



(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)



1-0047936

(51)^{2020.01} C12N 9/06; C12P 13/08; C12N 9/88;
C12N 9/02

(13) B

(21) 1-2021-07755

(22) 13/08/2020

(86) PCT/KR2020/010738 13/08/2020

(87) WO 2021/060701 01/04/2021

(30) 10-2019-0119058 26/09/2019 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/07/2022 412A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BAEK, Mina (KR); SON, Seung-ju (KR); KWON, Su Yon (KR); LEE, Imsang (KR); LEE, Kwang Woo (KR).

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

(54) POLYPEPTIT SỬA ĐỔI CỦA MESO-ĐIAMINOPIMELAT DEHYDROGENAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN

(21) 1-2021-07755

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit sửa đổi, trong đó hoạt tính của *meso*-điaminopimelat bị suy yếu, và phương pháp sản xuất L-threonin bằng cách sử dụng polypeptit này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến polypeptit sửa đổi trong đó hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza bị suy yếu, và phương pháp sản xuất L-threonin sử dụng polypeptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là *Corynebacterium glutamicum*, là vi sinh vật gram dương được sử dụng rộng rãi trong việc sản xuất các L-axit amin và các vật liệu hữu ích khác. Để sản xuất các L-axit amin và các vật liệu hữu ích khác, các nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để phát triển công nghệ quá trình lên men và các vi sinh vật có khả năng sản xuất hiệu quả cao các vật liệu này. Ví dụ, các cách tiếp cận vật liệu đặc hiệu đích (ví dụ phương pháp để tăng biểu hiện gen mã hóa enzym liên quan đến sinh tổng hợp L-lysin, phương pháp để loại bỏ gen không cần thiết cho sinh tổng hợp L-lysin, v.v.) chủ yếu được sử dụng (Patent Hoa Kỳ số 8,048,650).

Trong khi đó, trong số các L-axit amin, L-lysin, L-threonin, L-methionin, L-isoleuxin, và L-glyxin là các axit amin có nguồn gốc từ aspartat, và mức độ tổng hợp của oxaloaxetat (tức là, tiền chất của aspartat) có thể ảnh hưởng đến các mức độ tổng hợp của các L-axit amin này.

Meso-diaminopimelat dehydrogenaza là enzym quan trọng chuyển đổi piperodein 2,6-dicarboxylat, được tạo ra trong quá trình sản xuất lysin trong vi sinh vật, thành *meso*-2,6-diaminopimelat, và cố định nguồn nitơ trong con đường sản sinh lysin.

Các chi tiết đối với sự thay đổi trong kiểu hình của chủng sản sinh L-threonin do xóa gen *ddh* (tức là, gen mã hóa *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza) và gen *lysE* (tức là, gen sản sinh L-lysin) đã được báo cáo trong tài liệu đã có (X Dong, Y Zhao, J Hu, Y Li, X Wang – *Công nghệ vi khuẩn và enzym*, 2016). Tuy nhiên, do xóa gen *lysE* có tác động tiêu cực là làm chậm tốc độ sinh trưởng của chủng và giảm lượng sản sinh threonin, và do xóa gen *ddh* ức chế sự phát triển của chủng, vẫn cần tiến hành các nghiên cứu tập trung vào cả tăng khả năng sản xuất hiệu quả các L-axit amin và sinh trưởng của chủng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực để tăng sản sinh L-threonin trong khi giảm sản sinh L-lysin mà không làm chậm tốc độ sinh trưởng của chủng. Kết quả là, họ đã phát hiện ra rằng khi polypeptit sửa đổi mới trong đó hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza bị suy yếu đến mức độ nhất định được sử dụng, không chỉ có thể duy trì sinh trưởng của vi sinh vật, mà còn có thể tăng lượng sản xuất L-threonin, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chứa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin gồm có bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sử dụng vi sinh vật để sản xuất L-threonin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi sử dụng polypeptit sửa đổi mới của sáng chế, trong đó hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza bị suy yếu, có thể tăng cường hơn nữa lượng sản sinh L-threonin. Vì vậy, các hiệu quả về năng suất cao và thuận tiện có thể mong đợi về khía cạnh công nghiệp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, các phần mô tả và các phương án tương ứng được mô tả trong sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các chi tiết khác nhau được bộc lộ trong sáng chế nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể bên dưới.

Để đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác, và cụ thể hơn là đề xuất polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin, phenylalanin, glutamat, hoặc xystein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*meso*-điaminopimelat dehydrogenaza” đề cập đến men khử phụ thuộc NADPH xúc tác quá trình trung gian cho sinh tổng hợp lysin. *Meso*-điaminopimelat dehydrogenaza là enzym quan trọng chuyển đổi piperodein 2,6-dicarboxylat, được tạo ra trong quá trình sản xuất lysin trong vi sinh vật, để tạo ra *meso*-2,6-điaminopimelat, và cố định nguồn nitơ trong con đường sản sinh lysin. Cụ thể là, *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza là *meso*-2,6-điaminopimelat synthaza, và nó có vai trò điều chỉnh tốc độ trong bước thứ ba của con đường sản sinh lysin. Ngoài ra, enzym xúc tác phản ứng cố định nhóm amino vào trong piperodien 2,6-dicarbosylat và nhờ đó tạo thành *meso*-2,6-điaminopimelat.

Theo sáng chế, thuật ngữ “*meso*-điaminopimelat dehydrogenaza” có thể sử dụng thay thế cho xitrat synthaza, *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza, và DDH.

Theo sáng chế, trình tự của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có thể thu được từ Ngân hàng gen NCBI, là cơ sở dữ liệu chung. Ví dụ, trình tự của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có thể là trình tự của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có nguồn gốc từ *Corynebacterium* sp., và cụ thể hơn là, polypeptit/protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, nhưng trình tự của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, bất kỳ trình tự nào có hoạt tính giống với hoạt tính của trình tự axit amin nêu trên có thể bao gồm mà không bị giới hạn. Ngoài ra, trình tự axit amin của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc bất kỳ trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất tối thiểu 80% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, nhưng trình tự axit amin không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, trình tự axit amin có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và bất kỳ trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc hoặc lớn hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin, trong đó một phần của trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm, cũng có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất của trình tự axit amin với trình tự axit

amin của protein nêu trên và biểu hiện hiệu quả tương ứng với protein nêu trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến polypeptit, trong đó ít nhất một axit amin ở dạng thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi là khác với trình tự nêu trên, nhưng các chức năng hoặc các đặc tính của protein được duy trì. 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 xác định bằng sự sửa đổi một axit amin trong trình tự axit amin của polypeptit bên trên và bằng cách đánh giá các đặc tính của polypeptit sửa đổi bên trên. 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 một hoặc nhiều phần (ví dụ, trình tự dẫn đầu đầu N hoặc miền xuyên màng) được loại bỏ.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến thay thế của một axit amin với axit amin khác mà có các đặc tính hóa học và/hoặc cấu trúc tương tự. Biến thể có thể có, ví dụ, một hoặc nhiều thay thế bảo thủ trong khi vẫn giữ một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Các sự thay thế axit amin như vậy có thể thường xuất hiện dựa trên sự giống nhau về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, các axit amin (tính bazơ) điện tích dương bao gồm arginin, lysin, và histidin; các axit amin (tính axit) điện tích âm bao gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan, và tyrosin; các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, prolin, glyxin, và tryptophan. Thông thường, thay thế bảo thủ có ít hoặc không ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit được tạo ra.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm xóa hoặc thêm các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các đặc tính và cấu trúc thứ cấp của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể liên hợp với trình tự (hoặc dẫn đầu) tín hiệu tại đầu N của protein, mà trực tiếp truyền cùng dịch mã hoặc dịch mã sau của protein. Ngoài ra, polypeptit có thể kết hợp với trình tự khác hoặc đoạn nối để nhận dạng, tinh sạch, hoặc tổng hợp của polypeptit.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza” đề cập đến polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin của polypeptit mà có hoạt tính của *meso*-điaminopimelat

dehydrogenaza protein, và các thay thế axit amin bao gồm thay thế trong đó axit amin thứ 169 từ đầu N được thế bằng axit amin khác.

Cụ thể, polypeptit sửa đổi bao gồm polypeptit sửa đổi, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin của polypeptit mà có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza protein được thế bằng axit amin khác. Ví dụ, polypeptit sửa đổi bao gồm polypeptit sửa đổi, trong đó đột biến xuất hiện trên axit amin tại vị trí 169 từ đầu N trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Cụ thể hơn, polypeptit sửa đổi có thể là protein, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác.

Thuật ngữ “thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn miễn là axit amin được thế bằng axit amin mà khác với axit amin trước khi thay thế. Cụ thể, thay thế có thể là thay thế trong đó axit amin được thế bằng bất kỳ một axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-histidin, L-glutamat, L- axit aspartic, L-glyxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin, L-isoleuxin, L-methionin, L-phenylalanin, L-tryptophan, L-prolin, L-serin, L-xystein, L-tyrosin, L-asparagin, và L-glutamin. Cụ thể hơn, polypeptit sửa đổi có thể là polypeptit trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 là bất kỳ một axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-leuxin, L-phenylalanin, L-glutamat, và L-xystein, nhưng polypeptit sửa đổi không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, gốc axit amin được thế có thể bao gồm không chỉ các axit amin tự nhiên mà còn các axit amin không tự nhiên. Các axit amin không tự nhiên có thể là, ví dụ, các D-axit amin, các homo-axit amin, các beta-homo-axit amin, các N-metyl axit amin, các alpha-metyl axit amin, các axit amin khác thường (ví dụ, xitrullin, naphthyl alanin, v.v.), nhưng các axit amin không tự nhiên không bị giới hạn ở đây.

Trong khi đó, khi được biểu diễn “axit amin cụ thể được thế” trong sáng chế, rõ ràng là axit amin được thế bằng axit amin khác với axit amin trước khi thay thế, ngay cả khi nó không được chỉ ra một cách riêng biệt rằng nó được thế bằng axit amin khác.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương ứng với” đề cập đến gốc axit amin tại vị trí có trong protein hoặc peptit, hoặc gốc axit amin đồng nhất hoặc tương ứng với gốc có trong protein hoặc peptit. Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vùng tương ứng” thường đề cập đến vị trí giống nhau trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Theo sáng chế, việc đánh số cụ thể có thể được sử dụng cho các vị trí gốc axit amin trong polypeptit được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, có thể đánh số lại các vị trí tương ứng với các vị trí gốc axit amin của polypeptit của sáng chế bằng cách căn chỉnh polypeptit chủ thể cần so sánh với trình tự polypeptit của sáng chế.

Biến thể của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza được đề xuất theo sáng chế sao cho axit amin tại vị trí cụ thể trong *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza mô tả bên trên được thế, và do đó khả năng sản xuất L-threonin có thể tăng lên so với polypeptit trước khi sửa đổi.

Polypeptit sửa đổi có thể là polypeptit, trong đó axit amin thứ 169 từ đầu N trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được mô tả bên trên và/hoặc trình tự axit amin, có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc nhiều hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được sửa đổi.

Ngoài ra, polypeptit sửa đổi có thể là polypeptit, trong đó axit amin thứ 169 từ đầu N trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được mô tả bên trên và/hoặc trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc nhiều hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được sửa đổi; có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn, và ít hơn 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và có hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza.

Hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của polypeptit sửa đổi có thể yếu hơn hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, là kiểu đại.

Đối với mục đích của sáng chế, vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza khác biệt ở chỗ lượng các L-axit amin sản xuất tăng lên so với vi sinh vật tại đó polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza không có mặt. Polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza khác biệt ở chỗ có hoạt tính kiểm soát gen để tăng khả năng sản xuất L-axit amin so với *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza kiểu đại tự nhiên hoặc không sửa đổi. Nó có ý nghĩa quan trọng là lượng sản xuất L-axit amin có thể tăng lên thông qua vi sinh vật, trong đó polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza được đưa vào. Cụ thể, L-axit amin có thể là L-threonin hoặc axit amin có nguồn gốc từ L-threonin, nhưng bất kỳ

L-axit amin, có thể được tạo ra bằng cách đưa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza hoặc bằng cách bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza, có thể được bao gồm mà không bị giới hạn.

Axit amin có nguồn gốc từ L-threonin đề cập đến axit amin có thể được sinh tổng hợp bằng cách sử dụng L-threonin làm tiền chất, và axit amin có nguồn gốc từ L-threonin không bị giới hạn miễn là có thể sinh tổng hợp từ L-threonin.

Polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có thể là, ví dụ, polypeptit sửa đổi bao gồm trình tự axit amin, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác, và có thể là polypeptit bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3. Biến thể, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin, có thể là biến thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, nhưng biến thể không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin, mà có sự tương đồng hoặc đồng nhất 80% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, nhưng polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế có thể bao gồm protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc protein có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 3. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin có sự xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm trong một số axit amin của nó cũng có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế ngoài axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 SEQ ID NO: 1, miễn là protein có trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và biểu hiện hiệu quả tương ứng với protein bên trên.

