



- (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)<sup>2020.01</sup> C12P 13/12; C12N 9/10; C12N 1/21; (13) B  
C12N 15/54



1-0048892

- 
- (21) 1-2022-02936 (22) 28/10/2020  
(86) PCT/KR2020/014780 28/10/2020 (87) WO 2021/085999 06/05/2021  
(30) 10-2019-0134797 28/10/2019 KR  
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/08/2022 413A  
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)  
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea  
(72) CHOI, Sol (KR); LEE, Jin Nam (KR); KIM, Hee Ju (KR); RHO, Jin Ah (KR); LEE,  
Han Hyung (KR).  
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)
- 

- (54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-METIONIN BAO GỒM VIỆC NUÔI CẤY VI  
SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM ĐƯỢC ĐƯA VÀO PROTEIN  
ĐƯỢC MÃ HOÁ BỞI GEN METZ NGOẠI LAI VÀ CHẾ PHẨM SẢN XUẤT L-  
METIONIN CHỨA VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2022-02936

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa vào gen *metZ*, chế phẩm và phương pháp sản xuất L-metionin sử dụng vi sinh vật này.

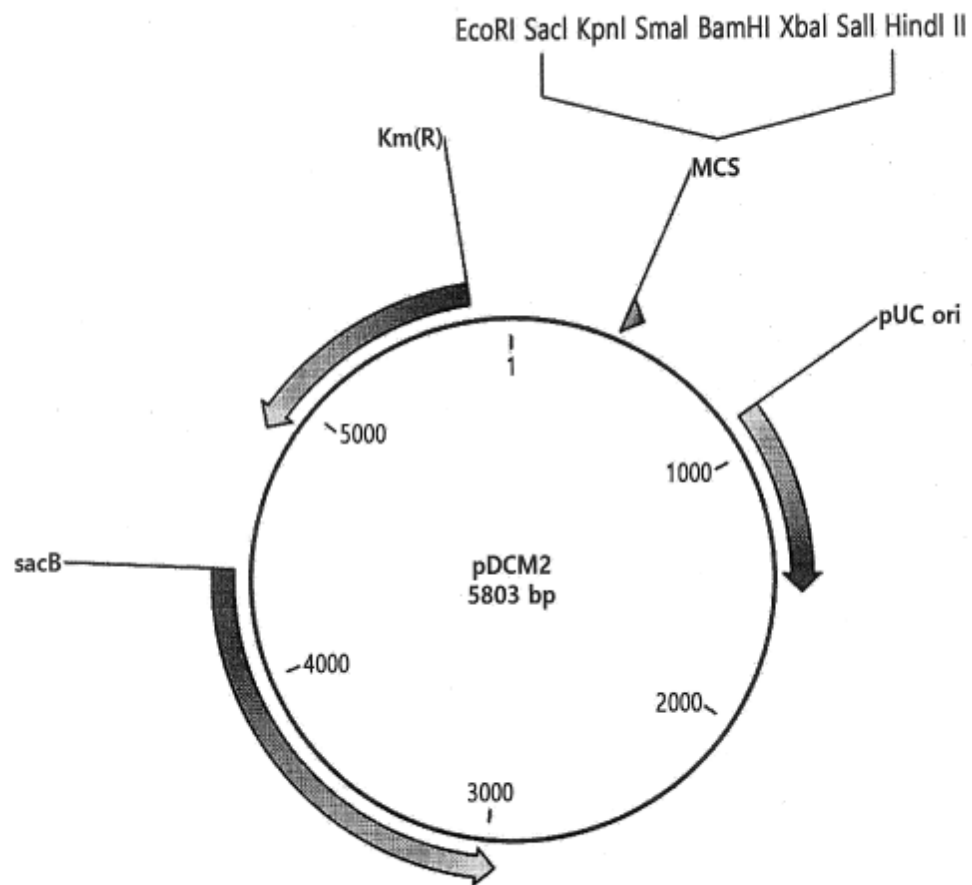


FIG.1

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai, chế phẩm và phương pháp sản xuất L-metionin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-Metionin là một trong những axit amin thiết yếu trong cơ thể, được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu thô y tế như nguyên liệu thô tổng hợp dùng cho các dung dịch y tế, vật tư y tế, v.v., và phụ gia thực phẩm. Metionin là axit amin quan trọng tham gia vào phản ứng chuyển nhóm metyl trong cơ thể, và có vai trò cung cấp lưu huỳnh.

Trong tổng hợp hóa học metionin, phương pháp sản xuất metionin trong hỗn hợp các loại L- và D thông qua quá trình thủy phân 5-( $\beta$ -methylmercaptoethyl)-hydantoin được sử dụng chủ yếu. Tuy nhiên, sự tổng hợp hóa học này tạo ra dạng hỗn hợp của các loại L- và D-.

Trong khi đó, L-metionin cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp sinh học. Cụ thể hơn là phương pháp sản xuất các vi sinh vật sử dụng L-metionin để sản sinh metionin bằng cách sulfhydryl hóa trực tiếp sử dụng *O*-axylhomoserin (*O*-axetyl homoserin hoặc *O*-suxinyl homoserin) và hydro sunfua làm các chất nền. Ví dụ, enzym được mã hóa bởi gen *metY* trong *Corynebacterium* đã biết để thực hiện chức năng sulfhydryl hóa trực tiếp. Phương pháp sản xuất L-metionin khác bởi các vi sinh vật để sản sinh metionin bằng cách chuyển sulfit hóa (transsulfuration) sử dụng *O*-axylhomoserin (*O*-axetyl homoserin hoặc *O*-suxinyl homoserin) và xystein làm các chất nền. Ví dụ, enzym được mã hóa bởi gen *metB* trong *Corynebacterium* đã biết để thực hiện chức năng chuyển sulfit hóa. Tuy nhiên, có những vấn đề là enzym được mã hóa bởi *metB* tạo ra nhiều sản phẩm phụ, và gen *metY* nhận ức chế phản hồi, và do đó, rất khó để áp dụng các sản phẩm phụ vào việc sản xuất hàng loạt L-metionin trong công nghiệp (Kromer JO *et al.*, *J Bacteriol* 188(2):609–618, 2006; Yeom HJ *et al.*, *J*

*Microbiol Biotechnol* 14(2):373–378, 2004; v.v.).

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực hết sức để hoàn thiện sáng chế bằng cách phát triển protein có thể thay thế protein, và kết quả là họ đã phát hiện rằng vi sinh vật được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* sản sinh L-metionin với năng suất cao.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-metionin, trong đó phương pháp bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường chứa thiosulfat.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm sản xuất L-metionin, trong đó chế phẩm bao gồm vi sinh vật và thiosulfat.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 là hình vẽ minh họa plasmit pDCM2.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

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

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy, hoặc có thể xác định chắc chắn bằng cách sử dụng không quá nhiều thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Hơn nữa, các phương án tương đương này được hiểu là nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Khía cạnh của sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-metionin, trong đó phương pháp bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật sản sinh L-metionin trong môi trường chứa thiosulfat.

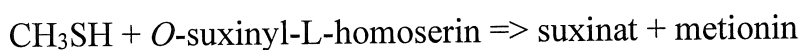
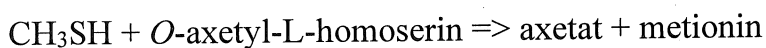
Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “gen *metZ*” là gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sulfhydrat hóa sử dụng axylhomoserin làm chất nền.

Như được sử dụng tại đây, “axylhomoserin” đề cập đến hợp chất trong đó nhóm axyl được liên kết với homoserin, và bao gồm cả suxinylhomoserin và axetylhomoserin. Ví dụ, axylhomoserin có thể là *O*-suxinylhomoserin hoặc *O*-axetylhomoserin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, enzym được mã hóa bởi gen *metZ* có thể là suxinylhomoserin sulfhydrylaza, axetylhomoserin sulfhydrylaza, hoặc enzym tham gia vào quá trình sulfhydrat hóa sử dụng *O*-suxinylhomoserin làm chất nền, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “quá trình sulfhydrat hóa” có thể được sử dụng thay thế với thuật ngữ “sulfhydryl hóa”, và đề cập đến phản ứng tạo ra nhóm sulfhydryl (-SH) cho phân tử cụ thể. Đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ này có thể đề cập đến phản ứng trong quá trình tổng hợp metionin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Enzym tham gia vào “quá trình sulfhydrat hóa” còn có thể được gọi là “sulfhydrylaza”, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong quá trình lên men truyền thống của metionin, enzym được biểu hiện bởi gen *metZ* đã được sử dụng trong các phản ứng *in vitro* sau đây:



Nói cách khác, trong phương pháp sản xuất metionin, phương pháp bao gồm bước thứ nhất là điều chế tiền chất metionin sử dụng vi sinh vật; và bước thứ hai là thực hiện phản ứng enzym *in vitro* bằng cách bổ sung metyl mercaptan và enzym chuyển đổi metionin vào dung dịch lên men chứa tiền chất metionin, enzym được biểu hiện bởi gen *metZ* được sử dụng làm enzym chuyển đổi metionin *in vitro* (tham khảo công bố đơn patent Hoa Kỳ số US 2010-0184164 A1).

Trong khi đó, trong quá trình lên men metionin ở vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, hai loại con đường sulfhydrat hóa (các bước sulfhydryl hóa) được sử dụng (Hwang BJ *et al.*, *J Bacteriol* 184(5):1277–1286, 2002). Một trong hai loại để chuyển *O*-axetylhomoserin (axetyl homoserin: AH) thành xystathionin sử dụng enzym

được mã hóa bởi gen *metB*. Trong trường hợp này, xystein được sử dụng như nguồn lưu huỳnh. Nói cách khác, phản ứng chuyển đổi axylhomoserin và xystein như các chất phản ứng thành xystathionin được gọi là “chuyển sulfit hóa”, và enzym tham gia vào phản ứng này được gọi là “transsulfuraza”. Loại con đường còn lại để chuyển O-axetyl homoserin thành homoxystein sử dụng enzym được mã hóa bởi gen *metY*. Trong trường hợp này, hợp chất lưu huỳnh vô cơ như hydro sunfua, v.v. được sử dụng làm nguồn lưu huỳnh. Trong phản ứng chuyển đổi axylhomoserin và hydro sulfua như các chất phản ứng thành homoxystein, xystathionin như chất trung gian không được tạo ra trong quá trình sản xuất homoxystein là tiền chất metionin, không giống như quá trình chuyển sulfit hóa được mô tả ở trên. Phản ứng này được gọi là phản ứng sulfhydryl hóa trực tiếp.

