



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C12N 9/00; C12N 15/52; C12R 1/15; (13) B
C12P 13/08; C12P 13/14; C12N 1/21



1-0048476

-
- (21) 1-2022-01176 (22) 06/09/2019
(86) PCT/CN2019/104683 06/09/2019 (87) WO2021/035793 04/03/2021
(30) 201910787948.9 26/08/2019 CN
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/11/2022 416A
(73) TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE
ACADEMY OF SCIENCES (CN)
32 West 7th Avenue, Tianjin Airport Economic Area Tianjin 300308, China
(72) SUN, Jibin (CN); LI, Qinggang (CN); ZHOU, Wenjuan (CN); DELE-OSIBANJO,
Taiwo Adeolu (NG); ZHENG, Ping (CN); MA, Yanhe (CN).
(74) Công ty cổ phần Tư vấn S&B (S&B CONSULTANT., CORP.)
-

- (54) CHẤT ĐỘT BIẾN PROTEIN MVIN, VẬT CHỦ TRUNG GIAN BIỂU HIỆN VÀ
TẾ BÀO CHỦ BAO GỒM CHẤT ĐỘT BIẾN NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU
CHẾ AXIT GLUTAMIC HOẶC LYSIN

(21) 1-2022-01176

(57) Sáng chế đề cập đến chất đột biến protein MviN, chất đột biến đã đề cập cải thiện khả năng sản xuất axit glutamic và lysin của *corynebacterium* bằng cách đưa đột biến axit amin vào một vị trí nhất định trong trình tự axit amin của protein MviN.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực kỹ thuật di truyền, và cụ thể là đề cập đến chất đột biến của flippaza lipit II xuyên màng (MviN) và phương pháp sản xuất axit glutamic và lysin sử dụng chất đột biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit glutamic và lysin là những chất dinh dưỡng quan trọng đối với con người và động vật, và đóng vai trò quan trọng trong ngành y tế, sức khỏe, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, và các loại tương tự. Chúng được tạo ra chủ yếu bằng quá trình lên men vi sinh vật. Trong những năm gần đây, công nghệ biến đổi chủng lên men, cốt lõi của ngành công nghiệp lên men, đã liên tục được phát triển. Quá trình liên quan trực tiếp đến quá trình chuyển hóa của chúng (bao gồm vận chuyển cơ chất, vận chuyển sản phẩm, tạo năng lượng,...) thường được biến đổi trong quá trình tổng hợp hợp chất nhất định. Các sửa đổi mô đun liên quan chặt chẽ đến cách tổng hợp axit amin, như loại bỏ sự ức chế phản hồi sản phẩm của các enzym chính, làm suy yếu cách cạnh tranh và tăng cường cơ chất hoặc vận chuyển sản phẩm, đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu, và khả năng sản xuất axit của các chủng cho sản xuất công nghiệp là do đó được cải thiện rất nhiều. Mặc dù các chủng công nghiệp đối với axit glutamic và lysin hiện đã đạt mức sản xuất cao, nhưng vẫn còn nhu cầu cấp thiết về mức sản xuất axit tăng hơn nữa, đặc biệt là tăng tỷ lệ chuyển đổi (tỷ lệ nguyên liệu ban đầu được chuyển đổi thành sản phẩm), và giảm chi phí sản xuất. Tuy nhiên, rất khó để tiếp tục, thậm chí một chút, tăng mức sản xuất cao của các chủng sản xuất axit glutamic và lysin.

Hiện nay, có rất ít sự thay đổi gen không liên quan đáng kể đến quá trình tổng hợp axit amin. Lý do nằm ở chỗ: như ai cũng biết rằng tế bào là một tổ hợp phức tạp của các mạng lưới chuyển hóa, ảnh hưởng của việc biến đổi các gen không liên quan đến các chủng là không thể đoán trước được; ngoài ra, rất khó tìm kiếm các mục tiêu sửa đổi có thể liên quan đến việc sản xuất axit glutamic và lysin từ nhiều gen.

MviN là flippaza lipit II xuyên màng, xúc tác bước cuối cùng trong quá trình tổng hợp peptidoglycan (PG) và vận chuyển lipit II từ màng tế bào chất bên trong đến chu chất, gây ra sự liên kết chéo của PG mới thành PG trưởng thành. Hiện tại, có rất ít nghiên cứu về MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium*. Chỉ một sáng chế (JP2010161970A) bộc lộ đột biến của phần dư axit amin (ở vị trí 197, 260 và 181) trong protein có thể tăng hiệu suất axit glutamic của *Corynebacterium glutamicum*, nhưng với một lượng rất nhỏ

chỉ 1 đến 5% (phần trăm sản phẩm) so với chủng ban đầu, và ảnh hưởng đến tỷ lệ chuyển đổi không được báo cáo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu theo sáng chế là đề cập chất đột biến protein MviN mới và phương pháp để tăng đáng kể tỷ lệ chuyển đổi sản xuất axit glutamic và lysin của tế bào chủ sử dụng chất đột biến protein.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chất đột biến protein flippaza lipid II xuyên màng (MviN) có trình tự axit amin bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

a) trình tự axit amin có sự thay thế của prolin, bởi leuxin, hoặc axit amin khác có chuỗi bên béo, ví dụ, bất kỳ một trong số isoleuxin, valin và alanin, tương ứng với vị trí 346, và/hoặc có sự thay thế của valin, bằng phenylalanin hoặc tryptophan, tương ứng với vị trí 599, của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8;

b) trình tự axit amin có cùng vùng đột biến với trình tự axit amin của a) và có 90% trở lên, ví dụ, 95% trở lên, hoặc 98% trở lên tương đồng với trình tự axit amin của a), trong đó trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* và duy trì hoạt động vận chuyển lipid II từ màng tế bào chất bên trong ra chu chất.

Trong một phương án, chất đột biến protein MviN bao gồm hoặc không bao gồm các đột biến ở các vùng khác. Ví dụ, chất đột biến protein MviN bao gồm đột biến bảo toàn từ trình tự axit amin đã đề cập, và chất đột biến protein MviN vẫn giữ hoạt động vận chuyển lipid II từ màng tế bào chất bên trong ra chu chất.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN ở khía cạnh thứ nhất.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vật chủ trung gian biểu hiện bao gồm gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN của khía cạnh thứ hai; trong một phương án, vật chủ trung gian biểu hiện được xây dựng bằng cách buộc trình tự nucleotit của gen mã hóa với plasmit, ví dụ, plasmit được chọn từ pEC-XK99E.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến tế bào chủ biểu hiện chất đột biến protein MviN ở khía cạnh thứ nhất.

Trong phương án tốt hơn, tế bào chủ biểu hiện chất đột biến bao gồm vật chủ trung gian biểu hiện của khía cạnh thứ ba hoặc có trình tự nucleotit của gen mã hóa của khía cạnh thứ hai được kết hợp trong bộ gen của nó. Trong một phương án, vật chủ trung gian biểu hiện được đưa vào tế bào chủ ban đầu để tạo thành tế bào chủ chứa gen mã

hóa cho chất đột biến.

Trong phương án còn tốt hơn, tế bào chủ ban đầu có nguồn gốc từ *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Pantoea*, *Brevibacterium sp*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* hoặc *Vibrio*, tốt hơn là *E. Coli* hoặc *Corynebacterium glutamicum*, and còn tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum*.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chất đột biến protein MviN của khía cạnh thứ nhất, hoặc gen mã hóa của khía cạnh thứ hai, hoặc vật chủ trung gian biểu hiện của khía cạnh thứ ba, hoặc tế bào chủ của khía cạnh thứ tư, để sản xuất axit glutamic hoặc lysin.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế axit glutamic hoặc lysin bao gồm các bước sau:

- a. xây dựng tế bào chủ của khía cạnh thứ tư;
- b. nuôi cấy tế bào chủ được xây dựng ở bước a để tạo ra chất lỏng nuôi cấy có chứa axit glutamic hoặc lysin; và
- c. tùy chọn phân lập axit glutamic hoặc lysin được tạo ra từ chất lỏng nuôi cấy của bước b.

Tác dụng có lợi của sáng chế

1. Sáng chế đề cập đến chất đột biến protein MviN mới, có thể làm tăng sản lượng axit glutamic và lysin và tăng đáng kể tỷ lệ chuyển đổi glucoza thông qua đột biến các axit amin tại các vùng cụ thể.
2. Sáng chế đề cập đến mục tiêu sửa đổi mới cho protein MviN, có thể làm tăng tốc độ phát triển của chủng và giảm chi phí sản xuất axit glutamic và lysin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa thêm khi tham khảo các ví dụ cụ thể sau đây. Cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa cho sáng chế chứ không phải giới hạn phạm vi theo sáng chế.

Trong trường hợp các điều kiện cụ thể không được chỉ ra trong phương pháp thực nghiệm trong các ví dụ sau, các điều kiện thông thường như được mô tả trong Sambrook và cộng sự, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) hoặc các điều kiện do nhà sản xuất thiết bị khuyến nghị phải tuân theo.

Định nghĩa và Giải thích:

Thuật ngữ "flippaza lipid II xuyên màng" và "protein màng", "protein sinh tổng

hợp murein", "protein MviN", "protein theo sáng chế", "polypeptit theo sáng chế" được sử dụng ở đây được sử dụng thay thế cho nhau và có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

"Protein MviN" theo sáng chế đề cập đến flippaza lipit II xuyên màng, xúc tác bước cuối cùng trong quá trình tổng hợp peptidoglycan (PG) và vận chuyển lipit II từ màng tế bào chất bên trong đến chu chất. Protein MviN có thể có nguồn gốc từ các loài khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Pantoea*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* hoặc *Vibrio*. Theo sáng chế, protein MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium*, và ví dụ, protein tương ứng với bất kỳ một trong các trình tự đã đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8; hoặc cũng có thể là polypeptit bao gồm bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8 và có hoạt động vận chuyển lipit II từ màng tế bào chất bên trong đến chu chất; hoặc thêm nữa có thể là polypeptit có hơn 90%, tốt hơn là 95%, và tốt hơn là 98%, tương đồng với bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8, có nguồn gốc từ *Corynebacterium* và có hoạt động vận chuyển lipit II từ bên trong tế bào chất ra chu chất.

"Chất đột biến protein MviN" theo sáng chế đề cập đến chất thu được bằng cách đột biến bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8. Cụ thể, chất đột biến protein MviN theo sáng chế có trình tự axit amin có sự thay thế prolin, bởi leuxin, tương ứng với vị trí 346 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8, hoặc có sự thay thế valin bằng phenylalanin, tương ứng với vị trí 599 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8; hoặc chất đột biến protein MviN theo sáng chế là đoạn của trình tự axit amin bao gồm vùng đột biến ở trên. Liên quan đến sáng chế, nó cũng có thể là một polypeptit có bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8 và có hoạt động vận chuyển lipit II từ màng tế bào chất bên trong đến chu chất; nó cũng có thể là polypeptit có hơn 90%, tốt hơn là 95%, và tốt nhất là 98% trở lên, tương đồng với bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8, có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* và có hoạt động vận chuyển lipit II từ màng tế bào chất bên trong đến chu chất; nó cũng nằm trong phạm vi theo sáng chế, với điều kiện là nó có sự thay thế prolin bằng leuxin, tương ứng với vị trí 346 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8, hoặc có sự thay thế valin bằng phenylalanin, tương ứng với vị trí 599 của bất

kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8.

Đến nay, có tổng số 22 chuỗi axit amin của "flippaza lipit II xuyên màng" có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* được công bố trong cơ sở dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (một số trình tự được chú thích là protein giả định hoặc protein màng trong cơ sở dữ liệu), trong số đó chỉ có một trình tự có 93% tương đồng với trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2 theo sáng chế, và 21 trình tự còn lại có hơn 98% tương đồng với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2 theo sáng chế; tất cả 22 trình tự có prolin tương ứng với vị trí 346 của trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2, và có valin tương ứng với vị trí 599 của trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2. Có thể thấy rằng flippaza lipit II xuyên màng bảo toàn cao trong *Corynebacterium glutamicum*, và cũng bảo toàn cao ở vị trí tương ứng với vị trí 346 hoặc 599 của trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, sáng chế biến đổi trình tự flippaza lipit II xuyên màng có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, và kết quả cho thấy rằng hoặc đột biến prolin ở vị trí 346 của bất kỳ một trong số 4 trình tự thành leuxin hoặc đột biến valin ở vị trí 599 thành phenylalanin có thể làm tăng hiệu suất của axit glutamic và lysin và làm tăng đáng kể tỷ lệ chuyển đổi của glucoza. Do đó, vì những lý do trên, các polypeptit khác có độ tương đồng hơn 98% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2 và có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* tất cả đều nằm trong phạm vi theo sáng chế, với điều kiện là chúng có sự thay thế prolin bằng leuxin, tương ứng với vị trí 346 của trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2, hoặc chúng có sự thay thế valin bằng phenylalanin, tương ứng với vị trí 599 của trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 2.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được sử dụng ở đây là tế bào có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, tức là, bao gồm protein MviN hoặc chất đột biến của chúng theo sáng chế. Nói cách khác, bất kỳ tế bào chủ nào cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là tế bào đó chứa protein MviN hoặc chất đột biến của chúng theo sáng chế và có khả năng tạo ra axit amin. Tế bào chủ có thể từ *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Pantoea*, *Brevibacterium sp*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* hoặc *Vibrio*, tốt hơn là *E. Coli* hoặc *Corynebacterium glutamicum*, và còn tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum*. Cụ thể, chủ sở hữu theo sáng chế đề cập đến chúng có khả năng tạo ra axit glutamic và lysin.