Tức là, ngay cả khi được mô tả là “protein có trình tự axit amin SEQ ID NO cụ thể”, rõ ràng rằng protein có trình tự axit amin với xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ, hoặc thêm trong một phần của trình tự cũng có thể được sử dụng trong sáng chế miễn là protein có hiệu quả đồng nhất hoặc tương ứng với protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO tương ứng. Ví dụ, miễn là protein có hoạt tính đồng nhất hoặc tương ứng với hoạt tính của protein sửa đổi, thêm trình tự không làm thay đổi chức năng của protein phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin, các đột biến xảy ra không tự nhiên, các đột biến câm lặng, hoặc các thay thế bảo thủ của nó không bị loại trừ. Rõ ràng

rằng ngay cả khi protein có thêm trình tự như vậy hoặc đột biến, nó cũng nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, và nó có thể được biểu diễn bằng phần trăm.

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

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit hoặc các polypeptit bảo tồn có thể được xác định bằng 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. Thực tế, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai với nhau dọc theo toàn bộ chiều dài hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc nhiều hơn của toàn bộ trình tự dưới các điều kiện vừa phải hoặc nghiêm ngặt cao hơn. Trong lai hóa, các polynucleotit bao gồm codon (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 ET AL.](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 đã cho bằng

cách sử dụng 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 and 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 EDNAFULL (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.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến chuỗi ADN hoặc ARN có chiều dài hơn chiều dài nhất định dưới dạng nucleotit polyme, là chuỗi dài của các monome nucleotit được nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, và cụ thể hơn là đề cập đến đoạn polynucleotit mã hóa protein sửa đổi được mô tả bên trên.

Polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế, có thể bao gồm bất kỳ trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế mà không giới hạn. Polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế, có thể bao gồm mà không giới hạn ở bất kỳ trình tự polynucleotit mã hóa protein sửa đổi, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác. Cụ thể, polynucleotit có thể bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa biến thể, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin. Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3,

nhưng polynucleotit không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, polynucleotit có thể là polynucleotit gồm có trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 4, nhưng polynucleotit không bị giới hạn ở đây. Xem xét thoái biến codon và các codon được ưu tiên trong tổ chức sinh học tại đó protein được biểu hiện, các sửa đổi khác nhau có thể thực hiện trong vùng mã hóa của polynucleotit trong phạm vi không làm thay đổi trình tự axit amin của protein. Theo đó, rõ ràng rằng bất kỳ polynucleotit có thể được dịch mã thành polypeptit bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc thành polypeptit có sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, cũng có thể bao gồm trong sáng chế.

Ngoài ra, bất kỳ trình tự mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác, bằng cách lai hóa với bất kỳ đoạn dò mà được điều chế từ các trình tự gen đã biết (ví dụ, các trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit bên trên) dưới các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm mà không giới hạn.

Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện mà cho phép lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả cụ thể trong tài liệu tham khảo (ví dụ, J Sambrook *et al.*, *supra*). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện mà dưới các điều kiện này các gen có tương đồng hoặc đồng nhất cao nhất (ví dụ, 80% hoặc lớn hơn, 85% hoặc lớn hơn, cụ thể 90% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn 95% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn nữa 97% hoặc lớn hơn, và cụ thể hơn nữa 99% hoặc lớn hơn) 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).

Mặc dù sự không phù hợp giữa các nucleotit có thể xảy ra do sự nghiêm ngặt của lai hóa, nó yêu cầu hai axit nucleic có trình tự bổ sung. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleic có thể lai hóa với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymin và xytosin được bổ sung với guanin. Theo đó, sáng chế có thể bao gồm không chỉ các trình tự axit nucleic về cơ bản tương tự, mà còn các đoạn axit nucleic đã phân lập được bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được xóa bằng cách

sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai hóa ở giá trị T_m là 55°C và các điều kiện được mô tả bên trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng không bị giới hạn ở đây, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực tùy theo mục đích.

Tính nghiêm ngặt thích hợp của lai hóa các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các biến thể đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-9.51 và 11.7-11.8).

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein được sửa đổi đích liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát thích hợp để cho phép biểu hiện protein được sửa đổi đích trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát có thể bao gồm promoter (vùng khởi động) có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự vận hành để kiểm soát phiên mã như vậy, trình tự mã hóa miền liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự kiểm soát 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, miễn là nó có thể sao chép trong tế bào vật chủ, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của các vector thường có thể bao gồm plasmid tái tổ hợp hoặc tự nhiên, cosmit, virus, và thực khuẩn. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng làm vector thực khuẩn hoặc vector cosmit; và các vector gốc pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng làm vector plasmid. Cụ thể, các vector chẳng hạn như pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein sửa đổi đích trong nhiễm sắc thể có thể được thể 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 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 (ví dụ, kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào, biểu hiện của các protein bề mặt, v.v.) 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, và do đó, các tế bào được biến nạp có thể được lựa chọn.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật bao gồm protein sửa đổi hoặc polynucleotit mã hóa protein sửa đổi, và do đó có khả năng sản xuất L-threonin. Cụ thể, vi sinh vật bao gồm biến thể protein hoặc polynucleotit mã hóa protein sửa đổi, có thể là vi sinh vật được điều chế bằng cách biến nạp với vector chứa polynucleotit mã hóa protein sửa đổi, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vector, mà bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào trong tế bào chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, nó có thể được tích hợp vào trong và được đặt trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, hoặc nó có thể là được đặt ngoài nhiễm sắc thể, hoặc không phân biệt của chúng. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể là được đưa vào ở dạng bất kỳ, miễn là nó có thể được đưa vào trong tế bào vật chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào vật chủ ở dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để tự biểu hiện của nó. Thông thường, catxet biểu hiện có thể bao gồm promotor được liên kết hoạt động với polynucleotit, các tín hiệu kết thúc phiên mã, các vị trí liên kết ribosom, và các tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể là polynucleotit được đưa vào trong tế bào vật chủ và liên kết hoạt động với trình tự đòi hỏi để biểu hiện trong tế bào vật chủ, nhưng polynucleotit không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “liên kết hoạt động” có nghĩa là trình tự vùng khởi động, khởi đầu và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa protein được sửa đổi đích của sáng chế, được liên kết hoạt động với trình tự gen nêu trên.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, mà bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit” có thể đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp mà được điều chế sao cho polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế được biểu hiện. Ví dụ, nó có thể đề cập đến tế bào chủ hoặc vi sinh vật, mà bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc được biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, và do đó có khả năng biểu hiện biến thể. Với mục đích của sáng chế, cụ thể, vi sinh vật là vi sinh vật biểu hiện polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, bao gồm một hoặc nhiều các thay thế axit amin bên trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện protein sửa đổi trong đó axit amin thứ 169 từ đầu N trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin và do đó có hoạt tính của polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit, có khả năng là bất kỳ vi sinh vật nào bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit và do đó có khả năng sản xuất L-axit amin (ví dụ, L-threonin), nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây. Ví dụ, vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit, có thể là vi sinh vật tái tổ hợp, được điều chế bằng cách đưa polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza vào trong vi sinh vật hoang dại tự nhiên hoặc vi sinh vật sản xuất L-axit amin, và do đó có khả năng biểu hiện polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza và có khả năng tăng cường sản sinh L-axit amin. Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin được tăng cường có thể là vi sinh vật có khả năng tăng cường sản sinh L-axit amin so với vi sinh vật hoang dại tự nhiên hoặc vi sinh vật không sửa đổi, và L-axit amin có thể là L-threonin, nhưng chúng không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất L-axit amin”

bao gồm cả vi sinh vật hoang dại và vi sinh vật trong đó sửa đổi tự nhiên hoặc nhân tạo xuất hiện, và nó có thể là vi sinh vật, trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường do việc chèn gen ngoại lai, do tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, v.v., trong đó biến thể di truyền xuất hiện hoặc hoạt tính được tăng cường để sản sinh L-axit amin mong muốn. Vi sinh vật chủ thể có thể là vi sinh vật được sửa đổi về mặt di truyền thông qua bất kỳ một hoặc nhiều được lựa chọn từ nhóm bao gồm polypeptit sửa đổi, polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi, và vectơ chứa polynucleotit; vi sinh vật được sửa đổi để biểu hiện polypeptit sửa đổi hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi; vi sinh vật tái tổ hợp, biểu hiện polypeptit sửa đổi hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi; hoặc vi sinh vật tái tổ hợp, có hoạt tính của polypeptit sửa đổi, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật sản xuất L-axit amin có thể là vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi, hoặc vi sinh vật trong đó vectơ chứa polynucleotit được đưa vào để có khả năng tăng cường sản xuất L-axit amin mong muốn. Cụ thể, việc đưa có thể đạt được bằng cách biến nạp nhưng không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, trong sáng chế, vi sinh vật sản xuất L-axit amin hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất L-axit amin có thể là vi sinh vật, trong đó một phần trong các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp L-axit amin được tăng cường hoặc suy yếu, hoặc vi sinh vật, trong đó một phần trong các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp L-axit amin được tăng cường hoặc suy yếu.

Với mục đích của sáng chế, vi sinh vật có thể bao gồm bất kỳ vi sinh vật, bao gồm polypeptit sửa đổi và do đó có khả năng sản sinh L-threonin hoặc axit amin có nguồn gốc từ L-threonin.

Thuật ngữ “vi sinh vật không sửa đổi” đề cập đến chủng tự nhiên của nó; vi sinh vật không chứa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza; hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza. “Vi sinh vật” có thể bao gồm vi sinh vật nhân sơ hoặc vi sinh vật nhân thực, miễn là vi sinh vật có thể sản xuất L-axit amin. Ví dụ, “vi sinh vật” có thể bao gồm các vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Brevibacterium*. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là *Corynebacterium glutamicum*,

nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-threonin trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, ví dụ, biểu hiện của gen *thrC* mã hóa threonin synthaza; gen *ppc* mã hóa phosphoenolpyruvat carboxykinaza; gen *galP* liên quan đến sự hấp thụ glucoza; gen *lysC* mã hóa aspartokinaza 3 nhạy cảm lysin; gen *hom* mã hóa homoserin dehydrogenaza; gen *pyc* gây tăng nhóm oxaloaxetat, v.v. có thể tăng cường hoặc tăng bên trong vi sinh vật.

Để giải phóng ức chế phản hồi đối với L-threonin, ví dụ, gen sửa đổi có thể được đưa vào trong gen *lysC*, gen *hom*, gen *thrA* (có đặc tính chức năng kép của aspartokinaza/homoserin dehydrogenaza 1), v.v..

Để bất hoạt các gen làm suy yếu con đường sinh tổng hợp L-threonin, ví dụ, biểu hiện của gen *pckA* liên quan đến chuyển đổi của oxaloaxetat (OAA) (tức là, chất trung gian của sinh tổng hợp L- threonin) thành phosphoenolpyruvat (PEP); biểu hiện của gen *tyrR* ức chế biểu hiện của gen *lysC*; biểu hiện của gen *galR* ức chế biểu hiện của gen *galP* liên quan đến hấp thụ glucoza; biểu hiện của gen *mcbR* (tức là, bộ điều hòa kép phiên mã liên kết ADN); v.v. có thể bị suy yếu hoặc bất hoạt bên trong vi sinh vật.

Để tăng hoạt tính của operon của L-threonin, plasmit bao gồm operon threonin, bao gồm các gen mã hóa aspartokinaza, homoserin dehydrogenaza, homoserin kinaza, và threonin synthaza (Công bố đơn 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, tính đề kháng có thể được quy cho các chất tương tự L-threonin (ví dụ, α -amin- β -hydroxy valeric axit, D,L-threonin hydroxamat, v.v.).

Ngoài ra, các gen tác động trên con đường sinh tổng hợp L-lysine và có tiền chất chung với L-threonin (ví dụ, dihydrodipicolinat synthaza (*dapA*) (tức là, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinat reductaza), diaminopimelat decarboxylaza (*lysA*), và diaminopimelat dehydrogenaza (*ddh*)), có thể bị yếu đi.

Tuy nhiên, các phương pháp biểu hiện gen không bị giới hạn ở đây, và khả năng sản sinh L-threonin có thể được tăng cường bằng phương pháp kiểm soát biểu hiện gen

đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

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

Sự tăng cường hoặc tăng như vậy của hoạt tính gen có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Sự tăng cường hoặc tăng về hoạt tính gen có thể đạt được bằng một hoặc nhiều các phương pháp được lựa chọn từ nhóm bao gồm phương pháp tăng số lượng bản sao của gen trong tế bào; phương pháp đưa vào sửa đổi trên trình tự kiểm soát biểu hiện của gen; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen với trình tự có hoạt tính mạnh hơn; phương pháp đưa vào sửa đổi thêm trên gen tương ứng để tăng hoạt tính của gen; và phương pháp đưa vào gen ngoại lai trong vi sinh vật, và có thể đạt được bằng cách kết hợp các phương pháp này, nhưng các phương pháp không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “bất hoạt” là khái niệm bao gồm trường hợp tại đó hoạt tính của gen bị suy yếu so với hoạt tính nội sinh của nó và trường hợp tại đó gen không có hoạt tính.

