 giếng sâu, các khuẩn lạc K12/pCL1920-Pn_rhtC, K12/pCL1920 và K12/thư viện đột biến đã biến nạp trước đó được cấy chuyển. Các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 1200 vòng/phút/15 giờ/37°C, sau đó đo OD ở bước sóng 600 nm. Lưu ý rằng chủng có khả năng sản sinh threonin được cải thiện đáng kể có thể phát triển ở nồng độ L-threonin là 60 g/L vì chủng *E. coli* K12 hoang dại thường bị ức chế tăng trưởng trong môi trường M9 ở khoảng 30 g/L, là nồng độ ức chế tối thiểu L-threonin (MIC). Hầu hết các thư viện chủng đột biến thể hiện sự phát triển ít trong các đĩa giếng sâu như các chủng đối chứng (K12/pCL1920 và K12/pCL1920-Pn_rhtC), nhưng bốn loài chủng, trong đó sự phát triển được quan sát trái ngược với các chủng đối chứng, đã được chọn và OD cho mỗi chủng đã được ghi lại.

Bảng 2

Tên chủng	OD
K12/pCL1920	0,15
K12/pCL1920-Pn_rhtC	0,16
Thư viện đột biến K12/pCL1920-Pn_rhtC (3-1 C5)	1,41
Thư viện đột biến K12/pCL1920-Pn_rhtC (3-2 D11)	2,60
Thư viện đột biến K12/pCL1920-Pn_rhtC (3-4 E3)	2,46
Thư viện đột biến K12/pCL1920-Pn_rhtC (3-4 G2)	2,57

Sau khi plasmit đột biến pCL1920-Pn_rhtC được chiết xuất từ bốn loài của các chủng đột biến đã chọn, giải trình tự được thực hiện để kiểm tra đột biến, và sự xuất hiện của đột biến đã được xác nhận trong trình tự mã hóa (CDS) nhưng không phải vùng promotor. Các plasmit đột biến được thể hiện trong bảng 2 được đặt tên là pCL1920-Pn_rhtC (m1), pCL1920-Pn_rhtC (m2), pCL1920-Pn_rhtC (m3) và pCL1920-Pn_rhtC (m4) ở trên.

Để so sánh và đánh giá hoạt tính của rhtC đột biến trong chủng *Corynebacterium*, các plasmit để chèn được điều chế thông qua phương pháp sau đây.

Đối với tái tổ hợp tương đồng, các vùng phía trước và phía sau của Ncgl2533 được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 45 và 46 và SEQ ID NO: 51 và 52, tương ứng. Để sử dụng promotor gap A như promotor của rhtC đột biến, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 48. Để đảm bảo các đoạn của rhtC đột biến đã chọn trong bảng 2, các đoạn rhtC, rhtC (m1), rhtC (m2), rhtC (m3) và rhtC (m4) được thu riêng rẽ bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 45 (Ncgl2533 lên F)

TCGAGCTCGGTACCCCAGCAAGATCTAGTCATCAA

SEQ ID NO: 46 (Ncgl2533 lên R)

GTCGTTTTTAGGCTTCCGCTGGAAAACATTTTGCA

SEQ ID NO: 47 (PgapA F)

AATGTTTTCCAGCGGAAGCCTAAAAACGACCGAGC

SEQ ID NO: 48 (PgapA R)

AAATAACATCAACATGTTGTGTCTCCTCTAAAGAT

SEQ ID NO: 49 (rhtC_m F)

TAGAGGAGACACAACATGTTGATGTTATTTCTCAC

SEQ ID NO: 50 (rhtC_m R)

TAAGCAGGTTGATTTTCACCGCGAAATAATCAAAT

SEQ ID NO: 51 (Ncgl2533 dn F)

ATTATTTTCGCGGTGAAAATCAACCTGCTTAGGCGT

SEQ ID NO: 52 (Ncgl2533 dn R)

CTCTAGAGGATCCCCTATAGCTACCATCTGGGTGG

Các đoạn PCR thu được thông qua quy trình nêu trên và vector pDZ để biến nạp nhiễm sắc thể được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI đã được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson để thu được plasmit kiểu dại và 5 plasmit tái tổ hợp rhtC đột biến. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ. Các plasmit đã điều chế được đặt tên lần lượt là pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC (m1), pDZ-PgapA_rhtC (m2), pDZ-PgapA_rhtC (m3) và pDZ-PgapA_rhtC (m4).

Ví dụ 2: Điều chế các chủng sản sinh L-threonin

2-1: Biến nạp aspartokinaza 3 (lysC) nhạy cảm với lysin đột biến

Việc tăng cường sự biểu hiện của gen lysC tương ứng với aspartokinaza 3 nhạy cảm với lysin và tính trạng đột biến (L377K) để loại bỏ sự ức chế phản hồi đối với L-lysine và L-threonine (Công bố đơn Patent Hàn Quốc số 10-2019-0003019) được giới thiệu. Cụ thể, vùng phía trước của promoter lysC để tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể và vùng phía sau của đột biến thứ 377 của lysC đã được thu lại, và thông qua PCR sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, đoạn gen của vùng phía trước của promoter lysC thu được thông qua cặp môi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, và đoạn gen của vùng phía sau của đột biến thứ 377 của lysC thu được thông qua cặp môi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 3 (promoter lysC lên 1)

TCGAGCTCGGTACCCGACAGGACAAGCACTGGTTG

SEQ ID NO: 4 (promotor lysC lên 2)

AGTAGCGCTGGGATGTTTCTCTTTGTGCACCTTTC

SEQ ID NO: 9 (lysC xuống 1)

GAACATCGAAAAGATTTCCACCTCTGAGAT

SEQ ID NO: 10 (lysC xuống 2)

CTCTAGAGGATCCCCGTTACCTCAGAGACGATTA

Ngoài ra, đoạn promotor Pcj7 thu được thông qua PCR sử dụng plasmit pECCG117-Pcj7-GFP (Patent Hàn Quốc số 10-0620092) làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 5 (Pcj7 1)

GAAAGGTGCACAAAGAGAGAAACATCCCAGCGCTACT

SEQ ID NO: 6 (Pcj7 2)

TACGACCAGGGCCATGAGTGTTTCCTTTCGTTGGG

Đoạn gen của vùng phía trước của đột biến lysC L377K thu được thông qua PCR sử dụng ADN bộ gen của vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 7 (lysC 1)

CGAAAGGAAACACTCATGGCCCTGGTCGTACAGAA

SEQ ID NO: 8 (lysC 2)

GGTGGAATCTTTTCGATGTTTCACGTTGAC

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng Solg™ Pfu-X ADN polymeraza làm polymeraza và các điều kiện sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 60°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 60 giây; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Bốn đoạn PCR thu được thông qua quy trình nêu trên và vector pDZ để biến nạp nhiễm sắc thể được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI (Patent Hàn Quốc số 10-1126041) được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson (DG Gibson *et al.*, Các phương pháp tự nhiên, Tập 6 số 5, tháng 5 năm 2009, NEBuilder HiFi ADN Assembly

Master Mix) để thu được plasmit tái tổ hợp, được đặt tên là pDZ-Pcj7_lysC L377K. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ.

Vectơ pDZ-Pcj7_lysC L377K được xây dựng đã được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 hoang dại bằng điện biến nạp (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541–545) và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được chủng trong gen lysC đó hoang dại được thay thế bằng gen Pcj7_lysC L377K đột biến trên nhiễm sắc thể. Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của quá trình tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 11 (xác nhận lysC1)

ACATTCCACCCATTACTGCA

SEQ ID NO: 12 (xác nhận lysC 2)

TCTTCATCGGTTTCGAAGGT

Chủng biến nạp thu được được đặt tên là Cgl-TH-1.

2-2: Biến nạp *homoserin dehydroaza* (Hom) đột biến

Để loại bỏ cơ chế điều hòa mcbR là cơ chế điều hòa kép phiên mã liên kết với ADN, và để tăng mức độ biểu hiện của hom tương ứng với *homoserin dehydroaza*, promotor hom đã được thay thế bằng promotor Pcj7. Hơn nữa, việc sản xuất L-threonin đã được tăng lên bằng cách áp dụng đối với Cgl-TH-1, các đột biến (G378E, R398Q) để loại bỏ sự ức chế phản hồi của hom trên L-threonin. Để biến nạp hom đột biến, pDZ-Pcj7_hom (G378E, R398Q) đã được xây dựng. Để thay thế promotor Pcj7 cho promotor hom, vùng phía trước của promotor hom để tái tổ hợp tương đồng đã thu được. Cụ thể, đoạn của vùng phía trước của promotor hom được thu thông qua PCR sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 55.