Nói cách khác, con đường sulfhyđrat hóa có thể đề cập đến con đường phản ứng chuyển đổi axylhomoserin thành nguyên liệu khác bằng phản ứng với nguồn lưu huỳnh, và có thể được chia phần lớn thành quá trình chuyển sulfit hóa và sulfhyđrat hóa trực tiếp.

Tuy nhiên, trong các chủng *Corynebacterium*, cả hai enzym tham gia vào quá trình sulfhyđrat hóa đều có những vấn đề. Ví dụ, protein được mã hóa bởi gen *metB* tạo ra sản phẩm phụ homolanthionin ngoài xystathionin bằng cách sử dụng axetylhomoserin và homoxystein (Kromer JO *et al.*, *J Bacteriol* 188(2):609–618, 2006). Hơn nữa, gen *metY* đã biết dễ nhận ức chế phản hồi bởi metionin (Yeom HJ *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* 14(2):373–378, 2004).

Sáng chế khác biệt ở chỗ gen *metZ* ngoại lai được đưa vào chủng *Corynebacterium* để chỉ tạo ra metionin về mặt sinh học thông qua phản ứng một bước, và việc đưa gen *metZ* vào đã được chứng minh rằng áp dụng hữu ích cho quá trình lên men metionin.

Trong con đường tổng hợp metionin, trong đó có sự tham gia của protein được mã hóa bởi gen *metZ* theo sáng chế, việc tạo ra các sản phẩm phụ có thể được giảm. Sản phẩm phụ có thể là homolanthionin. Việc giảm tạo ra các sản phẩm phụ có thể đề cập đến việc giảm tạo ra các sản phẩm phụ, so với việc tạo ra các sản phẩm phụ ở vi sinh vật kiểu dại hoặc trong con đường tổng hợp, trong đó có sự tham gia của protein được mã hóa bởi gen *metB*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Do đó, vi sinh vật được đưa vào gen *metZ* ngoại lai theo sáng chế, và phương pháp sản xuất metionin bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật có thể biểu hiện việc giảm tạo ra các sản phẩm phụ, so với việc vi sinh vật sản sinh metionin không được đưa vào gen *metZ* ngoại lai, và phương pháp sản xuất metionin sử dụng vi sinh vật này. Protein được mã hóa bởi gen *metZ* theo sáng chế không nhận ức chế phản hồi bởi metionin.

Protein được mã hóa bởi gen *metZ* theo sáng chế là *O*-axylhomoserin sulfhydrylaza có thể sử dụng hydro sulfua làm nguồn lưu huỳnh, và còn là *O*-axylhomoserin transsulfuraza có thể sử dụng xystein như nguồn lưu huỳnh. Cụ thể hơn, protein có thể là *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza, *O*-axetylhomoserin transsulfuraza, *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza, hoặc *O*-suxinylhomoserin transsulfuraza. Do đó, protein được mã hóa bởi gen *metZ* theo sáng chế có thể là protein có hoạt tính của *O*-axylhomoserin sulfhydrylaza, và cụ thể là, có thể là protein có một hoặc nhiều hoạt tính của *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza, *O*-axetylhomoserin transsulfuraza, *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza, và *O*-suxinylhomoserin transsulfuraza.

Ví dụ, gen ngoại lai *metZ* theo sáng chế có thể là gen có nguồn gốc từ những gen khác với vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa gen vào, hoặc có thể khác với gen có sẵn trong vi sinh vật sản sinh L-metionin được đưa gen vào. Cụ thể, gen này có thể là gen có tên *metZ* có nguồn gốc từ *Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, hoặc *Rhodobacter sphaeroides*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Đối với các mục đích của sáng chế, gen có thể bao gồm bất kỳ gen nào mà không bị giới hạn, miễn là nó có thể tăng cường khả năng sản xuất L-metionin. Trình tự của gen *metZ* có sẵn từ cơ sở dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI), và như phương pháp thu được trình tự tương ứng, có thể áp dụng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Trong sáng chế, protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều được chọn từ nhóm bao gồm trình tự polypeptit có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, và SEQ ID NO: 62; và các trình tự amin axit (các trình tự polypeptit) có ít nhất 90% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polypeptit này, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ví dụ, protein có thể bao gồm trình tự polypeptit có 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 97,7%, 97,8%, 98%, 98,5%, 98,7%, 98,8%, 99%, 99,5%, 99,7%, 99,8%, hoặc 100% sự tương

đồng hoặc đồng nhất với bất kỳ một trình tự polypeptit có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, và SEQ ID NO: 62. Ví dụ, protein có thể bao gồm bất kỳ một trình tự polypeptit có các mã nhận biết SEQ ID NO: 66 đến SEQ ID NO: 71 và trình tự được chọn từ các trình tự polypeptit có ít nhất 90% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polypeptit này, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Gen *metZ* của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm có các trình tự polynucleotit có các mã nhận biết SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, và SEQ ID NO: 65; và trình tự polynucleotit có ít nhất 90% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polynucleotit này, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ví dụ, gen có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự có các mã nhận biết SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, và SEQ ID NO: 65 và trình tự polynucleotit có 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 97,7%, 97,8%, 98%, 98,5%, 98,7%, 98,8%, 99%, 99,5%, 99,7%, 99,8%, hoặc 100% sự đồng nhất hoặc tương đồng với trình tự polynucleotit này.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến sợi ADN có chiều dài định trước hoặc dài hơn, là polyme chuỗi dài của các nucleotit được tạo ra bằng cách liên kết các đơn phân nucleotit thông qua các liên kết cộng hóa trị.

Theo sáng chế, miễn là gen *metZ* bao gồm polynucleotit mã hóa protein được mã hóa bởi bất kỳ một hoặc nhiều trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự có các mã nhận biết SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 và SEQ ID NO: 65, hoặc polynucleotit mã hóa protein có hiệu quả tương ứng với protein có bất kỳ một hoặc nhiều trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 và SEQ ID NO: 62, rõ ràng là bất kỳ polynucleotit nào mã hóa trình tự axit amin, trong đó một phần của trình tự bị xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung, có thể cũng nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ, gen *metZ* có thể là gen mã hóa trình tự axit amin có sự thay thế một phần, ví dụ, 1 đến 20 axit amin trong bất kỳ trình tự axit amin nào có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 và SEQ ID NO: 62. Theo phương án khác, gen *metZ* có thể là trình tự mã hóa trình tự axit amin có thêm 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, hoặc 11 hoặc ít hơn hoặc 11 trình tự axit amin trước/sau trình tự axit amin. Theo phương án khác, gen *metZ* có thể là trình tự mã hóa trình tự axit amin bao gồm tất cả sự thay thế

và bổ sung ở trên, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm đầu dò có thể được tạo ra từ trình tự nucleotit đã biết, ví dụ, polynucleotit lai với trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Nói cách khác, mặc dù sử dụng các khái niệm “polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có số trình tự cụ thể”, “polynucleotit gồm có trình tự nucleotit có số trình tự cụ thể” hoặc “polynucleotit có trình tự nucleotit có số trình tự cụ thể” trong sáng chế, rõ ràng rằng cũng có thể sử dụng trong sáng chế bất kỳ polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có một phần trình tự được xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ, hoặc thêm vào, miễn là protein có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đương với polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có polynucleotit số trình tự cụ thể. Ví dụ, có thể có trường hợp có sự thêm vào đầu N và/hoặc đầu C của trình tự axit amin với trình tự mà không tạo ra thay đổi về chức năng của protein, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm, hoặc thay thế bảo thủ của chúng.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế axit amin bằng axit amin khác có kết cấu và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “tương đồng hoặc đồng nhất” đề cập đến mức độ kết hợp với hai trình tự nucleotit, và có thể được biểu hiện 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 có thể được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và có thể được sử dụng với hàm phạt khoảng trống dịch chuyển mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường được dự kiến lai hóa với tất cả hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ chiều dài của các trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Trong các polynucleotit đã lai hóa, các polynucleotit bao gồm các đơn vị mã hóa (codon) thoái biến thay vì các codon cũng được xem xét.

Hai trình tự polynucleotit bất kỳ có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết chẳng hạn như chương trình “FASTA” trong Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444) sử dụng các tham số mặc định. Thay vào đó, có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453) được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở phân tử sinh học châu Âu, Rice *et al.*, 2000, *Trends Gent.* 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản cao hơn) (gói chương trình GCG (Devereux, J. *et al.*, Nghiên cứu các axit nucleic 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990); Hướng dẫn cho các máy tính lớn, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của cơ sở dữ liệu thông tin của Trung tâm quốc gia công nghệ sinh học.

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

Ngoài ra, hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự này

bằng các thí nghiệm lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai phù hợp đã xác định thuộc phạm vi của công nghệ theo sáng chế, và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Ngoài ra, trong polynucleotit theo sáng chế, các sự biến đổi có thể được thực hiện trong vùng mã hóa miễn là không làm thay đổi trình tự polypeptit, do thoái biến codon hoặc xem xét các codon được ưu tiên bởi sinh vật trong đó polynucleotit được biểu hiện. Ngoài ra, đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, bất kỳ trình tự polynucleotit có thể lai hóa với trình tự bổ sung hoàn toàn hoặc một phần cho trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt, và có thể tăng sản lượng L-metionin, trong khi không phải là trình tự có sẵn tự nhiên trong vi sinh vật trong đó trình tự được đưa vào mà không giới hạn ở đây. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các giáo trình đã biết (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) và đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao lai với nhau, ví dụ, ít nhất 40%, tốt hơn là 70%, 80%, tốt hơn là 85%, 90%, tốt hơn nữa là 95%, tốt hơn nữa là 97%, hoặc tốt nhất là 99% tương đồng hoặc đồng nhất, và các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn các sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên không lai với nhau; hoặc các điều kiện rửa thông thường của lai Southern, tức là rửa một lần, và tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS.

Sự lai hóa đòi hỏi hai polynucleotit chứa các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của các polynucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, polynucleotit theo sáng chế cũng

có thể bao gồm các đoạn polynucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như các trình tự polynucleotit giống nhau về cơ bản.