Sự bất hoạt hoặc suy yếu hoạt tính của gen có thể là đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ của các phương pháp này bao gồm: phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể, bao gồm trường hợp tại đó hoạt tính của gen bị loại bỏ; phương pháp thay thế gen mã hóa protein tương ứng trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến để giảm hoạt tính của protein tương ứng; phương pháp đưa vào sửa đổi trên 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 có hoạt tính yếu hơn hoặc không có hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế vùng khởi động của gen với vùng khởi động có hoạt tính yếu hơn so với vùng khởi động nội sinh của nó); phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể mã hóa protein; phương pháp đưa vào antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN), liên kết bổ sung với phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể, mã hóa protein, và nhờ đó ức chế dịch mã của mRNA vào trong protein; phương pháp thêm nhân tạo trình tự, được bổ sung với trình tự Shine-Dalgarno (SD), với vùng phía trước của trình tự SD của gen trên nhiễm sắc thể, mã hóa protein, và tạo thành cấu trúc thứ cấp do đó tạo ra phần kèm theo của ribosom không thể có được; phương pháp

kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE), trong đó vùng khởi động được thêm vào đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự tương ứng cần phiên mã ngược; v.v.. Ngoài ra, sự bất hoạt hoặc làm yếu của hoạt tính của gen có thể đạt được bằng cách kết hợp các phương pháp này, nhưng các phương pháp không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Ví dụ, tăng cường các hoạt tính của các gen *lysC*, *hom*, và *pyc* có thể là đạt được bằng phương pháp tăng số lượng bản sao của gen trong tế bào; phương pháp đưa vào sửa đổi trên trình tự kiểm soát biểu hiện của gen; phương pháp thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen với trình tự có hoạt tính mạnh hơn; phương pháp đưa vào sửa đổi thêm trên gen tương ứng để tăng cường hoạt tính của gen; phương pháp đưa vào gen ngoại lai trong vi sinh vật; v.v., nhưng các phương pháp không bị giới hạn cụ thể ở đây và bất kỳ phương pháp đã biết để tăng cường hoặc tăng hoạt tính gen có thể được sử dụng mà không giới hạn.

Ví dụ, việc suy yếu các hoạt tính của *dapA*, *ddh*, và *lysGens* có thể đạt được bằng phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể, bao gồm trường hợp tại đó hoạt tính của gen bị loại bỏ; phương pháp thay thế gen mã hóa protein tương ứng trên nhiễm sắc thể với gen đột biến để giảm hoạt tính của protein tương ứng; phương pháp đưa vào sửa đổi trên 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 với trình tự có hoạt tính yếu hơn hoặc không có hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế vùng khởi động của gen với vùng khởi động có hoạt tính yếu hơn so với vùng khởi động nội sinh của nó); phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen trên nhiễm sắc thể, mã hóa protein; v.v., nhưng các phương pháp không bị giới hạn ở đây và bất kỳ phương pháp đã biết để làm suy yếu hoạt tính gen có thể được sử dụng mà không giới hạn.

Ngoài ra, theo sáng chế, vi sinh vật bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza có thể còn bao gồm một hoặc nhiều được lựa chọn từ các polypeptit sửa đổi sau đây, hoặc một hoặc nhiều được lựa chọn từ các polynucleotit mã hóa các polypeptit sửa đổi sau.

Polypeptit sửa đổi có thể còn bao gồm một hoặc nhiều được lựa chọn từ polypeptit sửa đổi của dihydrodipicolinat reductaza (*dapB*) (tức là, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinat reductaza), trong đó axit amin thứ 13 trong trình tự axit amin SEQ

ID NO: 81 là arginin được thế bằng asparagin; polypeptit sửa đổi của điaminopimelat decarboxylaza (lysA), trong đó axit amin thứ 408 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 82 là methionin được thế bằng alanin; và polypeptit sửa đổi của dihydrođipicolinat synthaza (dapA), trong đó axit amin thứ 119 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 83 là tyrosin được thế bằng phenylalanin.

Trình tự axit amin của polypeptit sửa đổi của dihydrođipicolinat reductaza, trong đó axit amin thứ 13 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 81 là arginin, được thế bằng asparagin SEQ ID NO: 66, nhưng trình tự axit amin không bị giới hạn ở đây. Theo sáng chế, việc đưa vào polypeptit sửa đổi hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit có thể giảm lượng sản xuất lysin trong khi tăng lượng sản sinh threonin.

Trình tự axit amin của polypeptit sửa đổi của điaminopimelat decarboxylaza, trong đó axit amin thứ 408 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 82 là methionin được thế bằng alanin SEQ ID NO: 71, nhưng trình tự axit amin không bị giới hạn ở đây. Điaminopimelat decarboxylaza là enzym cuối cùng tác động trên sinh tổng hợp lysin, và sự thay thế của axit amin thứ 408 từ methionin thành alanin có thể giảm lượng sản sinh lysin trong khi tăng lượng sản sinh threonin.

Trình tự axit amin của polypeptit sửa đổi của dihydrođipicolinat synthaza, trong đó axit amin thứ 119 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 83 là tyrosin, được thế bằng phenylalanin SEQ ID NO: 76, nhưng trình tự axit amin không bị giới hạn ở đây. Dihydrođipicolinat synthaza là enzym để sinh tổng hợp lysin từ aspartyl semialdehyt (tức là, tiền chất chung đối với lysin và threonin), và thay thế của axit amin thứ 119 từ tyrosin thành phenylalanin có thể giảm lượng sản sinh lysin trong khi tăng lượng sản sinh threonin.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất threonin hoặc L-axit amin có nguồn gốc từ threonin, bao gồm bước nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polypeptit sửa đổi có hoạt tính của meso-điaminopimelat dehydrogenaza.

L-axit amin có nguồn gốc từ threonin có thể bao gồm không chỉ các L-axit amin có nguồn gốc từ threonin, mà còn các dẫn xuất của nó. Ví dụ, L-axit amin có nguồn gốc từ threonin có thể là L-threonin, L-isoleuxin, O-axetyl-L-homoserin, O-suxinyl-L-homoserin, O-phospho-L-homoserin, L-methionin, và/hoặc L-glyxin, nhưng L-axit

amin có nguồn gốc từ threonin không bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn, L-axit amin có nguồn gốc từ threonin có thể là L-threonin, L-isoleuxin, O-acetyl-L-homoserin, O-suxinyl-L-homoserin, và/hoặc L-methionin, nhưng L-axit amin có nguồn gốc từ threonin không bị giới hạn ở đây.

Trong phương pháp bên trên, bước nuôi cấy vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể được thực hiện nuôi cấy hàng loạt, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy mẻ có cấp dinh dưỡng, v.v. đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng tùy chọn độ pH (ví dụ, độ pH 5 đến 9, cụ thể độ pH 6 đến 8, và cụ thể hơn độ pH 6,8) có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoni) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric), và trạng thái hiếu khí có thể được duy trì bằng cách đưa oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy, nhưng các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn ở đây. Nhiệt độ nuôi cấy có thể là được duy trì ở 20°C đến 45°C, và cụ thể 25°C đến 40°C, và nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng 10 giờ đến khoảng 160 giờ, nhưng các điều kiện này không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, L-axit amin được sản xuất bằng nuôi cấy có thể được tiết vào trong môi trường nuôi cấy hoặc giữ lại trong các tế bào.

Hơn nữa, với nguồn cacbon cần sử dụng môi trường nuôi cấy để nuôi cấy, các sacarit và các carbohydrat (ví dụ, glucosza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, các molasza, tinh bột, và xenuloza), các dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu lạc, và dầu dừa), các axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), các axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v. có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở đây. Với nguồn nitơ, các hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, chiết xuất nấm men, nước thịt, chiết xuất mạch nha, dịch chiết ngô, bột đậu, và ure), và hợp chất hữu cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), v.v. có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không bị giới hạn ở đây. Với nguồn phospho, kali dihydro phosphat, đikali hydrophosphat, các muối chứa natri tương ứng của chúng, v.v. có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhưng nguồn phospho không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các nguyên liệu thúc đẩy tăng trưởng thiết yếu, chẳng hạn như các muối kim loại (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), các axit amin, và các vitamin.

Bước nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin từ môi trường nuôi cấy và vi sinh vật.

Đối với phương pháp thu hồi L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin được sản sinh trong bước nuôi cấy, L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin mong muốn có thể được thu gom từ dung dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp đã biết thích hợp trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography: HPLC), v.v. có thể được sử dụng, và L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin mong muốn có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp đã biết thích hợp trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Bước thu hồi có thể bao gồm bước tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết thích hợp trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin đã thu hồi có thể ở dạng đã tinh sạch hoặc chất lỏng lên men của vi sinh vật bao gồm L-axit amin (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất L-threonin, bao gồm: vi sinh vật chứa polypeptit sửa đổi của sáng chế có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi, và vectơ chứa polynucleotit, hoặc bất kỳ một trong số chúng; hoặc dung dịch nuôi cấy chứa vi sinh vật.

Meso-diaminopimelat dehydrogenaza, polypeptit sửa đổi của nó, polynucleotit, vectơ, và vi sinh vật giống với mô tả bên trên.

Vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây. Vi sinh vật giống với mô tả bên trên.

Chế phẩm để sản xuất L-threonin có thể đề cập đến chế phẩm có khả năng sản xuất L-threonin bởi polypeptit sửa đổi mà có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza. Chế phẩm có thể bao gồm mà không giới hạn ở polypeptit sửa đổi có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza hoặc cấu trúc có khả năng hoạt động polypeptit sửa đổi có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza. Polypeptit sửa đổi có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza có thể ở dạng tại đó nó chứa

trong vector để biểu hiện gen liên kết hoạt động với nó tế bào chủ, nơi nó được đưa vào.

Chế phẩm có thể còn bao gồm lyoprotectant hoặc tá dược. Lyoprotectant hoặc tá dược có thể là vật liệu không có trong tự nhiên hoặc vật liệu có trong tự nhiên, nhưng không bị giới hạn ở đây. Trong phương án cụ thể của sáng chế, lyoprotectant hoặc tá dược có thể là vật liệu mà vi sinh vật không tiếp xúc một cách tự nhiên, hoặc vật liệu không có trong tự nhiên đồng thời với vi sinh vật, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất sử dụng vi sinh vật chứa polypeptit sửa đổi của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của sáng chế, polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi, vector chứa polynucleotit, hoặc bất kỳ một trong số chúng, để sản xuất L-threonin hoặc các L-axit amin có nguồn gốc từ L-threonin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn 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: Điều chế thư viện vector để đưa vào sửa đổi bên trong ORF của gen *ddh*

Để khám phá ra các biến thể trong đó mức độ biểu hiện của gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum* hoặc hoạt tính của nó giảm xuống, thư viện được điều chế bằng phương pháp được thể hiện bên dưới.

Trước tiên, để đưa vào từ 0 đến 4,5 sửa đổi trên 1 kb của đoạn ADN (963 bp) chứa gen *ddh* (963 bp), bộ kit gây đột biến ngẫu nhiên genmorphII (Stratagene) được sử dụng. PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (WT) làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6. Cụ thể, dung dịch phản ứng chứa ADN nhiễm sắc thể của chủng WT (500 ng), cặp mồi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 (mỗi loại 125 ng), chất đệm phản ứng Mutazyme II (1X), hỗn hợp dNTP (40 mM), và Mutazyme II ADN polymeraza (2,5 U), trải qua các điều kiện sau: biến tính ở 94°C trong 2 phút; 25 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 3 phút; và kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Đoạn gen đã khuếch đại được liên kết với vector pCRII bằng cách sử dụng bộ kit

nhân bản TOPO TA (Invitrogen), và vector thu được được biến nạp vào trong *E. coli* DH5 α , và các thể biến nạp được cấy chuyển trên đĩa môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi lựa chọn 20 loại các khuẩn lạc đã biến nạp, plasmid được thu từ mỗi khuẩn lạc đã biến nạp. Kết quả phân tích các trình tự nucleotit, có thể thấy rằng các sửa đổi được đưa vào các vị trí khác nhau ở tần số 0,5 đột biến/kb. Cuối cùng, khoảng 10.000 khuẩn lạc *E. coli* đã biến nạp được thu gom được chiết xuất từ đó. Các khuẩn lạc được đặt tên là thư viện pTOPO-*ddh*(mt).

Ví dụ 2: Điều chế chủng xóa *ddh* và sàng lọc thư viện đột biến ngẫu nhiên

Để xác nhận ảnh hưởng của việc xóa *ddh* đối với việc sản xuất L-lysine, chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (Patent Hàn Quốc số 10-0159812) được sử dụng. Để điều chế chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (trong đó gen *ddh* bị xóa) vector pDZ- Δ *ddh* (trong đó gen *ddh* bị xóa) được điều chế như sau.