SEQ ID NO: 14 (lên F)

TCGAGCTCGGTACCCTGTCTCCGTATGCAGTGAGC

SEQ ID NO: 55 (lên R)

GGATGTTTCTTTGGAGCTTCGCTCAATCAT

Đoạn promoter Pcj7 thu được thông qua PCR sử dụng plasmit pECCG117-Pcj7-GFP (Patent Hàn Quốc số 10-0620092) làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 56.

SEQ ID NO: 13 (cj7 F)

GAAGCTCCAAAGAAACATCCCAGCGCTACT

SEQ ID NO: 56 (cj7 R)

AGATGCTGAGGTCATGATTGTTCTCCTATAATCGC

Để áp dụng các đột biến hom (G378E, R398Q), vùng phía trước của trình tự mã hóa hom axit amin thứ 1 đến 378, trình tự bao gồm các đột biến G378E/R398Q và trình tự phía sau của R398Q.

Cụ thể, đoạn của trình tự mã hóa hom axit amin thứ 1 đến 378 thu được thông qua PCR sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18. Bằng phương pháp tương tự, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 20, và đoạn của trình tự bao gồm các đột biến G378E/R398Q hom. Ngoài ra, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 21, và thu được đoạn của trình tự phía sau của R398Q hom để tái tổ hợp tương đồng.

SEQ ID NO: 17 (hom F)

TATAGGAGAACAATCATGACCTCAGCATCTGCCCC

SEQ ID NO: 18 (G378E R)

GCCAAAACCTCCACGCGATCTT

SEQ ID NO: 15 (G378E F)

AAGATCGCGTGGAGGTTTTGGC

SEQ ID NO: 20 (R398Q R)

GCGCTCTTCCTGTTGGATTGTACGC

SEQ ID NO: 19 (R398Q F)

GCGTACAATCCAACAGGAAGAGCGC

SEQ ID NO: 21 (hom R)

CTCTAGAGGATCCCCGACTGCGGAATGTTGTTGTG

Năm đoạn PCR thu được thông qua quy trình bên trên và vector pDZ để biến nạp nhiễm sắc thể được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson để thu được plasmit tái tổ hợp, được đặt tên là pDZ-Pcj7_hom (G378E, R398Q). Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ.

Vector pDZ-Pcj7_hom (G378E, R398Q) đã điều chế được biến nạp vào chủng Cgl-TH-1 bằng điện biến nạp và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được chủng trong đó gen hom hoang dại được thay thế bằng gen Pcj7_hom (G378E, Gen R398Q) đột biến trên nhiễm sắc thể. Thao tác di truyền tương ứng được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 22 (hom conf F)

TGGGTAGGTCGAGTTGTAA

SEQ ID NO: 23 (hom conf R)

CAGCGCAGTCGCACGAATAT

Chủng biến nạp thu được được đặt tên là Cgl-TH-2.

2-3: Ứng dụng của đột biến để tăng cường biểu hiện *pyruvate carboxylaza* (Pyc)

Với mục đích cải thiện sản sinh L-threonin thông qua tăng nhóm oxaloacetat, sự biểu hiện của gen pyc tương ứng với pyruvat carboxylaza được tăng lên. Để tăng biểu hiện pyc, promotor của gen pyc đã được thay thế bằng promotor Pcj7. Đoạn promotor Pcj7 thu được thông qua PCR sử dụng plasmit pECCG117-Pcj7-GFP (Patent Hàn Quốc số 10-0620092) làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 24 (CJ7 F)

CAACCTTTGCAAGGTGAAAAAGAAACATCCCAGCGCTACT

SEQ ID NO: 16 (CJ7 R)

TGTGTGAGTCGACATGAGTGTTTCCTTTCGTTGGG

Vùng phía trước của promotor pyc thu được cho tái tổ hợp tương đồng để thay thế promotor Pcj7 cho promotor pyc. Cụ thể, đoạn của vùng phía trước của promotor pyc thu được thông qua PCR sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 25 (F phía trước)

TCGAGCTCGGTACCCTGACAGTTGCTGATCTGGCT

SEQ ID NO: 26 (R phía trước)

AGTAGCGCTGGGATGTTTCTTTTTCACCTTGCAAAGGTTG

Để thu được đầu N của trình tự mã hóa pyc, được sử dụng như vùng tương đồng phía sau của promotor Pcj7, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* 13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, và đoạn phía sau của promotor pyc thu được.

SEQ ID NO: 27 (pyc F)

GGAATAATTACTCTAATGTCTGACTCACACATCTTC

SEQ ID NO: 28 (pyc R)

CTCTAGAGGATCCCCGGCATTTTCAGACAGGAAGC

Ba đoạn PCR thu được thông qua quy trình bên trên và vector pDZ để biến nạp nhiễm sắc thể được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson để thu được plasmit tái tổ hợp, được đặt tên là pDZ-Pcj7_pyc. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ.

Vector pDZ-Pcj7_pyc được xây dựng đã được biến nạp vào chủng Cgl-TH-2 bằng điện biến nạp và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được chủng trong đó gen pyc kiểu dại được thay thế bằng gen Pcj7_pyc đột biến trên nhiễm sắc thể. Thao tác di

truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp môi SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 29 (pyc conf F)

ACGCACTCGGTGAAGGCGTG

SEQ ID NO: 30 (pyc conf R)

CGCTTCAGCTTCACGAGATG

Chủng biến nạp thu được được đặt tên là Cgl-TH-3.

2-4: Chèn một bản sao của protein (ThrA (S352P) BC) có operon L-threonin đột biến, xóa Ncgl0179, và chức năng kép của aspartokinaza/homoserin dehydroaza 1

Để tăng cường sinh tổng hợp L-threonin, operon L-threonin có nguồn gốc từ *E. coli* đã được áp dụng. Cụ thể, trong gen thrA có chức năng kép của aspartokinaza/homoserin dehydroaza 1, thrA (S352P) (J Bacteriol. 1993 Feb; 175 (4): 959–65) đã được áp dụng để loại bỏ sự ức chế phản hồi đối với L-threonin. Ngoài ra, sự biểu hiện của operon L-threonin được tăng lên bằng cách sử dụng promotor SPL7 (Patent Hàn Quốc số 10-1783170).

Để chèn SPL7_thrA (S352P) BC vào vị trí Ncgl0179, các đoạn của các vùng tương đồng ở phía trước và phía sau của Ncgl0179 được khuếch đại trình tự nucleotit bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với các cặp môi SEQ ID NO: 31 và 32 và SEQ ID NO: 37 và 38, tương ứng. Ngoài ra, SPL7 được khuếch đại bằng cách sử dụng promotor SPL7 tổng hợp làm mạch khuôn cùng với cặp môi SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34.

Các vùng phía trước và phía sau của axit amin thứ 352 của thrA (S352P) trải qua khuếch đại trình tự nucleotit bằng cách sử dụng các cặp môi SEQ ID NO: 35 và 36 và SEQ ID NO: 39 và 40, tương ứng.