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai nêu trên bao gồm bước lai với giá trị  $T_m$  ở nhiệt độ 55°C trong các điều kiện nêu trên. Ngoài ra, giá trị  $T_m$  có thể là nhiệt độ 60°C, 63°C, hoặc 65°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được kiểm soát thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

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

Cụ thể, thuật ngữ “đưa vào protein” có nghĩa là cung cấp hoạt tính của protein cụ thể cho vi sinh vật, trong đó ban đầu không có sẵn protein hoặc hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa vào protein có thể có nghĩa là đưa protein cụ thể, polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào nhiễm sắc thể hoặc đưa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào vi sinh vật, nhờ đó có khả năng biểu hiện hoạt tính của protein. Theo sáng chế, phần đưa vào protein cũng có thể được biểu thị bằng cách tăng cường hoạt tính của protein ở vi sinh vật không có hoạt tính protein cụ thể.

Việc đưa vào protein có thể được thực hiện bằng cách đưa polynucleotit ngoại lai mã hóa protein biểu hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự như hoạt tính của protein nêu trên, hoặc bằng cách đưa polynucleotit biến thể tối ưu hóa codon của nó vào tế bào chủ. Bất kỳ trình tự polynucleotit ngoại lai nào cũng có thể được sử dụng mà không bị giới hạn về nguồn gốc hoặc trình tự của chúng, miễn là thể hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự như hoạt tính của protein nêu trên. Hơn nữa, polynucleotit ngoại lai có thể được đưa vào tế bào chủ, sau khi tối ưu hóa các codon của nó để quá trình phiên mã và dịch mã được tối ưu hóa có thể xảy ra trong tế bào chủ. Việc đưa vào protein có thể được thực hiện bằng phương pháp biến nạp đã biết được lựa chọn thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và protein có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện polynucleotit đã đưa vào trong tế bào chủ và do đó, hoạt tính của nó có thể được tăng lên.

Tăng cường hoạt tính của protein đã đưa vào có thể được thực hiện bằng cách:

- 1) tăng số lượng bản sao nội bào của gen hoặc polynucleotit mã hóa protein,
- 2) thay thế vùng điều hòa biểu hiện gen trên nhiễm sắc thể mã hóa protein bằng trình tự có hoạt tính mạnh,
- 3) sửa đổi trình tự nucleotit của codon khởi động hoặc vùng 5'-UTR của protein,
- 4) sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng hoạt tính của protein, hoặc
- 5) kết hợp các phương pháp nêu trên, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự polynucleotit đích được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp sao cho gen đích có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa bao gồm vùng gen khởi động (promotor) có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự điều khiển nào để điều hòa quá trình phiên mã, trình tự mã hóa miền liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi vector được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, nó có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen của vật chủ, và có thể được tích hợp vào chính bộ gen. Ví dụ, polynucleotit đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit biến đổi thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể. Việc đưa polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, sự tái kết hợp đồng nhất, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vector theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng bất kỳ vector đã biết nào trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmit, cosmit, virus và thực khuẩn tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng như vector cosmit hoặc vector thể thực khuẩn, và pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng như vector plasmit. Cụ thể là có thể sử dụng các vector pDZ, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v..

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là việc đưa vào vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ, nhờ đó có thể biểu hiện

protein được mã hóa bởi polynucleotit trong tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit đã biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, không quan trọng cho dù polynucleotit đã biến nạp có thể được tích hợp vào và đặt trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, hoặc nó có thể tồn tại ngoài nhiễm sắc thể, và có thể là sự kết hợp của cả hai trường hợp nêu trên. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa polypeptit đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới dạng bất kỳ, miễn là nó có thể được đưa vào tế bào vật chủ và biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho biểu hiện độc lập của nó. Thông thường, catxet biểu hiện có thể bao gồm promotor được liên kết chức năng với polynucleotit, các tín hiệu kết thúc phiên mã, các miên liên kết ribosom, và các tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể dưới dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit như nó vốn có có thể được đưa vào tế bào vật chủ và được liên kết chức năng với trình tự được yêu cầu cho sự biểu hiện trong tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự gen và trình tự promotor nêu trên, bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế.

Phương pháp biến nạp vector theo sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp đưa axit nucleic vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, tùy thuộc vào tế bào vật chủ. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm điện biến nạp, kết tủa canxi phosphat ( $\text{CaPO}_4$ ), kết tủa clorua canxi ( $\text{CaCl}_2$ ), vi tiêm, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật liposom cation, kỹ thuật liti axetat-DMSO, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo. Như đã mô tả trong sáng chế, có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở bất kỳ vi sinh vật được đưa vào hoặc bao gồm gen *metZ* ngoại lai.

Vi sinh vật có thể là vi sinh vật sản sinh L-metionin bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều gen *metZ* ngoại lai theo sáng chế; nhờ đó protein được mã hóa; và vector bao gồm gen *metZ*.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh L-metionin” bao gồm tất cả vi sinh vật kiểu dại, hoặc vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do chèn gen ngoại sinh, hoặc do sự tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, và có thể là vi sinh vật bao gồm sự biến đổi gen cho việc sản xuất L-metionin mong muốn.

Vi sinh vật sản sinh L-metionin có thể là vi sinh vật bao gồm protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai theo sáng chế để có khả năng sản sinh L-metionin tăng cường, như được so sánh với chủng bố mẹ hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “chủng trước khi sửa đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi sửa đổi” có thể đề cập đến, không loại trừ chủng bao gồm đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong vi sinh vật, chủng kiểu dại hoặc chủng kiểu tự nhiên, hoặc chủng trước khi thay đổi tính trạng của nó được thay đổi do sự biến đổi gen do các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo gây ra. “Chủng trước khi sửa đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi sửa đổi” có thể được sử dụng thay thế cho “chủng không biến đổi”, “chủng loại không biến đổi”, “vi sinh vật không biến đổi”, “vi sinh vật loại không biến đổi” hoặc “vi sinh vật tham chiếu”. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật trong đó các mức độ biểu hiện của các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp L-metionin không được điều hòa, hoặc vi sinh vật không được đưa vào gen *metZ* về bản chất không tồn tại.

Vi sinh vật sản sinh L-metionin theo sáng chế có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh L-metionin được tăng cường bằng cách tăng cường hoạt tính của một phần protein trong con đường sinh tổng hợp L-metionin hoặc bằng cách làm suy yếu hoạt tính của một phần protein trong con đường phân hủy L-metionin.

Cụ thể, các ví dụ về các protein hoặc gen, trong đó sự biểu hiện có thể được điều chỉnh để tăng cường con đường sinh tổng hợp L-metionin hoặc làm suy giảm/bất hoạt con đường phân hủy L-metionin như sau: các protein, gen đại diện mã hóa các protein, và số lượng EC đại diện được mô tả theo thứ tự. Các protein bắt đầu bằng chữ cái in hoa và các gen được in nghiêng. Ví dụ, con đường sinh tổng hợp L-amin axit có thể được tăng cường hoặc con đường phân hủy L-amin axit có thể được làm suy yếu bằng cách tăng cường hoạt tính của một phần của một hoặc nhiều protein hoặc các hệ thống được chọn từ thiosulfat sulfurtransferaza, chẳng hạn như Rdl2p, GlpE, PspE, YgaP, ThiI, YbbB, SseA, YnjE, YceA, YibN, NCgl0671, NCgl1369, NCgl2616, NCgl0053,

NCgl0054, NCgl2678, NCgl2890, v.v.; sulfit reductaza, *cysI*; hệ thống vận chuyển thiosulfat/sulfat, *cysPUWA* (EC 3.6.3.25); 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat reductaza, *cysH* (EC 1.8.4.8); sulfit reductaza, *cysJI* (EC 1.8.1.2); xystein synthaza A, *cysK* (EC 2.5.1.47); xystein synthaza B, *cysM* (EC 2.5.1.47); serin axetyltransferaza, *cysE* (EC 2.3.1.30); hệ thống phân cắt glyxin, *gcvTHP-lpd* (EC 2.1.2.10, EC 1.4.4.2, EC 1.8.1.4); lipoyl synthaza, *lipA* (EC 2.8.1.8); lipoyl protein ligaza, *lipB* (EC 2.3.1.181); phosphoglyxerat dehydrogenaza, *serA* (EC 1.1.1.95); 3-phosphoserin phosphataza, *serB* (EC 3.1.3.3); 3-phosphoserin/phosphohydroxythreonin amintransferaza, *serC* (EC 2.6.1.52); serin hydroxymetyltransferaza, *glyA* (EC 2.1.2.1); aspartokinaza I (EC 2.7.2.4); homoserin dehydrogenaza I, *thrA* (EC 1.1.1.3); aspartat kinaza, *lysC* (EC 2.7.2.4); homoserin dehydrogenaza, *hom* (EC 1.1.1.3); homoserin O-axetyltransferaza, *metX* (EC 2.3.1.31); homoserin O-suxinyltransferaza, *metA* (EC 2.3.1.46); xystathionin gamma-synthaza, *metB* (EC 2.5.1.48);  $\beta$ -C-S-lyaza, *aecD* (EC 4.4.1.8, *beta*-lyaza); xystathionin beta-lyaza, *metC* (EC 4.4.1.8); B12-độc lập homoxystein S-metyltransferaza, *metE* (EC 2.1.1.14); metionin synthaza, *metH* (EC 2.1.1.13); metylenetetrahydrofolat reductaza, *metF* (EC 1.5.1.20); chất vận chuyển L-metionin BrnFE; chất vận chuyển valin YgaZH (B2682, B2683), *ygaZH*(b2682. b2683); chất vận chuyển YjeH, *b4141*; pyridin nucleotit transhydrogenaza PntAB, *pntAB* (EC 1.6.1.2); và phosphoenolpyruvat cacboxylaza, *Pyc* (EC 4.1.1.31), hoặc bằng cách biểu hiện quá mức các polynucleotit mã hóa protein. Thay vào đó, hoạt tính của một hoặc nhiều protein được chọn từ nhóm gồm có glucoza 6-phosphat isomeraza, *pgi* (EC 5.3.1.9); homoserin kinaza, *thrB* (EC 2.7.1.39); S-adenosyl metionin synthaza, *metK* (EC 2.5.1.6); dihydrodipicolinat synthaza, *dapA* (EC 4.2.1.52); phosphoenolpyruvat cacboxykinaza, *pck* (EC 4.1.1.49); formyltetrahydrofolat hydrolaza, *purU* (EC 3.5.1.10); pyruvat kinaza I, *pykF* (EC 2.7.1.40); pyruvat kinaza II, *pykA* (EC 2.7.1.40); xystathionin  $\gamma$ -lyaza, *cg3086* (EC 4.4.1.1); xystathionin  $\beta$ -synthaza, *cg2344* (EC 4.2.1.22); protein điều hòa Cg3031, *cg3031*; protein ức chế sinh tổng hợp metionin và xystein McbR, *mcbR*; protein cơ chế phiên mã L-metionin (Met), *metJ*; chất chuyển L-metionin MetQNI, *metQ*, *metN*, *metI*; N-axyltransferaza, *yncA*; sARN *fmrS*; và chất chuyển L-metionin, *metP* có thể được làm suy giảm, hoặc biểu hiện của các gen mã hóa các protein có thể được ức chế hoặc loại bỏ.