Cụ thể, vector được điều chế ở dạng sao cho các đoạn ADN (mỗi đoạn 600 bp) được đặt tại các đầu 5' và 3' của gen *ddh*, mỗi đoạn được liên kết với vector pDZ (Công bố đơn Patent Hàn Quốc số 2009-0094433). Dựa trên trình tự nucleotit của gen *ddh* được báo cáo (SEQ ID NO: 2), cặp mỗi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 (trong đó vị trí nhận dạng của enzym giới hạn *Xba*I được chèn vào tại đoạn 5' và đoạn 3', tương ứng) và cặp mỗi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 được tách từ SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 bằng 663 bp, tương ứng) được tổng hợp (Bảng 1). Đoạn gen đầu 5' được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mỗi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 9. Theo cách tương tự, đoạn gen được đặt tại đầu 3' của gen *ddh* được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mỗi SEQ ID NO: 8 và 1 SEQ ID NO: 10. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 2 phút; 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn mỗi ở 56°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; và kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Trong khi đó, vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *Xba*I và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) được liên kết với đoạn ADN chèn được khuếch đại thông qua PCR bằng cách sử dụng kit nhân dòng Infusion, và vật liệu thu được được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , và các thể biến nạp được cấy chuyển trên đĩa môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với

vector, trong đó các gen mong muốn được chèn vào thông qua PCR bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, plasmit được thu lại bằng phương pháp chiết xuất plasmit thông thường đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và plasmit thu được được đặt tên là pDZ-*Addh*.

Bảng 1

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 7	CGGGGATCCTCTAGATGACCAACATCCGCG
SEQ ID NO: 8	CAGGTCGACTCTAGATTAGACGTCGCGTGCG
SEQ ID NO: 9	CGGTGAAATCGGCGACATCAAAGACTG
SEQ ID NO: 10	GATGTCGCCGATTTCACCGCTTCCTC

Vector đã điều chế pDZ-*Addh* được biến nạp vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P bằng điện biến nạp (Van der Rest *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:541-545, 1999), và sau đó chủng trong đó gen *ddh* bị xóa được điều chế bằng tái tổ hợp nhiễm sắc thể tương đồng. Chủng đã điều chế trong đó gen *ddh* bị xóa được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* WT::*Addh*.

Ngoài ra, thư viện pTOPO-*ddh*(mt) được điều chế trong ví dụ 1 bên trên được biến nạp vào trong chủng KCCM11016P::*Addh* bằng điện biến nạp, và các thể biến nạp được cấy chuyển trên đĩa môi trường cấy chuyển phức chứa kanamycin (25 mg/L), và khoảng 20.000 khuẩn lạc thu được trên đó. Mỗi khuẩn lạc được cấy truyền vào trong môi trường chọn lọc sau đây (300 µL) và sau đó được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng sâu ở 1.000 vòng/phút ở 32°C trong khoảng 24 giờ.

Môi trường chọn lọc (độ pH 8,0)

10 g glucosza, 5,5 g amoni sulfat, 1,2 g MgSO₄·7H₂O, 0,8 g KH₂PO₄, 16,4 g K₂HPO₄, 100 µg biotin, 1 mg thiamin HCl, 2 mg canxi pantothenat, 2 mg nicotinamit (trên 1 L nước cất)

Lượng L-lysin được sản sinh dung dịch nuôi cấy được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp ninhydrin (Moore, S., Stein, W.H., phương pháp ninhydrin quang độ để sử dụng cho sắc ký của các axit amin. *J. Biol. Chem.* 1948, 176, 367-388).

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, phần nổi trên bề mặt nuôi cấy (10 µL) và dung dịch phản ứng ninhydrin (190 µL) được phản ứng ở 65°C trong 30 phút, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 570 nm bằng cách sử dụng máy quang phổ. Chủng WT và chủng

WT::*Addh* được sử dụng làm các nhóm đối chứng. Sáu mươi loại chủng đã cho thấy độ hấp thụ thấp hơn so với chủng WT (tức là, kiểu dại) trong khi lại cho thấy độ hấp thụ cao hơn so với chủng WT::*Addh*, được lựa chọn.

60 loại chủng đã lựa chọn được nuôi cấy lại theo cách tương tự như mô tả bên trên, và phản ứng ninhydrin được thực hiện lặp lại. Kết quả là, 5 loại chủng đột biến hàng đầu cho thấy khả năng tăng cường sản sinh L-lysin so với chủng KCCM11016P::*Addh* nhưng giảm khả năng sản sinh L-lysin so với chủng KCCM11016P, được lựa chọn. 5 loại chủng đã lựa chọn được đặt tên là KCCM11016P::*ddh*(mt)-1 đến KCCM11016P::*ddh*(mt)-5 (Bảng 2), tương ứng.

Bảng 2: Nồng độ L-lysin sản sinh bởi 5 loại chủng đột biến ngẫu nhiên được lựa chọn

	Chủng	Khả năng hấp thụ (572 nm)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Nhóm đối chứng	KCCM11016P	0,228	0,205	0,216	0,215
1	KCCM11016P:: <i>ddh</i> (mt)-1	0,214	0,193	0,205	0,204
2	KCCM11016P:: <i>ddh</i> (mt)-2	0,185	0,181	0,179	0,182
3	KCCM11016P:: <i>ddh</i> (mt)-3	0,164	0,163	0,145	0,157
4	KCCM11016P:: <i>ddh</i> (mt)-4	0,135	0,141	0,128	0,135
5	KCCM11016P:: <i>ddh</i> (mt)-5	0,198	0,201	0,189	0,196
Nhóm đối chứng	KCCM11016P:: <i>Addh</i>	0,106	0,112	0,098	0,105

Ví dụ 3: Xác nhận các trình tự nucleotit của 5 loại chủng sửa đổi của *ddh*

Để xác nhận các trình tự nucleotit của gen *ddh* của 5 loại chủng được lựa chọn (tức là, KCCM11016P::*ddh*(mt)-1 đến KCCM11016P::*ddh*(mt)-5), các đoạn ADN bao gồm gen *ddh* trong nhiễm sắc thể được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mồi được thể hiện trong ví dụ 1 (SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6). PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 2 phút; 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; và kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 3

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 5	ATGACCAACATCCGCGTAGC
SEQ ID NO: 6	TTAGACGTCGCGTGCGATCAG

Kết quả phân tích các trình tự nucleotit của các gen được khuếch đại, có thể thấy rằng 5 loại chủng là: 1) biến thể, trong đó sửa đổi được đưa vào trong trình tự nucleotit được đặt tại vị trí thứ 37 phía sau của codon bắt đầu ORF của gen *ddh*, và do đó, trình tự ban đầu 'AAC' được chuyển đổi thành 'GAC' (tức là, axit amin thứ 13 từ đầu N (tức là, asparagin) được thế bằng axit aspartic); ii) biến thể, trong đó ba sửa đổi được đưa vào trong trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit thứ 106 đến 108 phía sau codon bắt đầu ORF của gen *ddh*, và do đó, trình tự ban đầu 'CGC' được chuyển đổi thành 'ATG' (tức là, axit amin thứ 36 từ đầu N (tức là, arginin) được thế bằng methionin); iii) biến thể, trong đó hai sửa đổi được đưa vào trong trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit thứ 448 đến 449 phía sau của codon bắt đầu ORF của gen *ddh*, và do đó, trình tự ban đầu 'CAG' được chuyển đổi thành 'ATG' (tức là, axit amin thứ 150 từ đầu N (tức là, glutamin) được thế bằng methionin); iv) biến thể, trong đó hai sửa đổi được đưa vào trong trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit thứ 505 đến 506 phía sau của codon bắt đầu ORF của gen *ddh*, và do đó, trình tự ban đầu 'ACC' được chuyển đổi thành 'CTC' (tức là, axit amin thứ 169 từ đầu N (tức là, threonin) được thế bằng leuxin); và v) biến thể, trong đó hai sửa đổi được đưa vào trong trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit thứ 584 đến 585 phía sau của codon bắt đầu ORF của gen *ddh*, và do đó, trình tự ban đầu 'CGC' được chuyển đổi thành 'CAA' (tức là, axit amin thứ 195 từ đầu N (tức là, arginin) được thế bằng glutamin).

Ví dụ 4: Điều chế các chủng ATCC13032 trong đó 5 loại sửa đổi *ddh* được đưa vào, và đánh giá khả năng của chúng trong việc sản sinh threonin và lysin

Đối với 5 loại sửa đổi đã xác nhận trong ví dụ 3 bên trên, để cuối cùng chọn ra các chủng mà khả năng sản sinh L-lysin được giảm xuống có thể tái tạo trong khi khả năng sản sinh L-threonin tăng lên, các chủng có nguồn gốc hoang dại trong đó sửa đổi được đưa vào được điều chế.

Để điều chế các chủng trong đó gen *ddh* đã sửa đổi được đưa vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 5 loại vector, trong đó gen *ddh* đã sửa đổi có thể được đưa vào (tức là, pDZ::*ddh* m1 đến pDZ::*ddh* m5), được điều chế như sau.

Cụ thể, vector được điều chế ở dạng sao cho các đoạn ADN (mỗi đoạn 963 bp) được đặt tại các đầu 5' và 3' của gen *ddh*, mỗi đoạn liên kết với vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 2009-0094433). Dựa trên trình tự nucleotit của gen *ddh* được báo cáo (SEQ ID NO: 2), đoạn môi SEQ ID NO: 11 (trong đó vị trí nhận dạng của enzym giới hạn *Xba*I được chèn vào tại đoạn 5' và đoạn 3', tương ứng) và đoạn môi SEQ ID NO: 12 (được phân tách từ SEQ ID NO: 11 bằng 931 bp, tương ứng) được tổng hợp.

Các đoạn ADN đã sửa đổi được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P::*ddh*(mt)-1 đến KCCM11016P::*ddh*(mt)-5 đã xác nhận trong ví dụ 3 bên trên cùng với cặp môi SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 2 phút; 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn môi ở 56°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; và kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Trong khi đó, vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *Xba*I và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) được liên kết với các đoạn ADN đã sửa đổi được khuếch đại thông qua PCR bằng cách sử dụng kit nhân dòng Infusion, và mỗi vector thu được được biến nạp vào trong *E. coli* DH5α, và các thể biến nạp được cấy chuyển trên đĩa môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector, trong đó gen mong muốn được chèn vào thông qua PCR bằng cách sử dụng cặp môi SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, các plasmit được thu lại bằng phương pháp chiết xuất plasmit thông thường đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và các plasmit thu được được đặt tên là pDZ::*ddh*(mt)1 đến pDZ::*ddh*(mt)5, tương ứng.

Từng vector đã điều chế (tức là, pDZ::*ddh*(mt)1 đến pDZ::*ddh*(mt)5) được biến nạp vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng điện biến nạp, và sau đó trải qua quá trình trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó các chủng, trong mỗi phần của trình tự nucleotit của gen *ddh* được thể bằng (các) nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể, được thu lại. Sự thay thế có phù hợp hay không được xác định bằng kỹ thuật PCR khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (mutant allele specific amplification MASA) (Takeda *et al.*, *Hum. Mutation*, 2, 112-117 (1993)) bằng cách sử dụng cặp môi sau đây, trong đó cặp môi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, phù hợp với các trình tự đã sửa đổi, sự phù hợp của thay thế được xác định lần thứ nhất bằng cách lựa chọn chủng cần được khuếch đại, và các phân tích trình tự của gen *ddh* của chủng được lựa chọn được xác nhận lần

thứ hai bằng việc phân tích các trình tự đã sửa đổi bằng cách sử dụng cặp môi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 15. Các chủng đã điều chế, trong đó mỗi chủng có gen *ddh* đã sửa đổi được đưa vào, được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::*ddh*(mt)1 đến *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::*ddh*(mt)5, tương ứng.

Bảng 4

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 11	CGGGGATCCTCTAGATGACCAACATCCGCG
SEQ ID NO: 12	CAGGTCGACTCTAGATTAGACGTCGCGTGCG
SEQ ID NO: 13	CACAATTTTGGAGGATTAC
SEQ ID NO: 14	TGGGTGACCACGATCAGAT
SEQ ID NO: 15	GGAAACCACACTGTTTCC

Đối với 5 loại chủng trong đó 5 loại sửa đổi được đưa vào, để cuối cùng lựa chọn các chủng mà khả năng sản sinh L-lysin được giảm xuống có thể tái tạo trong khi khả năng sản sinh L-threonin tăng lên, nuôi cấy trong bình cầu được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường sau đây. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các nồng độ của L-lysin và threonin trong dung dịch nuôi cấy được phân tích bằng cách sử dụng HPLC, và các nồng độ của L-lysin và threonin được sản sinh trong mỗi chủng đột biến được thể hiện trong các bảng 5 và 6 bên dưới.