SEQ ID NO: 31 (Ncgl0179 lên F)

TCGAGCTCGGTACCCTTTTGAGTAATTGGTAATAC

SEQ ID NO: 32 (Ncgl0179 lên R)

TGAAGCGCCGGTACCCGCTTAAACGGGCGATTAT

SEQ ID NO: 37 (Ncgl0179 xuống F)

ATGAATCATCAGTAATTAATGGCCCTCGATTTGGC

SEQ ID NO: 38 (Ncgl0179 xuống R)

TCTAGAGGATCCCCTGGAATAATCAGACTCTGGA

SEQ ID NO: 33 (SPL7 F)

ATCGCCCGTTTAAGCGGGTACCGGCGCTTCATGT

SEQ ID NO: 34 (SPL7 R)

CTTCAACACTCGCATGATATCTGTTTTGATCTCCT

SEQ ID NO: 35 (S352P lên F)

ATCAAAACAGATATCATGCGAGTGTTGAAGTTCGG

SEQ ID NO: 36 (S352P lên R)

TACTGTATTCGGAAGATGGTTGCGTAATCAGCACCAC

SEQ ID NO: 39 (S352P xuống F)

GTGGTGCTGATTACGCAACCATCTTCCGAATACAGTA

SEQ ID NO: 40 (S352P xuống R)

AAATCGAGGGCCATTAATTACTGATGATTCATCATC

Năm đoạn PCR thu được thông qua quy trình bên trên và vector pDZ để biến nạp nhiễm sắc thể được phân cắt bằng enzym giới hạn SmaI đã được tách dòng bằng phương pháp tách dòng Gibson để thu được plasmid tái tổ hợp, được đặt tên là pDZ-SPL7_thrA (S352P) BC. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng cách trộn thuốc thử tách dòng Gibson và từng đoạn gen theo số mol tính toán, sau đó được bảo quản ở 50°C trong 1 giờ.

Vector pDZ-SPL7_thrA (S352P) BC đã điều chế được biến nạp vào chủng Cgl-TH-3 bằng điện biến nạp và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được chủng trong đó operon SPL7_thrA (S352P) BC được chèn trên nhiễm sắc thể. Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí

bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 41 (thr conf F)

GATTCACATCACCAATGTC

SEQ ID NO: 42 (thr conf R)

GACACCATCGCAGCCCGAC

Chủng biến nạp thu được được đặt tên là Cgl-TH-4.

Chủng Cgl-TH-4 được đặt tên là CJ09-5010. Chủng này đã được nộp lưu chủng tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 31 tháng 5 năm 2019, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12537P.

2-5: Sản xuất L-threonin bằng chất sản sinh L-threonin đột biến (RhtC) được đưa vào chủng *Corynebacterium*

Các vector pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC (m1), pDZ-PgapA_rhtC (m2), pDZ-PgapA_rhtC (m3) và pDZ-PgapA_rhtC (m4) được xây dựng trong ví dụ 1 được biến nạp vào chủng Cgl-TH-4 bằng điện biến nạp và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được các chủng trong đó gen rhtC hoang dại và bốn gen rhtC được chèn vào nhiễm sắc thể, tương ứng. Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 53 và SEQ ID NO: 54 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 53 (HR bên ngoài F)

AAGGAATATCCCGGAGAACC

SEQ ID NO: 54 (HR bên ngoài R)

TTGCGTTTGAAAAGCCCTCG

Các chủng biến nạp thu được lần lượt được đặt tên là Cgl-TH-5, Cgl-TH-5 (m1), Cgl-TH-5 (m2), Cgl-TH-5 (m3) và Cgl-TH-5 (m4).

Hơn nữa, để khảo sát ảnh hưởng của việc đưa rhtC đột biến vào chủng *Corynebacterium*, các chủng Cgl-TH-5, Cgl-TH-5 (m1), Cgl-TH-5 (m2), Cgl-TH-5

(m3), và Cgl-TH-5 (m4) đã điều chế được nuôi cấy thông qua phương pháp sau đây để so sánh lượng sản sinh L-threonin. Mỗi chủng được cấy giống vào bình cầu có vách ngăn góc 250 mL chứa 25 mL môi trường cấy giống (20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g chiết xuất nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1.000 μg thiamin HCl, 2.000 μg canxi pantothenat, 2.000 μg nicotinamit, độ pH 7,0 (trên 1 L nước cất) và được nuôi lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 mL dịch nuôi cấy giống được cấy truyền vào bình cầu có vách ngăn góc 250 mL chứa 25 mL môi trường sản xuất (30 g glucoza, 15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g KH_2PO_4 , 5 g dịch chiết nấm men, 900 μg biotin, 4.500 μg thiamin hydroclorit, 4.500 μg canxi pantothenat, 30 g CaCO_3 và độ pH 7,0 (trên 1 L nước cất) và được nuôi lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng sản sinh L-threonin được đo thông qua HPLC, và kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Tên chủng	Lượng sản sinh L-threonin (g/L)	Lượng sản sinh L-threonin (*100 g/g, %)
Cgl-TH-4	11,1	15,9
Cgl-TH-5	14,0	20,0
Cgl-TH-5(m1)	17,9	25,6
Cgl-TH-5(m2)	24,0	34,3
Cgl-TH-5(m3)	21,8	31,1
Cgl-TH-5(m4)	17,9	25,6

Như được thể hiện trong bảng 3, Cgl-TH-4 được điều chế theo phương pháp trong ví dụ 2-4, cho thấy kết quả sản sinh L-threonin là 11,1 g/L, và Cgl-TH-5 có tính trạng PgapA_rhtC hoang dại được đưa vào trong đó sản sinh L-threonin ở 14,0 g/L. Ngoài ra, Cgl-TH-5 (m1), Cgl-TH-5 (m2), Cgl-TH-5 (m3) và Cgl-TH-5 (m4) có các tính trạng PgapA_rhtC (m) đột biến được đưa vào trong đó lần lượt sản sinh L-threonin là 17,9 g/L, 24,0 g/L, 21,8 g/L và 17,9 g/L. Đối với năng suất lên men L-threonin, Cgl-TH-5 thể hiện tăng 4,1%p so với Cgl-TH-4, trong khi các chủng Cgl-TH-5 (m1), Cgl-TH-5 (m2), Cgl-TH-5 (m3) và Cgl-TH-5 (m4) có các đột biến được áp dụng thể hiện mức tăng lần lượt là 9,7%p, 18,4%p, 15,3%p và 9,7%p so với Cgl-TH-4. Cụ thể, sự tăng năng suất đối với Cgl-TH-5 (m2) và Cgl-TH-5 (m3) lớn hơn khoảng 4 lần so với Cgl-TH-5. RhtC đột biến được áp dụng cho Cgl-TH-5 (m2) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 94 và bao gồm đột biến (L62S) trong đó leuxin (Leu) được sửa đổi thành serin (Ser)

ở vị trí axit amin thứ 62. RhtC đột biến được áp dụng cho Cgl-TH-5 (m3) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 93 và bao gồm đột biến (A53T) trong đó alanin (Ala) được sửa đổi thành threonin (Thr) ở vị trí axit amin thứ 53.

Hai chủng Cgl-TH-5 (m2) và Cgl-TH-5 (m3) được đặt tên lần lượt là CA09-5012 và CA09-5036. Các chủng này đã được nộp lưu chủng tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 31 tháng 5 năm 2019, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12538P và KCCM12539P.

Ví dụ 3: Sản xuất L-threonin bằng chất sản sinh L-threonin đột biến được đưa vào chủng *E. coli*

Vectơ trống pCL1920 và pCL1920-Pn_rhtC đã điều chế và bốn plasmit đột biến được chọn trong ví dụ 1 được biến nạp vào chủng *E. coli* TF4076 (KFCC10718, Đơn patent Hàn Quốc số 90-22965) để điều chế TF4076/pCL1920, TF4076/pCL1920-Pn_rhtC, TF4076/pCL1920-Pn_rhtC (m1), TF4076/pCL1920-Pn_rhtC (m2), TF4076/pCL1920-Pn_rhtC (m3) và TF4076/pCL1920-Pn_rhtC (m4), tương ứng. Để so sánh lượng sản sinh L-threonin giữa các chủng đã điều chế, việc đánh giá trong bình đã được thực hiện. Đối với thử nghiệm trong bình, từng chủng được xếp trên đĩa LB có chứa 50 µg/mL cloramphenicol và được nuôi cấy trong tủ ấm ở 33°C trong 16 giờ. Sau đó, khuẩn lạc đơn được cấy vào 2 mL môi trường LB, và sau đó được nuôi cấy trong tủ ấm ở 200 vòng/phút/33°C trong 12 giờ. Ngoài ra, 25 mL môi trường bình sản xuất threonin có thành phần được thể hiện trong bảng 4 dưới đây được cho vào bình 250 mL, và 500 µL môi trường nuôi cấy thu được thông qua lần nuôi cấy trước đó được thêm vào. Sau đó, bình được ủ trong tủ ấm ở 200 vòng/phút/33°C trong 48 giờ, và sau đó lượng threonin thu được từ mỗi chủng được so sánh bằng HPLC, và kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 4

Thành phần	Hàm lượng (trên lít)
Glucosa	70 g
Amoni sulfat	25 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg

ZnSO ₄	5 mg
Canxi cacbonat	30 g
Chiết xuất nấm men	2 g
Methionin	0,15 g
Độ pH	6,8

Bảng 5

Tên chủng	Lượng sản sinh L-threonin	Lượng sản sinh L-threonin
	(g/L)	(*100 g/g, %)
TF4076	25,7	36,7
TF4076/pCL1920	25,9	37,0
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC	29,9	42,6
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m1)	33,4	47,7
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m2)	40,4	57,7
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m3)	38,8	55,4
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m4)	33,8	48,3

Như được thể hiện trong bảng 5, việc đưa các plasmit rhtC đột biến vào chủng *E. coli* có khả năng sản sinh L-threonin đã làm tăng nhiều lượng sản sinh L-threonin. Cụ thể, việc áp dụng pCL1920-Pn_rhtC (m2) và pCL1920-Pn_rhtC (m3) cho thấy sản lượng L-threonin đã tăng lên đáng kể.