Thuật ngữ "bao gồm MviN theo sáng chế" được sử dụng ở đây có nghĩa được hiểu theo quy ước của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm nhưng không giới hạn ở, ví dụ, chèn polynucleotit bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein vào nhiễm sắc thể, hoặc nhân bản polynucleotit vào vật chủ trung gian để đưa

nó vào vi sinh vật, hoặc thêm trực tiếp bản sao của polynucleotit vào nhiễm sắc thể và các loại tương tự; các phương pháp cũng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, bất kỳ phương pháp nào đã biết mà bằng cách đó hoạt tính của protein có thể được đưa vào.

Thuật ngữ "có hoạt tính của protein MviN" được sử dụng ở đây có nghĩa giống hoặc tương tự như cách hiểu thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Có nghĩa là trình tự axit amin của đoạn nhất định là một phần của trình tự axit amin của protein hoặc polypeptit nguyên vẹn, và có chức năng hoặc hoạt động giống hoặc tương tự như protein hoặc polypeptit nguyên vẹn. Cụ thể, trong sáng chế, nó chỉ ra bất kỳ đoạn axit amin nào thu được từ protein MviN theo sáng chế và có chức năng tương tự như protein MviN. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá cao rằng việc thay đổi một vài phần dư axit amin trong các vùng nhất định của polypeptit, ví dụ, ở các vùng không quan trọng, về cơ bản không làm thay đổi hoạt tính sinh học. Ví dụ, trình tự thu được bằng cách thay thế thích hợp một số axit amin không ảnh hưởng đến hoạt động của nó. (xem Watson và cộng sự, *Molecular Biology of The Gene*, tái bản lần thứ tư, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co. P224). Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể thực hiện các thay thế như vậy và đảm bảo rằng phân tử tạo thành vẫn giữ được hoạt tính sinh học mong muốn. Do đó, rõ ràng là các đột biến tiếp theo trong MviN theo sáng chế dẫn đến các chất đột biến khác với chức năng MviN được giữ lại. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều biết rằng việc thêm hoặc bớt một số, ví dụ, 1 đến 20, tốt hơn là 1 đến 15, còn tốt hơn là 1 đến 10, còn tốt hơn là 1 đến 3, và tốt nhất là 1, các phần dư axit amin đến hoặc từ bất kỳ đầu nào của polypeptit không ảnh hưởng đến chức năng của chất đột biến tạo thành. Ví dụ, để dễ tinh sạch, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thường làm cho protein kết quả có thể 6×His ở hai đầu, và những protein như vậy có chức năng tương tự như những protein không có thể 6×His. Hơn nữa, sáng chế phải bao gồm các chất đột biến bảo toàn của MviN theo sáng chế. Các chất đột biến bảo toàn này có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách thay thế axit amin như được trình bày trong bảng dưới đây.

Phần dư ban đầu	Phần dư đại diện để thế	Phần dư tốt hơn để thế
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn

Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ "polynucleotit mã hóa polypeptit" có thể bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc polynucleotit có trình tự mã hóa bổ sung và/hoặc không mã hóa.

Gen của protein MviN có thể là đoạn dò được chuẩn bị trong các điều kiện nghiêm ngặt với bất kỳ một trong các trình tự nucleotit được đề cập trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 7, ví dụ, lai ADN với trình tự bổ sung cho một phần hoặc toàn bộ của bất kỳ một trong các trình tự nucleotit được đề cập trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 7, với điều kiện là chức năng ban đầu của nó được giữ lại. "Các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến các điều kiện mà trong đó phép lai cụ thể có thể được tạo thành và phép lai không cụ thể không được tạo thành. Ví dụ, nó đề cập đến các điều kiện mà các ADN có độ tương đồng cao, ví dụ, có độ tương đồng từ 90% trở lên, lai với nhau, và các ADN có độ tương đồng dưới 90% không lai với nhau, hoặc điều kiện rửa để lai Southern thông thường, tức là điều kiện cho 1, tốt hơn là 2 đến 3, rửa ở nồng độ muối $1 \times \text{SSC}$ và 0,1% SDS và nhiệt độ 60°C , tốt hơn là ở nồng độ muối $0,1 \times \text{SSC}$ và 0,1% SDS và nhiệt độ 60°C , và còn tốt hơn là ở nồng độ muối $0,1 \times \text{SSC}$ và 0,1% SDS và nhiệt độ 68°C .

Hơn nữa, vì sự thoái hóa của đơn vị mã khác nhau giữa các vật chủ, bất kỳ đơn vị mã nào trong gen của protein MviN đều có thể được thay thế bằng đơn vị mã tương đương tương ứng, nghĩa là, gen protein MviN có thể có bất kỳ đột biến nào đối với gen protein MviN do thoái hóa mã di truyền. Ví dụ, gen protein MviN có thể là gen đã được sửa đổi để nó có đơn vị mã tối ưu theo tần số đơn vị mã trong vật chủ sẽ được sử dụng.

Theo phương án cụ thể, gen protein MviN có thể là ADN có 90% trở lên, tốt hơn

là 95% trở lên, và còn tốt hơn là 99%, tương đồng hoặc đồng nhất trình tự với ADN mã hóa bất kỳ một trong các trình tự axit amin đã đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thu được đoạn hoạt động có hoạt tính hoặc chức năng giống hoặc tương tự dựa trên nghiên cứu theo sáng chế và protein MviN thu được cụ thể theo sáng chế. Các đoạn hoạt động như vậy có thể là những đoạn thu được bằng cách gây đột biến các vùng đột biến theo sáng chế (tương ứng với các vị trí 346 và 599 của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8) thành các phần dư axit amin khác, hoặc có thể là những phần dư thu được bằng cách gây đột biến các vùng liền kề hoặc gần với các vùng đột biến theo sáng chế (tương ứng với các vị trí 346 và 599 của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8), và các đoạn hoạt động như vậy phải được coi là yêu cầu bảo hộ tương đương theo sáng chế và do đó nằm trong phạm vi bảo hộ theo sáng chế.

Thuật ngữ "tương ứng với" được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, thuật ngữ "tương ứng với" đề cập đến vùng trong trình tự tương ứng với vùng được chỉ định trong trình tự khác sau khi xếp thẳng hàng của hai trình tự bằng cách tương đồng hoặc đồng nhất trình tự. Do đó, ví dụ, thuật ngữ phần dư axit amin tương ứng với vị trí 40 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8", nếu thế 6×His được thêm vào một đầu của bất kỳ một trong các axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8, sau đó vị trí 40 của chất đột biến tạo ra tương ứng với của bất kỳ một trong các trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8 có thể là vị trí 46.

Theo phương án cụ thể, sự tương đồng hoặc sự đồng nhất trình tự có thể không ít hơn 90%, tốt hơn là không ít hơn 95%, và còn tốt hơn là không ít hơn 98%, và có nguồn gốc từ *Corynebacterium*.

Các phương pháp xác định sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến bao gồm, nhưng không giới hạn ở: *Computational Molecular Biology*, Ed. Lesk, A.M., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Ed. Smith, D.W., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part One, Ed. Griffin, A.M. and Griffin, H.G., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Ed. Gribskov, M. and Devereux, J., M Stockton Press, New York, 1991; and

Carillo, H. and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073(1988). Phương pháp tốt hơn để xác định sự đồng nhất là để có được sự phù hợp lớn nhất giữa các trình tự được thử nghiệm. Các phương pháp xác định sự đồng nhất được biên soạn trong các chương trình máy tính có sẵn công khai. Các phương pháp chương trình máy tính để xác định sự đồng nhất giữa hai trình tự bao gồm, nhưng không giới hạn ở: Gói chương trình GCG (Devereux, J. và cộng sự, 1984), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F. và cộng sự, 1990). Chương trình BLASTX có sẵn công khai từ NCBI và các nguồn khác (BLAST Manual, Altschul, S. và cộng sự, NCBI NLM NIH Bethesda, Md.20894; Altschul, S. và cộng sự, 1990). Thuật toán Smith Waterman đã biết cũng có thể được sử dụng để xác định sự đồng nhất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Đưa đột biến gen MviN vào bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* chủng Z188 và B253

Khi sàng lọc gây đột biến được thực hiện trên *Corynebacterium glutamicum* Z188 (GenBank Accession number: NZ_AKXP000000000) để sản xuất axit glutamic, thu được hai chủng chất đột biến, và phân tích trình tự gen cho thấy C của chủng đột biến tương ứng với vị trí 1037 của trình tự nucleotit gen MviN của Z188 bị đột biến thành T (P ở vị trí 346 bị đột biến thành L đối với axit amin tương ứng), và G của chủng đột biến khác tương ứng với vị trí 1795 trình tự nucleotit của gen MviN bị đột biến thành T (V ở vị trí 599 bị đột biến thành F cho axit amin tương ứng). Để kiểm tra ảnh hưởng của đột biến MviN P346L và V599F từ các nguồn khác nhau đối với việc sản xuất axit glutamic bởi Z188 và lysin bởi B253 (số gia nhập Ngân hàng gen CP010451), MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* Z188 (được viết tắt là MviNZ, với trình tự nucleotit và axit amin tương ứng là SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2), MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* B253 (được viết tắt là MviNB, với trình tự nucleotit và axit amin tương ứng là SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4), MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 (số gia nhập Ngân hàng gen CP016335) (được viết tắt là MviN9, với trình tự nucleotit và axit amin tương ứng là SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6), và MviN có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (số gia nhập Ngân hàng gen CP025533) (được viết tắt là MviN2, với trình tự nucleotit và axit amin tương ứng là SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8) được chọn.

Các gen MviN của Z188 và B253 bị đột biến bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi MF (SEQ ID NO: 9 CCTCGAATTCATGAATGGTCAACAAGTGAGTTCTTC) và đoạn mồi MR1 (SEQ ID NO: 10 TCTACTGCAGTTACCAACCAACGAGTTGTACTTCAG) với bộ

gen Z188, B253 và ATCC 13869 là khuôn mẫu; khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi MF và đoạn môi MR2 (SEQ ID NO: 11 TCTACTGCAGTTACCAACCAACAAGTTGTACTTCAG) với ATCC 13032 là khuôn mẫu. Các đoạn PCR được tiêu hóa tương ứng với endonucleaza hạn chế *EcoRI* và *PstI* và sau đó được liên kết với plasmit được tiêu hóa tương tự pK18mobsacB (Số gia nhập ngân hàng gen: FJ437239) để thu được các plasmit tương ứng pK18-MviNZ, pK18-MviNB, pK18-MviN9 và pK18-MviN2. Khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi ATGCTGCGCCGTTTATTTAT (SEQ ID NO: 12) và ATAAATAAACGGCGCAGCAT (SEQ ID NO: 13) tương ứng với pK18-MviNZ, pK18-MviN9 và pK18-MviN2 là khuôn mẫu; khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi TGATGCTGCACCGTTTATTT (SEQ ID NO: 14) và AAATAAACGGTGCAGCATCA (SEQ ID NO: 15) với pK18-MviNB là khuôn mẫu. Các sản phẩm PCR đều được tự phân giải bằng cách sử dụng bộ nhân bản một bước ClonExpress II (Nanjing Vazyme Biotech Co., Ltd., Trung Quốc) để thu được các đột biến MviN P346L trong các plasmit tương ứng. Các plasmit đột biến đã được viết tắt là pK18-MviNZ^{P346L}, pK18-MviNB^{P346L}, pK18-MviN9^{P346L} và pK18-MviN2^{P346L}. Khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi TCTGCCAGAGGTCCAAAAC (SEQ ID NO: 16) và AGTTTTGGACCTCTGGCAGA (SEQ ID NO: 17) với pK18-MviNZ, pK18-MviNB và pK18-MviN9 là khuôn mẫu; khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi TTTGCCGGAGGTCCAAAAC (SEQ ID NO: 18) và AGTTTTGGACCTCCGGCAAA (SEQ ID NO: 19) với pK18-MviN2 là khuôn mẫu. Các sản phẩm PCR đều được tự phân giải bằng cách sử dụng bộ nhân bản một bước ClonExpress II (Nanjing Vazyme Biotech Co., Ltd., Trung Quốc) để thu được các đột biến MviN V599F trong các plasmit tương ứng. Các plasmit đột biến đã được viết tắt là pK18-MviNZ^{P346L}, pK18-MviNB^{P346L}, pK18-MviN9^{P346L} và pK18-MviN2^{P346L}.