Môi trường nhân giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g chiết xuất nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH₂PO₄, 8 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 100 µg biotin, 1 mg thiamin HCl, 2 mg canxi pantothenat, 2 mg nicotinamit (trên 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

100 g glucoza, 40 g (NH₄)₂SO₄, 2,5 g protein đậu nành, 5 g dịch chiết ngô, 3 g ure, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 100 µg biotin, 1 mg thiamin HCl, 2 mg canxi pantothenat, 3 mg nicotinamit, 30 g CaCO₃ (trên 1 L nước cất)

Bảng 5: Các nồng độ của L-lysin được sản sinh bởi 5 loại chủng đột biến ngẫu nhiên được lựa chọn

	Chủng	L-lysin (g/L)				Tốc độ tiêu thụ glucoza (g/giờ)
		Mé 1	Mé 2	Mé 3	Trung bình	

Nhóm đối chứng	<u>ATCC13032</u>	1,25	1,20	1,19	1,21	4,33
1	<u>ATCC13032::ddh (mt)1</u>	1,20	1,15	1,19	1,18	4,30
2	<u>ATCC13032::ddh (mt)2</u>	1,05	1,10	1,02	1,06	4,21
3	<u>ATCC13032::ddh (mt)3</u>	0,85	0,88	0,90	0,88	3,79
4	<u>ATCC13032::ddh (mt)4</u>	0,75	0,79	0,76	0,77	3,71
5	<u>ATCC13032::ddh (mt)5</u>	1,11	1,08	1,13	1,11	4,12
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13032::Addh</u>	0,70	0,68	0,71	0,70	3,56

Bảng 6: Các nồng độ của L-threonin được sản sinh bởi 5 loại chủng đột biến ngẫu nhiên được lựa chọn

	Chủng	L-threonin (g/L)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13032</u>	0,35	0,37	0,36	0,36
1	<u>ATCC13032::ddh (mt)1</u>	0,38	0,37	0,35	0,37
2	<u>ATCC13032::ddh (mt)2</u>	0,39	0,39	0,37	0,38
3	<u>ATCC13032::ddh (mt)3</u>	0,40	0,39	0,41	0,40
4	<u>ATCC13032::ddh (mt)4</u>	0,42	0,43	0,42	0,42
5	<u>ATCC13032::ddh (mt)5</u>	0,37	0,38	0,37	0,37
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13032::Addh</u>	0,45	0,41	0,42	0,43

Trong số 5 loại chủng đột biến được lựa chọn, khi chủng trong đó khả năng sản sinh L-lysine được giảm xuống đáng kể trong khi khả năng sản sinh L-threonine được tăng cường, chủng ATCC13032::ddh (mt)4 được lựa chọn.

Ví dụ 5: Điều chế các chủng ATCC13869 trong đó 5 loại sửa đổi *ddh* được đưa vào, và đánh giá khả năng của chúng trong việc sản sinh threonine và lysine

Đối với 5 loại sửa đổi xác nhận trong ví dụ 3 bên trên, để cuối cùng lựa chọn các chủng mà khả năng sản sinh L-lysine được giảm xuống có thể tái tạo trong khi khả năng sản sinh L-threonine tăng lên, các chủng có nguồn gốc hoang dại trong đó sửa đổi được đưa vào được điều chế.

Để điều chế các chủng thành từng chủng trong đó gen *ddh* đã sửa đổi được đưa vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, các vector được điều chế trong ví dụ 4 (tức là, pDZ::ddh(mt)1 đến pDZ::ddh(mt)5) được biến nạp vào trong chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 bằng điện biến nạp, và các thể biến nạp trải

qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó các chủng, mỗi chủng có một phần của trình tự nucleotit của gen *ddh* được thể bằng (các) nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể, được thu lại. Sự thay thế có phù hợp hay không được xác định bằng kỹ thuật PCR khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (MASA) (Takeda *et al.*, *Hum. Mutation*, 2, 112-117 (1993)) bằng cách sử dụng cặp mồi sau đây, trong đó cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, phù hợp với các trình tự đã sửa đổi, sự phù hợp của thay thế được xác định lần thứ nhất bằng lựa chọn chủng được khuếch đại, và các phân tích trình tự của gen *ddh* của chủng được lựa chọn được xác nhận lần thứ hai bằng phân tích các trình tự đã sửa đổi bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 15. Các chủng đã điều chế, mỗi chủng có gen *ddh* đã sửa đổi được đưa vào, được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869::*ddh* (mt)1 đến *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869::*ddh* (mt)5, tương ứng.

Đối với 5 loại chủng trong đó 5 loại sửa đổi được đưa vào, để cuối cùng lựa chọn các chủng mà khả năng sản sinh L-lysine được giảm xuống có thể tái tạo trong khi khả năng sản sinh L-threonine tăng lên, nuôi cấy trong bình cầu được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường sau đây. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các nồng độ của L-lysine và threonine trong dung dịch nuôi cấy được phân tích bằng cách sử dụng HPLC, và các nồng độ của L-lysine và threonine được sản sinh trong các chủng đột biến được thể hiện trong các bảng 7 và 8 bên dưới.

Môi trường nhân giống (độ pH 7,0)

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 mg thiamin HCl, 2 mg canxi pantothenat, 2 mg nicotinamit (trên 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

100 g glucoza, 40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g protein đậu nành, 5 g dịch chiết ngô, 3 g ure, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1 mg thiamin HCl, 2 mg canxi pantothenat, 3 mg nicotinamit, 30 g CaCO_3 (trên 1 L nước cất)

Bảng 7 Các nồng độ của L-lysine được sản sinh bởi 5 loại chủng đột biến ngẫu nhiên được lựa chọn

	Chủng	L-lysine (g/L)	Tốc độ tiêu
--	-------	----------------	-------------

		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình	thụ glucoza (g/giờ)
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13869</u>	1,21	1,22	1,22	1,22	4,03
1	<u>ATCC13869::ddh (mt)1</u>	1,19	1,19	1,20	1,19	3,98
2	<u>ATCC13869::ddh (mt)2</u>	1,08	1,07	1,10	1,08	3,89
3	<u>ATCC13869::ddh (mt)3</u>	0,88	0,87	0,85	0,87	3,75
4	<u>ATCC13869::ddh (mt)4</u>	0,73	0,77	0,76	0,75	3,68
5	<u>ATCC13869::ddh (mt)5</u>	1,09	1,11	1,12	1,11	3,89
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13032::Addh</u>	0,71	0,69	0,71	0,70	3,47

Bảng 8 Các nồng độ của L-threonin được sản sinh bởi 5 loại chủng đột biến ngẫu nhiên được lựa chọn

	Chủng	L-threonin (g/L)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13869</u>	0,25	0,27	0,28	0,27
1	<u>ATCC13869::ddh (mt)1</u>	0,27	0,29	0,27	0,28
2	<u>ATCC13869::ddh (mt)2</u>	0,30	0,31	0,31	0,31
3	<u>ATCC13869::ddh (mt)3</u>	0,35	0,33	0,36	0,35
4	<u>ATCC13869::ddh (mt)4</u>	0,38	0,39	0,38	0,38
5	<u>ATCC13869::ddh (mt)5</u>	0,31	0,29	0,32	0,31
Nhóm đối chứng	<u>ATCC13869::Addh</u>	0,40	0,41	0,39	0,40

Đối với chủng ATCC13869::Addh, trong đó *ddh* bị xóa so với chủng ATCC13869 (tức là, chủng hoang dại), đã xác nhận rằng tốc độ tiêu thụ glucoza được giảm xuống đáng kể và do đó ức chế sinh trưởng của chủng. Ngược lại, đối với 5 loại chủng đã lựa chọn, đã xác nhận rằng lượng sản sinh L-lysine bị giảm xuống nhưng lượng sản sinh L-threonine tăng lên, trong khi tốc độ tiêu thụ glucoza được duy trì ở mức độ tương đương với chủng kiểu dại.

Trong số 5 loại được lựa chọn của các chủng đột biến, do chủng trong đó khả năng sản sinh L-lysine được giảm xuống đáng kể trong khi khả năng sản sinh L-threonine được tăng cường, chủng ATCC13032::ddh (mt)4 được lựa chọn như trong ví dụ 4.

Ví dụ 6: Điều chế các chủng trong đó *ddh* đã sửa đổi được đưa vào trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonine và đánh giá khả năng sản sinh L-threonine

Chủng sản sinh L-threonin được phát triển từ chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại. Cụ thể, để giải phóng ức chế phản hồi của aspartat kinaza (lysC), tác động như enzym quan trọng thứ nhất trong con đường sinh tổng hợp L-threonin, axit amin thứ 377 của lysC (tức là, leuxin) được thế bằng lysin (SEQ ID NO: 16).

Cụ thể hơn, để điều chế các chủng trong đó mỗi chủng có sửa đổi lysC (L377K) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 hoặc cặp mồi SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng. ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Kết quả là, đối với sửa đổi của gen *lysC*, đoạn ADN 515 bp trong vùng phía trước 5' và đoạn ADN 538 bp trong vùng phía sau 3' được thu lại, tương ứng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm các mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Bảng 9

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 17	TCGAGCTCGGTACCCGCTGCGCAGTGTGGAATAC
SEQ ID NO: 18	TGGAAATCTTTTCGATGTTACGTTGACAT
SEQ ID NO: 19	ATGTCAACGTGAACATCGAAAAGATTTCCTCA
SEQ ID NO: 20	CTCTAGAGGATCCCCGTTACCTCAGAGACGATT

Kết quả là, đoạn ADN 1.023 bp bao gồm sửa đổi của gen *lysC* mã hóa biến thể aspartokinaza mà axit amin thứ 377 (tức là, leuxin) được thế bằng lysin, được khuếch đại. Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, vector pDZ-L377K để đưa sửa đổi L377K vào nhiễm sắc thể được điều chế như sau: vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *SmaI* và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) và đoạn ADN chèn (được khuếch đại bằng PCR bên trên) được kết hợp theo tỉ lệ nồng độ mol (M) là 1:2, và tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit

nhân dòng Infusion (TaKaRa) theo hướng dẫn được cung cấp.

Vectơ đã điều chế được biến nạp vào trong chủng ATCC13032 bằng điện biến nạp, và chủng đã biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó, chủng trong đó mỗi nucleotit được thế bằng nucleotit sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng được đặt tên là CJP1. CJP1 được đặt tên là CA01-2307 và 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 29 tháng 3 năm 2017, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12000P.

Để giải phóng ức chế phản hồi của homoserin dehydrogenaza (hom), tác động như enzym quan trọng thứ hai trong sản xuất L-threonin, axit amin thứ 407 của hom (tức là, arginin) được thế bằng histidin (SEQ ID NO: 21).

Cụ thể hơn, để điều chế các chủng trong đó mỗi chủng có sửa đổi hom (R407H) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 hoặc cặp mồi SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, tương ứng. ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Bảng 10

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 22	TCGAGCTCGGTACCCCGGATGATGTGTACTGCG
SEQ ID NO: 23	GACCACGATCAGATGTGCATCATCATCGCGC
SEQ ID NO: 24	GATGATGATGCACATCTGATCGTGGTCACCC
SEQ ID NO: 25	CTCTAGAGGATCCCGAGTCAGCGGGAAATCCG

Kết quả là, đối với sửa đổi của gen *hom*, đoạn ADN 533 bp trong vùng phía trước 5' và đoạn ADN 512 bp trong vùng phía sau 3' được thu lại, tương ứng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm các mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 25. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Kết quả là, đoạn ADN 1.018 bp bao gồm sửa đổi của gen *hom* mã hóa biến thể aspartokinaza mà axit amin thứ 407 (tức là, arginin) được thế bằng histidin, được khuếch

đại. Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, vector pDZ-R407H để chèn sửa đổi R407H vào trong nhiễm sắc thể được điều chế như sau: vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *Sma*I và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) và đoạn ADN chèn (được khuếch đại bằng PCR bên trên) được kết hợp theo tỉ lệ nồng độ mol (M) là 1:2, và tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng Infusion (TaKaRa) theo hướng dẫn được cung cấp.

Vector đã điều chế được biến nạp vào trong chủng CJP1 bằng điện biến nạp, và chủng được biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó, chủng trong đó mỗi nucleotit được thế bằng nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng được đặt tên là CA09-0900 (Số lưu chủng KCCM12418P).

Để xác nhận rõ ràng các thay đổi trong sản sinh L-threonin và L-lysin của chủng bên trên, sửa đổi T169L thể hiện sản sinh L-threonin cao nhất và giảm cao nhất trong sản sinh L-lysin trong các ví dụ 5 và 6 đối với gen mã hóa *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza (DDH), được đưa vào trên đó. Cụ thể, để chèn sửa đổi T169L vào trong chủng CA09-0900, vector pDZ::*ddh*(mt)4 được điều chế trong ví dụ 5 được biến nạp vào trong chủng CA09-0900 bằng điện biến nạp, và chủng được biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp theo cách tương tự như trong ví dụ 4, và nhờ đó, chủng trong đó nucleotit được thế bằng nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng thu được được đặt tên là CA09-0904.

Chủng CA09-0904 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 25 tháng 4 năm 2019, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12503P.