Ví dụ 4: Sự đột biến bão hòa của axit amin thứ 62 leuxin của chất sản sinh L-threonin

Vì rhtC (L62S) đột biến cho thấy hiệu quả tăng năng suất cao so với loài hoang dại như được thể hiện trong các bảng 3 và 5, giá trị cải thiện của việc sản sinh L-threonin ở vị trí thứ 62 phải được xác nhận bằng cách gây đột biến axit amin thứ 62 leuxin thành axit amin khác trong RhtC. Để đột biến leuxin thành 19 axit amin khác với leuxin, gây đột biến vị trí trực tiếp được thực hiện thông qua phương pháp sau đây sử dụng pDZ-PgapA-rhtC được điều chế trong ví dụ 1 làm mạch khuôn.

Bảng 6

Thành phần	Hàm lượng (μL)
Dung dịch đậm 10X pfu-X	5
Hỗn hợp 10 mM dNTP	1
pfu-X Polymeraza	1

Đoạn mồi xuôi gây đột biến (5 pmol)	2
Đoạn mồi ngược gây đột biến (5 pmol)	2
pDZ-PgapA_rhtC (ADN mạch khuôn, 200 ng/ μ L)	1
dH ₂ O	38
Tổng cộng	50

Bảng 7

Số chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian
1	95°C	5 phút
18	95°C	30 giây
	60°C	1 phút
	68°C	10 phút

Để thay thế axit amin thứ 62 leuxin (L) bằng axit amin khác trong RhtC, chế phẩm được thể hiện trong bảng 6 được điều chế, và PCR được thực hiện theo các điều kiện được thể hiện trong bảng 7. Trong PCR, mỗi đoạn mồi gây đột biến được thiết lập trong bảng 8 đã được sử dụng. Sau khi hoàn thành PCR, 1 μ L enzym giới hạn DpnI được bổ sung, sau đó ủ ở 37°C trong một giờ. Các plasmit pDZ-PgapA_rhtC đột biến thu được bằng cách biến nạp 3 μ L ADN được xử lý bằng DpnI vào các tế bào khả biến DH5a, và mỗi đột biến được thể hiện trong bảng 8 đã được xác nhận bằng giải trình tự.

Bảng 8

Plasmit rhtC đột biến	SEQ ID NO	Trình tự nucleotit
pDZ-PgapA_rhtC L62R	SEQ ID NO: 57	GCGCTGCTTGGCCTGCATCGTATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 58	GGCCATTTTTTCGATAATACGATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62A	SEQ ID NO: 59	GCGCTGCTTGGCCTGCATGCGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 60	GGCCATTTTTTCGATAATCGCATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62D	SEQ ID NO: 61	GCGCTGCTTGGCCTGCATGACATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 62	GGCCATTTTTTCGATAATGTCATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62K	SEQ ID NO: 63	GCGCTGCTTGGCCTGCATAAAATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 64	GGCCATTTTTTCGATAATTTTATGCA GGCCAAGCAGCGC

pDZ-PgapA_rhtC L62P	SEQ ID NO: 65	GCGCTGCTTGGCCTGCATCCGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 66	GGCCATTTTTTCGATAATCGGATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62C	SEQ ID NO: 67	GCGCTGCTTGGCCTGCATTGCATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 68	GGCCATTTTTTCGATAATGCAATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62G	SEQ ID NO: 69	GCGCTGCTTGGCCTGCATGGCATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 70	GGCCATTTTTTCGATAATGCCATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62T	SEQ ID NO: 71	GCGCTGCTTGGCCTGCATACGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 72	GGCCATTTTTTCGATAATCGTATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62I	SEQ ID NO: 73	GCGCTGCTTGGCCTGCATATTATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 74	GGCCATTTTTTCGATAATAATATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62Y	SEQ ID NO: 75	GCGCTGCTTGGCCTGCATTATATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 76	GGCCATTTTTTCGATAATATAATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62V	SEQ ID NO: 77	GCGCTGCTTGGCCTGCATGTGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 78	GGCCATTTTTTCGATAATCACATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62H	SEQ ID NO: 79	GCGCTGCTTGGCCTGCATCATATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 80	GGCCATTTTTTCGATAATATGATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62F	SEQ ID NO: 81	GCGCTGCTTGGCCTGCATTTTCTTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 82	GGCCATTTTTTCGATAATGAAATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62M	SEQ ID NO: 83	GCGCTGCTTGGCCTGCATATGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 84	GGCCATTTTTTCGATAATCATATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62Q	SEQ ID NO: 85	GCGCTGCTTGGCCTGCATCAGATTA TCGAAAAAATGGCC

	SEQ ID NO: 86	GGCCATTTTTTCGATAATCTGATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62N	SEQ ID NO: 87	GCGCTGCTTGGCCTGCATAACATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 88	GGCCATTTTTTCGATAATGTTATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62E	SEQ ID NO: 89	GCGCTGCTTGGCCTGCATGAAATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 90	GGCCATTTTTTCGATAATTTTCATGC AGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62W	SEQ ID NO: 91	GCGCTGCTTGGCCTGCATTGGATTA TCGAAAAAATGGCC
	SEQ ID NO: 92	GGCCATTTTTTCGATAATCCAATGC AGGCCAAGCAGCGC

Các vector pDZ-PgapA_rhtC L62R, pDZ-PgapA_rhtC L62A, pDZ-PgapA_rhtC L62D, pDZ-PgapA_rhtC L62K, pDZ-PgapA_rhtC L62P, pDZ-PgapA_rhtC L62C, pDZ-PgapA_rhtC L62G, pDZ-PgapA_rhtC L62T, pDZ-PgapA_rhtC L62I, pDZ-PgapA_rhtC L62Y, pDZ-PgapA_rhtC L62V, pDZ-PgapA_rhtC L62H, pDZ-PgapA_rhtC L62F, pDZ-PgapA_rhtC L62M, pDZ-PgapA_rhtC L62Q, pDZ-PgapA_rhtC L62N, pDZ-PgapA_rhtC L62E, và pDZ-PgapA_rhtC L62W được xây dựng như thể hiện trong bảng 8 được biến nạp vào chủng Cgl-TH-4 bằng phương pháp trong ví dụ 2-5 thông qua điện biến nạp, và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được 19 loài chủng trong đó các gen rhtC đột biến được chèn vào nhiễm sắc thể, tương ứng. Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 53 và SEQ ID NO: 54 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 53 (HR bên ngoài F)

AAGGAATATCCCGGAGAACC

SEQ ID NO: 54 (HR bên ngoài R)

TTGCGTTTGAAAAGCCCTCG

Các chủng biến nạp thu được lần lượt được đặt tên là Cgl-TH-5(L62R), Cgl-TH-5(L62A), Cgl-TH-5(L62D), Cgl-TH-5(L62K), Cgl-TH-5(L62P), Cgl-TH-5(L62C), Cgl-TH-5(L62G), Cgl-TH-5(L62T), Cgl-TH-5(L62I), Cgl-TH-5(L62Y), Cgl-TH-

5(L62V), Cgl-TH-5(L62H), Cgl-TH-5(L62F), Cgl-TH-5(L62M), Cgl-TH-5(L62Q), Cgl-TH-5(L62N), Cgl-TH-5(L62E), và Cgl-TH-5(L62W).

