



(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)



1-0047975

(51)^{2021.01} C12N 9/00; C12N 15/52; C12P 21/02; (13) B
C12N 1/20; C12N 15/74

(21) 1-2022-06849

(22) 24/03/2021

(86) PCT/KR2021/003617 24/03/2021

(87) WO 2021/194243 30/09/2021

(30) 10-2020-0036456 25/03/2020 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 26/12/2022 417A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) YANG, Eun Bin (KR); HA, Cheol Woong (KR); KIM, Yeonsoo (KR); IM, Yeong Eun (KR).

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

(54) BIẾN THỂ GLUTAMAT-XYSTEIN LIGAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ, VI
SINH VẬT SẢN SINH GLUTATHION VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
GLUTATHION SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2022-06849

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể glutamat-xystein ligaza mới và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng biến thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa biến thể glutamat-xystein ligaza, vectơ chứa polynucleotit, và vi sinh vật sản sinh glutathion.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể glutamat-xystein ligaza mới và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng biến thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa biến thể glutamat-xystein ligaza, vectơ chứa polynucleotit, và vi sinh vật sản sinh glutathion.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do hợp chất lưu huỳnh hữu cơ thường có mặt trong hầu hết các tế bào, glutathion (GSH) là tripeptit bao gồm ba axit amin: glyxin, glutamat, và xystein.

Glutathion có mặt trong cơ thể sống ở dạng khử của glutathion (GSH) và ở dạng oxy hóa của glutathion (GSSG). Dạng khử của glutathion (GSH) có mặt với tỷ lệ tương đối cao trong các trường hợp bình thường, phân bố chủ yếu trong gan và các tế bào da của cơ thể con người và có vai trò quan trọng là chức năng chống oxy hóa trong việc phân hủy và loại bỏ oxy phản ứng, chức năng giải độc trong việc loại bỏ các hợp chất xenobiotic chẳng hạn như các chất độc, và chức năng làm trắng trong việc ức chế sản sinh melanin.

Do việc sản xuất glutathion giảm dần khi quá trình lão hóa tiến triển, và sự giảm sút trong sản xuất glutathion có vai trò quan trọng trong các chức năng chống oxy hóa và chức năng giải độc, thúc đẩy sự tích tụ của oxy phản ứng, là nguyên nhân chính gây già hóa, nên cần phải cung cấp glutathion từ bên ngoài (Sipes IG *et al.*, “vai trò của glutathion trong độc tính của các hợp chất xenobiotic: hoạt hóa chuyển hóa của 1,2-dibromoetan bởi glutathion”, *Adv Exp Med Biol.* 1986; 197:457–67).

Glutathion có các chức năng khác nhau như mô tả bên trên, đã thu hút sự chú ý như chất nền trong các lĩnh vực khác nhau chẳng hạn như dược phẩm, thực phẩm chức năng sức khỏe, và mỹ phẩm, và còn được sử dụng để sản xuất các thành phần hương vị và thực phẩm và phụ gia thức ăn chăn nuôi. Đã biết rằng glutathion có hiệu quả lớn trong việc làm phong phú hương vị của nguyên liệu thô và duy trì hương vị tốt và có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc theo cách kết hợp với các chất khác, như chất tăng cường

hương vị *kokumi*. Thông thường, các chất *kokumi* đã được biết đến có hương vị phong phú hơn so với các chất *umami*, chẳng hạn như các axit nucleic đã biết và mononatri glutamat (MSG), và được tạo ra bởi sự phân hủy protein trong quá trình thuần thực.

Mặc dù có nhu cầu ngày càng tăng đối với glutathion cho các lĩnh vực ứng dụng khác nhau, thị trường này vẫn chưa được kích hoạt bởi vì chi phí cao để sản xuất công nghiệp glutathion do các quy trình tổng hợp các enzym từ đó chưa được thương mại hóa vì chi phí sản xuất cao, và năng suất của các phương pháp nuôi cấy các vi sinh vật và chiết xuất glutathion từ đó là thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề còn tồn tại nêu trên, từ kết quả các nghiên cứu chuyên sâu, các tác giả sáng chế đã phát triển biến thể glutamat–xystein ligaza mới và thấy rằng sự gia tăng đáng kể trong khả năng sản sinh glutathion của các chủng có glutamat–xystein ligaza mới được đưa vào trong đó, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Sáng chế đề xuất biến thể glutamat–xystein ligaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể và vectơ chứa polynucleotit.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh glutathion bằng cách chứa ít nhất một: biến thể; polynucleotit mã hóa biến thể; và vectơ chứa polynucleotit.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất glutathion bao gồm nuôi cấy vi sinh vật.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Biến thể glutamat–xystein ligaza mới của sáng chế gia tăng đáng kể sản sinh glutathion và do đó có thể được sử dụng trong sản xuất glutathion với năng suất cao. Do các nấm men sản sinh glutathion với năng suất cao, các sản phẩm sấy khô, các chiết xuất, các dịch nuôi cấy, và dịch ly giải của chúng, và glutathion được sản xuất có các tác dụng chống oxy hóa, giải độc và tăng cường miễn dịch, chúng có thể được sử dụng hiệu quả trong các chế phẩm mỹ phẩm, các chế phẩm thực phẩm, các chế phẩm thức ăn chăn nuôi, và các chế phẩm dược phẩm và các chế phẩm của chúng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng trong phần mô tả này cho các phần mô tả và các phương án khác. Nói cách khác, tất cả các sự kết hợp của các thành phần khác nhau trong sáng chế nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các phần mô tả bên dưới.

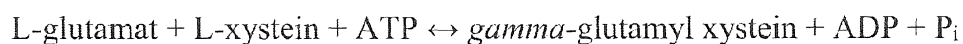
Người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ xác nhận và có thể xác định chắc chắn nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế mà không cần sử dụng nhiều thử nghiệm thông thường. Các phương án tương đương nằm trong phạm vi bảo hộ của các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể glutamat–xystein ligaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Biến thể có thể là biến thể glutamat–xystein ligaza bao gồm ít nhất một sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, trong đó sự thay thế bao gồm sự thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác.

Cụ thể, biến thể có thể là biến thể protein trong đó axit amin thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

“Glutamat–xystein ligaza (GCL)” của sáng chế là enzym còn được tham chiếu đến như “enzym liên kết glutamat–xystein” hoặc “*gamma*-glutamyl xystein synthetaza (GCS)”. Glutamat–xystein ligaza được biết là chất xúc tác cho phản ứng sau:



Ngoài ra, phản ứng được xúc tác bởi glutamat–xystein ligaza được biết đến là bước thứ nhất của tổng hợp glutathion.

Glutamat–xystein ligaza là trình tự có nguồn gốc từ nấm men, có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là trình tự axit amin được mã hóa bởi gen *gsh1* và có thể còn được tham chiếu đến như “protein GSH1” hoặc “glutamat–xystein ligaza”. Trình tự axit amin cấu thành glutamat–xystein ligaza

của sáng chế có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ví dụ, trình tự axit amin có thể có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó, và có thể bao gồm bất kỳ trình tự có cùng hoạt tính như trình tự axit amin mà không bị giới hạn.

Ngoài ra, mặc dù glutamat–xystein ligaza được xác định là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 theo sáng chế, không loại trừ đột biến có thể xuất hiện tự nhiên hoặc bằng cách bổ sung trình tự vô nghĩa ở phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc đột biến xảy ra tự nhiên hoặc đột biến cảm của nó, và hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật rằng bất kỳ protein nào có hoạt tính giống hoặc tương đương với protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 thuộc vào glutamat–xystein ligaza của sáng chế.

Ví dụ, glutamat–xystein ligaza của sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với nó. Hơn nữa, hiển nhiên rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm xóa, sửa đổi, sự thay thế, hoặc bổ sung với một hoặc một vài axit amin nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin giữ nguyên sự tương đồng hoặc đồng nhất được mô tả bên trên và hoạt tính tương đương với hoạt tính của protein.

Nói cách khác, mặc dù các khái niệm “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO định trước” và “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO định trước” được sử dụng trong sáng chế, hiển nhiên rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm xóa, sửa đổi, sự thay thế, hoặc bổ sung với một hoặc một vài axit amin cũng có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là protein có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với hoạt tính của polypeptit chứa trình tự axit amin định trước. Ví dụ, hiển nhiên rằng “polypeptit chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” thuộc vào “polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” miễn là polypeptit trước có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với hoạt tính của polypeptit sau.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” tham chiếu đến protein thu được bằng

cách thay thế bảo thủ và hoặc sửa đổi ít nhất một axit amin khác với axit amin của trình tự trong khi giữ các chức năng hoặc các đặc tính của các protein, và có thể là biến thể của glutamat-xystein ligaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng gốc axit amin khác với xystein theo các mục đích của sáng chế. Biến thể khác với trình tự được xác định bằng cách thay thế, xóa, hoặc bổ sung một vài axit amin. Các biến thể này có thể thường được xác định bằng cách sửa đổi một trong các trình tự axit amin bên trên của protein và đánh giá các đặc tính của protein đã sửa đổi. Tức là, khả năng của biến thể có thể tương lên tương đối so với protein tự nhiên. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể từ đó ít nhất một phần chẳng hạn như trình tự dẫn đầu đầu N- hoặc miền xuyên màng đã bị loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần được loại bỏ từ các đầu N- và/hoặc đầu C- của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế bằng các thuật ngữ khác chẳng hạn như sửa đổi, protein sửa đổi, polypeptit sửa đổi, đột biến, thể đột biến, và phân kỳ, và bất kỳ thuật ngữ nào được sử dụng để xác định sự biến đổi cũng có thể được sử dụng mà không giới hạn. Theo các mục đích của sáng chế, biến thể có thể tăng cường hoạt tính so với các protein không sửa đổi hoặc kiểu dại, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” tham chiếu đến sự thay thế của một axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc các tính chất hóa học tương tự. Biến thể có thể có ít nhất một thay thế bảo thủ trong khi vẫn giữ ít nhất một hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin như vậy có thể thường xuất hiện dựa trên sự giống nhau về tính phân cực, điện tích, khả năng hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc tính lưỡng tính của gốc.