Bảng 11: Xác nhận khả năng của các chủng đã điều chế để sản sinh L-threonin và L-lysin

Chủng	Axit amin (g/L)	
	Threonin	Lysin
CA09-0900	1,50	2,67
CA09-0904	2,35	1,58

Kết quả là, chủng được đưa vào với sửa đổi cho thấy giảm sản sinh L-lysin xuống 1,09 g/L và tăng sản sinh L-threonin lên 0,85 g/L so với chủng CA09-0900 (nhóm đối

chứng) (bảng 11). Do đó, đã xác nhận rằng hoạt tính của *Ddh* được giảm xuống đáng kể và sự suy yếu của con đường sinh tổng hợp L-lysin là tích cực cho sản sinh L-threonin.

Ví dụ 7: Điều chế các chủng khác nhau trong đó axit amin thứ 169 (tức là, asparagin) của gen *ddh* được thế bằng axit amin khác

Thông qua chủng CA09-0904 đã điều chế trong ví dụ 6, đã xác nhận rằng chủng giảm sản sinh L-lysin có hiệu quả tích cực cho sản sinh L-threonin. Nỗ lực được thực hiện để xác nhận xem bất kỳ thay thế của axit amin thứ 169 (tức là, threonin) trong gen *ddh* bằng axit amin tạo protein khác với threonin của kiểu đại có thể tăng sản sinh threonin.

Để đưa vào 19 loại sửa đổi của thay thế nucleotit không đồng nhất bao gồm sửa đổi T169L đã xác nhận trong ví dụ 6, mỗi vector tái tổ hợp được điều chế như sau.

Trước tiên, cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27), trong đó vị trí xác nhận enzym giới hạn (*Xba*I) được chèn vào trong đoạn 5' và đoạn 3', khoảng 600 bp cách khỏi phía sau và phía trước từ các vị trí nucleotit thứ 505 đến 506 của gen *ddh*, tương ứng, được tổng hợp bằng cách sử dụng ADN bộ gen được chiết xuất từ chủng WT làm mạch khuôn. Để đưa vào 19 loại sửa đổi thay thế nucleotit không đồng nhất, các đoạn mồi (SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 65) để thay thế các nucleotit thứ 505 đến 506 trong các trình tự nucleotit của gen *ddh* được tổng hợp (bảng 12).

Cụ thể, plasmit pDZ-*ddh*(T169A) được điều chế ở dạng sao cho các đoạn ADN (mỗi đoạn 600 bp) được đặt tại các đầu 5' và 3' của gen *ddh* được liên kết với vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 2009-0094433). Đoạn gen đầu 5' của gen *ddh* được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng WT làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 28. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 94°C trong 2 phút; 30 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; và kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Tương tự, đoạn gen đầu 3' của gen *ddh* được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 29. Các đoạn ADN đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (Qiagen) và được sử dụng làm các đoạn ADN chèn để điều chế các vector.

Trong khi đó, các đoạn ADN chèn được khuếch đại bằng PCR và vector pDZ, được phân cắt bằng enzym giới hạn (*Xba*I) và sau đó được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút,

được liên kết bằng cách sử dụng kit nhân dòng Infusion và sau đó được biến nạp vào trong *E. coli* DH5 α . Chúng thu được được cấy chuyển trên đĩa trên môi trường LB rắn chứa kanamycin (25 mg/L). Các khuẩn lạc đã biến nạp trong đó gen đích được chèn vào trong vector bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27 được lựa chọn, và plasmid được thu lại bằng cách sử dụng phương pháp chiết xuất plasmid thông thường đã biết và được đặt tên là pDZ-*ddh*(T169A).

Tương tự, các plasmid được điều chế như sau: pDZ-*ddh*(T169V) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 31); pDZ-*ddh*(T169Q) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 33); pDZ-*ddh*(T169H) bằng cách sử dụng cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 35); pDZ-*ddh*(T169R) bằng cách sử dụng cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 37); pDZ-*ddh*(T169P) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 39); pDZ-*ddh*(T169L) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 40 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 41); pDZ-*ddh*(T169Y) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 42 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 43); pDZ-*ddh*(T169S) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 44 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 45); pDZ-*ddh*(T169K) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 47); pDZ-*ddh*(T169M) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 48 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 49); pDZ-*ddh*(T169I) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 50 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 51); pDZ-*ddh*(T169E) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 53); pDZ-*ddh*(T169D) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 55); pDZ-*ddh*(T169G) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 57); pDZ-*ddh*(T169W) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 58 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 59); pDZ-*ddh*(T169C) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 60 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 61); pDZ-*ddh*(T169F) bằng cách sử dụng các cặp mồi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 62 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 63); và pDZ-*ddh*(T169N) bằng cách sử dụng các cặp

mỗi (SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 64 và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 65).

Bảng 12

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 26	CGGGGATCCTCTAGAATGACCAACATCCGCGTAG
SEQ ID NO: 27	CAGGTCGACTCTAGATTAGACGTCGCGTGCGATC
SEQ ID NO: 28	TCCAGTACGCTCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 29	GGATGGGAGAGCGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 30	TCCAGTACGTCCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 31	GGATGGGAGGACGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 32	TCCAGTACCAGCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 33	GGATGGGAGCTGGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 34	TCCAGTACCACCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 35	GGATGGGAGGTGGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 36	TCCAGTACCGACTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 37	GGATGGGAGTCGGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 38	TCCAGTACCCTCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 39	GGATGGGAGAGGGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 40	TCCAGTACTTACTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 41	GGATGGGAGTAAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 42	TCCAGTACTACCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 43	GGATGGGAGGTAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 44	TCCAGTACTCCCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 45	GGATGGGAGGGAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 46	TCCAGTACAAGCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 47	GGATGGGAGCTTGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 48	TCCAGTACATGCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 49	GGATGGGAGCATGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 50	TCCAGTACATCCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 51	GGATGGGAGGATGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 52	TCCAGTACGAACTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 53	GGATGGGAGTTTCGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 54	TCCAGTACGATCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 55	GGATGGGAGATCGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 56	TCCAGTACGGTCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 57	GGATGGGAGACCGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 58	TCCAGTACTGGCTCCCATCCGAAGACGCCC

SEQ ID NO: 59	GGATGGGAGCCAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 60	TCCAGTACTGCCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 61	GGATGGGAGGCAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 62	TCCAGTACTTCCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 63	GGATGGGAGGAAGTACTGGACTGCCTTTTG
SEQ ID NO: 64	TCCAGTACAACCTCCCATCCGAAGACGCCC
SEQ ID NO: 65	GGATGGGAGGTTGTACTGGACTGCCTTTTG

Mỗi vector đã điều chế được biến nạp vào trong chủng CA09-0901 bằng điện biến nạp. 19 chủng trong đó mỗi sửa đổi của thay thế nucleotit không đồng nhất được đưa vào gen *ddh* được đặt tên như sau: CA09-0900::*ddh*(T169A), CA09-0900::*ddh*(T169V), CA09-0900::*ddh*(T169Q), CA09-0900::*ddh*(T169H), CA09-0900::*ddh*(T169R), CA09-0900::*ddh*(T169P), CA09-0900::*ddh*(T169L), CA09-0900::*ddh*(T169Y), CA09-0900::*ddh*(T169S), CA09-0900::*ddh*(T169K), CA09-0900::*ddh*(T169M), CA09-0900::*ddh*(T169I), CA09-0900::*ddh*(T169E), CA09-0900::*ddh*(T169D), CA09-0900::*ddh*(T169G), CA09-0900::*ddh*(T169W), CA09-0900::*ddh*(T169C), CA09-0900::*ddh*(T169F), và CA09-0900::*ddh*(T169N).

Gen *ddh* trong chủng CA09-0900 được xóa bằng phương pháp được sử dụng trong ví dụ 2, và chủng thu được được đặt tên là CA09-0900::*Δddh*. Các chủng CA09-0900 và CA09-0900::*Δddh* được sử dụng làm các nhóm đối chứng, và 19 loại chủng đã lựa chọn được nuôi cấy bằng phương pháp được thể hiện bên dưới, và các nồng độ của lysin và threonin và tốc độ tiêu thụ glucoza của chúng được đo.

Bảng 13: Các số đo khả năng sản sinh lysin, khả năng sản sinh threonin, và các tốc độ tiêu thụ glucoza

Chủng	Nồng độ Threonin (g/L)	Nồng độ Lysin (g/L)	Tốc độ tiêu thụ glucoza (g/giờ)
CA09-0901	1,43	2,75	4,53
CA09-0900:: <i>Δddh</i>	2,67	1,38	2,41
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169A)	1,32	2,73	3,98
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169V)	1,43	2,58	3,89
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169Q)	1,38	2,62	3,91
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169H)	1,67	2,63	4,23
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169R)	1,72	2,41	2,44
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169P)	1,81	2,25	3,16

CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169L)	2,48	1,52	3,97
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169Y)	1,50	2,66	4,51
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169S)	1,62	2,33	4,28
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169K)	1,91	1,50	2,22
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169M)	1,02	1,75	2,38
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169I)	1,97	1,68	3,08
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169E)	1,54	1,66	2,59
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169D)	1,99	1,87	3,65
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169G)	1,42	2,61	4,07
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169W)	1,53	2,58	3,99
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169C)	1,91	1,74	3,78
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169F)	1,80	1,18	4,03
CA09-0900:: <i>ddh</i> (T169N)	1,44	2,77	4,35

Trong chủng mà gen *ddh* bị xóa, nồng độ threonin tăng lên 1,24 g/L và nồng độ lysin giảm xuống 1,37 g/L so với chủng bố mẹ. Xem xét rằng glucoza được giảm xuống bằng 46,1% P, trong trường hợp tại đó không có hoạt tính DDH do xóa gen *ddh*, sinh trưởng của chủng bị ức chế mặc dù sản sinh THR tăng lên và sản sinh LYS giảm xuống, do đó gây khó khăn cho sử dụng chủng trong công nghiệp. Trong trường hợp các chủng bao gồm polypeptit sửa đổi, trong đó axit amin thứ 169 SEQ ID NO: 1 được thế bằng axit amin khác, sự sản sinh LYS giảm xuống và sự sản sinh THR tăng trong khi sinh trưởng của chủng được duy trì ở mức độ có thể được áp dụng trong công nghiệp. Tức là, đã xác nhận rằng khi gen *ddh* bị suy yếu, nó giúp tăng sản sinh THR trong khi sản sinh LYS giảm xuống, và gen *ddh* bị suy yếu do sự thay đổi axit amin thứ 169 SEQ ID NO: 1 (bảng 13). Ngoài ra, đối với sửa đổi của axit amin thứ 169, sửa đổi tại đó threonin được thế bằng lysin dẫn đến tăng đáng kể trong việc giảm sản sinh lysin và tăng sản sinh THR và tốc độ tiêu thụ glucoza ở mức có thể chấp nhận về mặt thương mại, và do đó được xác định hiệu quả nhất.

Ví dụ 8: Điều chế và đánh giá các chủng trong đó *ddh* đã sửa đổi và *dapB* đã sửa đổi được đưa vào trong chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonin

Từ chủng CA09-0904 được điều chế trong ví dụ 6, đã xác nhận rằng chủng trong đó sản sinh L-lysin giảm xuống có hiệu quả tích cực về sản sinh của L-threonin. Để xác nhận xem khả năng sản sinh L-threonin có thể được tăng cường hơn nữa bằng việc suy

yếu hơn nữa con đường sinh tổng hợp L-lysin trong chủng bên trên, các chủng được phát triển.

Cụ thể, để làm suy yếu hoạt tính của enzym liên quan đến phản ứng thứ hai của con đường sinh tổng hợp L-lysin (tức là, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinat reductaza (dapB)), axit amin thứ 13 của dapB (tức là, arginin) được thế bằng asparagin (SEQ ID NO: 66).

Cụ thể hơn, để điều chế các chủng trong đó sửa đổi *dapB*(R13N) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mỗi SEQ ID NO: 67 và SEQ ID NO: 68 hoặc cặp mỗi SEQ ID NO: 69 và SEQ ID NO: 70, tương ứng. ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Kết quả là, đối với sửa đổi của gen *dapB*, đoạn ADN 512 bp trong vùng phía trước 5' và đoạn ADN 514 bp trong vùng phía sau 3' được thu lại, tương ứng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm các mạch khuôn cùng với cặp mỗi SEQ ID NO: 67 và SEQ ID NO: 70. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Kết quả là, đoạn AND 1.001 bp bao gồm sửa đổi của gen *dapB* mã hóa 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinat reductaza biến thể tại đó axit amin thứ 13 (tức là, arginin) được thế bằng asparagin, được khuếch đại. Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, vector pDZ-R13N để chèn sửa đổi R13N vào trong nhiễm sắc thể được điều chế như sau: vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *SmaI* và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) và đoạn ADN chèn (được khuếch đại bằng PCR bên trên) được kết hợp theo tỉ lệ nồng độ mol (M) là 1:2, và tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng Infusion (TaKaRa) theo hướng dẫn được cung cấp.

Vector đã điều chế được biến nạp vào trong chủng CA09-0904 bằng điện biến nạp, và chủng được biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó, chủng trong đó mỗi

nucleotit được thể bằng nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng được đặt tên là CA09-0904-R13N.