18 loài chủng được điều chế theo phương pháp nêu trên và các chủng Cgl-TH-4, Cgl-TH-5, và Cgl-TH-5 (m2) đã điều chế trước đó được nuôi cấy bằng môi trường bình sản xuất L-threonin và phương pháp nuôi cấy trong ví dụ 2-5. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản sinh L-threonin được đo thông qua HPLC, và kết quả được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

Tên chủng	rhtC form	Lượng sản sinh L-threonin (g/L)	Năng suất L-threonin (g/g, %)	Cải thiện năng suất so với loài hoang dại (Δ , %p)
Cgl-TH-4	-	11,3	16,1	-
Cgl-TH-5	rhtC hoang dại	14,0	20,0	-
Cgl-TH-5(m2)	rhtC L62S	24,0	34,3	14,3
Cgl-TH-5(L62R)	rhtC L62R	24,9	35,6	15,6
Cgl-TH-5(L62A)	rhtC L62A	23,5	33,5	13,5
Cgl-TH-5(L62D)	rhtC L62D	17,5	24,9	4,9
Cgl-TH-5(L62K)	rhtC L62K	24,0	34,3	14,3
Cgl-TH-5(L62P)	rhtC L62P	23,3	33,2	13,2
Cgl-TH-5(L62C)	rhtC L62C	15,8	22,6	2,6
Cgl-TH-5(L62G)	rhtC L62G	19,8	28,3	8,3
Cgl-TH-5(L62T)	rhtC L62T	25,8	36,9	16,9
Cgl-TH-5(L62I)	rhtC L62I	17,5	24,9	4,9
Cgl-TH-5(L62Y)	rhtC L62Y	16,4	23,4	3,4
Cgl-TH-5(L62V)	rhtC L62V	22,5	32,2	12,2
Cgl-TH-5(L62H)	rhtC L62H	23,8	34,0	14,0
Cgl-TH-5(L62F)	rhtC L62F	16,5	23,6	3,6
Cgl-TH-5(L62M)	rhtC L62M	19,1	27,3	7,3
Cgl-TH-5(L62Q)	rhtC L62Q	20,0	28,6	8,6
Cgl-TH-5(L62N)	rhtC L62N	21,8	31,2	11,2
Cgl-TH-5(L62E)	rhtC L62E	18,2	26,0	6,0
Cgl-TH-5(L62W)	rhtC L62W	20,7	29,6	9,6

Như được thể hiện trong bảng 9, tất cả 19 loài đột biến có đột biến của axit amin thứ 62 trong protein RhtC đã được áp dụng, cho thấy năng suất lên men cải thiện 3,4–

16,9%p so với Cgl-TH-5 có rhtC hoang dại đã được chèn vào trong đó.

Ví dụ 5: Sàng lọc dòng kháng AHV thông qua đột biến nhân tạo

Khả năng kháng 2-amin-3-hydroxy-valerat (AHV) là chất tương tự L-threonin, đã được truyền cho *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 (Patent Hàn Quốc số 0159812) làm chủng bố mẹ.

Sự đột biến được gây ra bằng cách gây đột biến nhân tạo sử dụng N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG). Chủng KFCC10881 được nuôi cấy trong môi trường cấy giống ở ví dụ 2-5 trong 18 giờ được cấy chuyển vào 4 mL môi trường cấy giống, và sau đó được nuôi cấy cho đến khi OD₆₆₀ đạt khoảng 1,0. Quá trình nuôi cấy được ly tâm để thu hồi các tế bào, và sau đó các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm Tris-malat 50 mM (độ pH 6,5) và cuối cùng tạo huyền phù trong 4 mL của cùng dung dịch đệm. Dung dịch NTG (2 mg/mL trong dung dịch đệm Tris-malat 0,05 M (độ pH 6,5) được thêm vào huyền phù tế bào để có nồng độ cuối cùng là 150 mg/L, và sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau đó, các tế bào được thu hồi bằng cách ly tâm và rửa hai lần với cùng dung dịch đệm để loại bỏ NTG. Các tế bào rửa sạch cuối cùng được tạo huyền phù trong 4 mL dung dịch glyxerol 20% và sau đó được bảo quản ở -70°C trước khi sử dụng. Các chủng đã xử lý NTG được cấy trên đĩa môi trường tối thiểu chứa 3 g/L AHV, và sau đó 155 chủng đột biến KFCC10881 kháng AHV được thu lại thông qua quy trình trên.

Ví dụ 6: Lựa chọn các chủng sản sinh L-threonin từ các chủng KFCC10881 kháng AHV

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên 155 chủng kháng AHV thu được trong ví dụ 5. 155 chủng, mỗi chủng được cấy chuyển vào bình có vách ngăn góc 250 mL chứa 25 mL môi trường cấy giống trong ví dụ 2-5, và sau đó nuôi cấy lắc ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau khi 1 mL môi trường cấy giống được đưa vào bình có vách ngăn góc 250 mL chứa 24 mL môi trường sản xuất L-threonin (30 g glucoza, 2 g KH₂PO₄, 3 g ure, 40 g (NH₄)₂SO₄, 2,5 g pepton, 5 g CSL (Sigma) (10 mL), 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 400 mg leuxin, 20 g CaCO₃, độ pH 7,2 (trên 1 L nước cất) và sau đó được nuôi lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng axit amin được tạo ra được đo bằng HPLC. Nồng độ của các axit amin trong môi trường nuôi cấy của 22 chủng hàng đầu,

thể hiện khả năng sản sinh L-threonin tốt, trong số 155 chủng được thử nghiệm, được thể hiện trong bảng 10. 22 chủng đã lựa chọn được xác nhận thông qua quy trình bên trên là đặt tên KFCC10881-1 đến KFCC10881-22.

Bảng 10

Tên chủng	OD	L-threonin (g/L)	Homoserin (g/L)
KFCC10881	58,5	0,0	0,1
KFCC10881-1	60,1	2,0	1,5
KFCC10881-2	57,1	3,0	2,2
KFCC10881-3	47,3	2,8	2,3
KFCC10881-4	51,7	3,2	2,1
KFCC10881-5	58,4	3,1	2,2
KFCC10881-6	52,6	3,4	2,5
KFCC10881-7	14,2	0,4	0,2
KFCC10881-8	55,8	3,0	2,0
KFCC10881-9	44,3	3,2	2,8
KFCC10881-10	47,5	3,7	3,0
KFCC10881-11	57,0	2,7	1,8
KFCC10881-12	51,8	3,3	3,5
KFCC10881-13	49,8	3,0	2,3
KFCC10881-14	62,7	2,4	2,1
KFCC10881-15	62,4	2,9	2,7
KFCC10881-16	59,6	2,8	2,5
KFCC10881-17	24,1	0,1	0,2
KFCC10881-18	60,5	2,6	2,5
KFCC10881-19	60,0	3,0	1,9
KFCC10881-20	65,8	2,7	2,0
KFCC10881-21	17,3	0,3	0,3
KFCC10881-22	60,1	3,5	1,9

Như thể hiện trong bảng 10, 22 loài chủng kháng AHV thể hiện kết quả sản sinh L-threonin, không quan sát thấy ở nhóm đối chứng (KFCC10881). Trong số các chủng kháng AHV, KFCC10881-10 được chọn làm chủng sản sinh L-threonin tốt nhất.

Ví dụ 7: Sản xuất L-threonin bởi các chủng KFCC10881-10 được đưa vào chất sản sinh L-threonin đột biến

Các vector pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC(m2), và pDZ-PgapA_rhtC(m3)

được xây dựng trong ví dụ 1 và các vector pDZ-PgapA_rhtC L62R, pDZ-PgapA_rhtC L62A, pDZ-PgapA_rhtC L62D, pDZ-PgapA_rhtC L62K, pDZ-PgapA_rhtC L62P, pDZ-PgapA_rhtC L62C, pDZ-PgapA_rhtC L62G, pDZ-PgapA_rhtC L62T, pDZ-PgapA_rhtC L62I, pDZ-PgapA_rhtC L62Y, pDZ-PgapA_rhtC L62V, pDZ-PgapA_rhtC L62H, pDZ-PgapA_rhtC L62F, pDZ-PgapA_rhtC L62M, pDZ-PgapA_rhtC L62Q, pDZ-PgapA_rhtC L62N, pDZ-PgapA_rhtC L62E, pDZ-PgapA_rhtC L62W được xây dựng như thể hiện trong bảng 8 trong ví dụ 4 được biến nạp vào chủng KFCC10881-10 bằng điện biến nạp và sau đó trải qua trao đổi chéo thứ cấp để thu được 22 loài trong đó các gen rhtC đột biến lần lượt được đưa vào nhiễm sắc thể. Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 53 và SEQ ID NO: 54 có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó gen tương ứng được chèn vào.