Plasmit pK18-MviNZ, pK18-MviNB, pK18-MviN9, pK18-MviN2, pK18-MviNZ^{P346L}, pK18-MviNB^{P346L}, pK18-MviN9^{P346L}, pK18-MviN2^{P346L}, pK18-MviNZ^{V599F}, pK18-MviNB^{V599F}, pK18-MviN9^{V599F} và pK18-MviN2^{V599F} được đưa vào các tế bào Z188 và B253 có khả năng (trong đó, pK18-MviNZ không cần được đưa vào Z188 và pK18-MviNB không cần được đưa vào B253). Sau khi nuôi cấy qua đêm trong môi trường LBG (10 g/L glucoza, 5 g/L bột men, 10 g/L pepton và 10 g/L natri clorua), các dòng vô tính kháng kanamycin được chọn trên đĩa rắn LBG có chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi chọn lọc, các dòng vô tính được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LBG chứa 10 g/L sucroza và trải trên đĩa rắn LBG chứa 10 g/L sucroza để chọn các dòng vô tính còn sống, và nó được xác minh bằng cách sử dụng đĩa rắn LBG có chứa kanamycin (25 mg/L) rằng chúng đã mất các gen kháng kanamycin và do đó không thể phát triển. Các gen nhân bản thu được bằng cách khuếch đại MF và MR1 được giải trình

tự để chọn lọc các dòng vô tính trong đó gen MviN ban đầu trong bộ gen của Z188 hoặc B253 được thay thế hoàn toàn bằng MviN tương ứng và chất đột biến của nó từ các nguồn khác nhau, do đó thu được các chủng Z188-MviNB, Z188-MviN9, Z188-MviN2, Z188-MviNZ^{P346L}, Z188-MviNB^{P346L}, Z188-MviN9^{P346L}, Z188-MviN2^{P346L}, Z188-MviNZ^{V599F}, Z188-MviNB^{V599F}, Z188-MviN9^{V599F} và Z188-MviN2^{V599F}, và chủng B253-MviNZ, B253-MviN9, B253-MviN2, B253-MviNZ^{P346L}, B253-MviNB^{P346L}, B253-MviN9^{P346L}, B253-MviN2^{P346L}, B253-MviNZ^{V599F}, B253-MviNB^{V599F}, B253-MviN9^{V599F} và B253-MviN2^{V599F}.

Ví dụ 2. Sự biểu hiện quá mức của các chất đột biến gen MviN khác nhau bằng cách sử dụng Plasmid trong *Corynebacterium glutamicum* chủng Z188 và B253

Gen MviN và chất đột biến của chúng đầu tiên được nhân bản từ các chủng khác nhau. Khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn môi MV-F (SEQ ID NO: 20 CTCGATGGAATTCCGTTAAGGCGCGCACTCGTACATGAATGGTC) và MV-R (SEQ ID NO: 21 CGCGGGATCCTTACCAACCAACGAGTTGTACTTCAGCGATC) với bộ gen tương ứng Z188-MviNZ^{P346L}, Z188-MviNZ^{V599F}, B253-MviNB^{P346L} và B253-MviNB^{V599F} là khuôn mẫu. Các sản phẩm khuếch đại đã được tiêu hóa với *EcoRI* và *BamHI* và sau đó mỗi lần liên kết với plasmid pEC-XK99E (Kirchner O, *Tauch A. J Biotechnol.* 2003, 104(1-3): 287-299) tương tự tiêu hóa tương ứng với *EcoRI* và *BamHI* để thu được pEC-MviNZ^{P346L} và pEC-MviNZ^{V599F}, cũng như pEC-MviNB^{P346L} và pEC-MviNB^{V599F}. Ngoài ra, plasmid pEC-XK99E được tiêu hóa với *EcoRI* và *BamHI* đã tự liên kết sau khi các đầu tận cùng được lấp đầy để thu được plasmid đối chứng không có gen MviN, được viết tắt là pEC. Plasmid pEC, pEC-MviNZ^{P346L} và pEC-MviNZ^{V599F} được chuyển đổi thành Z188 tương ứng thu được chủng Z188(pEC), Z188(pEC-MviNZ^{P346L}) và Z188 (pEC-MviNZ^{V599F}). Plasmid pEC, pEC-MviNB^{P346L} và pEC-MviNB^{V599F} được chuyển đổi thành B253 tương ứng thu được chủng B253(pEC), B253(pEC-MviNB^{P346L}) and B253(pEC-MviNB^{V599F}).

Ví dụ 3. Thử nghiệm lên men vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* Z188 và chủng đột biến gen MviN của chúng để tạo ra axit glutamic

Chủng Z188 và chủng Z188-MviNB, Z188-MviN9, Z188-MviN2, Z188-MviNZ^{P346L}, Z188-MviNB^{P346L}, Z188-MviN9^{P346L}, Z188-MviN2^{P346L}, Z188-MviNZ^{V599F}, Z188-MviNB^{V599F}, Z188-MviN9^{V599F} và Z188-MviN2^{V599F} với MviN được đột biến trong bộ gen, cũng như chủng Z188 (pEC-MviNZ^{P346L}) và Z188 (pEC-MviNZ^{V599F}) biểu hiện quá mức chất đột biến MviNZ bằng cách sử dụng plasmid và chủng đối chứng Z188 (pEC) của nó, đã được kiểm tra mức độ sản xuất axit glutamic bằng cách lên men sử dụng đĩa 96 giếng. Môi trường cấy chứa 50 g/L glucoza, 0,7 g/L

axit photphoric, 0,8 g/L magiê sulfat heptahydrat, 10 g/L amoni sulfat, 84 g/L axit 3-(N-morpholino)propanesulfonic, bột ngô 3 N, 10 N urê, 1 N pepton và 0,5 N bột men, và giá trị pH được điều chỉnh thành 7,0 bằng natri hydroxit. Môi trường lên men và môi trường hạt giống khác nhau ở chỗ không thêm pepton và bột nấm men vào môi trường lên men. Trong nuôi cấy Z188(pEC), Z188 (pEC-MviNZ^{P346L}) và Z188 (pEC-MviNZ^{V599F}), isopropyl thiogalactopyranosit (IPTG) được thêm vào ở nồng độ cuối cùng là 0,1 mM, và kanamycin ở nồng độ cuối cùng là 25 µg/L. Sau khi được nuôi cấy trong môi trường cấy qua đêm, chủng này được cấy vào môi trường lên men với lượng 10%. Mỗi giếng của đĩa 96 giếng chứa 150 µL môi trường lên men, và thí nghiệm đối với mỗi chủng được thực hiện ba lần. Nhiệt độ nuôi cấy là 30°C, và tốc độ quay của máy lắc là 800 vòng/phút. Sau 33 giờ nuôi cấy, hiệu suất axit glutamic và tỷ lệ chuyển đổi của glucoza thành axit glutamic được đo, và một số kết quả được thể hiện trong Bảng 1 và Bảng 2. Như có thể thấy từ Bảng 1 và Bảng 2, việc đưa MviN với vùng đột biến P346L hoặc V599F từ các nguồn khác nhau vào bộ gen hoặc biểu hiện quá mức MviN với vùng đột biến P346L hoặc V599F bằng cách sử dụng plasmit có thể làm tăng mức độ sản xuất axit glutamic của chủng, và tỷ lệ chuyển đổi tương đối tăng 15,77 đến 22,29%. Ngoài ra, tỷ lệ chuyển đổi của axit glutamic tương đối tăng 9,06 đến 22,18% đối với chủng trong đó đột biến điểm P346L hoặc V599F được đưa vào bộ gen so với Z188-MviNB, Z188-MviN9 và Z188-MviN2.

Bảng 1. Mức sản xuất axit glutamic bằng cách lên men các chất đột biến khác nhau của bộ gen Z188

Chủng	Axit glutamic (g/L)	Tỷ lệ chuyển đổi (g axit glutamic/g glucoza,%)	Tỷ lệ chuyển đổi tăng phần trăm so với Z188 (pEC) (%)
Z188	16,60±0,35	25,78±0,36	/
Z188-MviNZP346L	17,20±0,24	31,50±0,21	22,18
Z188-MviNZV599F	18,20±0,35	30,44±0,38	18,07
Z188-MviNB	16,90±0,34	26,38±0,32	/
Z188-MviNBP346L	18,83±0,35	31,59±0,47	19,73
Z188-MviNBV599F	19,34±0,35	30,13±0,65	14,21
Z188-MviN9	17,00±0,41	25,98±0,41	/
Z188-MviN9P346L	18,03±0,35	30,72±0,65	18,24
Z188-MviN9V599F	19,24±0,35	29,13±0,14	12,12
Z188-MviN2	17,02±0,25	26,18±0,27	/

Z188-MviN2P346L	18,23±0,35	30,88±0,71	17,95
Z188-MviN2V599F	19,89±0,35	28,55±0,27	9,06

Bảng 2. Mức sản xuất axit glutamic bằng cách lên men chủng Z188 (pEC), Z188 (pEC-MviNZ^{P346L}) and Z188 (pEC-MviNZ^{V599F})

Chủng	Axit glutamic (g/L)	Tỷ lệ chuyển đổi (g axit glutamic/g glucoza,%)	Tỷ lệ chuyển đổi tăng phần trăm so với Z188 (pEC) (%)
Z188 (pEC)	15,30±0,42	24,41 ±0,16	/
Z188 (pEC-MviNZV599F)	16,73±0,61	28,26±0,55	15,77
Z188 (pEC-MviNZP346L)	17,25 ±0,30	29,85 ±0,23	22,29

Ví dụ 4. Thử nghiệm lên men vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* B253 và chủng đột biến gen MviN của chúng để tạo ra lysin

Chủng B253 và chủng B253-MviNZ, B253-MviN9, B253-MviN2, B253-MviNZ^{P346L}, B253-MviNB^{P346L}, B253-MviN9^{P346L}, B253-MviN2^{P346L}, B253-MviNZ^{V599F}, B253-MviNB^{V599F}, B253-MviN9^{V599F} and B253-MviN2^{V599F} với MviN được đột biến trong bộ gen, cũng như chủng B253 (pEC-MviNB^{P346L}) và B253 (pEC-MviNB^{V599F}) biểu hiện quá mức chất đột biến MviNZ bằng cách sử dụng plasmit và chủng đối chứng B253 (pEC) của nó, đã được kiểm tra mức độ sản xuất axit glutamic bằng cách lên men sử dụng đĩa 96 giếng. LBG được sử dụng làm môi trường hạt giống, và môi trường lên men bao gồm các thành phần sau: 80 g/L glucoza; 8 g/L men bột; 9 g/L urê; 1,5 g/L K₂HPO₄; 0,01 g/L MnSO₄; 0,6 g/L MgSO₄; 0,01 g/L FeSO₄; và 42 g/L MOPS. Trong nuôi cấy B253 (pEC), B253 (pEC-MviNB^{P346L}) và B253 (pEC-MviNB^{V599F}), IPTG đã được thêm vào ở nồng độ cuối cùng là 0,1 mM, và kanamycin ở nồng độ cuối cùng của 25 µg/L. Chủng này đầu tiên được cấy vào môi trường LBG để nuôi cấy qua đêm. Môi trường nuôi cấy được cấy vào đĩa giếng sâu 96 giếng chứa 150 µL môi trường lên men cho mỗi giếng hạt giống với lượng 5%, và được nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ. Tốc độ quay của máy lắc là 800 vòng/phút. Thí nghiệm cho mỗi chủng được thực hiện ba lần. Sau khi lên men, hiệu suất lysin và tỷ lệ chuyển đổi glucoza thành lysin được đo. Kết quả của các thử nghiệm biểu hiện quá mức của các chất đột biến MviNB bằng các chủng sử dụng plasmit được thể hiện trong Bảng 3 và Bảng 4. Có thể thấy rằng MviN biểu hiện quá mức với vùng đột biến P346L hoặc V599F bằng cách sử dụng plasmit có thể làm tăng mức độ sản xuất lysin của chủng, và tỷ lệ chuyển đổi tương đối tăng 7,48%. Tỷ lệ chuyển đổi của lysin tương đối tăng 5,23 đến 8,22% đối với chủng trong đó đột biến điểm P346L hoặc V599F được đưa vào bộ gen so với B253, B253-

MviNZ, B253-MviN9 và B253-MviN2.