Các biến thể cũng có thể bao gồm xóa hoặc thêm các axit amin mà có sự ảnh hưởng tối thiểu đến các tính chất và cấu trúc thứ cấp của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được kết hợp với trình tự (hoặc dẫn đầu) tín hiệu tại đầu N của protein mà đồng dịch mã hoặc sau dịch mã dẫn hướng dịch chuyển của protein. Polypeptit có thể được kết hợp với trình tự khác hoặc đoạn nối để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit polypeptit.

Theo sáng chế, “được thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là axit amin sau khi thay thế là khác với axit amin trước khi thay thế. Tức là, sự thay thế của xystein là axit amin thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác cũng có thể được biểu hiện là “sự thay thế của axit amin thứ

86 bằng axit amin khác với xystein”. Trong khi đó, theo sáng chế, hiển nhiên rằng cụm từ “được thay thế bằng axit amin định trước” có nghĩa là axit amin sau thay thế là khác với axit amin trước khi thay thế trừ khi cụm từ “được thay thế bằng axit amin khác” được đưa ra.

“Biến thể glutamat–xystein ligaza” của sáng chế cũng có thể tham chiếu đến như “(biến thể) polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza” hoặc “GSH1 biến thể” có thể tăng sản sinh glutathion so với protein trước khi sửa đổi, polypeptit kiểu đại, hoặc polypeptit không sửa đổi, sáng chế không giới hạn ở đó.

Trong biến thể, ít nhất một axit amin của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể được thay thế bằng axit amin khác. Cụ thể, biến thể có thể bao gồm sự thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác với xystein. Axit amin khác có thể được lựa chọn từ glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, tyrosin, asparagin, glutamat, glutamin, aspartat, lysin, arginin, và histidin.

Theo sáng chế, hiển nhiên rằng “biến thể trong đó axit amin thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác” bao gồm biến thể trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, mặc dù axit amin là ở vị trí khác với vị trí thứ 86 do xóa/thêm/chèn hoặc tương tự của axit amin tại đầu N- hoặc đầu C- hoặc ở giữa của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Hơn nữa, mặc dù biến thể, trong đó axit amin thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, được bộc lộ như ví dụ của biến thể glutamat–xystein ligaza theo sáng chế, biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế không bị giới hạn ở biến thể của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và hiển nhiên rằng biến thể trong đó “axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” được thay thế bằng axit amin khác trong bất kỳ trình tự axit amin có hoạt tính glutamat–xystein ligaza cũng nằm trong phạm vi của biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế.

Trong bất kỳ trình tự axit amin, “axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” có thể được xác định bằng các phương pháp

căn chỉnh trình tự khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất của nó trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Biến thể glutamat–xystein ligaza trong đó axit amin thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác với xystein theo sáng chế có thể bao gồm một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21. Cụ thể, biến thể về cơ bản có thể bao gồm một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21, và cụ thể hơn, có thể chỉ bao gồm một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, biến thể có thể bao gồm một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21 hoặc trình tự axit amin bao gồm axit amin thứ 86 cố định (tức là, trong trình tự axit amin của biến thể, axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21 giống với axit amin tại vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21) và có ít nhất 80% sự tương đồng hoặc đồng nhất với nó, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Cụ thể, biến thể của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21 và polypeptit có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21. Hơn nữa, hiển nhiên rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc bổ sung với một hoặc một vài axit amin tại vị trí khác với vị trí thứ 86 nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là protein giữ lại sự tương đồng hoặc đồng nhất được mô tả bên trên và hiệu quả tương đương với hiệu quả của biến thể.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “tương tự” tham chiếu đến mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin đã cho hoặc các trình tự bazo và có thể được

biểu diễn dưới dạng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của 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 dịch chuyển tiêu chuẩn được thiết lập bởi các chương trình có thể được sử dụng cùng với nó. Ngoài ra, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai hóa với nhau với ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% của toàn bộ trình tự hoặc toàn bộ chiều dài dưới các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc vừa phải. Trong các polynucleotit đã lai hóa, các polynucleotit bao gồm đơn vị mã hóa (codon) thoái biến thay vì codon cũng có thể được xem xét.

Sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất trình tự giữa hai polypeptit hoặc polynucleotit nhất định có thể được xác định bằng cách sử dụng bất kỳ thuật toán máy tính đã biết chẳng hạn như chương trình “FASTA” bằng cách sử dụng các tham số hàm phạt như được giới thiệu bởi, ví dụ, 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 gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS) (Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) có thể được sử dụng để xác định sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất trình tự (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, *J MOLEC BIOL* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994; và CARILLO *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 của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, hoặc ClustalW.

Sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc các polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP, chẳng hạn như chương trình được giới thiệu bởi Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol.* 48:443 đã được bộc lộ trong Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP xác định sự tương tự như số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau chia cho tổng số ký hiệu trong một đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có

thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745, như được đưa ra bởi Schwartz và Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, các trang từ 353 đến 358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển 0,5); và (3) không có hàm phạt cho các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng.

Hơn nữa, sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất trình tự giữa hai polynucleotit hoặc polypeptit nhất định có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự của chúng bằng các lai Nam dưới các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt đã xác định nằm trong phạm vi kỹ thuật và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (Ví dụ, J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Ấn phẩm thứ 2*, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” tham chiếu đến polyme của các nucleotit trong đó các đơn phân nucleotit được liên kết với nhau theo hình dạng chuỗi dài bằng liên kết cộng hóa trị và thường có nghĩa là sợi ADN hoặc ARN có chiều dài tối thiểu nhất định, cụ thể hơn là đoạn polynucleotit mã hóa biến thể.

Polynucleotit mã hóa biến thể protein theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trình tự nucleotit mã hóa biến thể glutamat–xystein ligaza có hoạt tính được tăng cường mà không bị giới hạn.

Gen mã hóa glutamat–xystein ligaza của sáng chế có thể là gen *gshI*. Gen có thể có nguồn gốc từ nấm men. Cụ thể, gen có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể hơn là *Saccharomyces cerevisiae*. Cụ thể, gen có thể là gen mã hóa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, cụ thể hơn là trình tự bao gồm trình tự bazơ có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm các sửa đổi khác nhau được thực hiện trong vùng mã hóa với điều kiện không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit được biểu hiện từ vùng mã hóa bởi sự thoái biến codon hoặc xem xét các codon được ưu tiên bởi các vi sinh vật sống trong đó polypeptit được biểu hiện. Cụ thể, bất kỳ trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein trong đó các axit amin tại vị trí tương ứng với vị trí thứ 86 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác có thể bao gồm trong đó mà không bị giới hạn. Ví dụ, polynucleotit của sáng chế có thể có trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế, cụ thể protein bao gồm một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21 hoặc polypeptit có sự tương đồng hoặc đồng nhất với chúng, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó. Sự tương đồng hoặc đồng nhất đã được mô tả bên trên.

Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm trình tự nucleotit được lai hóa với đầu dò được điều chế bằng các sử dụng trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự nucleotit bổ sung một phần hoặc toàn bộ với trình tự nucleotit dưới các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa biến thể protein, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, mà không bị giới hạn.

Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” tham chiếu đến các điều kiện để cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả chi tiết trong các tài liệu đã biết (ví dụ, J. Sambrook *et al.*). Ví dụ, các điều kiện có thể bao gồm thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng cao, ví dụ, sự tương đồng ít nhất 80%, cụ thể ít nhất 90%, cụ thể hơn là ít nhất 95%, cụ thể hơn nữa là ít nhất 97%, và cụ thể nhất là ít nhất 99%, mà không thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng thấp hơn sự tương đồng nêu trên, hoặc thực hiện lai hóa một lần, cụ thể hai hoặc ba lần, dưới các điều kiện rửa thông thường của phép lai Nam ở nồng độ muối và nhiệt độ là 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, cụ thể 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS. Tuy nhiên, các điều kiện nghiêm ngặt không bị giới hạn ở đó và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo các mục đích đã định.

Phép lai yêu cầu hai polynucleotit có các trình tự bổ sung, mặc dù có thể có sự không phù hợp của các bazơ theo mức độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có khả năng lai hóa với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung cho thymine, và xytosin được bổ sung

cho guanin. Do đó, sáng chế có thể bao gồm không chỉ trình tự axit nucleic về cơ bản tương tự mà còn đoạn axit nucleic đã phân lập bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai được mô tả bên trên bao gồm quy trình lai hóa ở giá trị T_m là 55°C. Hơn nữa, giá trị T_m có thể là nhưng không giới hạn ở 60°C, 63°C hoặc 65°C, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo các mục đích đã định.