Trong phương án cụ thể, vi sinh vật sản sinh L-metionin theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều sự biến đổi được chọn từ nhóm gồm có sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của xystathionin gamma synthaza ngoài việc đưa vào *metZ*; sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của *O*-axetylhomoserin sulphydrylaza; sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của protein ức chế sinh tổng hợp metionin–xystein; tăng cường hoạt tính của metionin synthaza; và tăng cường hoạt tính của sulfit reductaza. Thay vào đó, sự biến đổi gen có thể bao gồm một hoặc nhiều sự biến đổi được chọn từ nhóm gồm có việc xóa/biểu hiện sự ức chế của gen *metB*; việc xóa gen *metY*; việc xóa/biểu hiện sự ức chế của gen *mcbR*; và tăng cường biểu hiện của gen *metH* và *cysI*. Ví dụ, gen *metB*, gen *metY*, gen *mcbR*, gen *metH*, và gen *cysI* có thể bao gồm trình tự polynucleotit có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polynucleotit có các mã nhận biết tương ứng SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 39, và SEQ ID NO: 40, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đây. Sự mô tả nêu trên liên quan đến sự tương đồng hoặc đồng nhất còn được áp dụng cho các gen *metB*, *metY*, *mcbR*, *metH*, và *cysI*.

Tuy nhiên, các gen chỉ là ví dụ, và không bị giới hạn ở đó, và vi sinh vật có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của các protein đã biết khác nhau của các con đường sinh tổng hợp L-metionin được tăng cường hoặc hoạt tính của các protein của các con đường phân hủy L-metionin được bất hoạt hoặc làm suy giảm.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “tăng cường” hoạt tính của polypeptit hoặc protein có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng lên so với hoạt tính nội tại của nó. Sự tăng cường có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “tăng điều hòa”, “biểu hiện quá mức”, “tăng”, v.v.. Trong phần mô tả này, việc tăng có thể bao gồm tất cả biểu hiện hoạt tính không sẵn có ban đầu hoặc biểu hiện hoạt tính được cải thiện so với hoạt tính nội tại hoặc hoạt tính trước khi biến đổi. Thuật ngữ “hoạt tính nội tại” có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi, khi một đặc điểm được thay đổi do sự biến đổi gen gây ra bởi yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. Thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “hoạt tính trước khi sửa đổi”. “Hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng cường hoặc tăng lên, so với hoạt tính nội tại” có nghĩa là hoạt tính được cải thiện so với hoạt tính của polypeptit hoặc protein cụ thể

có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi. Sự “tăng hoạt tính” có thể đạt được bằng cách đưa polypeptit hoặc protein ngoại lai vào hoặc bằng cách tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein nội tại, cụ thể là bằng cách tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein nội tại. Hoạt tính của polypeptit hoặc protein có được tăng cường hay không có thể được xác định bằng mức độ hoạt tính của polypeptit hoặc protein tương ứng, mức độ biểu hiện của nó, hoặc sự tăng lượng sản phẩm từ protein tương ứng.

Có thể áp dụng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật để tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein, và phương pháp này không bị giới hạn ở đây, miễn là có thể tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein mong muốn so với hoạt tính của vi sinh vật trước khi sửa đổi. Phương pháp có thể là nhưng không giới hạn ở phương pháp sử dụng kỹ thuật di truyền và/hoặc kỹ thuật protein đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật là phương pháp sinh học phân tử thông thường (Sitnicka *et al.* “Functional Analysis of Genes”. *Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1–16; Sambrook *et al.* *Molecular Cloning* 2012; v.v.).

Phương pháp tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein sử dụng kỹ thuật di truyền có thể được thực hiện bằng ví dụ,

1) phương pháp tăng số lượng bản sao nội bào của gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein;

2) phương pháp thay thế vùng điều hòa biểu hiện gen trên nhiễm sắc thể mã hóa protein polypeptit hoặc protein bằng trình tự có hoạt tính mạnh,

3) phương pháp sửa đổi trình tự nucleotit của codon khởi động hoặc vùng 5'-UTR của polypeptit hoặc protein,

4) phương pháp sửa đổi polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng hoạt tính của polypeptit hoặc protein,

5) phương pháp đưa vào polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit hoặc protein, hoặc đưa vào polynucleotit biến thể bằng cách tối ưu hóa codon của polynucleotit, hoặc

6) sự kết hợp của các phương pháp này, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở

đây.

Phương pháp tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein sử dụng kỹ thuật protein có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit hoặc protein, chọn vị trí tiếp xúc với nó, và sau đó thay đổi hoặc sửa đổi về mặt hóa học của vị trí đó, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

1) Phương pháp làm tăng số lượng bản sao nội bào của gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ để liên kết hoạt động với gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein tương ứng và có thể sao chép và hoạt động không phụ thuộc vào tế bào vật chủ. Thay vào đó, phương pháp có thể được thực hiện bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ để liên kết hoạt động với gen và có thể chèn gen hoặc polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vector giống như mô tả ở trên.

2) Phương pháp thay thế vùng điều hòa biểu hiện gen (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) trên nhiễm sắc thể mã hóa polypeptit hoặc protein bằng trình tự có hoạt tính mạnh có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách gây đột biến trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự nucleotit, hoặc sự kết hợp các phương pháp để tăng cường thêm hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở promotor, trình tự toán tử, trình tự mã hóa vị trí liên kết với ribosom, trình tự điều hòa việc kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v.. Phương pháp này có thể liên kết cụ thể promotor dị hợp mạnh thay vì promotor ban đầu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ về promotor mạnh đã biết có thể bao gồm các promotor từ cjl đến cj7 (Patent Hoa Kỳ số 7662943 B2), promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor tac, promotor PR lambda thể thực khuẩn, promotor PL, promotor tet, promotor gapA, promotor SPL7, promotor SPL13(sm3) (Patent Hoa Kỳ số 10584338 B2), promotor O2 (Patent Hoa Kỳ số 10273491 B2), promotor tkt, promotor yccA, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

3) Phương pháp sửa đổi trình tự nucleotit của codon khởi động hoặc vùng 5'-

UTR của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách thay thế codon khởi động nội tại của polypeptit hoặc protein bằng codon khởi động khác có tỷ lệ biểu hiện của polypeptit hoặc protein cao hơn codon khởi động nội tại, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

4) Phương pháp sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách gây đột biến trên trình tự điều hoà biểu hiện bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự nucleotit, hoặc sự kết hợp các phương pháp để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự polynucleotit được cải thiện để có hoạt tính mạnh hơn. Cụ thể, việc thay thế có thể là đưa gen vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vector có thể được sử dụng ở đây có thể bao gồm thêm chỉ dấu lựa chọn để xác định phần chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn giống như mô tả ở trên.

5) Phương pháp đưa vào polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách đưa vào tế bào vật chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit hoặc protein biểu hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự với hoạt tính của polypeptit hoặc protein, hoặc polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon của nó. Bất kỳ polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn về nguồn gốc hoặc trình tự của nó, miễn là thể hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự với hoạt tính của polypeptit hoặc protein. Ngoài ra, polynucleotit ngoại lai có thể được đưa vào tế bào vật chủ sau khi được tối ưu hóa codon sao cho xảy ra phiên mã và dịch mã đã tối ưu hóa. Việc đưa vào có thể được thực hiện bằng phương pháp biến nạp đã biết được lựa chọn thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật và polynucleotit đưa vào tế bào vật chủ được biểu hiện để sản sinh polypeptit hoặc protein, và do đó có thể tăng hoạt tính của nó.

Cuối cùng, 6) sự kết hợp các phương pháp có thể được thực hiện bằng cách áp dụng bất kỳ một hoặc nhiều phương pháp từ 1) đến 5).

Sự tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein như vậy có thể là sự gia tăng

hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein tương ứng, dựa trên hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein được biểu hiện trong chủng kiểu đại hoặc chủng vi sinh vật trước khi biến đổi, hoặc sự gia tăng số lượng sản phẩm được sản xuất từ polypeptit hoặc protein tương ứng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “bất hoạt” hoặc “suy giảm” của polypeptit hoặc protein có nghĩa là bao gồm tất cả các trường hợp trong đó hoạt tính được làm suy giảm hoặc không có hoạt tính so với hoạt tính nội tại. Sự bất hoạt hoặc suy giảm có thể được sử dụng thay thế cho nhau bằng thuật ngữ “giảm điều hòa”, “giảm”, “làm giảm”, v.v.. Sự bất hoạt hoặc suy giảm còn có thể bao gồm trường hợp trong đó hoạt tính của bản thân protein được làm giảm hoặc loại bỏ do sự đột biến trong gen mã hóa protein, v.v., so với hoạt tính của protein có sẵn ban đầu bởi vi sinh vật, trường hợp trong đó mức độ tổng thể của hoạt tính protein nội bào thấp hơn so với hoạt tính của chủng tự nhiên, do sự ức chế biểu hiện hoặc ức chế dịch mã của gen mã hóa protein, trường hợp trong đó biểu hiện của gen hoàn toàn không xảy ra, và trường hợp trong đó protein không có hoạt tính nào, mặc dù được biểu hiện. Thuật ngữ “hoạt tính nội tại” có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi, khi một tính trạng bị thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. Thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho nhau bằng thuật ngữ “hoạt tính trước khi sửa đổi”. “Hoạt tính của polypeptit hoặc protein giảm so với hoạt tính nội tại” có nghĩa là hoạt tính giảm so với hoạt tính của polypeptit hoặc cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Sự bất hoạt hoặc suy giảm hoạt tính của protein có thể đạt được nhưng không giới hạn ở các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (Nakashima N *et al.*, “Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing”. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2773–2793; Sambrook *et al.* *Molecular Cloning* 2012; v.v.).