Bảng 3. Mức sản xuất lysin bằng cách lên men B253 (pEC), B253 (pEC-MviNB^{P346L}) và B253 (pEC-MviNB^{V599F})

Chủng	Lysin (g/L)	Tỷ lệ chuyển đổi (g lysin/g glucoza, %)	Tỷ lệ chuyển đổi tăng phần trăm so với B253 (pEC) (%)
B253 (pEC)	14,7±0,14	29,4 ±0,28	/
B253(pEC-MviNBV599F)	15,8±0,28	31,6±0,57	7,48
B253(pEC-MviNBP346L)	15,8 ±0,00	31,6 ±0,00	7,48

Bảng 4. Mức sản xuất lysin bằng cách lên men các chất đột biến khác nhau của bộ gen B253

Chủng	Lysin (g/L)	Tỷ lệ chuyển đổi (g lysin/g glucoza, %)	Tỷ lệ chuyển đổi tăng phần trăm so với B253 (pEC) (%)
B253	15,7±0,14	30,4±0,28	/
B253-MviNZP346L	16,1±0,28	32,9±0,40	8,22
B253-MviNZV599F	16,3±0,32	32,7±0,42	7,57
B253-MviNB	15,3±0,24	31,0±0,28	/
B253-MviNBP346L	16,4±0,10	33,5±0,33	8,06
B253-MviNBV599F	16,3±0,00	33,2±0,33	7,10
B253-MviN9	14,9±0,51	30,9±0,43	/
B253-MviN9P346L	16,0±0,00	33,1±0,03	7,12
B253-MviN9V599F	16,2±0,02	32,9±0,23	6,47
B253-MviN2	15,6±0,44	30,6±0,27	/
B253-MviN2P346L	16,1±0,08	32,5±0,25	6,21
B253-MviN2V599F	16,3±0,00	32,2±0,51	5,23

Các ví dụ theo sáng chế đã được mô tả ở trên. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn trong các ví dụ trên. Mọi sửa đổi, tương đương, cải biến và các loại tương tự được thực hiện mà không xuất phát từ tinh thần và nguyên tắc theo sáng chế sẽ thuộc phạm vi bảo hộ theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất đột biến protein flippaza lipid II xuyên màng (MviN), khác biệt ở chỗ trình tự axit amin của chất đột biến protein là trình tự amin tương ứng với bất kỳ một trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8 chỉ prolin tại vị trí 346 được thế bằng leuxin, hoặc trình tự axit amin tương ứng với bất kỳ một trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8 chỉ valin tại vị trí 599 được thế bằng phenylalanin.

2. Gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN theo điểm 1.

3. Vật chủ trung gian biểu hiện bao gồm gen mã hóa theo điểm 2.

4. Tế bào chủ khác biệt ở chỗ bằng biểu hiện chất đột biến protein MviN theo điểm 1 hoặc bao gồm gen mã hóa theo điểm 2.

5. Tế bào chủ theo điểm 4, khác biệt ở chỗ tế bào chủ bao gồm vật chủ trung gian biểu hiện cho gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN hoặc gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ.

6. Tế bào chủ theo điểm 4 hoặc điểm 5, khác biệt ở chỗ tế bào chủ có nguồn gốc từ *Corynebacterium*.

7. Phương pháp điều chế axit glutamic hoặc lysin bao gồm các bước sau:

a. đưa gen mã hóa cho chất đột biến protein MviN vào *Corynebacterium glutamicum* sản xuất axit glutamic hoặc vào *Corynebacterium glutamicum* sản xuất lysin để xây dựng tế bào chủ theo bất kỳ một trong số các điểm 4 đến điểm 6;

b. nuôi cấy tế bào chủ được xây dựng ở bước a để tạo ra chất lỏng nuôi cấy có chứa axit glutamic hoặc lysin; và

c. tùy chọn phân lập axit glutamic hoặc lysin được tạo ra từ chất lỏng nuôi cấy của bước b.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học công nghiệp Tianjin, Viện Khoa học Trung Quốc

<120> CHẤT ĐỘT BIẾN PROTEIN MVIN, VẬT CHỦ TRUNG GIAN BIỂU HIỆN VÀ TẾ BÀO CHỦ BAO GỒM CHẤT ĐỘT BIẾN NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ AXIT GLUTAMIC HOẶC LYSIN

<130> CPWO19111096

<141> 2019-08-13

<160> 21

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 3345

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```
atgaatggtc aacaagtgag ttcttcgctt tcgaataatt cggagcagtc cggcctgcgt
60
agcaggatcg ttgctccagc accgccggcg cctgtgcccg aggcgcgcaa gaaggctgtc
120
gcacgcacgg atggtgatcg ctcgagtttg aaaaactcgc ctacggcatc cgccaccag
180
gcagcccaga cgcgcccggc agaaccggaa ccagaaaagc acacctccga ttctgatgtg
240
gtgcgctcga ctggctccat ggcaatagcc acgctgctga gtcgtatcac cggtttctgt
300
cgcaccgtga tgattggtgc ggcgctgtcg ccggctatcg cgtcggcggt caacactgcc
360
aacacgctgc ccaacctgat cactgaaatc gtgttggtg cggctgtgac atcgctgggt
420
attccggtgc ttaccgcgc ggaaaaggaa gacgccgacg gcggttccgg gttcttcagg
480
cggctgctca ccctgtcggg gacgctgctg ggtggtgtca ccatcctgtc gattatcggc
540
gcgccgctgc tgacacggat gatgctgtcc tctgagggac aagtcaacgt ggtcatgtcc
600
acggcctttg cgtattggct gctgccacag attttcttct acggcctgtt tgccctgttc
660
atggctgtgt tgaacaccg tgaagtgttc aaaccggcg cgtgggcacc tgttgtaaac
720
aatgtgatca ccttgaccgt gctgggcgtg tacatggtgc tgccctgcgcg tttgcaccgcg
780
catgagcagg tgggcatttt tgatccgcag atcgttttcc tcggcgtggg caccaccctt
840
ggtgtggttg cacagtgtct aatcatgatt ccgtacctgc gtcgcgcggg cattgatatg
900
cgccactgt ggggtatcga tgcgcgtttg aagcagttcg gtggcatggc catggcgatc
960
atcgtgtacg tggcgatctc ccagttcggg tacatcatca ccactcgat tgccctactg
1020
gcagacgatg ctgcgccgtt tatttatcag cagcactgga tgttgctgca agttccttat
1080
ggcatcatcg gcgtcacctt gctcaccgcg attatgccgc gactgtcccg caacgcggga
1140
```

gacggcgatg atagggcagt agtctctgac cttcagttgg gttctaagct aaccttcac
1200
gcactgatcc ccatcggtgt gtttttcacc gccttcggtg tccctattgc caatggcctt
1260
tttgcctacg gccaatcga tgccaacgcc gccaacatcc ttggttggac tctgagcttc
1320
tctgctttca cgctgattcc ttacgctttg gtgctgctac atctgctgtg gttttatgag
1380
cgtgaagagg tctggacccc aaccttcac atcgccggca tcaccgccac caaggtcgtg
1440
ctgtccctgt tggcacccgt gctctcgagc tccccagagc gcgtagtagt tcttcttggg
1500
gcggccaaag gcttcagttt catcacccgc gcggtcatcg gcgctatct gttacgcaag
1560
aaactcggcc tggtgggtat gcgctctttg gctaaaacct ccctgtgggc gttgggctct
1620
gcggcggttg gtgcagcagc agcatgggag ttgggggtggc tgattcaagc cgtcgtgggc
1680
gatttcttgc tgggcactct aagctccgta ggctacttgt tgtacctggc tgtgctgggt
1740
gtcttcttca tcatcgctac cggcatcgtg ctgtcacgtt ctggtctgcc agaggtccaa
1800
aacttaggcc aggcaactgac ccgcatcccg ggtatgggtc gctttattcg cccgaacacc
1860
aagatctctt tggatgtcgg cgaagtctcc cagcaggatt tctccacca gctggtcgca
1920
ccaagcgagt tctccgaac ccctgttccg ccaccaatgt ctgccggtat tgtccgcgga
1980
cctcgcctgg ttccgggtgc ccagtcagc gacggtcgtt tccgcttgcg cgccgatcac
2040
ggcggcgctc aggggtgcgcg tttctggcag gcccgcgaga tcgccaccgg caaggaagtc
2100
gcgctgatct ttgtggatac ttccggcaac gcccatttg cgccactgtc ttccggcagcc
2160
gcagcgggca tcgcctacga ggtgcagcgc cgaccaaga agctggccag cttgggcagc
2220
ttggcggttg cccccaatat ccactccgag gcgtaccgca acggttgctt cattgtggcc
2280
gattgggtgc ctggctccag cttgagcgcc gtcgcggaat ccggtgccga tccccgcgcc
2340
gccgcgttcg cgctcgcgga actaactgaa accatcggcg agggccacga gatgggtatc
2400
ccggccggct tggacaacaa gtgccgcac cgcatcaaca ccgacggcca tgccgtctc
2460
gccttcccgg cgattttgcc caatgcctca gagctccgcg acgccaagtc cctggcctcg
2520
gccgccgaga tgcttatcga cgcgaccctc gctcccagcg acgtcaaggc aatggctcact
2580
gaagcccagg ggctagctac agaagacaat cccgattacg catcacttgc catggcgatg
2640
cgcacctgcg gactgttcac cgaggaacca acccaccttg tggatgaaga ggaaaagaca
2700
ccaaagcctg cgacacgtga tggtttcggt gcctccgact acaccgtcaa gggcatggca
2760
gccatcgccg ctgtggtgat catcttggtc tccctgggtg ctgccggtac cgcgttcctc
2820
accagcttct tcggcagcag caccaacgaa caatccccgt tggcctctgt tgaagccacc
2880
acttctgcaa caccagaacc tgtggggcca ccggtctacc tggatctgga tcaagcccgc
2940

acgtgggatg acggtgcagg aacagatgtc accgacgtca ccgacggcaa cacctccacc
 3000
 gcatggacct ccaccggcgg cgacggcctc ctagttgacc tgtccacgcc tgcccgcctc
 3060
 gaccgctca tcttgaccac cggcaccggc tccgacagca acgtgacctc gaccgtgaag
 3120
 atctacgcat tcaacgacgc ctcaccacac tccctgtcgg aaggcatcga gatcggcacc
 3180
 gtggattatt ccggccgcag tctcagccac agcatccgtg attcctccaa gcttccgggt
 3240
 caggtggaat ccgtggtgat tctggtcgat gaggttcatt cctcacaac ctcagacacc
 3300
 aatccacaga tgcagatcgc tgaagtacaa ctcgttggtt ggtaa
 3345

<210> 2

<211> 1114

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

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