Mức độ nghiêm ngặt thích hợp của phép lai của các polynucleotit có thể phụ thuộc vào các chiều dài của các polynucleotit, và mức độ bổ sung và các tham số của chúng đã được biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể protein.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” tham chiếu đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự bazơ của polynucleotit mã hóa protein đích, được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp để biểu hiện protein đích trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm promoter (vùng gen khởi động) cho phép bắt đầu phiên mã, trình tự điều hòa để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector được đưa vào trong tế bào chủ thích hợp, có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chúng.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Do vector được biểu hiện bởi nấm men, cả các plasmid nấm men tích hợp (YIp) và các vector plasmid ngoài nhiễm sắc thể có thể được sử dụng. Vector plasmid ngoài nhiễm sắc thể có thể bao gồm các plasmid nấm men thể kết hợp (episomal) (YEp), các plasmid nấm men sao chép (YRp), và các plasmid đoạn trung tâm nấm men (YCp). Hơn nữa, các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YACs) còn có thể được sử dụng làm vector của sáng chế. Trong ví dụ cụ thể, các vector có sẵn có thể bao gồm pESCHIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAPα A, pGAPα B, pGAPα C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6α A, pPIC6α B, pPIC6α C, pPIC9K, pYC2/CT, vector hiển thị nấm men pYD1, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A,

pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, dạng A micrômet nấm men, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405, và pYJ406, sáng chế không giới hạn ở đó.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit đột biến bằng cách sử dụng vectơ để chèn nhiễm sắc thể vào trong các tế bào. Việc chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, sáng chế không giới hạn ở đó. Chỉ dấu chọn lọc có thể có để xác nhận chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc được sử dụng để lựa chọn các tế bào được biến nạp với vectơ, tức là, để xác nhận việc chèn của polynucleotit mong muốn, và các ví dụ của chỉ dấu chọn lọc có thể bao gồm các chỉ dấu cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc, chẳng hạn như kháng thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, kháng các chất gây độc tế bào, hoặc biểu hiện bề mặt của biến thể polypeptit. Trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các kiểu hình khác nhau, sao cho các tế bào đã biến nạp có thể được lựa chọn.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” tham chiếu đến quá trình để đưa vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể glutamat-xystein ligaza vào trong tế bào chủ theo cách để protein được mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào chủ. Polynucleotit đã biến nạp có thể ở dạng chèn vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc ở dạng nằm bên ngoài nhiễm sắc thể miễn là protein được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa biến thể glutamat-xystein ligaza. Polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ ở dạng bất kỳ miễn là polynucleotit được đưa vào trong tế bào chủ và protein được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ ở dạng catxet biểu hiện là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho quá trình tự sao chép. Catxet biểu hiện có thể thường bao gồm promoter liên kết chức năng với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế

bào chủ ở dạng gốc của nó và liên kết chức năng với trình tự được yêu cầu để biểu hiện trong tế bào chủ, sáng chế không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết chức năng” có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế và trình tự promotơ khởi đầu và làm trung gian phiên mã của trình tự polynucleotit. Các phương pháp để phiên mã theo sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp cho phép đưa vectơ vào trong tế bào chủ, và có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật được lựa chọn theo tế bào chủ. Ví dụ, điện biến nạp, chất kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), chất kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp dextran DEAE, phương pháp cation liposom, và phương pháp liti axetat–DMSO có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Sáng chế có thể đề xuất vi sinh vật sản sinh glutathion bằng cách chứa ít nhất một: biến thể; polynucleotit mã hóa biến thể; và vectơ chứa polynucleotit.

Vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể hoặc vi sinh vật có biến thể được đưa vào.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật bao gồm biến thể”, “vi sinh vật được đưa biến thể vào trong đó”, hoặc “vi sinh vật biểu hiện biến thể” có thể đề cập đến vi sinh vật được điều chế bằng cách tăng cường khả năng sản sinh glutathion cho vi sinh vật tự nhiên có khả năng sản sinh glutathion thấp hoặc bằng cách tạo ra khả năng sản sinh glutathion cho chủng bố mẹ không có khả năng để sản sinh glutathion. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể glutamat–xystein ligaza bao gồm ít nhất một đột biến axit amin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và đột biến axit amin có thể bao gồm sự thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N bằng axit amin khác. Ngoài ra, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể glutamat–xystein ligaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Glutamat–xystein ligaza và các biến thể của nó đã được mô tả bên trên.

Như sử dụng ở đây, protein “cần biểu hiện/đang được biểu hiện” có nghĩa là trạng thái trong đó protein đích được đưa vào trong hoặc được biểu hiện trong vi sinh vật.

Trong trường hợp khi protein có mặt trong vi sinh vật, hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính của protein nội sinh của nó hoặc hoạt tính của protein trước khi sửa đổi. Theo mục đích của sáng chế, “protein đích” có thể là biến thể glutamat-xystein ligaza được mô tả bên trên.

Cụ thể, thuật ngữ “đưa protein” tham chiếu đến việc cung cấp hoạt tính của protein cụ thể cho vi sinh vật không có protein hoặc tăng cường hoạt tính của protein so với hoạt tính nội tại của protein hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa protein có thể đề cập đến việc đưa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào trong nhiễm sắc thể hoặc đưa đoạn hoặc vector chứa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào trong vi sinh vật, nhờ đó biểu hiện hoạt tính của protein. Ngoài ra, “tăng cường hoạt tính” có thể có nghĩa hoạt tính của protein cụ thể của vi sinh vật được tăng cường khi so với hoạt tính nội tại hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Thuật ngữ “hoạt tính nội tại” tham chiếu đến hoạt tính protein cụ thể được sở hữu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp khi vi sinh vật được biến nạp bởi biến dị di truyền tự nhiên hoặc nhân tạo.

Cụ thể, tăng cường hoạt tính theo sáng chế có thể được thực hiện bằng ít nhất một trong các phương pháp bao gồm tăng số lượng bản sao của gen mã hóa biến thể protein, đưa đột biến vào trong trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein, thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn, thay thế gen nhiễm sắc thể mã hóa protein kiểu dại bằng gen mã hóa biến thể protein, đưa bổ sung đột biến vào trong gen mã hóa biến thể protein để tăng hoạt tính của biến thể protein, và đưa biến thể protein vào trong vi sinh vật, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Mặc dù không có giới hạn cụ thể, tăng số lượng bản sao của gen được thực hiện ở dạng liên kết chức năng với vector hoặc ở dạng tích hợp vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Cụ thể, phương pháp này có thể được thực hiện bằng đưa vào trong tế bào chủ vector để sao chép và hoạt động bất kể vật chủ và được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa protein của sáng chế. Ngoài ra, số lượng bản sao của gen có thể được tăng lên bằng cách đưa vector vào trong tế bào chủ để chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ và được liên kết chức năng với polynucleotit. Việc chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng.

Tiếp theo, sửa đổi của trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bằng tạo ra biến thể trong trình tự axit nucleotit bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm promotor, trình tự điều hòa, mã hóa trình tự vị trí liên kết ribosom, và trình tự để điều hòa phiên mã và dịch mã, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Promotor mạnh hơn promotor nội tại có thể được liên kết phía trước của đơn vị biểu hiện polynucleotit, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó. Ví dụ, khi tế bào chủ là nấm men, promotor sẵn có có thể bao gồm promotor TEF1, promotor TEF2, promotor GAL10, promotor GAL1, promotor ADH1, promotor ADH2, promotor PHO5, promotor GAL1-10, promotor TDH3 (promotor GPD), promotor TDH2, promotor TDH1, promotor PGK1, promotor PYK2, promotor ENO1, promotor ENO2, và promotor TPI1, sáng chế không giới hạn ở đó. Ngoài ra, sửa đổi của trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể đã mô tả có thể được thực hiện bằng tạo ra biến thể trong trình tự điều hòa biểu hiện bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit đã biến đổi để có hoạt tính mạnh hơn, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Thông thường, tạo ra và tăng cường của hoạt tính protein có thể tăng hoạt tính hoặc nồng độ của protein tương ứng bằng 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, hoặc 500%, đến tối đa 1000% hoặc 2000%, từ hoạt tính hoặc nồng độ của chúng vi sinh vật kiểu đại hoặc không biến đổi, sáng chế không giới hạn ở đó.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật không biến đổi” không loại trừ các chủng có đột biến mà có thể xuất hiện tự nhiên trong các vi sinh vật và có thể là chủng kiểu đại, vi sinh vật không chứa biến thể protein, hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa biến thể protein.