SEQ ID NO: 53 (HR bên ngoài F)

AAGGAATATCCCGGAGAACC

SEQ ID NO: 54 (HR bên ngoài R)

TTGCGTTTGAAAAGCCCTCG

Các chủng biến nạp thu được được đặt tên là KFCC10881-10(rhtC WT), KFCC10881-10(rhtC L62S), KFCC10881-10(rhtC A53T), KFCC10881-10(rhtC L62R), KFCC10881-10(rhtC L62A), KFCC10881-10(rhtC L62D), KFCC10881-10(rhtC L62K), KFCC10881-10(rhtC L62P), KFCC10881-10(rhtC L62C), KFCC10881-10(rhtC L62G), KFCC10881-10(rhtC L62T), KFCC10881-10(rhtC L62I), KFCC10881-10(rhtC L62Y), KFCC10881-10(rhtC L62V), KFCC10881-10(rhtC L62H), KFCC10881-10(rhtC L62F), KFCC10881-10(rhtC L62M), KFCC10881-10(rhtC L62Q), KFCC10881-10(rhtC L62N), KFCC10881-10(rhtC L62E), và KFCC10881-10(rhtC L62W), tương ứng.

Thao tác di truyền tương ứng đã được xác nhận thông qua giải trình tự bộ gen và PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 53 và SEQ ID NO: 54, có khả năng khuếch đại tương ứng các vị trí bên ngoài của các vùng phía trước và phía sau của sự tái tổ hợp tương đồng tại đó các gen tương ứng đã chèn vào.

22 loài chủng đã điều chế bằng phương pháp nêu trên được nuôi cấy sử dụng môi trường sản xuất L-threonin và phương pháp nuôi cấy trong ví dụ 6. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng sản sinh L-threonin được đo qua HPLC và kết quả được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11

Tên chủng	Lượng sản sinh L-threonin (g/L)	Năng suất L-threonin (g/g, %)	Cải thiện năng suất so với rhtC hoang dại (Δ , %p)
KFCC10881-10	3,8	12,7	-
KFCC10881-10(rhtC WT)	5,5	18,3	-
KFCC10881-10(rhtC A53T)	9,0	30,0	11,7
KFCC10881-10(rhtC L62S)	10,1	33,5	15,2
KFCC10881-10(rhtC L62R)	10,0	33,2	14,9
KFCC10881-10(rhtC L62A)	9,8	32,5	14,2
KFCC10881-10(rhtC L62D)	6,6	22,1	3,8
KFCC10881-10(rhtC L62K)	10,2	34,1	15,8
KFCC10881-10(rhtC L62P)	10,0	33,2	14,9
KFCC10881-10(rhtC L62C)	5,9	19,8	1,5
KFCC10881-10(rhtC L62G)	7,8	26,1	7,8
KFCC10881-10(rhtC L62T)	10,2	34,0	15,7
KFCC10881-10(rhtC L62I)	6,3	20,9	2,6
KFCC10881-10(rhtC L62Y)	6,8	22,5	4,2
KFCC10881-10(rhtC L62V)	9,2	30,5	12,2
KFCC10881-10(rhtC L62H)	9,8	32,8	14,5
KFCC10881-10(rhtC L62F)	6,4	21,3	3,0
KFCC10881-10(rhtC L62M)	7,3	24,2	5,9
KFCC10881-10(rhtC L62Q)	7,9	26,3	8,0
KFCC10881-10(rhtC L62N)	8,9	29,5	11,2
KFCC10881-10(rhtC L62E)	7,4	24,5	6,2
KFCC10881-10(rhtC L62W)	8,5	28,2	9,9

Như được thể hiện trong bảng 11, có thể quan sát thấy mức tăng năng suất cao khi đưa RhtC đột biến vào KFCC10881-10 so với RhtC hoang dại, như trong kết quả được thể hiện trong các ví dụ 3 và 4.

Ví dụ 8: Sản xuất L-threonin bởi các chủng TF4076 được đưa chất sản sinh L-threonin đột biến

Đột biến theo sáng chế được đưa vào *rhtC* có nguồn gốc từ chủng khác có độ tương đồng cao với protein *rhtC* có nguồn gốc từ *E. coli* W3110 (SEQ ID NO: 1) để khảo sát kết quả sản sinh L-threonin.

Cụ thể, các đoạn trình tự nucleotit (*eco rhtC*, *sfe rhtC*, *efe rhtC*) được tìm được từ ADN bộ gen của *E. coli* W3110, *Shigella flexneri* và *Escherichia fergusonii* bằng cách thực hiện PCR tương ứng và mỗi *rhtC* đột biến, đột biến L62S được đưa vào trong đó, được điều chế bằng phương pháp của ví dụ 1. *RhtC* đột biến đã điều chế hoặc *rhtC* hoang dại của mỗi chủng được tách dòng thành pCL1920 để tìm ra các plasmit tái tổ hợp pCL1920-Pn_*rhtC*.*eco*, pCL1920-Pn_*rhtC*.*eco* L62S, pCL1920-Pn_*rhtC*. *sfe*, pCL1920-Pn_*rhtC*.*sfe* L62S, pCL1920-Pn_*rhtC*.*efe*, và pCL1920-Pn_*rhtC*.*efe* L62S.

Các plasmit tái tổ hợp được xây dựng như bên trên được biến nạp vào TF4076, là chủng *E. coli* có khả năng sản sinh L-threonin, và do đó TF4076/pCL1920, TF4076/pCL1920-Pn_*rhtC*.*eco*, TF4076/pCL1920-Pn_*rhtC*.*eco* L62S, TF4076/Các chủng pCL1920-Pn_*rhtC*.*sfe*, TF4076/pCL1920-Pn_*rhtC*.*sfe* L62S, TF4076/pCL1920-Pn_*rhtC*.*efe* và TF4076/pCL1920-Pn_*rhtC*.*efe* L62S được điều chế. Để so sánh lượng sản sinh L-threonin giữa các chủng đã điều chế, đánh giá trong bình được thực hiện và kết quả được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12

Tên chủng	Lượng sản sinh L-threonin (g/L)	Năng suất L-threonin (*100 g/g, %)
TF4076	25,7	36,7
TF4076/pCL1920	25,9	37
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>eco</i>	29,9	42,6
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>eco</i> L62S	40,4	57,7
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>sfe</i>	31,1	44,43
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>sfe</i> L62S	41,5	59,29
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>efe</i>	29,1	41,57
TF4076/pCL1920-Pn_ <i>rhtC</i> . <i>efe</i> L62S	38,2	54,57

Khi *RhtC* đột biến thu được bằng cách đưa đột biến L62S vào *RhtC* có nguồn gốc từ *E. coli* W3110, *Shigella flexneri* và *Escherichia fergusonii* được đưa vào TF4076, mức tăng năng suất cao hơn so với *RhtC* hoang dại, như trong kết quả được thể hiện trong các ví dụ 3, 4 và 7.

Do đó, có thể thấy rằng mặc dù trình tự tham chiếu là khác nhau, việc thay thế bằng axit amin khác ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 hoặc 62 theo sáng chế có thể cải thiện khả năng sản sinh L-threonin.