Bảng 14 Xác nhận khả năng của các chủng đã điều chế để sản sinh L-threonin và L-lysine

Chủng	Axit amin (g/L)	
	Threonin	Lysin
CA09-0900	1,52	2,70
CA09-0904	2,41	1,53
CA09-0904-R13N	3,03	1,08

Kết quả là, chủng được đưa vào với sửa đổi cho thấy giảm sản sinh L-lysine xuống 1,62 g/L và tăng sản sinh L-threonin lên 1,51 g/L so với chủng CA09-0900 (nhóm đối chứng), trong khi cho thấy giảm sản sinh L-lysine xuống 0,48 g/L và tăng sản sinh L-threonin lên 0,62 g/L so với chủng CA09-0904 (bảng 14). Do đó, đã xác nhận rằng việc suy yếu của con đường sinh tổng hợp L-lysine là tích cực cho sản sinh L-threonin.

Ví dụ 9: Điều chế và đánh giá các chủng trong đó *ddh* đã sửa đổi và *lysA* đã sửa đổi được đưa vào trong chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonin

Từ chủng CA09-0904 được điều chế trong ví dụ 6, đã xác nhận rằng chủng trong đó sản sinh L-lysine giảm xuống có hiệu quả tích cực cho sản sinh L-threonin. Để xác nhận xem khả năng sản sinh L-threonin có thể được tăng cường hơn nữa bằng việc làm suy yếu hơn nữa con đường sinh tổng hợp L-lysine trong chủng bên trên, các chủng được phát triển.

Cụ thể, để làm suy yếu hoạt tính của enzyme liên quan đến phản ứng cuối cùng của con đường sinh tổng hợp L-lysine (tức là, diaminopimelat decarboxylaza (*lysA*)), axit amin thứ 408 của *lysA* (tức là, methionine) được thể bằng alanine (*Biochemical và Biophysical Research Communications*, Tập 495, quyển 2, 8/1/2018) (SEQ ID NO: 71).

Cụ thể hơn, để điều chế các chủng trong đó sửa đổi *lysA*(M408A) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mỗi SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 73 hoặc cặp mỗi SEQ ID NO: 74 và SEQ ID NO: 75, tương ứng. ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. PCR được

thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Kết quả là, đối với sửa đổi của *lysGen*, đoạn ADN 534 bp trong vùng phía trước 5' và đoạn ADN 527 bp trong vùng phía sau 3' được thu lại, tương ứng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm các mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 75. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Bảng 15

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 72	TCGAGCTCGGTACCCGTTGGGCCTGTACTCACAG
SEQ ID NO: 73	TAGCGGGAGCTCGCGGCGTAGCAGTATGCGCC
SEQ ID NO: 74	TACTGCTACGCCGCGAGCTCCCGCTACAACGC
SEQ ID NO: 75	CTCTAGAGGATCCCGTGCAAGGTGAACCAACTG

Kết quả là, đoạn ADN 1.035 bp bao gồm sửa đổi của *lysGen* mã hóa biến thể diaminopimelat decarboxylaza tại đó axit amin thứ 408 (tức là, methionin) được thế bằng alanin, được khuếch đại. Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vectơ. Trong khi đó, vectơ pDZ-M408 để đưa sửa đổi M408A vào trong nhiễm sắc thể được điều chế như sau: vectơ pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *SmaI* và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) và đoạn ADN chèn (được khuếch đại bằng PCR bên trên) được kết hợp theo tỉ lệ nồng độ mol (M) là 1:2, và tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng Infusion (TaKaRa) theo hướng dẫn được cung cấp.

Vectơ đã điều chế được biến nạp vào trong chủng CA09-0904 bằng điện biến nạp, và chủng được biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó, chủng trong đó mỗi nucleotit được thế bằng nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng được đặt tên là CA09-0904-M408A.

Bảng 16: Xác nhận khả năng của các chủng đã điều chế để sản sinh L-threonin và L-lysin

Chủng	Axit amin (g/L)	
	Threonin	Lysin
CA09-0900	1,61	2,51
CA09-0904	2,63	1,52
CA09-0904-M408A	3,08	1,10

Kết quả là, chủng được đưa vào với sửa đổi cho thấy giảm sản sinh L-lysine xuống 1,41 g/L và tăng sản sinh L-threonine lên 1,33 g/L so với chủng CA09-0900 (nhóm đối chứng), trong khi cho thấy giảm sản sinh L-lysine xuống 0,42 g/L và tăng sản sinh L-threonine lên 0,35 g/L so với chủng CA09-0904 (bảng 16). Do đó, đã xác nhận rằng việc suy yếu của con đường sinh tổng hợp L-lysine là tích cực cho sản sinh L-threonine.

Ví dụ 10: Điều chế và đánh giá các chủng trong đó *ddh* đã sửa đổi và *dapA* đã sửa đổi được đưa vào trong chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonine

Từ chủng CA09-0904 được điều chế trong ví dụ 6, đã xác nhận rằng chủng trong đó sản sinh L-lysine giảm xuống có hiệu quả tích cực cho sản sinh L-threonine. Để xác nhận xem khả năng sản sinh L-threonine có thể được tăng cường hơn nữa bằng việc suy yếu hơn nữa con đường sinh tổng hợp L-lysine trong chủng bên trên, các chủng được phát triển.

Cụ thể, để làm suy yếu hoạt tính của enzym liên quan đến phản ứng thứ hai của con đường sinh tổng hợp L-lysine (tức là, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (*dapA*)), axit amin thứ 119 của *dapA* (tức là, tyrosine) được thế bằng phenylalanine (*Journal of Molecular biology*, Tập 338, quyển 2, 23/4/2004)) (SEQ ID NO: 76).

Cụ thể hơn, để điều chế các chủng trong đó sửa đổi *dapA*(Y119F) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 77 và SEQ ID NO: 78 hoặc cặp mồi SEQ ID NO: 79 và SEQ ID NO: 80, tương ứng. ADN polymerase độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymerase cho phản ứng PCR. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Kết quả là, đối với sửa đổi của *dapGen*, đoạn ADN 538 bp trong vùng phía trước 5' và đoạn ADN 528 bp trong vùng phía sau 3' được thu lại, tương ứng. PCR được thực

hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm các mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 77 và SEQ ID NO: 80. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút.

Bảng 17

SEQ ID NO	Trình tự (5'→3')
SEQ ID NO: 77	TCGAGCTCGGTACCCTTCATATAGTTAAGACAAC
SEQ ID NO: 78	CGGCTTGGAGAAATAAGGAGTTACAACTAAAAG
SEQ ID NO: 79	TAACTCCTTATTTCTCCAAGCCGAGCCAAGAG
SEQ ID NO: 80	CTCTAGAGGATCCCGAGCCTCAAGTTCCTGCTC

Kết quả là, đoạn ADN 1.000 bp bao gồm sửa đổi của *dapGen* mã hóa 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinat synthaza biến thể tại đó axit amin thứ 119 (tức là, tyrosin) được thế bằng phenylalanin, được khuếch đại. Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, vector pDZ-Y119F để đưa sửa đổi *dapA*(Y119F) vào trong nhiễm sắc thể được điều chế như sau: vector pDZ (được phân cắt bằng enzym giới hạn *SmaI* và sau đó trải qua xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút) và đoạn ADN chèn (được khuếch đại bằng PCR bên trên) được kết hợp ở tỷ lệ nồng độ mol là 1:2, và tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng Infusion (TaKaRa) theo hướng dẫn được cung cấp.

Vector đã điều chế được biến nạp vào trong chủng CA09-0904 bằng điện biến nạp, và chủng được biến nạp trải qua trao đổi chéo thứ cấp, và nhờ đó, chủng trong đó mỗi nucleotit được thế bằng nucleotit đã sửa đổi trên nhiễm sắc thể được thu lại. Chủng được đặt tên là CA09-0904-Y119F.

Bảng 18: Xác nhận khả năng của các chủng đã điều chế để sản sinh L-threonin và L-lysin

Chủng	Axit amin (g/L)	
	Threonin	Lysin
CA09-0900	1,48	2,68
CA09-0904	2,52	1,57
CA09-0904-Y119F	3,31	0,82

Kết quả là, chủng được đưa vào với sửa đổi cho thấy giảm sản sinh L-lysin xuống 1,86 g/L và tăng sản sinh L-threonin lên 1,83 g/L so với chủng CA09-0900 (nhóm đối chứng), trong khi cho thấy giảm sản sinh L-lysin xuống 0,75 g/L và tăng sản sinh L-threonin lên 0,79 g/L so với chủng CA09-0904 (bảng 18). Do đó, đã xác nhận rằng việc suy yếu của con đường sinh tổng hợp L-lysin là tích cực cho sản sinh L-threonin.

Các kết quả bên trên gợi ý rằng chủng bao gồm polypeptit sửa đổi của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza, trong đó axit amin thứ 169 trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 của sáng chế được thế bằng leuxin, phenylalanin, glutamat, hoặc xystein, cuối cùng có khả năng sản sinh L-threonin được tăng cường thông qua giảm lượng sản sinh L-lysin và tăng lượng sản sinh L-threonin, so với các chủng không sửa đổi.

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 kỹ thuật và phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit sửa đổi, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 của SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin, phenylalanin, glutamat, hoặc xystein, và có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 tối thiểu 90% và nhỏ hơn 100%, và có hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza,

trong đó hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của polypeptit sửa đổi yếu hơn hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza kiểu đại có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

2. Polynucleotit mã hóa polypeptit sửa đổi theo điểm 1.

3. Polynucleotit theo điểm 2, trong đó polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4.

4. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó vi sinh vật bao gồm:

polypeptit sửa đổi, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 của SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin, phenylalanin, glutamat, hoặc xystein, và có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 tối thiểu 90% và nhỏ hơn 100%, và có hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza; hoặc polynucleotit chứa polypeptit sửa đổi này,

trong đó hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza của polypeptit sửa đổi yếu hơn hoạt tính của *meso*-điaminopimelat dehydrogenaza kiểu đại có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* còn bao gồm một hoặc nhiều polypeptit sửa đổi được lựa chọn từ (1) đến (3) được thể hiện bên dưới:

(1) polypeptit sửa đổi, trong đó hoạt tính của dihydrodipicolinat reductaza (dapB) bị suy yếu;

(2) polypeptit sửa đổi, trong đó hoạt tính của điaminopimelat decarboxylaza (lysA) bị suy yếu; và

(3) polypeptit sửa đổi, trong đó hoạt tính của dihydrodipicolinat synthaza (dapA) bị suy yếu.

6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó polypeptit sửa đổi bao gồm một hoặc nhiều

polypeptit sửa đổi được lựa chọn từ (1) đến (3) được thể hiện bên dưới:

(1) polypeptit sửa đổi của dihydrodipicolinat reductaza (dapB), trong đó axit amin thứ 13 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81 là arginin (R) được thế bằng asparagin (N);

(2) polypeptit sửa đổi của diaminopimelat decarboxylaza (lysA), trong đó axit amin thứ 408 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82 là methionin (M) được thế bằng alanin (A); và

(3) polypeptit sửa đổi của dihydrodipicolinat synthaza (dapA), trong đó axit amin thứ 119 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 83 là tyrosin (T) được thế bằng phenylalanin (F).

7. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật có khả năng sản sinh L-threonin được tăng cường so với chủng không sửa đổi.

8. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum*.