Theo sáng chế, vi sinh vật bao gồm biến thể glutamat-xystein ligaza hoặc polynucleotit mã hóa biến thể có thể là, ví dụ, vi sinh vật tái tổ hợp được điều chế bằng cách biến nạp vi sinh vật với vectơ chứa polynucleotit, nhưng sáng chế không giới hạn

ở đó. Vi sinh vật tái tổ hợp có thể là nấm men, ví dụ, vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể *Saccharomyces cerevisiae*. Ví dụ, vi sinh vật có thể là chủng *Saccharomyces cerevisiae* với số lưu chủng KCCM12659P, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “glutathion” có thể được sử dụng thay thế với “GSH” và tham chiếu đến hợp chất tripeptit bao gồm ba axit amin: glutamat, xystein, và glyxin. Glutathion có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô trong các dược phẩm, các thực phẩm chức năng sức khỏe, các thành phần hương vị, các phụ gia thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, các mỹ phẩm, và tương tự, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh glutathion” bao gồm các vi sinh vật được biến đổi bằng cách biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo và có thể đề cập đến vi sinh vật có cơ chế cụ thể được suy yếu hoặc được tăng cường thông qua việc đưa gen ngoại sinh hoặc tăng cường hoặc bất hoạt của gen nội sinh bằng cách biến đổi gen để sản sinh glutathion. Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh glutathion có thể đề cập đến vi sinh vật chứa glutamat-xystein ligaza và có khả năng sản sinh lượng lớn glutathion đích so với các vi sinh vật kiểu dại hoặc không biến đổi. “Vi sinh vật sản sinh glutathion” có thể được sử dụng thay thế với “vi sinh vật sản xuất glutathion”, “vi sinh vật có khả năng sản sinh glutathion”, “chủng sản sinh glutathion”, “chủng có khả năng sản sinh glutathion”, hoặc tương tự.

Vi sinh vật sản sinh glutathion có thể là vi sinh vật tái tổ hợp. Vi sinh vật tái tổ hợp đã được mô tả bên trên.

Loại vi sinh vật sản sinh glutathion không bị giới hạn cụ thể miễn là glutathion được sản sinh từ nó, nhưng có thể là vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể *Saccharomyces cerevisiae*, sáng chế không giới hạn ở đó.

Chủng bố mẹ của vi sinh vật sản sinh glutathion bao gồm biến thể không bị giới hạn cụ thể miễn là chủng có khả năng sản sinh glutathion. Vi sinh vật có thể bao gồm sửa đổi để tăng cường con đường sinh tổng hợp để tăng khả năng sản xuất glutathion, giải phóng ức chế phản hồi, và bất hoạt của các gen làm suy yếu con đường thoái biến hoặc con đường sinh tổng hợp, và sửa đổi như vậy không loại trừ biến đổi xuất hiện tự nhiên. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất glutathion bao gồm nuôi cấy vi sinh vật. Vi sinh vật và glutathion được mô tả bên trên. Glutathion có thể

được tích lũy trong chủng bằng cách nuôi cấy các chủng.

Đối với môi trường nuôi cấy hoặc các điều kiện nuôi cấy khác để nuôi cấy chủng của sáng chế, bất kỳ môi trường nuôi cấy thường sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* có thể được sử dụng mà không bị giới hạn. Cụ thể, chủng của sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường ban đầu chứa các nguồn cacbon, các nguồn nitơ, các nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, các axit amin, và/hoặc các vitamin thích hợp dưới các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, và tương tự.

Theo sáng chế, làm các nguồn cacbon, các carbohydrat chẳng hạn như glucoza, fructoza, sucroza, và maltoza; các rượu đường chẳng hạn như mannitol và sorbitol; các axit hữu cơ chẳng hạn như axit pyruvic, axit lactic, và axit xitric; và các axit amin chẳng hạn như glutamat, methionin, và lysin có thể được sử dụng, sáng chế không giới hạn ở đó. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên chẳng hạn như các dịch thủy phân tinh bột, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, bã mía, và dịch chiết ngô có thể được sử dụng, và các carbohydrat chẳng hạn như glucoza và mật đường xử lý vô trùng (tức là, mật đường chuyển hóa thành đường khử) có thể được sử dụng, và các lượng phù hợp của bất kỳ các nguồn cacbon khác cũng có thể được sử dụng mà không bị giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp của ít nhất hai nguồn.

Đối với các nguồn nitơ, các nguồn nitơ vô cơ chẳng hạn như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat; và các nguồn nitơ hữu cơ chẳng hạn như các axit amin, pepton, NZ-amin, chiết xuất thịt, chiết xuất nấm men, chiết xuất mạch nha, dịch chiết ngô, dịch thủy phân casein, cá hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, và bánh đậu nành khử chất béo hoặc sản phẩm phân hủy của nó có thể được sử dụng. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp của ít nhất hai nguồn.

Đối với các nguồn phospho, monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng của nó có thể được sử dụng. Đối với các hợp chất vô cơ, natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, và tương tự có thể được sử dụng.

Dung dịch nuôi cấy có thể còn bao gồm các axit amin, các vitamin, và/hoặc các

tiền chất thích hợp. Cụ thể, các L-axit amin hoặc tương tự có thể được bổ sung cho dung dịch nuôi cấy cho chủng. Cụ thể, glyxin, glutamat, và/hoặc xystein có thể được bổ sung cho dung dịch nuôi cấy, và các L-axit amin chẳng hạn như lysin có thể còn được bổ sung vào đó, nếu yêu cầu, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Dung dịch nuôi cấy và các tiền chất có thể được bổ sung cho dịch nuôi cấy trong quy trình theo mẻ hoặc liên tục, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trong quá trình nuôi cấy chủng, các hợp chất chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric có thể được bổ sung phù hợp vào dịch nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của dịch nuôi cấy. Ngoài ra, chất khử bọt chẳng hạn như este polyglycol axit béo có thể được bổ sung để ức chế sự hình thành bọt trong quá trình nuôi cấy. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào trong dịch nuôi cấy để duy trì dịch nuôi cấy ở điều kiện hiếu khí, và nitơ, hydro, hoặc các khí carbon đioxit có thể được bơm vào dịch nuôi cấy để duy trì các điều kiện vi hiếu khí và kỵ khí mà không bơm bất kỳ khí nào khác vào đó.

Nhiệt độ của dịch nuôi cấy có thể được duy trì ở 25°C đến 40°C, cụ thể hơn là ở 28°C đến 37°C, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó. Việc nuôi cấy có thể liên tục cho đến khi thu được lượng mong muốn của chất quan tâm, cụ thể trong 1 giờ 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Phương pháp sản xuất glutathion có thể còn bao gồm quy trình bổ sung sau bước nuôi cấy. Quy trình bổ sung có thể được lựa chọn thích hợp theo mục đích sử dụng của glutathion.

Cụ thể, phương pháp sản xuất glutathion có thể bao gồm thu hồi glutathion từ ít nhất một lựa chọn từ chủng, sản phẩm sấy khô, chiết xuất, sản phẩm nuôi cấy, và dịch ly giải của chúng sau khi nuôi cấy vi sinh vật.

Phương pháp có thể còn bao gồm ly giải chủng trước hoặc đồng thời với bước thu hồi. Quá trình ly giải chủng có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến, ví dụ, bằng xử lý nhiệt hoặc bằng cách sử dụng các dung dịch đệm để ly giải, máy phá sóng siêu âm, và ép kiểu Pháp. Ngoài ra, bước ly giải có thể bao gồm phản ứng enzym bằng enzym phân hủy thành tế bào, nucleaza, transnucleotidaza, proteaza, hoặc tương tự, sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo các mục đích của sáng chế, nấm men sấy khô, chiết xuất nấm men, bột hỗn hợp chiết xuất nấm men, và glutathion tinh khiết, mỗi sản phẩm có hàm lượng glutathion cao có thể được điều chế bằng phương pháp sản xuất glutathion. Tuy nhiên, sáng chế không giới hạn ở đó, và các sản phẩm này có thể được điều chế thích hợp theo các sản phẩm mong muốn.

Theo sáng chế, nấm men sấy khô có thể được sử dụng thay thế cho “sản phẩm sấy khô của chúng”. Nấm men sấy khô có thể được điều chế bằng cách sấy khô chủng nấm men trong đó glutathion được tích lũy, và cụ thể, có thể có trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thực phẩm, và tương tự, sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, chiết xuất nấm men có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như “chiết xuất của chúng”. Chiết xuất của chúng có thể tham chiếu đến các chất còn lại sau khi phân tách các thành tế bào khỏi các chủng. Cụ thể, chiết xuất chủng có thể đề cập đến các thành phần còn lại ngoại trừ các thành tế bào, trong số các thành phần thu được bằng cách ly giải các tế bào. Chiết xuất của chúng bao gồm glutathion và một hoặc nhiều các thành phần khác được lựa chọn từ các protein, các carbohydrat, các axit nucleic, và các sợi ngoài glutathion, sáng chế không giới hạn ở đó.

Bước thu hồi có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và glutathion là chất đích có thể được thu hồi.

Bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh sạch. Quá trình tinh sạch có thể được thực hiện bằng chỉ phân lập glutathion khỏi chủng. Thông qua quá trình tinh sạch, glutathion tinh khiết có thể được điều chế.

Nếu yêu cầu, phương pháp điều chế glutathion có thể còn bao gồm trộn tá được với một trong các lựa chọn từ chủng, sản phẩm sấy khô, chiết xuất, dịch nuôi cấy, và chất ly giải của chúng, và glutathion được thu hồi từ đó. Bằng bước trộn, bột hỗn hợp chiết xuất nấm men có thể được điều chế.