Từ phần mô tả bên trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện theo các dạng cụ thể khác mà không thay đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Theo đó, các phương án ví dụ được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ đề cập đến các phương án ví dụ mà còn các thay thế, sửa đổi, tương đương khác nhau, và các phương án khác có thể nằm trong nguyên lý và phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể protein sản sinh L-threonin bao gồm sự thể bằng threonin ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc thể bằng axit amin khác ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 62 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, có sự đồng nhất trình tự không ít hơn 90% và dưới 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và có hoạt tính sản sinh L-threonin.
2. Biến thể protein theo điểm 1, trong đó axit amin khác được chọn từ serin, arginin, alanin, axit aspartic, lysin, prolin, xystein, glyxin, threonin, isoleuxin, tyrosin, valin, histidin, phenylalanin, methionin, glutamin, asparagin, axit glutamic, hoặc tryptophan.
3. Biến thể protein theo điểm 1, trong đó biến thể protein bao gồm trình tự axit amin có bất kỳ trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 93 đến SEQ ID NO: 112.
4. Polynucleotit mã hóa biến thể protein theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3.
5. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 4.
6. Vi sinh vật sản sinh L-threonin, vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể chất sản sinh L-threonin, polynucleotit mã hóa cho biến thể, và vector bao gồm polynucleotit, trong đó biến thể chất sản sinh L-threonin bao gồm sự thể bằng threonin tại vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc thể bằng axit amin khác ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 62 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và có sự đồng nhất trình tự không ít hơn 90% và dưới 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
7. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó vi sinh vật này là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium sp.* hoặc *Escherichia sp.*
8. Phương pháp sản xuất L-threonin, phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể protein sản sinh L-threonin, polynucleotit mã hóa biến thể, và vector bao gồm polynucleotit trong môi trường nuôi cấy, trong đó biến thể protein sản sinh L-threonin bao gồm sự thể bằng threonin ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 53 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc thể bằng axit amin khác ở vị trí tương ứng với vị trí thứ 62 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và có sự đồng nhất trình tự không ít hơn 90% và dưới 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này bao gồm việc thu hồi L-threonin

từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> BIẾN THỂ PROTEIN SẢN SINH L-THREONIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY
 <130> OPA20085
 <150> KR 10/2019/0111509
 <151> 2019-09-09
 <160> 116
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> rhtC hoang dại
 <400> 1
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 2
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> rhtC hoang dại

<400> 2
 atgttgatgt tattttctcac cgtcgccatg gtgcacattg tggcgcttat gagccccggt 60
 cccgatttct tttttgtctc tcagaccgct gtcagtcggt cccgtaaaga agcgatgatg 120
 ggcgtgctgg gcattacctg cggcgtaatg gtttgggctg ggattgcgct gcttggcctg 180
 catttgatta tcgaaaaaat ggccctggctg catagctga ttatgggtggg cgggtggcctg 240
 tatctctgct ggatgggtta ccagatgcta cgtgggtgcac tgaaaaaaga ggcggtttct 300
 gcacctgcmc cacaggctga gctggcgaaa agtgggcmca gtttctctgaa aggtttactg 360
 accaatctcg ctaatccgaa agcgattatc tactttggct cgggtgttctc attgtttgtc 420
 ggtgataacg ttggcactac cgcgcgctgg ggcatttttg cgctgatcat tgcgaaaacg 480
 ctggcggtgt ttaccgtcgt tgccagcctg tttgccctgc cgcaaatgcm ccgtgggttat 540
 caacgtctgg cgaagtggat tgatggtttt gccggggcgt tatttgccgg atttggcatt 600
 catttgatta tttcgcggtg a 621

<210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC promotơ lên 1

<400> 3
 tcgagctcgg taccgcacag gacaagcact gggtg 35

<210> 4
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC promotơ lên 2

<400> 4
 agtagcgctg ggatgtttct ctttgtgcac ctttc 35

<210> 5

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

<220>
 <223> Pcj7 1

<400> 5
 gaaaggtgca caaagagaaa catcccagcg ctact

35

<210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Pcj7 2

<400> 6
 tacgaccagg gccatgagtg tttcctttcg ttggg

35

<210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC 1

<400> 7
 cgaaaggaaa cactcatggc cctgggtcgta cagaa

35

<210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC 2

<400> 8
 ggtggaaatc ttttcgatgt tcacgttgac

30

<210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC xuống 1

<400> 9
 gaacatcgaa aagatttcca cctctgagat

30

<210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC xuống 2

<400> 10
 ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatta

35

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC 1 xác nhận

<400> 11
 acattccacc cattactgca

20

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC 2 xác nhận

<400> 12
 tcttcatcgg tttcgaaggt

20

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cj7 F

<400> 13
 gaagctccaa agaaacatcc cagcgctact

30

<210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lên F

<400> 14
 tcgagctcgg taccctgtct ccgtatgcag tgagc

35

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G378E F

<400> 15
 aagatcgcggt ggaggttttg gc

22

<210> 16
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CJ7 R

<400> 16
 tgtgtgagtc gacatgagtg tttcctttcg ttggg

35

<210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom F

<400> 17
 tataggagaa caatcatgac ctcagcatct gcccc

35

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G378E R

<400> 18
 gccaaaacct ccacgcgac tt

22

<210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R398Q F

<400> 19
 gcgtacaatc caacaggaag agcgc

25

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R398Q F

<400> 20
 gcgctcttcc tgttgattg tacgc

25

<210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom R

<400> 21
 ctctagagga tccccgactg cggaatgttg ttgtg

35

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom xác nhận F

<400> 22
 tgggtaggtc gagttgttaa

20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom xác nhận R

<400> 23
 cagcgagtc gcacgaatat

20

<210> 24
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CJ7 F

<400> 24

caaccttttgc aaggtgaaaa agaaacatcc cagcgctact

40

<210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ngược dòng F

<400> 25
 tcgagctcgg taccctgaca gttgctgac tggct

35

<210> 26
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ngược dòng R

<400> 26
 agtagcgctg ggatgtttct ttttcacctt gcaaaggttg

40

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

<220>
 <223> pyc F

<400> 27
 ggaataatta ctctaattgtc gactcacaca tcttc

35

<210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pyc R

<400> 28
 ctctagagga tccccggcat tttcagacag gaagc

35

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pyc xác nhận F

<400>	29		
acgcactcgg	tgaaggcgtg		20
<210>	30		
<211>	20		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	pyc xác nhận R		
<400>	30		
cgcttcagct	tcacgagatg		20
<210>	31		
<211>	35		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Ncgl0179 lên F		
<400>	31		
tcgagctcgg	tacccttttg agtaattggt aatac		35
<210>	32		
<211>	34		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Ncgl0179 lên R		
<400>	32		
tgaagcgccg	gtaccgcgtt aaacggggoga ttat		34
<210>	33		
<211>	34		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	SPL7 F		
<400>	33		
atcgcccggtt	taagcgggta ccggcgcttc atgt		34
<210>	34		
<211>	35		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	SPL7 R		