Các ví dụ về phương pháp có thể bao gồm:

- 1) phương pháp xóa tất cả hoặc một phần gen mã hóa protein;
- 2) phương pháp sửa đổi vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) sao cho làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein;

3) phương pháp sửa đổi trình tự gen mã hóa protein sao cho hoạt tính của protein được loại bỏ hoặc làm suy yếu;

4) phương pháp đưa vào antisense oligonucleotit (ví dụ, ARN antisense) liên kết bổ sung với bản phiên mã của gen mã hóa protein;

5) phương pháp bổ sung trình tự bổ sung với phía trước trình tự Shine–Dalgarno của trình tự Shine–Dalgarno của gen mã hóa protein để tạo ra cấu trúc thứ cấp, do đó ức chế sự liên kết của ribosom; và

6) phương pháp kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) bổ sung promoter ở đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự polynucleotit của gen mã hóa protein để được phiên mã ngược, và phương pháp có thể đạt được bằng sự kết hợp nêu trên, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, phương pháp xóa một phần hoặc tất cả gen mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein mong muốn nội sinh trong nhiễm sắc thể với polynucleotit có trình tự nucleotit được xóa một phần hoặc gen chỉ dấu, thông qua vector để đưa nhiễm sắc thể vào vi sinh vật. Phương pháp xóa một phần hoặc tất cả polynucleotit có thể được lấy ví dụ bằng phương pháp xóa polynucleotit bằng cách tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp xóa một phần hoặc tất cả gen có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến bằng cách sử dụng ánh sáng như tia cực tím (ultra violet: UV) hoặc chất hóa học và sau đó chọn chủng trong đó gen đích được xóa từ đột biến thu được. Phương pháp xóa gen bao gồm phương pháp bằng công nghệ tái tổ hợp ADN. Công nghệ tái tổ hợp ADN có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, đưa vào trình tự nucleotit hoặc vector bao gồm trình tự nucleotit có sự tương đồng với gen đích vào vi sinh vật để tạo ra sự tái tổ hợp tương đồng. Ngoài ra, trình tự nucleotit hoặc vector cần đưa vào có thể bao gồm chỉ dấu lựa chọn trội, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ của phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự polynucleotit, hoặc sự kết hợp các phương pháp để tăng

cường thêm hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện), hoặc bằng cách thay thế trình tự với trình tự polynucleotit có hoạt tính suy yếu. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm promotor, trình tự hoạt động, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự gen có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ gen trình tự, hoặc sự kết hợp các phương pháp để làm suy giảm thêm hoạt tính của polypeptit, hoặc bằng cách thay thế trình tự với trình tự gen được cải thiện để có hoạt tính yếu hơn hoặc với trình tự gen được cải thiện để không có hoạt tính, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ví dụ, sự biểu hiện gen có thể được ức chế hoặc làm suy giảm bằng cách đưa đột biến vào trình tự gen để tạo ra codon kết thúc.

Tuy nhiên, phương pháp nêu trên chỉ là ví dụ, và các phương pháp tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của protein và các phương pháp thao tác trên gen đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và do đó, vi sinh vật sản sinh L-metionin có thể được điều chế bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết khác nhau.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Trong sáng chế, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể bao gồm tất cả các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris*, hoặc *Corynebacterium flavescens*, và tốt hơn nữa là *Corynebacterium glutamicum*.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế có thể là bất kỳ môi trường nào thường được sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* mà không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí trong môi trường chung chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit

amin và/hoặc vitamin thích hợp, v.v., trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

Trong sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các carbohydrat, chẳng hạn như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; các rượu đường như mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin như axit glutamic, metionin, lysin, v.v. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên, chẳng hạn như tinh bột hydrolysate, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, mật mía, dịch chiết ngô, v.v., có thể được sử dụng, và cụ thể, các carbohydrat chẳng hạn như glucoza, mật đường đã qua xử lý khử trùng (tức là mật đường chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng. Ngoài ra, lượng thích hợp các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đây. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại với nhau, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Nguồn nitơ có thể bao gồm các nguồn nitơ vô cơ, chẳng hạn như amoni, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat, v.v.; các axit amin, chẳng hạn như axit glutamic, metionin, glutamin, v.v.; và các nguồn nitơ hữu cơ, chẳng hạn như pepton, NZ-amin, cao thịt, dịch chiết nấm men, cao mạch nha, dịch chiết ngô, casein hydrolysate, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, bánh đậu nành đã khử chất béo hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, v.v.. Hợp chất vô cơ có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sunfat, sắt sunfat, mangan sunfat, canxi cacbonat v.v..

Nguồn lưu huỳnh có thể bao gồm ankansulfonat, chẳng hạn như metanesulfonat và etanesulfonat, các hợp chất chứa lưu huỳnh hữu cơ và vô cơ như sulfat, sulfit, hydro sulfua như  $H_2S$ , sulfua, các dẫn xuất sulfua, hỗn hợp của hợp chất chứa lưu huỳnh hữu cơ và vô cơ và thiosulfat, chẳng hạn như thioglycolat, thioxyanat và/hoặc thiourea, hoặc nguồn lưu huỳnh có thể không bao gồm các chất khác thiosulfat, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp sản xuất L-metionin theo sáng chế có thể bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường chứa thiosulfat. Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật bao gồm *metZ* ngoại lai và sử dụng thiosulfat như nguồn lưu huỳnh.

Thiosulfat có thể được sử dụng như nguồn lưu huỳnh của vi sinh vật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Đối với hợp chất vô cơ, natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, canxi cacbonat, v.v. có thể được sử dụng. Ngoài ra, môi trường có thể bao gồm các vitamin và/hoặc các tiền chất thích hợp, v.v.. Môi trường hoặc tiền chất có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo cách thức theo mẻ hoặc liên tục, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong sáng chế, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật bằng cách bổ sung hợp chất chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, axit sulfuric, v.v. vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp. Hơn nữa, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt chẳng hạn như axit béo polyglycol este có thể được thêm vào để ngăn tạo bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được đưa vào môi trường nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường nuôi cấy; hoặc có thể không đưa khí vào hoặc khí nitơ, hydrogên, hoặc cacbon đioxit có thể được đưa vào môi trường nuôi cấy để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc vi hiếu khí, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể là từ 25°C đến 40°C, và tốt hơn là, từ 28°C đến 37°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Việc nuôi cấy có thể tiếp tục cho đến khi thu được các nguyên liệu hữu ích với lượng mong muốn, và cụ thể trong 1 giờ đến 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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

Các amin axit chứa lưu huỳnh hoặc các dẫn xuất amin axit chứa lưu huỳnh đích có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, phương pháp nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ bổ sung. Ví dụ, các phương pháp chẳng hạn như ly tâm, lọc, xử lý bằng chất kết tủa kết tinh protein (phương pháp tách muối), tách chiết, nghiền bằng sóng âm, siêu lọc, thẩm tách, các loại sắc ký khác nhau như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, v.v., và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với nhau,

tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương thức này có thể bao gồm quá trình làm sạch bổ sung. Trong quá trình làm sạch, phương pháp làm sạch thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm sản sinh L-metionin, chế phẩm bao gồm vi sinh vật và thiosulfat.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm bất kỳ tá dược thích hợp nào thường được sử dụng trong các chế phẩm để sản xuất L-metionin, và các tá dược này có thể bao gồm, ví dụ, các chất bảo quản, chất làm ướt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định, chất đẳng trương, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế vi sinh vật sản sinh L-metionin, phương pháp bao gồm bước đưa protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai vào vi sinh vật.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai trong việc sản xuất L-metionin.

Do đó, vi sinh vật, gene *metZ* ngoại lai và protein được mã hóa, và việc đưa vào protein giống với mô tả ở trên.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Trong phần mô tả sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

#### **Ví dụ tham khảo 1: Điều chế plasmit**

Plasmit (pDCM2, trên Fig.1, có mã nhận biết SEQ ID NO: 81) được điều chế để đưa vào và thay thế gen trong nhiễm sắc thể *Corynebacterium*, và plasmit được tổng hợp sử dụng dịch vụ tổng hợp gen của Bionics Co. Plasmit được điều chế bao gồm enzym giới hạn để sử dụng để nhân dòng, tham khảo bài báo liên quan đến hệ thống sacB đã biết (*Gene*, 145 (1994) 69–73). Do đó, plasmit pDCM2 đã tổng hợp có những đặc điểm sau:

- 1) có khả năng tự sao chép trong *E. coli*, nhưng không thể tự sao chép trong *Corynebacterium*, bởi vì nó có nguồn gốc sao chép chỉ hoạt động trong *E. coli*;
- 2) plasmit pDCM2 có gen kháng kanamycin như chỉ dấu lựa chọn;
- 3) plasmit pDCM2 có gen Levan sucroza (*sacB*) như chỉ dấu lựa chọn dương thứ cấp; và
- 4) plasmit pDCM2 không để lại bất kỳ thông tin gen nào có nguồn gốc trong chủng đã điều chế cuối cùng.

Ví dụ 1: Điều chế vector tái tổ hợp để xóa gen *mcbR*

Trong ví dụ này, để điều chế chủng sản sinh metionin, chủng ATCC13032 kiểu dại được sử dụng để điều chế vector để bất hoạt *mcbR* mã hóa protein ức chế sinh tổng hợp metionin–xystein đã được bộc lộ trước đó (*J. Biotechnol.* 103:51–65, 2003).

Cụ thể, để xóa gen *mcbR* trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032, vector plasmit tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp sau đây. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (U.S. National Institutes of Health: NIH), thu được gen *mcbR* và trình tự bên cạnh của *Corynebacterium glutamicum* (có mã nhận biết SEQ ID NO: 1).

Nhằm mục đích thu được gen *mcbR* đã xóa, phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction: PCR) được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3, và các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 (bảng 1).

Bảng 1

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                    |
|-----------|-------------------------------------|
| 2         | TCGAGCTCGGTACCCCTGCCTGGTTTGTCTTGTA  |
| 3         | CGGAAAATGAAGAAAGTTCGGCCACGTCCTTTCGG |
| 4         | AGGACGTGGCCGAACCTTCTTCATTTTCCGAAGGG |
| 5         | CTCTAGAGGATCCCCGTTTCGATGCCCACTGAGCA |

PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó

kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng các đoạn ADN 700 bp.

Vector pDCM2 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, và các đoạn gen *mcbR* đã khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn, *smaI*, để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau khi phản ứng nhân dòng ghép đẳng nhiệt, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào các đoạn gen đích thông qua PCR, và plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên là pDCM2- $\Delta$ mcbR.