Tá được có thể được lựa chọn và sử dụng phù hợp theo hình thức hoặc mục đích sử dụng và có thể là, ví dụ, được lựa chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, glycogen, D-mannitol, sorbitol, lactitol, maltodextrin, canxi cacbonat, nhôm silic tổng hợp, canxi monohydro phosphat, canxi sulfat, natri clorua, natri hydro cacbonat, lanolin đã tinh sạch, dextrin, natri alginat, methyl xenluloza, keo silic colloidal, hydroxypropyl tinh bột, hydroxypropylmetyl xenluloza, propylen glycol, casein, canxi lactat, primojel,

và gồm Arabia, và cụ thể, ít có thể bao gồm ít nhất một thành phần được lựa chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, đextrin, glycogen, D-mannitol, và maltodextrin, sáng chế không giới hạn ở đó.

Tá được có thể bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất giữ ẩm, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định hoặc chất đẳng trương, sáng chế không giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sử dụng biến thể glutamat-xystein ligaza để sản xuất glutathion. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất sử dụng vi sinh vật để sản xuất glutathion. Biến thể glutamat-xystein ligaza, vi sinh vật, và glutathion đã được mô tả bên trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ này được đưa ra để minh họa cụ thể cho sáng chế, và phạm vi của sáng chế không giới hạn ở các phương án ví dụ này.

Ví dụ 1: Lựa chọn chủng sản sinh glutathion và xác nhận khả năng sản sinh glutathion

Các chủng thu được từ các khối nấm men chứa các chủng khác nhau, và các đặc tính của chúng được cải thiện để lựa chọn ra các chủng có khả năng sản sinh glutathion.

Cụ thể, các mẫu ngũ cốc chẳng hạn như gạo, lúa mạch, đậu xanh và yến mạch được thu thập từ 20 khu vực, chẳng hạn như, Hwasong, Pyeongtaek, Yongin, và tương tự của Gyeonggi-do, Republic of Korea, được nghiền thành bột, nhào, bọc trong một tấm vải, ép chặt để tạo hình, bọc rom để ủ men trong 10 ngày, sấy khô từ từ để điều chế các khối nấm men.

Các thử nghiệm sau đây được thực hiện để phân lập các chủng từ các khối nấm men đã điều chế. 45 mL dung dịch nước muối được thêm vào 5 g các khối nấm men và được nghiền thành bột bằng cách sử dụng máy trộn. Đối với các chủng nấm men đã phân lập sạch, chất thu được được pha loãng bằng kỹ thuật pha loãng dần dần, cấy trải trên thạch YPD (10 g/L chiết xuất nấm men, 20 g/L bacto pepton, và 20 g/L glucoza trên 1 L nước cất), và được nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, dựa trên hình thái của các khuẩn lạc và xác minh bằng kính hiển vi, các khuẩn lạc của nấm men được đánh dấu thành vết trên thạch YPD. 25 mL canh trường YPD được cấy giống trong bình cầu

250 mL, và chủng đã phân lập sạch được cấy chuyển trên đó và được nuôi cấy trong tủ ủ lắc trong 48 giờ ở 30°C và 200 vòng/phút. Các chủng đã được sàng lọc bằng cách xác định sản sinh glutathion.

Để cải thiện các chủng đã phân lập sơ cấp, đột biến ngẫu nhiên được tạo ra trong các chủng đã phân lập. Cụ thể, chủng được xác nhận có khả năng sản sinh glutathion được phân lập từ các khối nấm men và được đặt tên là chủng CJ-37. Chủng CJ-37 được nuôi cấy môi trường rắn và được cấy chuyển vào trong canh trường để thu được dung dịch nuôi cấy của nó, và dung dịch nuôi cấy được tiếp xúc với ánh sáng UV bằng cách sử dụng đèn UV. Sau khi dung dịch nuôi cấy tiếp xúc với các tia UV được cấy trải trên môi trường đĩa, chỉ chủng đột biến có tạo thành các khuẩn lạc được phân lập, và xác định sự sản sinh glutathion của nó.

Kết quả là, trong số các chủng đột biến, chủng biểu hiện sản sinh glutathion nhiều nhất được lựa chọn làm chủng sản sinh glutathion, được đặt tên là chủng CJ-5, được nộp lưu chủng quốc tế ở Trung tâm bảo thủ Vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), cơ quan lưu chủng theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 31/07/2019, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12568P.

Ví dụ 2: Thử nghiệm để cải thiện hơn nữa khả năng sản sinh glutathion

Đột biến được tạo ra theo cách sau đây để cải thiện hơn nữa khả năng sản sinh glutathion của chủng CJ-5.

Chủng CJ-5 được nuôi cấy trong môi trường rắn và được cấy chuyển vào trong canh trường để thu được dung dịch nuôi cấy, và dung dịch nuôi cấy được tiếp xúc với ánh sáng UV bằng cách sử dụng đèn UV. Sau khi dung dịch nuôi cấy tiếp xúc với ánh sáng UV được cấy trải trên môi trường đĩa, chỉ chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc được phân lập. Chủng biểu hiện sản sinh glutathion nhiều nhất được phân lập, được đặt tên là chủng CC02-2490, được nộp lưu chủng quốc tế ở Trung tâm bảo thủ Vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), cơ quan lưu chủng theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 17/01/2020, và được xác nhận số lưu chủng KCCM12659P. Kết quả phân tích trình tự bazơ của *gshI*, là gen sinh tổng hợp glutathion, liên quan đến tăng cường khả năng sản sinh glutathion của chủng, xác nhận rằng xystein, là axit amin thứ 86 của protein GSH1 được mã hóa bởi gen *gshI*, đã được thay thế bằng arginin.

Ví dụ 3: Thử nghiệm đột biến của gốc GSH1 C86

Xem xét axit amin tại vị trí thứ 86 của protein GSH1 là quan trọng trong sản xuất glutathion dựa trên các kết quả của Ví dụ 2, các chủng đột biến của *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CEN.PK2-1D và *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CJ-5 được điều chế sao cho các biến thể protein được biểu hiện trong đó xystein tại vị trí thứ 86 của protein GSH1 được thay thế bằng axit amin khác, và tăng sản sinh glutathion được xác minh.

Để điều chế các chủng trong đó xystein tại vị trí thứ 86 của protein GSH1 của *Saccharomyces cerevisiae* được thay thế bằng arginin, các plasmit pWAL100 và pWBR100 được sử dụng có tham chiếu đến luận án của Lee TH *et al.* (*J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16(6), 979–982). Cụ thể, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn như sau. Một phần trình tự của đầu N- của protein GSH1 bao gồm trình tự bên BamHI đầu N-, codon khởi đầu GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến C86R thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, và một phần trình tự của đầu C- của protein GSH1 bao gồm trình tự bên XhoI đầu C-, condon kết thúc GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến C86R thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25. Sau đó, kết quả của việc thực hiện PCR chồng lắp sử dụng hai trình tự làm các mạch khuôn với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 25, đoạn GSH1 ORF bao gồm trình tự mã hóa protein sửa đổi GSH1 thu được trong đó xystein tại vị trí thứ 86 được thay thế bằng arginin và các trình tự enzym giới hạn BamHI đầu N- và XhoI đầu C-. Đoạn ORF được xử lý với BamHI và XhoI và sau đó được nhân dòng vào vector pWAL100 được xử lý với cùng các enzym để điều chế vector pWAL100-GSH1(C86R).

Ngoài ra, 500 bp phía sau từ codon kết thúc GSH1 ORF bao gồm các trình tự enzym giới hạn SpeI đầu N- và NcoI đầu C- thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27 và được xử lý với các enzym giới hạn SpeI và NcoI. Sau đó, sản phẩm thu được được nhân dòng vào trong pWBR100 được xử lý với cùng các enzym để điều chế vector pWBR100-GSH1.

Để điều chế đoạn ADN cuối cùng cần đưa vào trong nấm men, các sản phẩm PCR

bao gồm trình tự mã hóa arginin đột biến và một phần của KIURA3 thu được bằng cách sử dụng vector pWAL100-GSH1(C86R) được điều chế như mô tả bên trên làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 28, và các sản phẩm PCR bao gồm một phần của KIURA3 và 500 bp phía sau từ codon kết thúc GSH1 thu được bằng cách sử dụng vector pWBR100-GSH1 làm mạch khuôn và cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 27. *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CJ-5 được biến nạp với các sản phẩm PCR theo cùng tỷ lệ mol. PCR được thực hiện thông qua biến tính ở 95°C trong 5 phút, ủ để gắn mồi ở 53°C trong 1 phút, và trùng hợp trong 1 phút trên mỗi kb ở 72°C, và biến nạp của nấm men được thực hiện theo phương pháp liti axetat được sửa đổi từ phương pháp đã bộc lộ trong luận án của Geitz (*Nucleic Acid Research*, 20(6), 1425). Cụ thể, các tế bào nấm men có OD là 0,7 đến 1,2 được rửa hai lần bằng dung dịch đệm liti axetat/TE và được trộn với các sản phẩm PCR và AND sợi đơn (Sigma D-7656). Các tế bào được nuôi cấy dưới điều kiện nuôi cấy tĩnh trong dung dịch đệm liti axetat/TE/40% PEG ở 30°C trong 30 phút và ở 42°C trong 15 phút. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong đĩa thạch SC (2% glucoza) không chứa uracil cho đến khi quan sát thấy các khuẩn lạc để thu được chủng trong đó trình tự mã hóa đột biến GSH1 C86R và gen KIURA3 được đưa vào. Tiếp theo, để loại bỏ KIURA3, các chủng được nuôi cấy qua đêm trong 2 mL YPD, pha loãng ở tỷ lệ 1/100, cấy trải trên đĩa thạch SC (2% glucoza) chứa 0,1% 5-FOA để điều chế chủng đột biến *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D GSH1 C86R và chủng đột biến *S. cerevisiae* CJ-5 GSH1 C86R từ đó chỉ dấu uracil đã được loại bỏ. Các chủng có khả năng biểu hiện các protein sửa đổi GSH1 trong đó xystein được thay thế bằng 18 loại axit amin khác với arginin cũng được điều chế theo cách tương tự, ngoại trừ cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 được sử dụng trong đó trình tự mã hóa arginin thứ 86 được thay thế bằng trình tự mã hóa axit amin khác.