```

Ile Val Tyr Val Ala Ile Ser Gln Phe Gly Tyr Ile Ile Thr Thr Arg
      325                      330                      335
Ile Ala Ser Leu Ala Asp Asp Ala Ala Pro Phe Ile Tyr Gln Gln His
      340                      345                      350
Trp Met Leu Leu Gln Val Pro Tyr Gly Ile Ile Gly Val Thr Leu Leu
      355                      360                      365
Thr Ala Ile Met Pro Arg Leu Ser Arg Asn Ala Ala Asp Gly Asp Asp
      370                      375                      380
Arg Ala Val Val Ser Asp Leu Gln Leu Gly Ser Lys Leu Thr Phe Ile
385                      390                      395                      400
Ala Leu Ile Pro Ile Val Val Phe Phe Thr Ala Phe Gly Val Pro Ile
      405                      410                      415
Ala Asn Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gln Phe Asp Ala Asn Ala Ala Asn
      420                      425                      430
Ile Leu Gly Trp Thr Leu Ser Phe Ser Ala Phe Thr Leu Ile Pro Tyr
      435                      440                      445
Ala Leu Val Leu Leu His Leu Arg Val Phe Tyr Ala Arg Glu Glu Val
      450                      455                      460
Trp Thr Pro Thr Phe Ile Ile Ala Gly Ile Thr Ala Thr Lys Val Val
465                      470                      475                      480
Leu Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Ser Ser Pro Glu Arg Val Val
      485                      490                      495
Val Leu Leu Gly Ala Ala Asn Gly Phe Ser Phe Ile Thr Gly Ala Val
      500                      505                      510
Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Arg Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Met Arg
      515                      520                      525
Ser Leu Ala Lys Thr Ser Leu Trp Ala Leu Gly Ser Ala Ala Val Gly
      530                      535                      540
Ala Ala Ala Ala Trp Ala Leu Gly Trp Leu Ile Gln Ala Val Val Gly
545                      550                      555                      560
Asp Phe Leu Leu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Tyr Leu Leu Tyr Leu
      565                      570                      575
Ala Val Leu Gly Val Phe Phe Ile Ile Val Thr Gly Ile Val Leu Ser
      580                      585                      590
Arg Ser Gly Leu Pro Glu Val Gln Asn Leu Gly Gln Ala Leu Thr Arg
      595                      600                      605
Ile Pro Gly Met Gly Arg Phe Ile Arg Pro Asn Thr Lys Ile Ser Leu
      610                      615                      620
Asp Val Gly Glu Val Ser Gln Gln Asp Phe Ser Thr Gln Leu Val Ala
625                      630                      635                      640
Pro Ser Glu Phe Ser Ala Thr Pro Val Pro Pro Pro Met Ser Ala Gly
      645                      650                      655
Ile Val Arg Gly Pro Arg Leu Val Pro Gly Ala Pro Val Ser Asp Gly
      660                      665                      670
Arg Phe Arg Leu Leu Ala Asp His Gly Gly Val Gln Gly Ala Arg Phe
      675                      680                      685
Trp Gln Ala Arg Glu Ile Ala Thr Gly Lys Glu Val Ala Leu Ile Phe
      690                      695                      700
Val Asp Thr Ser Gly Asn Ala Pro Phe Ala Pro Leu Ser Ser Ala Ala
705                      710                      715                      720
Ala Ala Gly Ile Ala Tyr Glu Val Gln Arg Arg Thr Lys Lys Leu Ala
      725                      730                      735
Ser Leu Gly Ser Leu Ala Val Ala Pro Asn Ile His Ser Glu Ala Tyr
      740                      745                      750
Arg Asn Gly Cys Leu Ile Val Ala Asp Trp Val Pro Gly Ser Ser Leu
      755                      760                      765
Ser Ala Val Ala Glu Ser Gly Ala Asp Pro Arg Ala Ala Ala Phe Ala
      770                      775                      780
Leu Ala Glu Leu Thr Glu Thr Ile Gly Glu Ala His Glu Met Gly Ile
785                      790                      795                      800
Pro Ala Gly Leu Asp Asn Lys Cys Arg Ile Arg Ile Asn Thr Asp Gly

```

```

      805              810              815
His Ala Val Leu Ala Phe Pro Ala Ile Leu Pro Asn Ala Ser Glu Leu
      820              825              830
Arg Asp Ala Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ala Glu Met Leu Ile Asp Ala
      835              840              845
Thr Leu Ala Pro Ser Asp Val Lys Ala Met Val Thr Glu Ala Gln Gly
      850              855              860
Leu Ala Thr Glu Asp Asn Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Ala Met Ala Met
865              870              875              880
Arg Thr Cys Gly Leu Phe Thr Glu Glu Pro Thr His Leu Val Val Lys
      885              890              895
Lys Glu Lys Thr Pro Lys Pro Ala Thr Arg Asp Gly Phe Gly Ala Ser
      900              905              910
Asp Tyr Thr Val Lys Gly Met Ala Ala Ile Ala Ala Val Val Ile Ile
      915              920              925
Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Gly Thr Ala Phe Leu Thr Ser Phe Phe
      930              935              940
Gly Ser Ser Thr Asn Glu Gln Ser Pro Leu Ala Ser Val Glu Ala Thr
945              950              955              960
Thr Ser Ala Thr Pro Glu Pro Val Gly Pro Pro Val Tyr Leu Asp Leu
      965              970              975
Asp Gln Ala Arg Thr Trp Asp Asp Gly Ala Gly Thr Asp Val Thr Asp
      980              985              990
Val Thr Asp Gly Asn Thr Ser Thr Ala Trp Thr Ser Thr Gly Gly Asp
      995              1000              1005
Gly Leu Leu Val Asp Leu Ser Thr Pro Ala Arg Leu Asp Arg Val Ile
      1010              1015              1020
Leu Thr Thr Gly Thr Gly Ser Asp Ser Asn Val Thr Ser Thr Val Lys
1025              1030              1035              1040
Ile Tyr Ala Phe Asn Asp Ala Ser Pro His Ser Leu Ser Glu Gly Ile
      1045              1050              1055
Glu Ile Gly Thr Val Asp Tyr Ser Gly Arg Ser Leu Ser His Ser Ile
      1060              1065              1070
Arg Asp Ser Ser Lys Leu Pro Gly Gln Val Glu Ser Val Val Ile Leu
      1075              1080              1085
Val Asp Glu Val His Ser Ser Gln Thr Ser Asp Thr Asn Pro Gln Met
      1090              1095              1100
Gln Ile Ala Glu Val Gln Leu Val Gly Trp
1105              1110

```

<210> 3
 <211> 3345
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3
 atgaatggtc aacaagtgag ttcttcgctt tcgaataatt cggagcagtc cggcctgcgt
 60
 ggcaggatcg ttgctccagc accgccggcg cctgtgcccg aggcgcgcaa gaaggctgtc
 120
 gcacgcacgg atggtgatcg ctcgagtttg aaaaactcgc ctacggcatc cgccacgcag
 180
 gcagcccaga cgcgtccagc agaaccggaa ccagaaaagc acacctccga ttctgatgtg
 240
 gtgcgctcga ctggctccat ggcaatagcc acgctgctga gtcgtatcac cgttttctcg
 300
 cgcaccgtga tgattggtgc ggcgctgtcg ccggctatcg cgtcggcggtt caacactgcc
 360
 aacacgctgc ccaacctgat cactgaaatc gtgttgggtg cgggtgctgac atcgctggtt
 420

attccggtgc ttaccgcgc gaaaaaggaa gacgccgacg gcggttccgg gttcttcagg
480
cggctactca ccctgtcggg tacgctgctg ggtgggtgtca ccatcttgtc gattatcggc
540
gcgccgctgc tgacacggat gatgctgtcc tctgagggac aagtcaacgt ggtcatgtcc
600
acggcctttg cgtattgggt gctgccacag attatcttct acggcctggt tgccctgttc
660
atggctgtgt tgaacacccg tgaagtgttc aaacccggcg cgtgggcacc tgttgtcaac
720
aatgtgatca ccttgaccgt gctgggcgtg tacatgggtg tgccctgcgcg tttgcacccg
780
catgagcagg tgggcatttt tgatccgcag atcattttcc tcggcgtggg caccaccctt
840
ggtgtgggtg cacagtgtct aatcatgatt cgtacctgc gtcgcgcggg cattgatatg
900
cgccctctgt ggggtatcga tgcgcgtttg aagcaattcg gtggcatggc gatggcgatc
960
atcgtgtacg tggcaatctc ccagttcggg tacatcatca ccactcgtat tgccctactg
1020
gcagatgatg ctgcaccgtt tatttatcag caacactgga tgttgttgca ggttccttat
1080
ggcatcatcg gcgtcacttt actcaccgcg attatgccgc gactgtcccg caacgccgcg
1140
gacggcgacg atagggcagt ggtctctgac cttcagttgg gttccaagct gaccttcatt
1200
gcattgatcc cgatcgtggg gtttttcacc gccttcgggt tgccgattgc caatggcctt
1260
tttgccacg gccaatcga ttccaccgcc gctaacaatc ttgggttgga gttgagcttc
1320
tctgctttca cgttgattcc ttacgctttg gtgctgctgc atttgctgtg gttttatgcg
1380
cgtgaagagg tctggacccc aaccttcac atcgccggca tcaccgccac caaggtcgtg
1440
ctttccctgt tggcaccgct gctctcgagc tcccagagc gtgtgggtgg gcttcttggg
1500
gcggccaacg gcttcagttt catcaccggc gcggtcatcg gcgcgtatct gttgcgcaag
1560
aaactcggcc tgttggttat gcgctctttg gctaaaacct ccctgtgggc gttgggctct
1620
gcggcggttg gtgcagcagc agcatgggcg ttgggggtgg tgattcaagc cgtcgtgggc
1680
gatttcttgc tgggcactct aagctccgta ggctacttgt tgtacctggc tgtgttgggt
1740
gtcttcttca tcatcgtcac cggcatcgtg ctgtcacgtt ctggtctgcc agaggtccaa
1800
aacttaggcc aggcactgac ccgcatcccg ggtatgagtc gctttattcg cccgaacacc
1860
aagatctctt tggatgtcgg cgaagtctcc cagcaagatt tctccacca gctggtcgca
1920
ccaagcgagt tctccgaac ccctgttccg ccaccaatgt ctgccggtat tgtccgcgga
1980
cctcgcctgg ttccgggtgc ccagtcagc gacggtcgct tccgcttgct cgccgatcac
2040
ggcggcgtcc aggggtgcgcg tttctggcag gcccgcgaga tcgccaccgg caaggaagtc
2100
gcgctgatct tcgtggatac ttccggcaac gcccatttg cgccactgtc ttcggcagcc
2160
gcagcgggca tcgcctacga ggtgcagcgc cgcaccaaga agctggccag cttgggcagc
2220

ttggcgggtgg cccccaatat ccactccgag gcgtaccgca acggttgccct cattgtggcc
 2280
 gattgggtgc ctggctccag cttgagcgcc gtgcgcgaat ccggtgccga tccccgcgcc
 2340
 gccgcgttcg cgctcgcgga actaactgaa accatcggcg aggcccacga gatgggtatc
 2400
 ccggccggct tggacaacaa gtgccgcctc cgcatacaaca ccgacggcca tgccgtcctc
 2460
 gccttcccgg cgattttgcc cgatgcctca gagctccgcg acgccaagtc cctggcctct
 2520
 gccaccgaga tgcttatcga cgcaaccctc gctcccagcg acgttaaggc aatggctact
 2580
 gaagcccagg ggctagctac agaagacaat cccgattacg catcacttgc catggcgatg
 2640
 cgcacctgcg gactgttcac cgaggaacca acccaccttg tggatgaagaa gaaaagaca
 2700
 ccaaagcccg ccaagcgcg cggcttcggc gcctccgact acaccgtcaa gggcatggca
 2760
 gccatcgccg ctgtggtgat catcttggtt tccctggtgg ctgccggtac cgcgttcctc
 2820
 accagcttct tcggcagcag caccaacgaa caatcccat tggcttctgt tgaagccacc
 2880
 acctctgcaa caccagaacc tgtggggcca ccggtctacc tggatctgga tcaagcccgc
 2940
 acgtgggatg acggtgcagg aacagatgtc accgacgtca ccgacggcaa cacctccacc
 3000
 gcatggacct ccaccggcgg cgacggcctc ctagttgacc tgtccacgcc tgcccgcctc
 3060
 gaccgcgtca tcttgaccac cggcacgggc tccgacagca acgtgacctc gaccgtgaag
 3120
 atctacgcat tcaacgacgc ctcaccacac tccttgctcg aaggcatcga gatcggcacc
 3180
 gtggattatt ccggccgcag tctcagccac agcatccgcg attcctccaa gcttccgggt
 3240
 caggtggaat ccgtggtgat tctggtcgat gaggttcatt cctcacaac ctcagacacc
 3300
 aatccacaga tgcagatcgc tgaagtacaa ctcgttggtt ggtaa
 3345

<210> 4
 <211> 1114
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
 Met Asn Gly Gln Gln Val Ser Ser Ser Leu Ser Asn Asn Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Ser Gly Leu Arg Gly Arg Ile Val Ala Pro Ala Pro Pro Ala Pro Val
 20 25 30
 Pro Glu Ala Arg Lys Lys Ala Val Ala Arg Thr Asp Gly Asp Arg Ser
 35 40 45
 Ser Leu Lys Asn Ser Pro Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Gln Thr
 50 55 60
 Arg Pro Ala Glu Pro Glu Pro Glu Lys His Thr Ser Asp Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Thr Gly Ser Met Ala Ile Ala Thr Leu Leu Ser Arg Ile
 85 90 95
 Thr Gly Phe Leu Arg Thr Val Met Ile Gly Ala Ala Leu Ser Pro Ala
 100 105 110
 Ile Ala Ser Ala Phe Asn Thr Ala Asn Thr Leu Pro Asn Leu Ile Thr
 115 120 125

Glu	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Ile	Pro	Val	Leu
130						135					140				
Thr	Arg	Ala	Glu	Lys	Glu	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg
145					150					155					160
Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Ile	Leu
				165						170				175	
Ser	Ile	Ile	Gly	Ala	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Met	Met	Leu	Ser	Ser	Glu
			180					185					190		
Gly	Gln	Val	Asn	Val	Val	Met	Ser	Thr	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp	Leu	Leu
		195					200					205			
Pro	Gln	Ile	Ile	Phe	Tyr	Gly	Leu	Phe	Ala	Leu	Phe	Met	Ala	Val	Leu
	210					215					220				
Asn	Thr	Arg	Glu	Val	Phe	Lys	Pro	Gly	Ala	Trp	Ala	Pro	Val	Val	Asn
225					230					235					240
Asn	Val	Ile	Thr	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Val	Tyr	Met	Val	Leu	Pro	Ala
				245					250					255	
Arg	Leu	His	Pro	His	Glu	Gln	Val	Gly	Ile	Phe	Asp	Pro	Gln	Ile	Ile
			260					265					270		
Phe	Leu	Gly	Val	Gly	Thr	Thr	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Ile
		275					280					285			
Met	Ile	Pro	Tyr	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Ile	Asp	Met	Arg	Pro	Leu	Trp
	290					295					300				
Gly	Ile	Asp	Ala	Arg	Leu	Lys	Gln	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Met	Ala	Ile
305					310					315					320
Ile	Val	Tyr	Val	Ala	Ile	Ser	Gln	Phe	Gly	Tyr	Ile	Ile	Thr	Thr	Arg
				325					330					335	
Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gln	His
			340					345					350		
Trp	Met	Leu	Leu	Gln	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Leu
		355					360					365			
Thr	Ala	Ile	Met	Pro	Arg	Leu	Ser	Arg	Asn	Ala	Ala	Asp	Gly	Asp	Asp
	370					375					380				
Arg	Ala	Val	Val	Ser	Asp	Leu	Gln	Leu	Gly	Ser	Lys	Leu	Thr	Phe	Ile
385					390					395					400
Ala	Leu	Ile	Pro	Ile	Val	Val	Phe	Phe	Thr	Ala	Phe	Gly	Val	Pro	Ile
				405					410					415	
Ala	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Gln	Phe	Asp	Ser	Thr	Ala	Ala	Asn
			420					425					430		
Ile	Leu	Gly	Trp	Thr	Leu	Ser	Phe	Ser	Ala	Phe	Thr	Leu	Ile	Pro	Tyr
		435					440					445			
Ala	Leu	Val	Leu	Leu	His	Leu	Arg	Val	Phe	Tyr	Ala	Arg	Glu	Glu	Val
	450					455					460				
Trp	Thr	Pro	Thr	Phe	Ile	Ile	Ala	Gly	Ile	Thr	Ala	Thr	Lys	Val	Val
465					470					475					480
Leu</															