Ví dụ 2: Điều chế và nuôi cấy đã xóa gen *mcbR*

ATCC13032 chủng được biến nạp bằng sự tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể với vector pDC- $\Delta$ mcbR đã điều chế trong ví dụ 1 bằng điện biến nạp (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Sau đó, tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Chủng *Corynebacterium glutamicum* đã biến nạp, trong đó việc tái tổ hợp thứ cấp đã hoàn thành được thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 (bảng 2) để xác định chủng trong đó gen *mcbR* được xóa. Chủng tái tổ hợp được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* CM02-0618.

CM02-0618 được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế là Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng KCCM12425P vào ngày 04/01/2019.

Bảng 2

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')     |
|-----------|----------------------|
| 6         | AATCTGGATTTCGCCAGGT  |
| 7         | CTTCCTAACTCCTGAGGAAG |

Để phân tích khả năng sản xuất L-metionin của CM02-0618 đã điều chế, chủng được nuôi cấy cùng với chủng bố mẹ là chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 theo cách sau đây.

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và *Corynebacterium glutamicum* CM02-0618 của sáng chế được cấy chuyển tương ứng trong bình tam giác 250 ml chứa 25 mL môi trường bên dưới, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt

độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 24 mL môi trường sản xuất, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các chế phẩm của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau. Trong môi trường sản xuất,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  là loại thiosulfat được sử dụng như nguồn lưu huỳnh.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotin 100 µg, thiamin HCl 1000 µg, canxi pantothenat 2000 µg, nicotinamit 2000 µg (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (pH 8,0)

glucoza 50 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  12 g, dịch chiết nấm men 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 g, biotin 100 µg, HCl 1000 µg, canxi pantothenat 2000 µg, nicotinamit 3000 µg,  $\text{CaCO}_3$  30 g, xyanocobalamin (vitamin B12) 1 µg (trong 1 L nước cất)

Sau khi nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy nêu trên, nồng độ của L-metionin trong môi trường nuôi cấy được phân tích và thể hiện ở bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Xác định khả năng sản sinh L-metionin của các chủng kiểu dại và chủng đã xóa *mcbR*

| Chủng                                                  | L-Metionin (g/L) |
|--------------------------------------------------------|------------------|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (kiểu dại) | 0,00             |
| CM02-0618                                              | 0,04             |

Kết quả là, trong chủng chỉ loại bỏ *mcbR*, quan sát được việc sản sinh L-metionin.

Ví dụ 3-1: Điều chế các vector để đưa vào ba gen *metZ* ngoại lai

Thực nghiệm được thực hiện để giải quyết những vấn đề còn tồn tại của phương pháp sinh tổng hợp metionin hiện có đồng thời tăng cường sản xuất metionin bằng cách đưa *metZ* ngoại lai vào chủng *Corynebacterium*. Cụ thể, các vector để đưa vào *metZ* có nguồn gốc từ *Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodobacter sphaeroides* được điều chế.

Cụ thể, các vector plasmit tái tổ hợp được điều chế bằng các phương pháp sau đây để đưa vào bổ sung mỗi trong số ba loại gen *metZ* ngoại lai vào nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032.

Trước tiên, để đưa vào *metZ*, vector loại bỏ Ncgl1021 (Transposaza) được điều chế. Dựa trên trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của NIH, thu được Ncgl1021 và trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 8) của *Corynebacterium glutamicum*. Nhằm mục đích thu được gen Ncgl1021 đã xóa, PCR được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 (bảng 4).

Bảng 4

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                    |
|-----------|-------------------------------------|
| 9         | ACCCGGGGATCCTCTAGAATGTTTGTGATGCGCAG |
| 10        | GTCAGAGAGTACTTACGCTGATCGGGAGGGAAAGC |
| 11        | ATCAGCGTAAGTACTCTCTGACTAGCGTCACCCTC |
| 12        | CTGCAGGTCGACTCTAGAAAAGGGATTGGAGTGTT |

PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được các đoạn ADN tương ứng. Vector pDCM2 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, và các đoạn gen Ncgl1021 đã khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn *sma*I, để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau khi phản ứng nhân dòng ghép đẳng nhiệt, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào các đoạn gen đích thông qua PCR, và plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên là pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021.

Nhằm mục đích thu được các gen *metZs* (có nguồn gốc từ *Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, và *Rhodobacter sphaeroides*), PCR được thực hiện với mỗi ADN nhiễm sắc thể của *Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, và *Rhodobacter sphaeroides* làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và

SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18. Để biểu hiện ba loại gen *metZ* tương ứng, promoter PspI1 được sử dụng, và PspI1 được thực hiện PCR sử dụng vector ADN spl1-GFP đã bộc lộ trước đó (patent Hàn Quốc số 10-1783170 B1) làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 22 (bảng 5). PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

Bảng 5

| SEQ ID NO | Trình tự (5'-3')                     |
|-----------|--------------------------------------|
| 13        | ATCAAAACAGATATCATGGCATCCGACGCGCCGCA  |
| 14        | CGCTAGTCAGAGAGTTTAGTCAAGGCCCCGCAACA  |
| 15        | ATCAAAACAGATATCATGGCGGATGCACCCGGCGG  |
| 16        | CGCTAGTCAGAGAGTTTACAAGCTGTAAAGCGAAG  |
| 17        | ATCAAAACAGATATCATGACGAAGGACTGGAAGAC  |
| 18        | CGCTAGTCAGAGAGTTTCAATCACCAGCGAGCGCCT |
| 19        | CCGATCAGCGTAAGTGGCGCTTCATGTCAACAATC  |
| 20        | CGCGTCGGATGCCATGATATCTGTTTTGATCTCCT  |
| 21        | GGGTGCATCCGCCATGATATCTGTTTTGATCTCCT  |
| 22        | CCAGTCCTTCGTCATGATATCTGTTTTGATCTCCT  |

Kết quả là, thu được tương ứng ba loại đoạn gen *metZ* ngoại lai (có các mã nhận biết từ SEQ ID NO: 63 đến SEQ ID NO: 65) và các đoạn gen tương ứng promoter spl1 để biểu hiện ba loại gen *metZ*. Vector pDCM2-ΔNcgl1021 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzym giới hạn scaI. Sau khi phản ứng nhân dòng ghép đẳng nhiệt của các đoạn promoter spl1 đã khuếch đại với các đoạn *metZ* theo từng chủng, sau đó mỗi sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5α, sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào gen đích thông qua PCR, và tổng số ba loại plasmid thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmid, sau đó được đặt tên tương ứng là pDCM2-ΔNcgl1021-PsplCv*metZ* (*Chromobacterium violaceum metZ*), pDCM2-ΔNcgl1021-PsplHn*metZ* (*Hyphomonas neptunium metZ*), và pDCM2-ΔNcgl1021-PsplRsp*metZ* (*Rhodobacter sphaeroides metZ*).

Ví dụ 3-2: Điều chế vector để đưa vào gen *metZ*

Các vector cho các trình tự của sáu gen *metZ* có nguồn gốc từ *Rhodobacter sphaeroides* đã biết được điều chế bổ sung. Theo cách tương tự như trong ví dụ 3-1 (tham khảo các công bố đơn Hoa Kỳ số US 2013-0273614 A1 và US 2018-0355389 A1), các vector trong đó mỗi gen *metZ* mã hóa tương ứng các trình tự amin axit có các mã nhận biết từ SEQ ID NO: 66 đến SEQ ID NO: 71 được điều chế. Các gen *metZ* được đặt tên tương ứng là *RspmetZ\_dài*, *RspmetZ\_3*, *RspmetZ\_65*, *RspmetZ\_104*, *RspmetZ\_196*, và *RspmetZ\_3\_65\_104*, và cặp mỗi được sử dụng để đưa vào mỗi gen như sau.

Bảng 6

|                    | Đoạn mỗi      | Trình tự (5'–3')                        |
|--------------------|---------------|-----------------------------------------|
| <i>RspmetZ</i>     | SEQ ID NO: 72 | ATCAAAACAGATATCATGGGTATCGCGTTTCG<br>TGA |
| <i>RspmetZ_3</i>   | SEQ ID NO: 73 | CCTTCACGAAACGCGtTACCCATGATATCTG         |
| <i>RspmetZ_3</i>   | SEQ ID NO: 74 | CAGATATCATGGGTAAcGCGTTTCGTGAAGG         |
| <i>RspmetZ_65</i>  | SEQ ID NO: 75 | TAGCGGGCATAGATGtATTCGTGCGCGCCGG         |
| <i>RspmetZ_65</i>  | SEQ ID NO: 76 | CCGGCGCCGACGAATaCATCTATGCCCGCTA         |
| <i>RspmetZ_104</i> | SEQ ID NO: 77 | ACGATCGAGGTGAGCgCGCCGTGGATCGCGG         |
| <i>RspmetZ_104</i> | SEQ ID NO: 78 | CCGCGATCCACGGCGcGCTCACCTCGATCGT         |
| <i>RspmetZ_196</i> | SEQ ID NO: 79 | CGGGCGTCGCGAAGAtATTGTCCACGATGAC         |
| <i>RspmetZ_196</i> | SEQ ID NO: 80 | GTCATCGTGGACAATaTCTTCGCGACGCCCCG        |

Trước tiên, nhằm mục đích thu được *RspmetZ\_dài*, PCR được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Rhodobacter sphaeroides* sử dụng cặp mỗi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 22, và SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 18.

Kết quả là, thu được đoạn gen và đoạn promoter *spl1*.

Vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzym giới hạn *scaI*. Sau khi phản ứng nhân dòng ghép đẳng nhiệt của các đoạn promoter *spl1* đã khuếch đại với các đoạn *metZ* theo từng chủng, sau đó mỗi sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào gen đích thông qua PCR, và plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên là pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-Pspl*RspmetZ\_dài*.

Nhằm mục đích thu được *RspmetZ\_3*, *RspmetZ\_65*, *RspmetZ\_104*, *RspmetZ\_196*, và *RspmetZ\_3\_65\_104*, PCR được thực hiện với vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-Pspl*RspmetZ*\_dài làm mạch khuôn sử dụng các mã nhận biết SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 và SEQ ID NO: 18 (*RspmetZ\_3*), SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 và SEQ ID NO: 18 (*RspmetZ\_65*), SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 và SEQ ID NO: 18 (*RspmetZ\_104*), SEQ ID NO: 71 và SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 và 1 SEQ ID NO: 8 (*RspmetZ\_196*), SEQ ID NO: 72 và SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 và SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 và SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 77 và SEQ ID NO: 18 (*RspmetZ\_3\_65\_104*). PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

Kết quả là, thu được tổng số 10 đoạn.