Bảng 1

Đoạn mồi	Trình tự 5'→3'
F_BamHI_GSH1 (SEQ ID NO: 22)	GGTAGGATCCATGGGACTCTTAGCTTTGGGCAC
R_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 23)	TTAGCCTCCCTAAGGGACGAATCCT
F_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 24)	CGTCCCTTAGGGAGGCTAACGATGT

R_XhoI_GSH1 (SEQ ID NO: 25)	ATGACTCGAGTTAACATTTGCTTTCTATTGAAGGC
F_SpeI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 26)	TAGAACTAGTACTCCTTTTATTTTCGGTTGTGAA
R_NcoI_GSH1_D W (SEQ ID NO: 27)	GCTGCCATGGGAATAGTGTGAACCGATAACTGTGT
R_AL killer (SEQ ID NO: 28)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR killer (SEQ ID NO: 29)	CTTGACGTTTCGTTTCGACTGATGAG

Sau khi nuôi cấy các chủng được điều chế như mô tả bên trên trong 26 giờ, các nồng độ glutathion đã sản xuất (GSH) được đo và liệt kê trong các bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2

<i>S.cerevisiae</i> CEN.PK2-1D		
Đột biến	Nồng độ GSH	
	(mg/L) 26 giờ	Tăng (gấp)
WT	86,0	1,00
F	109,5	1,27
H	103,2	1,20
K	100,7	1,17
E	100,1	1,16
G	99,5	1,16
D	97,5	1,13
N	96,3	1,12
R	95,2	1,11
Y	94,6	1,10
I	93,0	1,08
L	92,2	1,07
P	92,0	1,07
W	90,8	1,06
Q	90,3	1,05
S	90,0	1,05
M	89,9	1,05
T	86,6	1,01
A	86,4	1,00
V	86,2	1,00

Bảng 3

S.cerevisiae CJ-5		
Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (gấp)
WT	271,3	1,00
R	330,0	1,22
N	321,9	1,19
D	318,4	1,17
E	314,4	1,16
P	304,2	1,12
K	302,4	1,11
A	294,9	1,09
Q	286,4	1,06
V	285,6	1,05
F	282,5	1,04
Y	277,5	1,02
W	276,0	1,02
S	274,5	1,01
T	273,9	1,01
I	273,5	1,01
H	272,1	1,00
G	272,0	1,00

Dựa trên các kết quả thử nghiệm, xác nhận rằng khả năng sản sinh glutathion thu được bằng cách thay thế xystein tại vị trí thứ 86 của protein GSH1 bằng axit amin khác tăng lên đến 27% so với khả năng sản sinh glutathion thu được bởi protein GSH1 kiểu dại.

Dựa trên đó, xác nhận rằng biến thể GSH1 được điều chế bằng cách thay thế xystein tại vị trí thứ 86 của protein GSH1 bằng axit amin khác khả năng sản sinh glutathion được cải thiện đáng kể.

Ví dụ 4: Xác nhận ảnh hưởng của gốc Cys khác đến sản sinh glutathion

Đối với ví dụ so sánh, gốc Cys khác của protein GSH1 được sửa đổi, và khả năng sản sinh glutathion thu được bằng cách sửa đổi được xác định. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4 bên dưới.

Bảng 4

S.cerevisiae CJ-5		
Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (gấp)
WT	267,7	1,00
C70A	255,7	0,96
C164A	208,2	0,78
C213A	228,2	0,85
C264A	238,9	0,89
C266A	174,2	0,65
C571A	234,5	0,88
C642A	254,6	0,95
C678A	250,4	0,94

Tham chiếu đến các kết quả của thử nghiệm, gốc xystein khác với xystein ở vị trí thứ 86 không ảnh hưởng đến việc tăng sản sinh glutathion, mà thay vào đó làm giảm sản sinh glutathion.

Dựa trên đó, xác nhận rằng không phải tất cả các gốc xystein có mặt trong protein có ảnh hưởng đến việc tăng sản sinh glutathion. Hơn nữa, xác nhận rằng biến thể GSH1 mới được phát triển theo sáng chế tăng sản sinh glutathion.

Do nấm men sản xuất glutathion có năng suất cao, sản phẩm sấy khô, chiết xuất, dịch nuôi cấy, và chất ly giải của chúng, và glutathion được sản xuất có tác dụng chống oxy hóa, giải độc, và tăng cường miễn dịch, chúng có thể được sử dụng hiệu quả để điều chế các chế phẩm mỹ phẩm, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi, và chế phẩm dược.

Phần mô tả bên trên của sáng chế được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các thay đổi và sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không thay đổi nguyên lý kỹ thuật và các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, rõ ràng rằng các phương án được mô tả bên trên là minh họa tất cả các khía cạnh và không giới hạn sáng chế. Các phương án khác nhau được bộc lộ ở đây không nhằm mục đích giới hạn, với phạm vi bảo hộ và nguyên lý kỹ thuật được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây. Sáng chế chỉ bị giới hạn bởi các điều khoản của các điểm yêu cầu bảo hộ, cùng với toàn bộ phạm vi tương đương mà các điểm yêu cầu bảo hộ đề cập.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> BIẾN THỂ GLUTAMAT-XYSTEIN LIGAZA, POLYNUCLEOTIT, VECTO, VI SINH VẬT
 SẴN SINH GLUTATHION VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY
 <130> OPA20226
 <150> KR 10-2020-0036456
 <151> 2020-03-25
 <160> 29
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 1
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Cys Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu

```

225                230                235                240
Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
                245                250                255

Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
                260                265                270

Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
                275                280                285

Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
                290                295                300

Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
305                310                315                320

Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
                325                330                335

Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
                340                345                350

Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
                355                360                365

Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
                370                375                380

Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
385                390                395                400

Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
                405                410                415

Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
                420                425                430

Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
                435                440                445

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
                450                455                460

Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
465                470                475                480

Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
                485                490                495

Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
                500                505                510

Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
                515                520                525

Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
                530                535                540

Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545                550                555                560

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
                565                570                575

```

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 2
 <211> 2037
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2
 atgggactct tagctttggg cacgcctttg cagtggtttg agtctaggac gtacaatgaa 60
 cacataaggg atgaaggtat cgagcagttg ttgtatat ttccaagctgc tggtaaaaga 120
 gacaatgacc ctcttttttg gggagacgag cttgagtaca tggttgtaga ttttgatgat 180
 aaggagagaa attctatgct cgacgtttgc catgacaaga tactcactga gcttaatatg 240
 gaggattcgt ccctttgtga ggctaacgat gtgagttttc accctgagta tggccggtat 300
 atgtagagg caacaccagc ttctccatat ttgaattacg tgggtagtta cgttgagggtt 360
 aacatgcaaa aaagacgtgc cattgcagaa tataagctat ctgaatatgc gagacaagat 420
 agtaaaaata acttgcatgt gggctccagg tctgtccctt tgacgctgac tgtcttcccg 480
 aggatgggat gccccgactt tattaacatt aaggatccgt ggaatcataa aaatgccgct 540
 tccaggtctc tgtttttacc cgatgaagtc attaacagac atgtcagggtt tcctaacttg 600
 acagcatcca tcaggaccag gcgtggtgaa aaagtttgca tgaatgttcc catgtataaa 660
 gatatagcta ctccagaaac ggatgactcc atctacgac gagattgggtt tttaccagaa 720
 gacaaagagg cgaaactggc ttccaaaccg ggtttcattt atatggattc catgggtttt 780
 ggcattgggt gttcgtgctt acaagtgacc tttcaggcac ccaatatcaa caaggcacgt 840
 tacctgtacg atgcattagt gaattttgca cctataatgc tagccttctc tgccgctgcg 900
 cctgctttta aaggttggct agccgaccaa gatgttcgtt ggaatgtgat atctggtgcg 960
 gtggacgacc gtactccgaa ggaaagaggt gttgcgccat tactacccaa atacaacaag 1020
 aacggatttg gaggcattgc caaagacgta caagataaag tccttgaaat accaaagtca 1080

```

agatatagtt cggttgatct tttcttgggt gggtcgaaat ttttcaatag gacttataac      1140
gacacaaatg tacctattaa tgaaaaagta ttaggacgac tactagagaa tgataaggcg      1200
ccactggact atgatcttgc taaacatttt gcgcatctct acataagaga tccagtatct      1260
acattcgaag aactgttgaa tcaggacaac aaaacgtctt caaatcactt tgaaaacatc      1320
caaagtacaa attggcagac attacgtttt aaacccccca cacaacaagc aaccccggac      1380
aaaaaggatt ctcttggttg gagagtggaa ttcagaccat ttgaagtgca actattagat      1440
tttgagaacg ctgcgtattc cgtgctcata tacttgattg tcgatagcat ttgaccttt      1500
tccgataata ttaacgcata tattcatatg tccaaagtat gggaaaatat gaagatagcc      1560
catcacagag atgctatcct atttgaaaaa tttcattgga aaaaatcatt tcgcaacgac      1620
accgatgtgg aaactgaaga ttattctata agcgagattt tccataatcc agagaatggt      1680
atatttcctc aatttgttac gccaatccta tgccaaaaag ggtttgtaac caaagattgg      1740
aaagaattaa agcattcttc caaacacgag agactatact attattttaa gctaatttct      1800
gatagagcaa gcggtgaatt gccacaaca gcaaaattct ttagaaattt tgtactacaa      1860
catccagatt acaaacatga ttcaaaaatt tcaaagtcga tcaattatga tttgctttct      1920
acgtgtgata gacttaccca tttagacgat tcaaaagggtg aattgacatc ctttttagga      1980
gctgaaattg cagaatatgt aaaaaaaaaa aagccttcaa tagaaagcaa atgttaa      2037