```

        610                615                620
Asp Val Gly Glu Val Ser Gln Gln Asp Phe Ser Thr Gln Leu Val Ala
625                630                635                640
Pro Ser Glu Phe Ser Ala Thr Pro Val Pro Pro Pro Met Ser Ala Gly
        645                650                655
Ile Val Arg Gly Pro Arg Leu Val Pro Gly Ala Pro Val Ser Asp Gly
        660                665                670
Arg Phe Arg Leu Leu Ala Asp His Gly Gly Val Gln Gly Ala Arg Phe
        675                680                685
Trp Gln Ala Arg Glu Ile Ala Thr Gly Lys Glu Val Ala Leu Ile Phe
        690                695                700
Val Asp Thr Ser Gly Asn Ala Pro Phe Ala Pro Leu Ser Ser Ala Ala
705                710                715                720
Ala Ala Gly Ile Ala Tyr Glu Val Gln Arg Arg Thr Lys Lys Leu Ala
        725                730                735
Ser Leu Gly Ser Leu Ala Val Ala Pro Asn Ile His Ser Glu Ala Tyr
        740                745                750
Arg Asn Gly Cys Leu Ile Val Ala Asp Trp Val Pro Gly Ser Ser Leu
        755                760                765
Ser Ala Val Ala Glu Ser Gly Ala Asp Pro Arg Ala Ala Ala Phe Ala
        770                775                780
Leu Ala Glu Leu Thr Glu Thr Ile Gly Glu Ala His Glu Met Gly Ile
785                790                795                800
Pro Ala Gly Leu Asp Asn Lys Cys Arg Ile Arg Ile Asn Thr Asp Gly
        805                810                815
His Ala Val Leu Ala Phe Pro Ala Ile Leu Pro Asp Ala Ser Glu Leu
        820                825                830
Arg Asp Ala Lys Ser Leu Ala Ser Ala Thr Glu Met Leu Ile Asp Ala
        835                840                845
Thr Leu Ala Pro Ser Asp Val Lys Ala Met Val Thr Glu Ala Gln Gly
        850                855                860
Leu Ala Thr Glu Asp Asn Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Ala Met Ala Met
865                870                875                880
Arg Thr Cys Gly Leu Phe Thr Glu Glu Pro Thr His Leu Val Val Lys
        885                890                895
Lys Glu Lys Thr Pro Lys Pro Ala Lys Arg Asp Gly Phe Gly Ala Ser
        900                905                910
Asp Tyr Thr Val Lys Gly Met Ala Ala Ile Ala Ala Val Val Ile Ile
        915                920                925
Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Gly Thr Ala Phe Leu Thr Ser Phe Phe
        930                935                940
Gly Ser Ser Thr Asn Glu Gln Ser Pro Leu Ala Ser Val Glu Ala Thr
945                950                955                960
Thr Ser Ala Thr Pro Glu Pro Val Gly Pro Pro Val Tyr Leu Asp Leu
        965                970                975
Asp Gln Ala Arg Thr Trp Asp Asp Gly Ala Gly Thr Asp Val Thr Asp
        980                985                990
Val Thr Asp Gly Asn Thr Ser Thr Ala Trp Thr Ser Thr Gly Gly Asp
        995                1000                1005
Gly Leu Leu Val Asp Leu Ser Thr Pro Ala Arg Leu Asp Arg Val Ile
        1010                1015                1020
Leu Thr Thr Gly Thr Gly Ser Asp Ser Asn Val Thr Ser Thr Val Lys
1025                1030                1035                1040
Ile Tyr Ala Phe Asn Asp Ala Ser Pro His Ser Leu Ser Glu Gly Ile
        1045                1050                1055
Glu Ile Gly Thr Val Asp Tyr Ser Gly Arg Ser Leu Ser His Ser Ile
        1060                1065                1070
Arg Asp Ser Ser Lys Leu Pro Gly Gln Val Glu Ser Val Val Ile Leu
        1075                1080                1085
Val Asp Glu Val His Ser Ser Gln Thr Ser Asp Thr Asn Pro Gln Met
1090                1095                1100

```

Gln Ile Ala Glu Val Gln Leu Val Gly Trp
 1105 1110

<210> 5
 <211> 3345
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 5
 atgaatggtc aacaagtgag ttcttcgctt tcgaataatt cggagcagtc cggcctgcgt
 60
 ggcaggatcg ttgctccagc accgccggcg cctgtgcccc aggcgcgcaa gaaggctgtc
 120
 gcacgcacgg atggtgatcg ctcgagtttg aaaaactcgc ctacggcatt cgccaccag
 180
 gcagcccaga cgctcttggc agaaccggaa ccagaaaagc acacctcga ttctgatgtg
 240
 gtgcgctcga ctggctccat ggcaatagcc acgtgtctga gtcgtatcac cggtttctctg
 300
 cgcaccgtga tgattggtgc ggcgctgtcg ccggctatcg cgtcggcggt caacactgcc
 360
 aacacgctgc ccaacctgat cactgagatc gtgttgggtg cgggtgtgac atcgtgtggt
 420
 attccggtgc ttaccgcgc ggaaaaagaa gacgccgacg gcggttccgg gttcttcagg
 480
 cggctgtcga cctgtcggg gacgtgtctg ggcggtgtca ccatcctgtc gattatcggc
 540
 gcgccgctgc tgacacggat gatgctgtcc tctgaggac aagtcaacgt ggtcatgtcc
 600
 acggcctttg cgtattggct gctgccacag attttcttct acggcctgtt tgccctgttc
 660
 atggctgtgt tgaacacccg tgaagtgttc aaaccggcg cgtgggcacc tgttgtcaac
 720
 aatgtgatca ccttgaccgt gctgggcgtg tacatggtgc tgcctgcgcg tttgcacccg
 780
 catgagcagg tgggcatttt tgatccgcag atcattttcc tcggcggtggg caccaccctt
 840
 ggtgtggttg cacagtgtct aatcatgatt ccgtacctgc gtcgcgcggg cattgatatg
 900
 cgccctctgt ggggtatcga tgcgcgtttg aagcagttcg gtggcatggc catggcgatc
 960
 atcgtgtacg tggcgatctc ccagttcggg tacatcatca ccactcgcatt tgcgtcgatt
 1020
 gcagacgatg ctgcgccgtt tatttatcag cagcactgga tgttgctgca agttccttat
 1080
 ggcattcatt gcgtcacctt gtcaccgcg attatgccgc gactgtcccg caacgcggca
 1140
 gacggcgacg atagggcagt agtctctgac cttcagttgg gttccaagct gaccttcatt
 1200
 gcactgatcc ccatcgtggt gttcttcacc gccttcggtg tccctattgc caatggcctt
 1260
 tttgcctacg gccaatcga tgccaacgcc gccaacatcc ttgggttgac tctgagcttc
 1320
 tctgctttca cgtgatctc ttacgctttg gtgctgtac atctgcgtgt gttttatgcg
 1380
 cgtgaagagg tctggacccc aaccttcatt atcgccggca tcaccgccac caaggctcgtg
 1440
 ctgtccctgt tggcaccgct gctgtcgagc tccccggagc gtgtgggtgt gttctctggt
 1500
 gcggccaacg gtttcagttt catcaccggc gcggtcatcg gcgcgtatct gttgcgcaag
 1560

aaactcggcc tgttgggtat gcgctctttg gctaaaacct ccctgtgggc gttgggctct
1620
gcggcggttg gtgcagcagc agcatgggcg ttgggggtggc tgattcaagc cgctgtgggc
1680
gatttcttgc tgggcactct aagctccgta ggctacttgt tgtacctggc tgtgttgggt
1740
gtcttcttca tcatcatcac cggcatcgtg ctgtcacgtt ctggctctgcc agaggtccaa
1800
aacttaggcc aggcaactgac ccgcatcccg ggtatgagtc gctttattcg cccgaacacc
1860
aagatctctt tggatgtcgg cgaagtctcc cagcaagatt tctccacca gctggtcgcg
1920
ccaagcgagt tctccgaac ccctgttccg ccaccaatgt ccgccggtat tgtccgcgga
1980
cctcgcctgg ttcccggcgc ccagtcggc gacggtcgct tccgcttgct tgccgatcac
2040
ggcggcgtcc aggggtgcacg tttctggcag gcccgcgaga tcgccaccgg caaggaagtc
2100
gcgctgatct tcgtggatac ttccggcaac gcccatttg cgccactgtc ttccggcagcc
2160
gcagcgggca tcgcctacga ggtgcagcgc cgcaccaaga agctggccag cttgggcagc
2220
ttggcgggtg cccccaatat ctactccgag gcgtaccgca acggttgctt cattgtggcc
2280
gattgggtgc ctggctccag cttgagcgcc gtcgcggaat ccggtgccga tccccgcgc
2340
gccgcgttcg cgctcgcgga actaactgaa accatcggcg agggccacga gatgggtatc
2400
ccggccggct tggacaacaa gtgccgcac cgcacaaaca ccgacggcca tgccgtcctc
2460
gccttcccgg cgattttgcc cgatgcctca gagctccgcg acgccaagtc cctggcctcg
2520
gccgccgaga tgcttatcga cgcgaccctc gctcccagcg acgtcaaggc aatggctcact
2580
gaagcccagg ggctagctac agaagacaat cccgattacg catcacttgc catggcgatg
2640
cgcacctgcg gactgttcac cgaggaacca acccaccttg tggatgaagaa ggaaaagaca
2700
ccaaagcctg cgacacgtga tggtttcggt gcctccgact acaccgtcaa gggcatggca
2760
gccatcgccg ctgtggtgat catcttggtt tccctggtgg ctgccggtac cgcgttcctc
2820
accagcttct tcggcagcag caccaacgaa caatcccat tggcttctgt tgaagccacc
2880
acttctgcaa caccagaacc tgtggggcca ccggtctacc tggatctgga tcaagcccgc
2940
acgtgggatg acggtgcagg aacagatgtc accgacgtca ccgacggcaa cacctccacc
3000
gcatggacct ccaccggcgg cgacggcctc ctagttgacc tgtccacgcc tgcccgcctc
3060
gaccgctca tcttgaccac cggcaccggc tctgacagca acgtgacctc gaccgtgaag
3120
atctacgat tcaacgacgc ctcaccacac tccctgtcgg aaggcatcga gatcggcacc
3180
gtggattatt ccggccgcag cctcagccac agcatccgcg attcctccaa gcttccgggt
3240
caggtggaat ccatggtgat tctggtcgat gaggttcatt cctcaciaaac ctcagacacc
3300
aatccacaga tgcagatcgc tgaagtacaa ctcgttggtt ggtaa
3345

<210> 6
 <211> 1114
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
 Met Asn Gly Gln Gln Val Ser Ser Ser Leu Ser Asn Asn Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Ser Gly Leu Arg Gly Arg Ile Val Ala Pro Ala Pro Pro Ala Pro Val
 20 25 30
 Pro Glu Ala Arg Lys Lys Ala Val Ala Arg Thr Asp Gly Asp Arg Ser
 35 40 45
 Ser Leu Lys Asn Ser Pro Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Gln Thr
 50 55 60
 Arg Leu Ala Glu Pro Glu Pro Glu Lys His Thr Ser Asp Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Thr Gly Ser Met Ala Ile Ala Thr Leu Leu Ser Arg Ile
 85 90 95
 Thr Gly Phe Leu Arg Thr Val Met Ile Gly Ala Ala Leu Ser Pro Ala
 100 105 110
 Ile Ala Ser Ala Phe Asn Thr Ala Asn Thr Leu Pro Asn Leu Ile Thr
 115 120 125
 Glu Ile Val Leu Gly Ala Val Leu Thr Ser Leu Val Ile Pro Val Leu
 130 135 140
 Thr Arg Ala Glu Lys Glu Asp Ala Asp Gly Gly Ser Gly Phe Phe Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Leu Gly Gly Val Thr Ile Leu
 165 170 175
 Ser Ile Ile Gly Ala Pro Leu Leu Thr Arg Met Met Leu Ser Ser Glu
 180 185 190
 Gly Gln Val Asn Val Val Met Ser Thr Ala Phe Ala Tyr Trp Leu Leu
 195 200 205
 Pro Gln Ile Phe Phe Tyr Gly Leu Phe Ala Leu Phe Met Ala Val Leu
 210 215 220
 Asn Thr Arg Glu Val Phe Lys Pro Gly Ala Trp Ala Pro Val Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Val Ile Thr Leu Thr Val Leu Gly Val Tyr Met Val Leu Pro Ala
 245 250 255
 Arg Leu His Pro His Glu Gln Val Gly Ile Phe Asp Pro Gln Ile Ile
 260 265 270
 Phe Leu Gly Val Gly Thr Thr Leu Gly Val Val Ala Gln Cys Leu Ile
 275 280 285
 Met Ile Pro Tyr Leu Arg Arg Ala Gly Ile Asp Met Arg Pro Leu Trp
 290 295 300
 Gly Ile Asp Ala Arg Leu Lys Gln Phe Gly Gly Met Ala Met Ala Ile
 305 310 315 320
 Ile Val Tyr Val Ala Ile Ser Gln Phe Gly Tyr Ile Ile Thr Thr Arg
 325 330 335
 Ile Ala Ser Ile Ala Asp Asp Ala Ala Pro Phe Ile Tyr Gln Gln His
 340 345 350
 Trp Met Leu Leu Gln Val Pro Tyr Gly Ile Ile Gly Val Thr Leu Leu
 355 360 365
 Thr Ala Ile Met Pro Arg Leu Ser Arg Asn Ala Ala Asp Gly Asp Asp
 370 375 380
 Arg Ala Val Val Ser Asp Leu Gln Leu Gly Ser Lys Leu Thr Phe Ile
 385 390 395 400
 Ala Leu Ile Pro Ile Val Val Phe Phe Thr Ala Phe Gly Val Pro Ile
 405 410 415
 Ala Asn Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gln Phe Asp Ala Asn Ala Ala Asn
 420 425 430
 Ile Leu Gly Trp Thr Leu Ser Phe Ser Ala Phe Thr Leu Ile Pro Tyr

		435					440					445				
Ala	Leu	Val	Leu	Leu	His	Leu	Arg	Val	Phe	Tyr	Ala	Arg	Glu	Glu	Val	
	450					455					460					
Trp	Thr	Pro	Thr	Phe	Ile	Ile	Ala	Gly	Ile	Thr	Ala	Thr	Lys	Val	Val	
465					470					475					480	
Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Val	Val	
				485					490					495		
Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Asn	Gly	Phe	Ser	Phe	Ile	Thr	Gly	Ala	Val	
			500					505					510			
Ile	Gly	Ala	Tyr	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Arg	
		515					520					525				
Ser	Leu	Ala	Lys	Thr	Ser	Leu	Trp	Ala	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	