Bảng 7

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| Đoạn 1  | SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 |
| Đoạn 2  | SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 18 |
| Đoạn 3  | SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 75 |
| Đoạn 4  | SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 18 |
| Đoạn 5  | SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 77 |
| Đoạn 6  | SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 18 |
| Đoạn 7  | SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 79 |
| Đoạn 8  | SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 18 |
| Đoạn 9  | SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 |
| Đoạn 10 | SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 |

Vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzym giới hạn *scaI*. Sau khi phản ứng nhân dòng ghép đẳng nhiệt của *RspmetZ\_3* và đoạn 1, đoạn 2, *RspmetZ\_65* và đoạn 3, đoạn 4, *RspmetZ\_104* và đoạn 5, đoạn 6, *RspmetZ\_196* và đoạn 7, đoạn 8, *RspmetZ\_3\_65\_104* và đoạn 1, đoạn 11, đoạn 12, đoạn 6, sau đó mỗi sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào gen đích thông qua PCR, và thu được tổng số sáu loại plasmit sử dụng phương pháp

tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên tương ứng là pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_dài, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_65, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_104, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_196, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3\_65\_104.

Ví dụ 4: Điều chế và nuôi cấy chủng được đưa vào *metZ* ngoại lai

9 loại gen *metZ* ngoại lai tương ứng được đưa vào chủng CM02-0618 là chủng sản sinh metionin đã điều chế trong ví dụ 2.

Cụ thể, chủng CM02-0618 là chủng sản sinh metionin đã điều chế trong ví dụ 2 được biến nạp bằng sự tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể với các vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplCvimetZ, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplHnemetZ, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_dài, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_65, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_104, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_196, và pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3\_65\_104 đã điều chế tương ứng trong ví dụ 3 bằng điện biến nạp (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999).

Sau đó, sự tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Chủng *Corynebacterium glutamicum* được biến nạp, trong đó sự tái tổ hợp thứ cấp được hoàn thành, được thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 để xác định chủng trong đó gen Ncgl1021 được xóa và gen *metZ* được đưa vào. Mỗi chủng tái tổ hợp được điều chế bằng cách đưa vào một trong chín loại vector vào CM02-0618, được đặt tên tương ứng là CM02-0618/ $\Delta$ Ncgl1021 và CM02-0757, CM02-0758, CM02-0759-1, CM02-0759-2, CM02-0759-3, CM02-0759-4, CM02-0759-5, và CM02-0759.

Để phân tích khả năng sản sinh L-metionin của các chủng đã điều chế, mỗi chủng được nuôi cấy với nhau cùng với chủng bố mẹ CM02-0618 theo cách sau đây.

Mỗi chủng được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 25 mL môi trường dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 24 mL môi trường sản xuất, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các chế phẩm của

môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 2000  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

glucoza 50 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  12 g, dịch chiết nấm men 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 3000  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CaCO}_3$  30 g, cobalamin (vitamin B12) 1  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất).

Hơn nữa, để so sánh với nguồn lưu huỳnh được sử dụng trong enzym chuyển hóa metionin hiện có, nguồn lưu huỳnh được sử dụng trong môi trường sản xuất được thay thế từ thiosulfat ( $\text{S}_2\text{O}_3$ ) bằng methyl mercaptan ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ), và các chủng được nuôi cấy theo cách tương tự. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-metionin trong mỗi môi trường nuôi cấy được phân tích và thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8

Xác định khả năng sản sinh L-metionin của các chủng được tăng cường biểu hiện *metZ*

| Chủng                                    | L-Metionin (g/L)<br>(nguồn lưu huỳnh: $\text{S}_2\text{O}_3$ ) | L-Metionin (g/L)<br>(nguồn lưu huỳnh: $\text{CH}_3\text{SH}$ ) |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| CM02-0618                                | 0,04                                                           | 0,01                                                           |
| CM02-0618 $\Delta$ Ncgl021               | 0,04                                                           | 0,01                                                           |
| CM02-0757 (C <i>vimetZ</i> )             | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0758 (H <i>nemetZ</i> )             | 0,12                                                           | 0,01                                                           |
| CM02-0759-1 (R <i>spmetZ</i> )           | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759-2 (R <i>spmetZ</i> _dài)       | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759-3 (R <i>spmetZ</i> _3)         | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759-4 (R <i>spmetZ</i> _65)        | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759-5 (R <i>spmetZ</i> _104)       | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759-6 (R <i>spmetZ</i> _196)       | 0,13                                                           | 0,02                                                           |
| CM02-0759<br>(R <i>spmetZ</i> _3_65_104) | 0,14                                                           | 0,02                                                           |

Kết quả là, khi chín loại gen *metZ* tương ứng được đưa vào, sản lượng L-

metionin tăng ít nhất 266%, so với sản lượng của chủng đối chứng, thể hiện rằng *metZ* ngoại lai theo sáng chế làm tăng đáng kể năng suất L-metionin thông qua sulfhydryl hóa, và cụ thể, hiệu quả cao so với việc sử dụng metyl mercaptan làm nguồn lưu huỳnh theo phương pháp hiện tại. Điều này có thể giải thích rằng không giống như *Corynebacterium glutamicum metB* và *metY*, *metZ* ngoại lai theo sáng chế không nhận ức chế phản hồi, và do đó sản lượng metionin tăng lên.

Các chủng CM02-0757, CM02-0758, và CM02-0759 được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế là Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận số lưu chủng tương ứng KCCM12506P, KCCM12507P, KCCM12508P vào ngày 02/05/2019.

Ví dụ 5: Điều chế vector tái tổ hợp để xóa các gen *metB* và *metY*

Để kiểm tra chức năng (hoạt tính) của protein được mã hóa bởi *metZ* theo sáng chế và để so sánh hoạt tính với hoạt tính *metY* và *metB*, *metB* và *metY* của *C.gl* được xóa tương ứng. Cụ thể, để xóa tương ứng các gen *metB* và *metY*, các vector plasmit tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp sau đây. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của NIH, thu được các gen *metB* và *metY* và các trình tự bên cạnh (có các mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26) của *Corynebacterium glutamicum*.

Nhằm mục đích thu được tương ứng các gen *metB* và *metY*, PCR được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30 (*metB*) và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34 (*metY*) (bảng 9).

Bảng 9

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                                          |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| 27        | GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGCCAGTAAGGTGTTACCCATGC               |
| 28        | CTGCTTGCCGCCAAATAGTTTAGTACTGGTAGATCAACTCCTGTAATCAGAATTCTA |
| 29        | TAGAATTCTGATTACAGGAGTTGATCTACCAGTACTAACTATTTGGCGGCAAGCAG  |
| 30        | TCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGATCTCAATTCCCATGCCT                |

|    |                                     |
|----|-------------------------------------|
|    | C                                   |
| 31 | TCGAGCTCGGTACCCCTGCAATAGCTGCAAAGTGG |
| 32 | TGAGTCTATTTAAAGCGGGTAATTTTCTTGACTTT |
| 33 | CAAGAAAATTACCCGCTTTAAATAGACTCACCCCA |
| 34 | CTCTAGAGGATCCCCGCCTTAATTTGGGCGGATTG |

PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng các đoạn ADN 700 bp.

Vectơ pDCM2 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, và các đoạn gen *metB* và *metY* đã khuếch đại tương ứng được xử lý với enzym giới hạn *smal*, để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau khi gắn sử dụng ADN ligaza, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với mỗi vectơ được đưa vào các đoạn đã xóa của các gen đích thông qua PCR, và mỗi plasmid thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmid, và sau đó các plasmid thu được được đặt tên tương ứng là pDCM2- $\Delta$ metB và pDCM2- $\Delta$ metY.

Ví dụ 6: Điều chế và nuôi cấy chủng đã xóa gen *metB* hoặc *metY* từ ba loại chủng được tăng cường *metZ*

Các chủng CM02-0618, CM02-0757, CM02-0758, và CM02-0759 được biến nạp bởi sự tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể với các vectơ pDCM2- $\Delta$ metB và pDCM2- $\Delta$ metY đã điều chế nêu trên tương ứng bằng điện biến nạp (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Sau đó, tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Chủng *Corynebacterium glutamicum* đã biến nạp trong đó sự tái tổ hợp thứ cấp đã hoàn thành được kiểm tra để xóa các gen *metB* và *metY* sử dụng tương ứng các cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36 (*metB*) và SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 38 (*metY*) (bảng 10).

Bảng 10

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')     |
|-----------|----------------------|
| 35        | TTCCTGGTCTGACGACAGTG |

|    |                       |
|----|-----------------------|
| 36 | GATGTCTTCAGCTTCACCCTG |
| 37 | CCGAGGATAATCCACAAGGT  |
| 38 | CGAAGCGTTCGTCGATTTCT  |

Các chủng tái tổ hợp được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CM02-0618/ $\Delta$ metB CM02-0757/ $\Delta$ metB, CM02-0758/ $\Delta$ metB, CM02-0759/ $\Delta$ metB, CM02-0618/ $\Delta$ metY, CM02-0757/ $\Delta$ metY, CM02-0758/ $\Delta$ metY, CM02-0759/ $\Delta$ metY.

Để phân tích khả năng sản sinh L-metionin của các chủng CM02-0618/ $\Delta$ metB, CM02-0757/ $\Delta$ metB, CM02-0758/ $\Delta$ metB, CM02-0759/ $\Delta$ metB, CM02-0618/ $\Delta$ metY, CM02-0757/ $\Delta$ metY, CM02-0758/ $\Delta$ metY, và CM02-0759/ $\Delta$ metY đã điều chế, chúng được nuôi cấy tương ứng bằng phương pháp sau.

CM02-0618, CM02-0757, CM02-0758, và CM02-0759 làm các chủng bố mẹ và CM02-0618/ $\Delta$ metB, CM02-0757/ $\Delta$ metB, CM02-0758/ $\Delta$ metB, CM02-0759/ $\Delta$ metB, CM02-0618/ $\Delta$ metY, CM02-0757/ $\Delta$ metY, CM02-0758/ $\Delta$ metY, và CM02-0759/ $\Delta$ metY đã điều chế nêu trên được cấy chuyển tương ứng trong bình tam giác 250 ml chứa 25 mL môi trường dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, mỗi 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 24 mL môi trường sản xuất, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các chế phẩm của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 2000  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

glucoza 50 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  12 g, dịch chiết nấm men 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 3000  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CaCO}_3$  30 g, cobalamin (Vitamin B12) 1  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất).