<400> 34
 cttcaacact cgcacatgat ctgttttgat ctcct

35

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

<220>
 <223> S352P lên F

<400> 35
 atcaaaacag atatcatgcg agtggtgaag ttcgg

35

<210> 36
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S352P lên R

<400> 36
 tactgtattc ggaagatggt tgcgtaatca gcaccac

37

<210> 37
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Ncgl0179 xuống F

<400> 37
 atgaatcatc agtaattaat ggccctcgat ttggc

35

<210> 38
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Ncgl0179 xuống R

<400> 38
 tctagaggat cccctggaat aatcagactc tgga

34

<210> 39
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S352P xuống F

<400> 39
gtggtgctga ttacgcaacc atcttccgaa tacagta

37

<210> 40
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> S352P xuống R

<400> 40
aaatcgaggg ccattaatta ctgatgattc atcatc

36

<210> 41
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thr xác nhận F

<400> 41
gattcacatc accaatgtc

19

<210> 42
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thr xác nhận R

<400> 42
gacaccatcg cagcccagac

19

<210> 43
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> rhtC F

<400> 43
gtcgactcta gaggatcccc gctgattcgt gcgcatgttg

40

<210> 44
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> rhtC R

<400> 44
tgaattcgag ctcggtaccc tcaccgcgaa ataatacaaat

40

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

<220>
<223> Ncgl2533 lên F

<400> 45
tcgagctcgg taccccagca agatctagtc atcaa

35

<210> 46
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Ncgl2533 lên R

<400> 46
gtcgttttta ggcttcgct ggaaaacatt ttgca

35

<210> 47
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PgapA F

<400> 47
aatgtttttcc agcggaagcc taaaaacgac cgagc

35

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

<220>
<223> PgapA R

<400> 48
aaataacatc aacatgttgt gtctcctcta aagat

35

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

<220>

<223> rhtC_m F

<400> 49

tagaggagac acaacatggt gatggtattt ctcac

35

<210> 50

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> rhtC_m R

<400> 50

taagcaggtt gattttcacc gcgaaataat caaat

35

<210> 51

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ncgl2533 dn F

<400> 51

attatttcgc ggtgaaaatc aacctgctta ggcgt

35

<210> 52

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ncgl2533 dn R

<400> 52

ctctagagga tcccctatag ctaccatctg ggtgg

35

<210> 53

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HR bên ngoài F

<400> 53

aaggaatatc ccggagaacc

20

<210> 54

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>		
<223>	HR bên ngoài R	
<400>	54	
	ttgcgtttga aaagccctcg	20
<210>	55	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	up R	
<400>	55	
	ggatgtttct ttggagcttc gctcaatcat	30
<210>	56	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	cj7 R	
<400>	56	
	agatgctgag gtcattgattg ttctcctata atcgc	35
<210>	57	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	pDZ-PgapA_rhtC L62R F	
<400>	57	
	gcgctgcttg gcctgcatcg tattatcgaa aaaatggcc	39
<210>	58	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	pDZ-PgapA_rhtC L62R R	
<400>	58	
	ggccattttt tcgataatac gatgcaggcc aagcagcgc	39
<210>	59	
<211>	39	
<212>	ADN	

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-PgapA_rhtC L62A F

<400> 59
gcgctgcttg gcctgcatgc gattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 60
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-PgapA_rhtC L62A R

<400> 60
ggccattttt tcgataatcg catgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-PgapA_rhtC L62D F

<400> 61
gcgctgcttg gcctgcatga cattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 62
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-PgapA_rhtC L62D R

<400> 62
ggccattttt tcgataatgt catgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 63
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ-PgapA_rhtC L62K F

<400> 63
gcgctgcttg gcctgcataa aattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 64
<211> 39

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62K R

 <400> 64
 ggccattttt tcgataattt tatgcaggcc aagcagcgc 39

 <210> 65
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62P F

 <400> 65
 gcgctgcttg gcctgcatcc gattatcgaa aaaatggcc 39

 <210> 66
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62P R

 <400> 66
 ggccattttt tcgataatcg gatgcaggcc aagcagcgc 39

 <210> 67
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62C F

 <400> 67
 gcgctgcttg gcctgcattg cattatcgaa aaaatggcc 39

 <210> 68
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62C R

 <400> 68
 ggccattttt tcgataatgc aatgcaggcc aagcagcgc 39

 <210> 69

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

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62G F

<400> 69
 gcgctgcttg gcctgcatgg cattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 70
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62G R

<400> 70
 ggccattttt tcgataatgc catgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62T F

<400> 71
 gcgctgcttg gcctgcatac gattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 72
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62T R

<400> 72
 ggccattttt tcgataatcg tatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 73
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62I F

<400> 73
 gcgctgcttg gcctgcatat tattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 74
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62I R

<400> 74
 ggccattttt tcgataataa tatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 75
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62Y F

<400> 75
 gcgctgcttg gcctgcatta tattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 76
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62Y R

<400> 76
 ggccattttt tcgataatat aatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 77
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62V F

<400> 77
 gcgctgcttg gcctgcatgt gattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 78
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62V R

<400> 78
 ggccattttt tcgataatca catgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 79
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62H F

<400> 79
 gcgctgcttg gcctgcatca tattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 80
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62H R

<400> 80
 ggccattttt tcgataatat gatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 81
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62F F

<400> 81
 gcgctgcttg gcctgcattt cattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 82
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62F R

<400> 82
 ggccattttt tcgataatga aatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 83
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62M F

<400> 83
 gcgctgcttg gcctgcatat gattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 84
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62M R

<400> 84
 ggccattttt tcgataatca tatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 85
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62Q F

<400> 85
 gcgctgcttg gcctgcatca gattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 86
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62Q R

<400> 86
 ggccattttt tcgataatct gatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 87
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62N F

<400> 87
 gcgctgcttg gcctgcataa cattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 88
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62N R

<400> 88

ggccattttt tcgataatgt tatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 89
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62E F

<400> 89
 gcgctgcttg gcctgcatga aattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 90
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62E R

<400> 90
 ggccattttt tcgataattt catgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 91
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62W F

<400> 91
 gcgctgcttg gcctgcattg gattatcgaa aaaatggcc

39

<210> 92
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDZ-PgapA_rhtC L62W R

<400> 92
 ggccattttt tcgataatcc aatgcaggcc aagcagcgc

39

<210> 93
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC A53T

<400> 93
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
1 5 10 15
Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30
Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45
Val Met Val Trp Thr Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
50 55 60
Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
85 90 95
Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
100 105 110
Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
115 120 125
Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
130 135 140
Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
145 150 155 160
Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
165 170 175
Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
180 185 190
Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
195 200 205

<210> 94
<211> 206
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> rhtC L62S

<400> 94
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
1 5 10 15
Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30
Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45
Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Ser Ile Ile
50 55 60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 95
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62R

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

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

<210> 96
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62A

<400> 96
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Ala Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 97
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62D

<400> 97
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Asp Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 98
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62K

<400> 98

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

<210> 99
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62P

<400> 99
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Pro Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu

```

65              70              75              80
Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
                        85                      90                      95
Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
                        100                     105                     110
Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
                        115                     120                     125
Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
                        130                     135                     140
Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
                        145                     150                     155                     160
Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
                        165                     170                     175
Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
                        180                     185                     190
Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
                        195                     200                     205

```

```

<210>      100
<211>      206
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      rhtC L62C

```

```

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

```

Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 101
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62G

<400> 101
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Gly Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 102
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62T

<400> 102
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Thr Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 103
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62I

<400> 103
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu

```

      1              5              10              15
Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
      20              25              30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
      35              40              45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Ile Ile Ile
      50              55              60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
      65              70              75              80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
      85              90              95

Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
      100             105             110

Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
      115             120             125

Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
      130             135             140

Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
      145             150             155             160

Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
      165             170             175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
      180             185             190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
      195             200             205

```

```

<210>      104
<211>      206
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      rhtC L62Y

```

```

<400>      104
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
  1              5              10              15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
      20              25              30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
      35              40              45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Tyr Ile Ile
      50              55              60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
      65              70              75              80

```

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 105
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62V

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

Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 106
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62H

<400> 106
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His His Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 107
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62F

<400> 107
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Phe Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 108
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62M

<400> 108
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Met Ile Ile
50 55 60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
85 90 95

Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
100 105 110

Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
115 120 125

Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
130 135 140

Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
145 150 155 160

Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
165 170 175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
180 185 190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
195 200 205

<210> 109
<211> 206
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> rhtC L62Q

<400> 109
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
1 5 10 15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Gln Ile Ile
50 55 60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 110
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62N

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

```

145                      150                      155                      160
Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
                      165                      170                      175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
                      180                      185                      190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
                      195                      200                      205

<210>      111
<211>      206
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      rhtC L62E

<400>      111
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
  1                      5                      10                      15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
                      20                      25                      30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
                      35                      40                      45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Glu Ile Ile
  50                      55                      60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
  65                      70                      75                      80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
                      85                      90                      95

Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
                      100                      105                      110

Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
                      115                      120                      125

Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
  130                      135                      140

Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
  145                      150                      155                      160

Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
                      165                      170                      175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
                      180                      185                      190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
                      195                      200                      205

```

<210> 112
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtC L62W

<400> 112
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Trp Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 113
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Shigella flexneri rhtC(sfe rhtC)

<400> 113
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
50 55 60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
85 90 95

Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
100 105 110

Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
115 120 125

Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
130 135 140

Gly Thr Thr Glu Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
145 150 155 160

Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
165 170 175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
180 185 190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
195 200 205

<210> 114
<211> 206
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> sfe rhtC L62S

<400> 114
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
1 5 10 15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
20 25 30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
35 40 45

Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Ser Ile Ile
50 55 60

Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys

<210>	115
<211>	206
<212>	PRT
<213>	Chưa biết

```
<220>
<223> Escherichia fergusonii rhtC(efe rhtC)
```

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

Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Cys Ala Gly
 180 185 190

Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 116
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> efe rhtC L62S

<400> 116
 Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Ser Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Glu Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Cys Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205