	530					535					540					
Ala	Ala	Ala	Ala	Trp	Ala	Leu	Gly	Trp	Leu	Ile	Gln	Ala	Val	Val	Gly	
545					550					555					560	
Asp	Phe	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	
				565					570					575		
Ala	Val	Leu	Gly	Val	Phe	Phe	Ile	Ile	Ile	Thr	Gly	Ile	Val	Leu	Ser	
			580					585					590			
Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Glu	Val	Gln	Asn	Leu	Gly	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	
		595					600					605				
Ile	Pro	Gly	Met	Ser	Arg	Phe	Ile	Arg	Pro	Asn	Thr	Lys	Ile	Ser	Leu	
	610					615					620					
Asp	Val	Gly	Glu	Val	Ser	Gln	Gln	Asp	Phe	Ser	Thr	Gln	Leu	Val	Ala	
625					630					635					640	
Pro	Ser	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Ala	Gly	
				645					650					655		
Ile	Val	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Gly	Asp	Gly	
			660					665					670			
Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Gly	Val	Gln	Gly	Ala	Arg	Phe	
		675				680						685				
Trp	Gln	Ala	Arg	Glu	Ile	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Val	Ala	Leu	Ile	Phe	
	690					695					700					
Val	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn	Ala	Pro	Phe	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Ala	
705					710					715					720	
Ala	Ala	Gly	Ile	Ala	Tyr	Glu	Val	Gln	Arg	Arg	Thr	Lys	Lys	Leu	Ala	
				725					730					735		
Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Asn	Ile	Tyr	Ser	Glu	Ala	Tyr	
		740						745					750			
Arg	Asn	Gly	Cys	Leu	Ile	Val	Ala	Asp	Trp	Val	Pro	Gly	Ser	Ser	Leu	
		755				760						765				
Ser	Ala	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Asp	Pro	Arg	Ala	Ala	Ala	Phe	Ala	
	770					775					780					
Leu	Ala	Glu	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Gly	Glu	Ala	His	Glu	Met	Gly	Ile	
785				</												

Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Gly Thr Ala Phe Leu Thr Ser Phe Phe
 930 935 940
 Gly Ser Ser Thr Asn Glu Gln Ser Pro Leu Ala Ser Val Glu Ala Thr
 945 950 955 960
 Thr Ser Ala Thr Pro Glu Pro Val Gly Pro Pro Val Tyr Leu Asp Leu
 965 970 975
 Asp Gln Ala Arg Thr Trp Asp Asp Gly Ala Gly Thr Asp Val Thr Asp
 980 985 990
 Val Thr Asp Gly Asn Thr Ser Thr Ala Trp Thr Ser Thr Gly Gly Asp
 995 1000 1005
 Gly Leu Leu Val Asp Leu Ser Thr Pro Ala Arg Leu Asp Arg Val Ile
 1010 1015 1020
 Leu Thr Thr Gly Thr Gly Ser Asp Ser Asn Val Thr Ser Thr Val Lys
 1025 1030 1035 1040
 Ile Tyr Ala Phe Asn Asp Ala Ser Pro His Ser Leu Ser Glu Gly Ile
 1045 1050 1055
 Glu Ile Gly Thr Val Asp Tyr Ser Gly Arg Ser Leu Ser His Ser Ile
 1060 1065 1070
 Arg Asp Ser Ser Lys Leu Pro Gly Gln Val Glu Ser Met Val Ile Leu
 1075 1080 1085
 Val Asp Glu Val His Ser Ser Gln Thr Ser Asp Thr Asn Pro Gln Met
 1090 1095 1100
 Gln Ile Ala Glu Val Gln Leu Val Gly Trp
 1105 1110

<210> 7
 <211> 3345
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7
 atgaatgggc aacaagtgcg ttcttcgctt tcgaataatt cggagcagtc cggcctgcgt
 60
 ggcaggatcg ttgctccagc accgccggcg cctgtgcccc aggcgcgcaa gaaggctgtc
 120
 gcacgcacgg atgggtgatcg ctcgagtttg aaaaactcgc ctacggcatc cgccaccag
 180
 gcagcccaga cgcgcccggc agaaccggaa ccagaaaagc acacctccga ttctgatgtg
 240
 gtgcgctcga ctggctccat ggcaatagcc acgctgctga gtcgtatcac cggtttcttg
 300
 cgcaccgtga tgattggtgc ggcgctgtcg ccggccatcg ctctggcggt caacactgcc
 360
 aacacgctgc ccaacctgat cactgaaatc gtgttggtg cggctgtgac atcgctggtt
 420
 attccggtcc ttaccgcgc ggaaaaagaa gacgccgacg gcggttccgg gttcttcagg
 480
 cggctgctca ccctgtcggt gacgctgctg ggtggtgtca ccatcctgtc gattatcggc
 540
 gcgccgctgc tgacacggat gatgctgtcc tctgaggac aagtcaacgt ggtcatgtcc
 600
 acggcctttg cgtattggct gctgccacag attttcttct acggcctggt tgcctgttc
 660
 atggctgtgt tgaacacccg tgaagtgttc aaaccggcg cgtgggcacc tgttgtcaac
 720
 aatgtgatca ccttgaccgt gctgggcgtg tacatggtgc tgcctgcgcg tttgcacccg
 780
 catgagcagg tgggcatttt tgatccgcag atcattttcc tcggcgtggg caccaccctt
 840
 ggtgtggttg cacagtgtct aatcatgatt ccgtacctgc gtcgcgcggg cattgatatg
 900

cgccctctgt ggggtatcga tgcgcgtttg aagcaattcg gtggcatggc gatggcgatc
960
atcgtgtacg tggcaatctc ccagttcggg tacatcatca ccactcgcat tgcgtcgatt
1020
gcagacgatg ctgcgcggtt tatttatcag cagcactgga tgttgctgca agttccttat
1080
ggcatcatcg gcgtcacctt gtcaccgcg attatgccc gactgtccc caacgcggca
1140
gacggcgatg atagggcagt agtctctgac cttcagttgg gttccaagct aaccttcac
1200
gcactgatcc ccatcgtggg gttcttcacc gccttcggg tccctattgc caatggcctt
1260
tttgcctacg gccaatcga tgccaacgcc gccaacatcc ttggttggac tctgagcttc
1320
tctgctttca cgctgattcc ttacgctttg gtgctgctac atctgcgtgt gttttatgcy
1380
cgtgaagagg tctggacccc aaccttcac atcgccggca tcaccgccac caaggtcgtg
1440
ctttccctgt tggcaccgct gctgtcgagc tccccggagc gtgtgggtgg gcttcttggg
1500
gcggccaacg gtttcagttt catcaccggc gcggtcatcg gcgcgtatct gttgcgcaac
1560
aaactcggcc tgttgggtat gcgctctttg gctaaaacct ccctgtgggc gttgggctct
1620
gcggcggttg gtgcagcagc agcatgggcy ttgggggtgg tgattcaagc cgtcgtgggc
1680
gatttcttgc tgggcactct aagctccgta ggctacttgt tgtacctggc tgtgttgggt
1740
gtcttcttca tcttcgtcac cggcatcgtg ttgtcacgtt ctggtttgcc ggaggtccaa
1800
aacttgggcy aggcactgac ccgcatccca ggtttgagcc ggtttattcg cccgaatacc
1860
aagatctctt tggatgtcgg cgaagtctcc gagcaggatt tctccacca gctggtcgcy
1920
ccaagcgagt tcgcagcaac ccctgtgccg ccaccgatgt ccgcgggtat tgtccgcgga
1980
cctcgcttg tttccggcgc cccagtcggc gacggtcgtt tccgtctgct cgccgatcac
2040
ggcggcgtcc aaggcgcgcy tttctggcag gccgcgaga tcgccaccgg caaggaagtc
2100
gcgctgatct ttgtggatac ttccggcaac gcccatttg cgccactgtc ttcggcagcc
2160
gcagcgggca tcgcctacga ggtgcagcgc cgcaccaaga agctggccag cttgggcagc
2220
ttggcggtag cccccaacat ccactccgag gcgtaccgca acggttgcct cattgtggcc
2280
gattgggtgc ctggctccag cttgagcgc gtgcggaat ccggtgccga tccccgcgc
2340
gccgcgttcg cgctcgcgga actaactgaa accatcggcy aggccacga gatgggtatc
2400
ccggccggct tggacaacaa gtgccgcac cgcatcaaca ccgacggcca tgccgtcctc
2460
gccttcccgg cgattttgcc cgatgcctca gagctccgcy acgccaagtc cctggcctcy
2520
gccgccgaga tgcttatcga cgcgaccctc gctcccagcy acgtcaaggc aatggtcact
2580
gaagcccagg ggctagctac agaagacaat cccgattacg catcacttgc catggcgatg
2640
cgcacctgcy gactgttcac cgaggaacca acccaccttg tgggtgaagaa ggaaaagaca
2700

ccaaagcctg cgacacgtga tggtttcggt gcctccgact acaccgtcaa gggcatggca
 2760
 gccatcgccg ctgtggtgat catcttggtt tccctggtgg ccgccggtac cgcgttcctc
 2820
 accagcttct tcggcagcag caccaacgaa caatccccgt tggcctctgt tgaagccacc
 2880
 acctctgcaa caccagaacc tgtggggcca ccggtctacc tggatctgga tcaagcccgc
 2940
 acgtgggatg acggtgcagg aacagatgtc accgacgtca ccgacggcaa cacctccacc
 3000
 gcatggacct ccaccggcgg cgacggcctc ctagttgacc tgtccacgcc tgcccgcctc
 3060
 gaccgcgtca tcttgaccac cggcaccggc tccgacagca acgtgacctc gaccgtgaag
 3120
 atctacgcat tcaacgacgc ctcaccacac tccctgtcgg aaggcatcga gatcggcacc
 3180
 gtggattatt ccggccgcag tctcagccac agcatccgcg attcctccaa gcttccgggt
 3240
 caggtggaat ccgtggtgat tctgggtgat gaggttcggt cctcacaac ctcagacacc
 3300
 aatccacaga tgcagatcgc tgaagtacaa cttgttggtt ggtaa
 3345

<210> 8
 <211> 1114
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8
 Met Asn Gly Gln Gln Val Ser Ser Ser Leu Ser Asn Asn Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Ser Gly Leu Arg Gly Arg Ile Val Ala Pro Ala Pro Pro Ala Pro Val
 20 25 30
 Pro Glu Ala Arg Lys Lys Ala Val Ala Arg Thr Asp Gly Asp Arg Ser
 35 40 45
 Ser Leu Lys Asn Ser Pro Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Gln Thr
 50 55 60
 Arg Pro Ala Glu Pro Glu Pro Glu Lys His Thr Ser Asp Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Thr Gly Ser Met Ala Ile Ala Thr Leu Leu Ser Arg Ile
 85 90 95
 Thr Gly Phe Leu Arg Thr Val Met Ile Gly Ala Ala Leu Ser Pro Ala
 100 105 110
 Ile Ala Ser Ala Phe Asn Thr Ala Asn Thr Leu Pro Asn Leu Ile Thr
 115 120 125
 Glu Ile Val Leu Gly Ala Val Leu Thr Ser Leu Val Ile Pro Val Leu
 130 135 140
 Thr Arg Ala Glu Lys Glu Asp Ala Asp Gly Gly Ser Gly Phe Phe Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Leu Gly Gly Val Thr Ile Leu
 165 170 175
 Ser Ile Ile Gly Ala Pro Leu Leu Thr Arg Met Met Leu Ser Ser Glu
 180 185 190
 Gly Gln Val Asn Val Val Met Ser Thr Ala Phe Ala Tyr Trp Leu Leu
 195 200 205
 Pro Gln Ile Phe Phe Tyr Gly Leu Phe Ala Leu Phe Met Ala Val Leu
 210 215 220
 Asn Thr Arg Glu Val Phe Lys Pro Gly Ala Trp Ala Pro Val Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Val Ile Thr Leu Thr Val Leu Gly Val Tyr Met Val Leu Pro Ala
 245 250 255

Arg Leu His Pro His Glu Gln Val Gly Ile Phe Asp Pro Gln Ile Ile
 260 265 270
 Phe Leu Gly Val Gly Thr Thr Leu Gly Val Val Ala Gln Cys Leu Ile
 275 280 285
 Met Ile Pro Tyr Leu Arg Arg Ala Gly Ile Asp Met Arg Pro Leu Trp
 290 295 300
 Gly Ile Asp Ala Arg Leu Lys Gln Phe Gly Gly Met Ala Met Ala Ile
 305 310 315 320
 Ile Val Tyr Val Ala Ile Ser Gln Phe Gly Tyr Ile Ile Thr Thr Arg
 325 330 335
 Ile Ala Ser Ile Ala Asp Asp Ala Ala Pro Phe Ile Tyr Gln Gln His
 340 345 350
 Trp Met Leu Leu Gln Val Pro Tyr Gly Ile Ile Gly Val Thr Leu Leu
 355 360 365
 Thr Ala Ile Met Pro Arg Leu Ser Arg Asn Ala Ala Asp Gly Asp Asp
 370 375 380
 Arg Ala Val Val Ser Asp Leu Gln Leu Gly Ser Lys Leu Thr Phe Ile
 385 390 395 400
 Ala Leu Ile Pro Ile Val Val Phe Phe Thr Ala Phe Gly Val Pro Ile
 405 410 415
 Ala Asn Gly Leu Phe Ala Tyr Gly Gln Phe Asp Ala Asn Ala Ala Asn
 420 425 430
 Ile Leu Gly Trp Thr Leu Ser Phe Ser Ala Phe Thr Leu Ile Pro Tyr
 435 440 445
 Ala Leu Val Leu Leu His Leu Arg Val Phe Tyr Ala Arg Glu Glu Val
 450 455 460
 Trp Thr Pro Thr Phe Ile Ile Ala Gly Ile Thr Ala Thr Lys Val Val
 465 470 475 480
 Leu Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Ser Ser Pro Glu Arg Val Val
 485 490 495
 Val Leu Leu Gly Ala Ala Asn Gly Phe Ser Phe Ile Thr Gly Ala Val
 500 505 510
 Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Arg Asn Lys Leu Gly Leu Leu Gly Met Arg
 515 520 525
 Ser Leu Ala Lys Thr Ser Leu Trp Ala Leu Gly Ser Ala Ala Val Gly
 530 535 540
 Ala Ala Ala Ala Trp Ala Leu Gly Trp Leu Ile Gln Ala Val Val Gly
 545 550 555 560
 Asp Phe Leu Leu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Tyr Leu Leu Tyr Leu
 565 570 575
 Ala Val Leu Gly Val Phe Phe Ile Phe Val Thr Gly Ile Val Leu Ser
 580 585 590
 Arg Ser Gly Leu Pro Glu Val Gln Asn Leu Gly Gln Ala Leu Thr Arg
 595 600 605
 Ile Pro Gly Leu Ser Arg Phe Ile Arg Pro Asn Thr Lys Ile Ser Leu
 610 615 620
 Asp Val Gly Glu Val Ser Glu Gln Asp Phe Ser Thr Gln Leu Val Ala
 625 630 635 640
 Pro Ser Glu Phe Ala Ala Thr Pro Val Pro Pro Pro Met Ser Ala Gly
 645 650 655
 Ile Val Arg Gly Pro Arg Leu Val Pro Gly Ala Pro Val Gly Asp Gly
 660 665 670
 Arg Phe Arg Leu Leu Ala Asp His Gly Gly Val Gln Gly Ala Arg Phe
 675 680 685
 Trp Gln Ala Arg Glu Ile Ala Thr Gly Lys Glu Val Ala Leu Ile Phe
 690 695 700
 Val Asp Thr Ser Gly Asn Ala Pro Phe Ala Pro Leu Ser Ser Ala Ala
 705 710 715 720
 Ala Ala Gly Ile Ala Tyr Glu Val Gln Arg Arg Thr Lys Lys Leu Ala
 725 730 735
 Ser Leu Gly Ser Leu Ala Val Ala Pro Asn Ile His Ser Glu Ala Tyr