9. Phương pháp sản xuất L-threonin bao gồm bước nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polypeptit sửa đổi, trong đó axit amin tương ứng với axit amin thứ 169 của SEQ ID NO: 1 được thế bằng leuxin, phenylalanin, glutamat, hoặc xystein, và có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 tối thiểu 90% và nhỏ hơn 100%, và có hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza,

trong đó hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza của polypeptit sửa đổi yếu hơn hoạt tính của *meso*-diaminopimelat dehydrogenaza kiểu dại có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó bước nuôi cấy vi sinh vật còn bao gồm bước thu hồi L-threonin từ môi trường nuôi cấy và vi sinh vật.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> POLYPEPTIT SỬA ĐỔI CỦA MESO-ĐIAMINOPIMELAT dehydrogenaza VÀ PHƯƠNG
 PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN
 <130> OPA20112
 <150> KR 10-2019-0119058
 <151> 2019-09-26
 <160> 83
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> DDH (meso-diaminopimelat dehydrogenaza)
 <400> 1
 Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly
 20 25 30
 Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp
 35 40 45
 Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu
 50 55 60
 Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala
 65 70 75 80
 Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro
 85 90 95
 Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
 100 105 110
 Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
 115 120 125
 Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
 165 170 175
 Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
 180 185 190
 His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
 195 200 205

Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
210 215 220

Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
225 230 235 240

Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
245 250 255

Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
260 265 270

Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
275 280 285

Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
290 295 300

Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
305 310 315 320

<210> 2
<211> 963
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> gen DDH (meso-diaminopimelat dehydrogenaza)

<400> 2
atgaccaaca tccgcgtagc tatcgtgggc tacggaaacc tgggacgcag cgtcgaaaag 60
cttattgcca agcagcccga catggacctt gtaggaatct tctcgcgccg ggccaccctc 120
gacacaaaga cgccagtctt tgatgtogcc gacgtggaca agcacgccga cgacgtggac 180
gtgctgttcc tgtgcatggg ctccgccacc gacatccctg agcaggcacc aaagttcgcg 240
cagttgcct gcaccgtaga cacctacgac aaccaccgcg acatcccacg ccaccgccag 300
gtcatgaacg aagccgccac cgcagccggc aacgttgac tggctctctac cggctgggat 360
ccaggaatgt tctccatcaa ccgcgtctac gcagcggcag tottagccga gcaccagcag 420
cacaccttct ggggccagc tttgtcacag ggccactccg atgctttgcg acgcatccct 480
ggcgttcaaa aggcagtcca gtacaccctc ccatccgaag acgccctgga aaaggcccgc 540
cgcggcgaag ccggcgacct taccggaaag caaacccaca agcgccaatg cttcgtggtt 600
gccgacgcgg ccgatcacga gcgcatcgaa aacgacatcc gcaccatgcc tgattacttc 660
gttggttacg aagtcgaagt caacttcata gacgaagcaa ctttcgactc cgagcacacc 720
ggcatgccac acggtggcca cgtgattacc accggcgaca ccggtggctt caaccacacc 780
gtggaatata toctcaagct ggaccgaaac ccagatttca ccgcttcctc acagatcgct 840
ttcggtcgcg cagctcaccg catgaagcag cagggccaaa gcggagcttt caccgtcctc 900
gaagttgctc catacctgct ctcccagag aacttgacg atctgatogc acgcgacgtc 960

taa

963

<210> 3
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> DDH sửa đổi (meso-điaminopimelat dehydrogenaza)

<400> 3
 Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly
 20 25 30
 Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp
 35 40 45
 Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu
 50 55 60
 Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala
 65 70 75 80
 Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro
 85 90 95
 Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
 100 105 110
 Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
 115 120 125
 Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Leu Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
 165 170 175
 Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
 180 185 190
 His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
 195 200 205
 Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
 210 215 220
 Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
 225 230 235 240
 Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
 245 250 255
 Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
 260 265 270

Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
275 280 285

Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
290 295 300

Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
305 310 315 320

<210> 4
<211> 963
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> gen của DDH sửa đổi (meso-diaminopimelat dehydrogenaza)

<400> 4
atgaccaaca tccgcgtagc tatcgtgggc tacggaaacc tgggacgcag cgtcgaaaag 60
cttattgccca agcagcccga catggacctt gtaggaatct tctcgcgccg ggccaacctc 120
gacacaaaga cgccagtctt tgatgtcgcc gacgtggaca agcagccga cgacgtggac 180
gtgctgttcc tgtgcatggg ctccgccacc gacatccctg agcaggcacc aaagttcgcg 240
cagttcgcct gcaccgtaga cacctacgac aaccaccgcg acatcccacg ccaccgccag 300
gtcatgaacg aagccgccac cgcagccggc aacgttgac tggtctctac cggctgggat 360
ccaggaatgt tctccatcaa ccgcgtctac gcagcggcag tcttagccga gcaccagcag 420
cacaccttct gggggcccagg tttgtcacag ggccactccg atgctttgcg acgcatccct 480
ggcgttcaaa aggcagtcca gtacttactc ccatccgaag acgccctgga aaaggcccgc 540
cgcggcgaag ccggcgacct taccggaaag caaacccaca agcgccaatg cttcgtggtt 600
gccgacgcgg ccgatcacga gcgcatcgaa aacgacatcc gcaccatgcc tgattacttc 660
gttggttacg aagtccaagt caacttcatc gacgaagcaa ccttcgactc cgagcacacc 720
ggcatgccac acggtggcca cgtgattacc accggcgaca ccggtggctt caaccacacc 780
gtggaataca tcctcaagct ggaccgaaac ccagatttca ccgcttcctc acagatcgct 840
ttcggtcgcg cagctcaccg catgaagcag cagggccaaa gcggagcttt caccgtcctc 900
gaagttgctc catacctgct ctcccagag aacttgagc atctgatcgc acgcgacgctc 960
taa 963

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 5
 atgaccaaca tccgcgtagc 20

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 6
 ttagacgtcg cgtgcgatca g 21

 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 7
 cggggatcct ctagatgacc aacatccgcg 30

 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 8
 caggtcgact ctagattaga cgtcgcgtgc g 31

 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 9
 cggtgaaatc ggcgacatca aagactg 27

 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 10
gatgtcgccg atttcaccgc ttcctc 26

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 11
cggggatacct ctagatgacc aacatccgcg 30

<210> 12
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 12
caggtcgact ctagattaga cgtcgcggtgc g 31

<210> 13
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 13
cacaattttg gaggattac 19

<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 14
tgggtgacca cgatcagat 19

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 15
ggaaaccaca ctgtttcc

18

<210> 16
<211> 421
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> LysC sửa đổi (aspartokinaza 3 nhạy cảm lysin)

<400> 16
Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180 185 190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195 200 205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210 215 220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225 230 235 240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Lys Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 17
 tcgagctcgg tacccgctgc gcagtgttga atac

34

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 18
 tggaaatcctt ttccgatgttc acgttgacat

30

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 19

atgtcaacgt gaacatcgaa aagattttcca

30

<210> 20

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 20

ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatt

34

<210> 21

<211> 445

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> Hom sửa đổi (homoserin dehydrogenaza)

<400> 21

Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
1 5 10 15

Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
20 25 30

Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
35 40 45

Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
50 55 60

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

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
85 90 95

Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
100 105 110

Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
115 120 125

Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
130 135 140

Ala Val Ala Gly Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
145 150 155 160

Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr

165 170 175
 Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190
 Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205
 Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
 225 230 235 240
 Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255
 Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270
 Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285
 Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300
 Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335
 Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
 355 360 365
 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
 370 375 380
 Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu
 385 390 395 400
 Glu Arg Asp Asp Asp Ala His Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu
 405 410 415
 Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val
 420 425 430
 Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
 435 440 445

<210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 22

tcgagctcgg taccocggat gatgtgtact gcg

33

<210> 23
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 23
 gaccacgatc agatgtgcat catcatcgcg c

31

<210> 24
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 gatgatgatg cacatctgat cgtgggcacc c

31

<210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 ctctagagga tccccgagtc agcgggaaat ccg

33

<210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 cggggatocct ctagaatgac caacatccgc gtag

34

<210> 27
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 27
caggtcgact ctagattaga cgtcgcgtgc gatc 34

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 28
tccagtagcg tctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 29
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 29
ggatgggaga gcgtactgga ctgccttttg 30

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 30
tccagtagct cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 31
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 31
ggatgggagg acgtactgga ctgccttttg 30

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 32
tccagtagca gctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 33
ggatgggagc tggtagtgga ctgccttttg 30

<210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 34
tccagtagca cctcccatcc gaagacgccc 30

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 35
ggatgggagg tggtagtgga ctgccttttg 30

<210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 36
tccagtagcg actcccatcc gaagacgccc 30

<210> 37
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 37
ggatgggagt cgg tactgga ctgccttttg 30

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 38
tccagtaccc tctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 39
ggatgggaga ggg tactgga ctgccttttg 30

<210> 40
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 40
tccagtactt actcccatcc gaagacgccc 30

<210> 41
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 41
ggatgggagt aagtactgga ctgccttttg 30

<210> 42
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 42
tccagtacta cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 43
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 43
ggatgggagg tagtactgga ctgccttttg 30

<210> 44
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 44
tccagtactc cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 45
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 45
ggatgggagg gagtactgga ctgccttttg 30

<210> 46
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 46
tccagtacaa gctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 47
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 47
ggatgggagc ttgtactgga ctgccttttg 30

<210> 48
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 48
tccagtacat gctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 49
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 49
ggatgggagc atgtactgga ctgccttttg 30

<210> 50
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 50
tccagtacat cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 51
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 51
ggatgggagg atgtactgga ctgccttttg 30

<210> 52
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 52
tccagtagca actcccatcc gaagacgccc 30

<210> 53
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 53
ggatgggagt tcgtactgga ctgccttttg 30

<210> 54
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 54
tccagtagca tctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 55
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 55
ggatgggaga tcgtactgga ctgccttttg 30

<210> 56
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 56
tccagtagcg tctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 57
<211> 30
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 57

ggatgggaga ccgtactgga ctgccttttg

30

<210> 58

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 58

tccagtactg gctcccatcc gaagacgccc

30

<210> 59

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 59

ggatgggagc cagtactgga ctgccttttg

30

<210> 60

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 60

tccagtactg cctcccatcc gaagacgccc

30

<210> 61

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 61

ggatgggagg cagtactgga ctgccttttg

30

<210> 62

<211> 30

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 62
tccagtactt cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 63
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 63
ggatgggagg aagtactgga ctgccttttg 30

<210> 64
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 64
tccagtacaa cctcccatcc gaagacgccc 30

<210> 65
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 65
ggatgggagg ttgtactgga ctgccttttg 30

<210> 66
<211> 248
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> DapB sửa đổi (dihydrodipicolinat reductaza)

<400> 66
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Asn Val Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala

20 25 30
 Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala
 35 40 45
 Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Leu
 50 55 60
 Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly Thr Thr Gly
 65 70 75 80
 Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Asp Trp Leu Glu Gly Lys
 85 90 95
 Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile Ser Ala Val
 100 105 110
 Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe Glu Ser Ala
 115 120 125
 Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala Pro Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala
 145 150 155 160
 Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu Glu Gly Ser
 165 170 175
 Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val Arg Met Ser
 180 185 190
 Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr
 195 200 205
 Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly
 210 215 220
 Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val
 225 230 235 240
 Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu
 245

<210> 67
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 67
 tcgagctcgg taccccgacg gggaacccaa cgg

33

<210> 68
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 68
gtttgaccaa cgttgccttt ggctccgaga ac 32

<210> 69
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 69
gagccaaagg caacgttggt caaactattg tg 32

<210> 70
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 70
ctctagagga tccccttgcg ccacgggaac cc 32

<210> 71
<211> 445
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> LysA sửa đổi (điaminopimelat decarboxylaza)

<400> 71
Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
1 5 10 15
Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
20 25 30
Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
35 40 45
Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
50 55 60
Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
65 70 75 80
Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
85 90 95
Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
100 105 110

Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala
 115 120 125
 Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
 130 135 140
 Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe
 165 170 175
 Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195 200 205
 Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210 215 220
 Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260 265 270
 Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu
 275 280 285
 Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile
 290 295 300
 Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly
 325 330 335
 Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp
 340 345 350
 Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg
 355 360 365
 Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu
 370 375 380
 Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr
 405 410 415
 Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420 425 430
 Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435 440 445

<210> 72
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 72
 tcgagctcgg taccggttg gcctgtactc acag

34

<210> 73
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 73
 tagcgggagc tcgcggcgta gcagtatgcg cc

32

<210> 74
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 74
 tactgctacg ccgcgagctc ccgctacaac gc

32

<210> 75
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 75
 ctctagagga tcccgtgcaa ggtgaaccaa ctg

33

<210> 76
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> DapA sửa đổi (dihydrodipicolinat synthaza)

<400> 76
 Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr
 1 5 10 15

Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp
 20 25 30
 Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu
 35 40 45
 Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr
 50 55 60
 Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr
 85 90 95
 Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu
 100 105 110
 Leu Val Val Thr Pro Tyr Phe Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu
 115 120 125
 Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
 130 135 140
 Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
 195 200 205
 Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
 210 215 220
 Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
 245 250 255
 Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile Asn
 260 265 270
 Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu
 275 280 285
 Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
 290 295 300

<210> 77
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 77
tcgagctcgg tacccttcat atagttaaga caac 34

<210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 78
cggcttgagg aaataaggag ttacaactaa aag 33

<210> 79
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 79
taactcctta tttctccaag ccgagccaag ag 32

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 80
ctctagagga tcccgagcct caagttcctg ctc 33

<210> 81
<211> 248
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> DapB (đihydrodipicolinat reductaza)

<400> 81
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg Val Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu Leu Val Ala
20 25 30
Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp Asn Gly Ala
35 40 45

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

<210> 82
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> LysA (điaminopimelat decarboxylaza)

<400> 82
 Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
 1 5 10 15
 Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20 25 30
 Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
 35 40 45
 Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
 50 55 60
 Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
 65 70 75 80

Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
 85 90 95
 Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
 100 105 110
 Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala
 115 120 125
 Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
 130 135 140
 Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe
 165 170 175
 Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195 200 205
 Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210 215 220
 Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260 265 270
 Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu
 275 280 285
 Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile
 290 295 300
 Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly
 325 330 335
 Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp
 340 345 350
 Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg
 355 360 365
 Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu
 370 375 380
 Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr
 405 410 415

Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420 425 430

Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435 440 445

<210> 83
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> DapA (đihydrodipicolinat synthaza)

<400> 83
 Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr
 1 5 10 15
 Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp
 20 25 30
 Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu
 35 40 45
 Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr
 50 55 60
 Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr
 85 90 95
 Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu
 100 105 110
 Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu
 115 120 125
 Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
 130 135 140
 Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
 195 200 205
 Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
 210 215 220
 Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
 245 250 255

Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile Asn
260 265 270

Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu
275 280 285

Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val
290 295 300