```

```

<210>      3
<211>      678
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      S.cerevisiae GSH1 C86A

```

```

<400>      3
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
  1              5              10              15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
      20              25              30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
      35              40              45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
      50              55              60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
      65              70              75              80

Glu Asp Ser Ser Leu Ala Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
      85              90              95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
      100             105             110

```


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

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 4
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86D

<400> 4
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Asp Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380

Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 5
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> S.cerevisiae GSH1 C86E

<400> 5

```

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1           5           10           15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
      20           25           30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
      35           40           45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
      50           55           60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
      65           70           75           80

Glu Asp Ser Ser Leu Glu Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
      85           90           95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
      100          105          110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
      115          120          125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
      130          135          140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
      145          150          155          160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
      165          170          175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
      180          185          190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
      195          200          205

Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
      210          215          220

Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
      225          230          235          240

Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
      245          250          255

Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
      260          265          270

Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
      275          280          285

Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
      290          295          300

Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
      305          310          315          320

```

Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro

```

        660                665                670
Ser Ile Glu Ser Lys Cys
    675

<210>      6
<211>      678
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      S.cerevisiae GSH1 C86F

<400>      6
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
  1              5              10              15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
    20              25              30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
    35              40              45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
    50              55              60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
    65              70              75              80

Glu Asp Ser Ser Leu Phe Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
    85              90              95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
    100             105             110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
    115             120             125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
    130             135             140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
    145             150             155             160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
    165             170             175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
    180             185             190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
    195             200             205

Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
    210             215             220

Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
    225             230             235             240

Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
    245             250             255

```

Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro


```

      595              600              605
Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610              615              620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625              630              635              640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
      645              650              655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
      660              665              670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
      675

<210>      7
<211>      678
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      S.cerevisiae GSH1 C86G

<400>      7
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
  1              5              10              15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
      20              25              30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
      35              40              45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
      50              55              60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
      65              70              75              80

Glu Asp Ser Ser Leu Gly Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
      85              90              95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
      100              105              110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
      115              120              125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
      130              135              140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
      145              150              155              160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
      165              170              175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
      180              185              190

```

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu

```

530              535              540
Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545              550              555              560
Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
565              570              575
Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
580              585              590
Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
595              600              605
Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
610              615              620
Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
625              630              635              640
Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
645              650              655
Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
660              665              670
Ser Ile Glu Ser Lys Cys
675

```

```

<210>      8
<211>      678
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      S.cerevisiae GSH1 C86H

```

```

<400>      8
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1              5              10              15
Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
20              25              30
Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
35              40              45
Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
50              55              60
Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
65              70              75              80
Glu Asp Ser Ser Leu His Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
85              90              95
Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
100             105             110
Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
115             120             125

```

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp

```

465          470          475          480
Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
          485          490          495
Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
          500          505          510
Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
          515          520          525
Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
          530          535          540
Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545          550          555          560
Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
          565          570          575
Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
          580          585          590
Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
          595          600          605
Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
          610          615          620
Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
625          630          635          640
Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
          645          650          655
Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
          660          665          670
Ser Ile Glu Ser Lys Cys
          675

```

```

<210> 9
<211> 678
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> S.cerevisiae GSH1 C86I

```

```

<400> 9
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1          5          10          15
Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
          20          25          30
Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
          35          40          45
Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
          50          55          60

```

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Ile Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg

```

              405              410              415
Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
      420              425              430

Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
      435              440              445

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
      450              455              460

Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
      465              470              475              480

Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
      485              490              495

Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
      500              505              510

Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
      515              520              525

Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
      530              535              540

Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
      545              550              555              560

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
      565              570              575

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
      580              585              590

Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
      595              600              605

Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
      610              615              620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
      625              630              635              640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
      645              650              655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
      660              665              670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
      675

```

```

<210>    10
<211>    678
<212>    PRT
<213>    Trình tự nhân tạo

<220>
<223>    S.cerevisiae GSH1 C86K

<400>    10

```

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Lys Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp


```

          340          345          350
Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
    355          360          365

Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
    370          375          380

Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
385          390          395          400

Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
    405          410          415

Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
    420          425          430

Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
    435          440          445

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
    450          455          460

Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
465          470          475          480

Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
    485          490          495

Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
    500          505          510

Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
    515          520          525

Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
    530          535          540

Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545          550          555          560

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
    565          570          575

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
    580          585          590

Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
    595          600          605

Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
    610          615          620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
625          630          635          640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
    645          650          655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
    660          665          670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
    675

```

<210> 11
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86L

<400> 11
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Leu Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn

275	280	285
Phe Ala Pro Ile Met	Leu Ala Phe Ser	Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
290	295	300
Gly Trp Leu Ala Asp	Gln Asp Val Arg Trp	Asn Val Ile Ser Gly Ala
305	310	315 320
Val Asp Asp Arg Thr	Pro Lys Glu Arg Gly	Val Ala Pro Leu Leu Pro
	325	330 335
Lys Tyr Asn Lys Asn	Gly Phe Gly Gly Ile	Ala Lys Asp Val Gln Asp
	340	345 350
Lys Val Leu Glu Ile	Pro Lys Ser Arg Tyr	Ser Ser Val Asp Leu Phe
	355	360 365
Leu Gly Gly Ser Lys	Phe Phe Asn Arg Thr	Tyr Asn Asp Thr Asn Val
	370	375 380
Pro Ile Asn Glu Lys	Val Leu Gly Arg Leu	Leu Glu Asn Asp Lys Ala
385	390	395 400
Pro Leu Asp Tyr Asp	Leu Ala Lys His Phe	Ala His Leu Tyr Ile Arg
	405	410 415
Asp Pro Val Ser Thr	Phe Glu Glu Leu Leu	Asn Gln Asp Asn Lys Thr
	420	425 430
Ser Ser Asn His Phe	Glu Asn Ile Gln Ser	Thr Asn Trp Gln Thr Leu
	435	440 445
Arg Phe Lys Pro Pro	Thr Gln Gln Ala Thr	Pro Asp Lys Lys Asp Ser
	450	455 460
Pro Gly Trp Arg Val	Glu Phe Arg Pro Phe	Glu Val Gln Leu Leu Asp
465	470	475 480
Phe Glu Asn Ala Ala	Tyr Ser Val Leu Ile	Tyr Leu Ile Val Asp Ser
	485	490 495
Ile Leu Thr Phe Ser	Asp Asn Ile Asn Ala	Tyr Ile His Met Ser Lys
	500	505 510
Val Trp Glu Asn Met	Lys Ile Ala His His	Arg Asp Ala Ile Leu Phe
	515	520 525
Glu Lys Phe His Trp	Lys Lys Ser Phe Arg	Asn Asp Thr Asp Val Glu
	530	535 540
Thr Glu Asp Tyr Ser	Ile Ser Glu Ile Phe	His Asn Pro Glu Asn Gly
545	550	555 560
Ile Phe Pro Gln Phe	Val Thr Pro Ile Leu	Cys Gln Lys Gly Phe Val
	565	570 575
Thr Lys Asp Trp Lys	Glu Leu Lys His Ser	Ser Lys His Glu Arg Leu
	580	585 590
Tyr Tyr Tyr Leu Lys	Leu Ile Ser Asp Arg	Ala Ser Gly Glu Leu Pro
	595	600 605
Thr Thr Ala Lys Phe	Phe Arg Asn Phe Val	Leu Gln His Pro Asp Tyr
	610	615 620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
625 630 635 640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
645 650 655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
660 665 670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
675

<210> 12

<211> 678

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S.cerevisiae GSH1 C86M

<400> 12

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
20 25 30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
50 55 60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Leu Met Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
85 90 95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
100 105 110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
115 120 125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
130 135 140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
145 150 155 160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
165 170 175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
180 185 190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
195 200 205

Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr

```

210                215                220
Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
225                230                235                240
Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
245                250                255
Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
260                265                270
Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
275                280                285
Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
290                295                300
Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
305                310                315                320
Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
325                330                335
Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
340                345                350
Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
355                360                365
Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
370                375                380
Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
385                390                395                400
Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
405                410                415
Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
420                425                430
Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
435                440                445
Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
450                455                460
Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
465                470                475                480
Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
485                490                495
Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
500                505                510
Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
515                520                525
Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
530                535                540
Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545                550                555                560

```

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 13
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86N

<400> 13
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Asn Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro

145	150	155	160
Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His			
	165	170	175
Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn			
	180	185	190
Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg			
	195	200	205
Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr			
	210	215	220
Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu			
	225	230	235
Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp			
	245	250	255
Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln			
	260	265	270
Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn			
	275	280	285
Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys			
	290	295	300
Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala			
	305	310	315
Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro			
	325	330	335
Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp			
	340	345	350
Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe			
	355	360	365
Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val			
	370	375	380
Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala			
	385	390	395
Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg			
	405	410	415
Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr			
	420	425	430
Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu			
	435	440	445
Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser			
	450	455	460
Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp			
	465	470	475
Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser			
	485	490	495

Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 14
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86P

<400> 14
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Pro Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu

85					90					95						
Tyr	Gly	Arg	Tyr	Met	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	Tyr	Leu	Asn	
100					105					110						
Tyr	Val	Gly	Ser	Tyr	Val	Glu	Val	Asn	Met	Gln	Lys	Arg	Arg	Ala	Ile	
115					120					125						
Ala	Glu	Tyr	Lys	Leu	Ser	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asp	Ser	Lys	Asn	Asn	
130					135					140						
Leu	His	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Pro	
145					150					155					160	
Arg	Met	Gly	Cys	Pro	Asp	Phe	Ile	Asn	Ile	Lys	Asp	Pro	Trp	Asn	His	
165					170					175						
Lys	Asn	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Val	Ile	Asn	
180					185					190						
Arg	His	Val	Arg	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Ala	Ser	Ile	Arg	Thr	Arg	Arg	
195					200					205						
Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Met	Asn	Val	Pro	Met	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Thr	
210					215					220						
Pro	Glu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Leu	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Phe	Ile	Tyr	Met	Asp	
245					250					255						
Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Cys	Leu	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	
260					265					270						
Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	
275					280					285						
Phe	Ala	Pro	Ile	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Lys	
290					295					300						
Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Val	Asp	Asp	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
325					330					335						
Lys	Tyr	Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Gln	Asp	
340					345					350						
Lys	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Phe	
355					360					365						
Leu	Gly	Gly	Ser	Lys	Phe	Phe	Asn	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	Thr	Asn	Val	
370					375					380						
Pro	Ile	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Glu	Asn	Asp	Lys	Ala	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ala	Lys	His	Phe	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Arg	
405					410					415						
Asp	Pro	Val	Ser	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Thr	
420					425					430						

Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 15
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86Q

<400> 15
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr

20					25					30						
Ile	Phe	Gln	Ala	Ala	Gly	Lys	Arg	Asp	Asn	Asp	Pro	Leu	Phe	Trp	Gly	
35					40					45						
Asp	Glu	Leu	Glu	Tyr	Met	Val	Val	Asp	Phe	Asp	Asp	Lys	Glu	Arg	Asn	
50					55					60						
Ser	Met	Leu	Asp	Val	Cys	His	Asp	Lys	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Asn	Met	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Ser	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Asn	Asp	Val	Ser	Phe	His	Pro	Glu	
85					90					95						
Tyr	Gly	Arg	Tyr	Met	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	Tyr	Leu	Asn	
100					105					110						
Tyr	Val	Gly	Ser	Tyr	Val	Glu	Val	Asn	Met	Gln	Lys	Arg	Arg	Ala	Ile	
115					120					125						
Ala	Glu	Tyr	Lys	Leu	Ser	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asp	Ser	Lys	Asn	Asn	
130					135					140						
Leu	His	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Pro	
145					150					155					160	
Arg	Met	Gly	Cys	Pro	Asp	Phe	Ile	Asn	Ile	Lys	Asp	Pro	Trp	Asn	His	
165					170					175						
Lys	Asn	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Val	Ile	Asn	
180					185					190						
Arg	His	Val	Arg	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Ala	Ser	Ile	Arg	Thr	Arg	Arg	
195					200					205						
Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Met	Asn	Val	Pro	Met	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Thr	
210					215					220						
Pro	Glu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Leu	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Phe	Ile	Tyr	Met	Asp	
245					250					255						
Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Cys	Leu	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	
260					265					270						
Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	
275					280					285						
Phe	Ala	Pro	Ile	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Lys	
290					295					300						
Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Val	Asp	Asp	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
325					330					335						
Lys	Tyr	Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Gln	Asp	
340					345					350						
Lys	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Phe	
355					360					365						

Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 16
 <211> 678

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86R

<400> 16
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Arg Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300

Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
645 650 655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
660 665 670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
675

<210> 17

<211> 678

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S.cerevisiae GSH1 C86S

<400> 17

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
20 25 30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
50 55 60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Leu Ser Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
85 90 95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
100 105 110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
115 120 125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
130 135 140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
145 150 155 160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
165 170 175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
180 185 190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
195 200 205

Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
210 215 220

Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
225 230 235 240

Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 18
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86T

<400> 18
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Thr Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510

Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 19
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86V

<400> 19
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Val Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110

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

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 20
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> S.cerevisiae GSH1 C86W

<400> 20
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Trp Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205
 Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220
 Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
 245 250 255
 Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
 260 265 270
 Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
 275 280 285
 Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
 290 295 300
 Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380

```

Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
385                      390                      395                      400

Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
                      405                      410                      415

Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
                      420                      425                      430

Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
                      435                      440                      445

Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
450                      455                      460

Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
465                      470                      475                      480

Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
                      485                      490                      495

Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
                      500                      505                      510

Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
                      515                      520                      525

Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
530                      535                      540

Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
545                      550                      555                      560

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
                      565                      570                      575

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
                      580                      585                      590

Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
595                      600                      605

Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
610                      615                      620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
625                      630                      635                      640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
                      645                      650                      655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
660                      665                      670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys
675

```

```

<210> 21
<211> 678
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>

```

<223> S.cerevisiae GSH1 C86Y

<400> 21

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
20 25 30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
50 55 60

Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Leu Tyr Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
85 90 95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
100 105 110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
115 120 125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
130 135 140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
145 150 155 160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
165 170 175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
180 185 190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
195 200 205

Gly Glu Lys Val Cys Met Asn Val Pro Met Tyr Lys Asp Ile Ala Thr
210 215 220

Pro Glu Thr Asp Asp Ser Ile Tyr Asp Arg Asp Trp Phe Leu Pro Glu
225 230 235 240

Asp Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ser Lys Pro Gly Phe Ile Tyr Met Asp
245 250 255

Ser Met Gly Phe Gly Met Gly Cys Ser Cys Leu Gln Val Thr Phe Gln
260 265 270

Ala Pro Asn Ile Asn Lys Ala Arg Tyr Leu Tyr Asp Ala Leu Val Asn
275 280 285

Phe Ala Pro Ile Met Leu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Pro Ala Phe Lys
290 295 300

Gly Trp Leu Ala Asp Gln Asp Val Arg Trp Asn Val Ile Ser Gly Ala
305 310 315 320

Val Asp Asp Arg Thr Pro Lys Glu Arg Gly Val Ala Pro Leu Leu Pro
 325 330 335
 Lys Tyr Asn Lys Asn Gly Phe Gly Gly Ile Ala Lys Asp Val Gln Asp
 340 345 350
 Lys Val Leu Glu Ile Pro Lys Ser Arg Tyr Ser Ser Val Asp Leu Phe
 355 360 365
 Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Gly Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro

660	665	670
Ser Ile Glu Ser Lys Cys		
675		
<210>	22	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	F_BamHI_GSH1	
<400>	22	
ggtaggatcc atgggactct tagctttggg cac		33
<210>	23	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	R_GSH1_C86R	
<400>	23	
ttagcctccc taagggacga atcct		25
<210>	24	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	F_GSH1_C86R	
<400>	24	
cgtcccttag ggaggctaac gatgt		25
<210>	25	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	R_XhoI_GSH1	
<400>	25	
atgactcgag ttaacatttg ctttctattg aaggc		35
<210>	26	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		

<223> F_SpeI_GSH1_DW

<400> 26
tagaactagt actcctttta tttcggttgt gaa 33

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

<220>
<223> R_NcoI_GSH1_DW

<400> 27
gctgccatgg gaatagtggtg aaccgataac tgtgt 35

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R_AL killer

<400> 28
gagcaatgaa cccaataacg aaatctt 27

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> F_BR killer

<400> 29
cttgacgttc gttcgactga tgag 24

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể glutamat-xystein ligaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.
2. Biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm 1, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 86 được thay thế bằng glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, tyrosin, asparagin, glutamat, glutamin, aspartat, lysin, arginin, hoặc histidin.
3. Biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm 1, trong đó biến thể có sự tương đồng trình tự bằng hoặc lớn hơn 80% và nhỏ hơn 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.
4. Biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm 1, trong đó biến thể chỉ chứa một trình tự axit amin được lựa chọn từ trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 21.
5. Polynucleotit mã hóa biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 4.
6. Vector chứa polynucleotit theo điểm 5.
7. Vi sinh vật sản sinh glutathion chứa ít nhất một trong số biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 4; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*.
9. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là *Saccharomyces cerevisiae*.
10. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu chủng với số lưu chủng KCCM12659P.
11. Phương pháp sản xuất glutathion, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật chứa ít nhất một trong số biến thể glutamat-xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 4; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit, trong môi trường nuôi cấy.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi glutathion từ ít nhất một trong số được lựa chọn từ vi sinh vật nuôi cấy, sản phẩm sấy

khô của vi sinh vật, chiết xuất của vi sinh vật, dịch nuôi cấy của vi sinh vật, và dịch ly giải vi sinh vật.