```

      740              745              750
Arg Asn Gly Cys Leu Ile Val Ala Asp Trp Val Pro Gly Ser Ser Leu
      755              760              765
Ser Ala Val Ala Glu Ser Gly Ala Asp Pro Arg Ala Ala Ala Phe Ala
      770              775              780
Leu Ala Glu Leu Thr Glu Thr Ile Gly Glu Ala His Glu Met Gly Ile
      785              790              795              800
Pro Ala Gly Leu Asp Asn Lys Cys Arg Ile Arg Ile Asn Thr Asp Gly
      805              810              815
His Ala Val Leu Ala Phe Pro Ala Ile Leu Pro Asp Ala Ser Glu Leu
      820              825              830
Arg Asp Ala Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ala Glu Met Leu Ile Asp Ala
      835              840              845
Thr Leu Ala Pro Ser Asp Val Lys Ala Met Val Thr Glu Ala Gln Gly
      850              855              860
Leu Ala Thr Glu Asp Asn Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Ala Met Ala Met
      865              870              875              880
Arg Thr Cys Gly Leu Phe Thr Glu Glu Pro Thr His Leu Val Val Lys
      885              890              895
Lys Glu Lys Thr Pro Lys Pro Ala Thr Arg Asp Gly Phe Gly Ala Ser
      900              905              910
Asp Tyr Thr Val Lys Gly Met Ala Ala Ile Ala Ala Val Val Ile Ile
      915              920              925
Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Gly Thr Ala Phe Leu Thr Ser Phe Phe
      930              935              940
Gly Ser Ser Thr Asn Glu Gln Ser Pro Leu Ala Ser Val Glu Ala Thr
      945              950              955              960
Thr Ser Ala Thr Pro Glu Pro Val Gly Pro Pro Val Tyr Leu Asp Leu
      965              970              975
Asp Gln Ala Arg Thr Trp Asp Asp Gly Ala Gly Thr Asp Val Thr Asp
      980              985              990
Val Thr Asp Gly Asn Thr Ser Thr Ala Trp Thr Ser Thr Gly Gly Asp
      995              1000              1005
Gly Leu Leu Val Asp Leu Ser Thr Pro Ala Arg Leu Asp Arg Val Ile
      1010              1015              1020
Leu Thr Thr Gly Thr Gly Ser Asp Ser Asn Val Thr Ser Thr Val Lys
      1025              1030              1035              1040
Ile Tyr Ala Phe Asn Asp Ala Ser Pro His Ser Leu Ser Glu Gly Ile
      1045              1050              1055
Glu Ile Gly Thr Val Asp Tyr Ser Gly Arg Ser Leu Ser His Ser Ile
      1060              1065              1070
Arg Asp Ser Ser Lys Leu Pro Gly Gln Val Glu Ser Val Val Ile Leu
      1075              1080              1085
Val Asp Glu Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Asp Thr Asn Pro Gln Met
      1090              1095              1100
Gln Ile Ala Glu Val Gln Leu Val Gly Trp
      1105              1110

```

```

<210> 9
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<400> 9
cctcgaaattc atgaatgggtc aacaagtgag ttcttc
36

```

```

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

<400> 10
tctactgcag ttaccaacca acgagttgta cttcag
36

<210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 11
tctactgcag ttaccaacca acaagttgta cttcag
36

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

<400> 12
atgctgcgcc gtttatattat
20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 13
ataaataaac ggcgagcat
20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 14
tgatgctgca ccgtttatatt
20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 15
aaataaacgg tgcagcatca
20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 16
tctgccagag gtccaaaact
20

<210> 17
<211> 20

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 17
agtttttgac ctctggcaga
20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 18
tttgccggag gtccaaaact
20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 19
agtttttgac ctccggcaaa
20

<210> 20
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 20
ctcgatggaa ttccgttaag gcgcgcactc gtacatgaat ggtc
44

<210> 21
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 21
cgcggggatcc ttaccaacca acgagttgta cttcagcgat c
41