Các nồng độ của L-metionin và homolanthionin sản phẩm phụ trong mỗi môi trường nuôi cấy được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy nêu trên được phân tích và thể hiện ở bảng 11.

Bảng 11

Xác định khả năng sản sinh L-metionin hoặc homolanthionin của các chủng được xóa *metY* hoặc *metB*

| Chủng                    | L-Metionin (g/L) | Homolanthionin (g/L) |
|--------------------------|------------------|----------------------|
| CM02-0618                | 0,04             | 0,82                 |
| CM02-0618/ $\Delta$ metB | 0,03             | 0                    |
| CM02-0618/ $\Delta$ metY | 0,02             | 0,81                 |
| CM02-0757                | 0,13             | 0,17                 |
| CM02-0758                | 0,12             | 0,17                 |
| CM02-0759                | 0,13             | 0,18                 |
| CM02-0757/ $\Delta$ metB | 0,13             | 0                    |
| CM02-0758/ $\Delta$ metB | 0,12             | 0                    |
| CM02-0759/ $\Delta$ metB | 0,13             | 0                    |
| CM02-0757/ $\Delta$ metY | 0,08             | 0,19                 |
| CM02-0758/ $\Delta$ metY | 0,07             | 0,18                 |
| CM02-0759/ $\Delta$ metY | 0,08             | 0,19                 |

Từ các kết quả, xác nhận rằng *metZ* ngoại lai thực hiện chức năng tương tự như *metB*, tức là tạo ra metionin thông qua chuyển sulfite hóa sử dụng xystein làm nguồn lưu huỳnh. Nói cách khác, mặc dù *metB* hoặc *metY* được xóa, việc sản xuất metionin có thể được duy trì với năng suất cao bằng cách sử dụng *metZ*, và do đó, gen có thể được thay thế với *metZ* ngoại lai để giải quyết những vấn đề còn tồn tại của *metB* và/hoặc *metY* trong *Corynebacterium*.

Hơn nữa, trong chủng có mặt *metB* và được đưa vào *metZ* ngoại lai, việc sản xuất metionin được tăng cường và việc sản xuất homolanthionin chỉ khoảng 20% so với đối chứng (CM02-0618), thể hiện rằng việc sản xuất homolanthionin sản phẩm phụ giảm khi *metZ* được tăng cường. Homolanthionin là chất được tổng hợp bằng cách tiêu thụ *O*-acetylhomoserin, và do đó việc sản xuất homolanthionin giảm sản xuất metionin. *metZ* ngoại lai ức chế sản xuất sản phẩm phụ, điều này giải quyết những vấn đề còn tồn tại của *metB* để ức chế sản xuất sản phẩm phụ và tăng cường tổng hợp metionin.

Các kết quả nêu trên lần đầu tiên cho thấy rằng *metZ* theo sáng chế có thể làm trung gian chuyển sulfite hóa bằng cách sử dụng xystein, và *metZ* theo sáng chế có thể được sử dụng không chỉ để tăng sản xuất metionin mà còn giải quyết những vấn đề còn tồn tại của *metB* thuộc chủng *Corynebacterium*.

### Ví dụ 7: Điều chế vector tái tổ hợp để đồng thời tăng cường *metH* và *cysI*

Trong ví dụ này, để điều chế chủng sản sinh metionin trong đó *mcbR* không được xóa, vector để tăng cường *metH* mã hóa metionin synthaza (Ncgl1450) và *cysI* mã hóa sulfite reductaza (Ncgl2718) được điều chế đồng thời.

Cụ thể, để đưa vào bổ sung các gen *metH* và *cysI* vào nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032, vector plasmid tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp sau đây. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của NIH, thu được gen *metH* và trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 39) và gen *cysI* và trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 40) của *Corynebacterium glutamicum*.

Nhằm mục đích thu được gen *metH* và *cysI*, PCR được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42, và SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44. Promotor Pcj7 được sử dụng để tăng cường biểu hiện của gen *metH*, và promotor Psp11 được sử dụng để tăng cường biểu hiện của gen *cysI*. Để thu được mỗi promotor, PCR được thực hiện đối với Pcj7 với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46, và đối với Psp11 với vector ADN sp11-GFP (KR 10-1783170 B1) đã bộc lộ trước đó làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 48. Các trình tự của cặp mồi được sử dụng được thể hiện trong bảng 12 dưới đây.

Bảng 12

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                     |
|-----------|--------------------------------------|
| 41        | CAACGAAAGGAAACAATGTCTACTTCAGTTACTTC  |
| 42        | TAGTCAGAGAGTGATTAGACGTTAAAGTACTTTG   |
| 43        | ATCAAAACAGATATCATGACAACAACCAACCGGAAG |
| 44        | CGCTAGTCAGAGAGTTCACACCAAATCTTCCTCAG  |
| 45        | CCGATCAGCGTAAGTAGAAACATCCCAGCGCTACT  |
| 46        | AACTGAAGTAGACATTGTTTCCTTTCGTTGGGTAC  |
| 47        | TACTTTAACGTCTAAGGTACCGGCGCTTCATGTCA  |
| 48        | GGTGGTTGTTGTCATGATATCTGTTTTGATCTCCT  |

PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong

5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 4 phút, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng *metH* và *cysI*, các đoạn ADN promotor Pcj7 và promotor Psp11.

Vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzym giới hạn *scaI*, và bốn đoạn ADN đã khuếch đại được xử lý với *scaI* để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau phản ứng IST, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào các đoạn đã xóa của các gen đích thông qua PCR, và plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên là pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-Pcj7*metH*-Psp11*cysI*.

Ví dụ 8: Điều chế chủng để đồng thời tăng cường *metH* và *cysI* và sản xuất L-metionin sử dụng chủng này

Chủng ATCC13032 được biến nạp bởi sự tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể tương ứng với các vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021 và pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-Pcj7*metH*-Psp11*cysI* đã điều chế nêu trên bằng điện biến nạp (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Sau đó, tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Các chủng *Corynebacterium glutamicum* đã biến nạp, trong đó việc tái tổ hợp thứ cấp đã hoàn thành, được kiểm tra để xóa gen Ncgl1021 và đưa vào gen Pcj7-*metH*-Psp11*cysI* sử dụng tương ứng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên tương ứng là 13032/ $\Delta$ Ncgl1021 và CM02-0753.

Để phân tích khả năng sản sinh L-metionin của các chủng 13032/ $\Delta$ Ncgl1021 và CM02-0753 đã điều chế, chúng được nuôi cấy tương ứng cùng với chủng bố mẹ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng phương pháp sau đây.

Các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và 13032/ $\Delta$ Ncgl1021 và CM02-0753 đã điều chế nêu trên được cấy chuyển tương ứng trong bình tam giác 250 ml chứa 25 mL môi trường dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, mỗi 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 24 mL môi trường sản xuất,

và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các chế phẩm của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 2000  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

glucoza 50 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  12 g, dịch chiết nấm men 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 3000  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CaCO}_3$  30 g, cobalamin (vitamin B12) 1  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất).

Các nồng độ của L-metionin trong mỗi môi trường nuôi cấy được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy nêu trên được phân tích và thể hiện ở bảng 13.

Bảng 13

Xác định khả năng sản sinh L-metionin của chủng có *mcbR*

| Chủng                                                  | L-Metionin (g/L) |
|--------------------------------------------------------|------------------|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (kiểu đại) | 0                |
| 13032/ $\Delta\text{Ncgl1021}$                         | 0                |
| CM02-0753                                              | 0,03             |

Kết quả là, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-metionin của chủng biểu hiện quá mức *metH* và *cysI* trong đó *mcbR* vẫn có mặt được cải thiện 0,03 g/L so với chủng đối chứng.

Ví dụ 9-1: Điều chế vector để tăng cường các gen *metZ* ở các vị trí khác ngoài vị trí Ncgl1021

Để đưa vào ba loại gen *metZ* ngoại lai ở các vị trí khác ngoài vị trí hiện tại trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032, các vector plasmit tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp sau đây.

Trước tiên, để đưa vào *metZ*, vector để xóa Ncgl2748 (Transposaza) được điều chế. Dựa trên các trình tự nucleotit được nộp lưu chủng ở Ngân hàng gen của NIH, thu được Ncgl2748 và trình tự bên cạnh (có mã nhận biết SEQ ID NO: 49) của *Corynebacterium glutamicum*. Nhằm mục đích thu được gen Ncgl2748 đã xóa, PCR

được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 50 và SEQ ID NO: 51, và SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 53 (bảng 14). PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng các đoạn ADN.

Bảng 14

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                         |
|-----------|------------------------------------------|
| 50        | GTACCCGGGGATCCTCTAGACCTGGGTAACTTCCTGTCCA |
| 51        | CAGGTTAGCAGTACTTCTCAAGTTTCTCGGCGGTG      |
| 52        | AACTTGAGAAGTACTGCTAACCTGCAGAAACCTTG      |
| 53        | GCCTGCAGGTCGACTCTAGACTCCGCAGAAATCGTGGGGC |

Vector pDCM2 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* và các đoạn gen Ncgl2748 đã khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn *smaI*, để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau khi phản ứng IST, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào các đoạn đã xóa của các gen đích thông qua PCR, và plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên là pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748.

Nhằm mục đích thu được ba loại gen *metZ* (*Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodobacter sphaeroides*), PCR được thực hiện với các vector đã điều chế pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplCv*metZ* (*Chromobacterium violaceum metZ*), pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplHn*metZ* (*Hyphomonas neptunium metZ*), và pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRsp*metZ* (*Rhodobacter sphaeroides metZ*) làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 56, và SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 57 (bảng 15). PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tổng số 30 chu kỳ gồm có biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được ba loại đoạn ADN.

Bảng 15

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')                    |
|-----------|-------------------------------------|
| 54        | CGCCGAGAACTTGAGAAGTGGCGCTTCATGTCAA  |
| 55        | CTGCAGGTTAGCAGTTTAGTCAAGGCCCCGCAACA |
| 56        | CTGCAGGTTAGCAGTTCACAAGCTGTTAAGCGAAG |
| 57        | CTGCAGGTTAGCAGTTCAGATCACCGCGAGCGCCT |

Vector pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748 không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum* được xử lý với enzyme giới hạn *scaI*. Sau khi phản ứng IST với các đoạn đã khuếch đại theo từng chủng, sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , sau đó xét nghiệm kính phết sản phẩm trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với vector được đưa vào gen đích thông qua PCR, và tổng số ba plasmit thu được sử dụng phương pháp tách chiết plasmit, sau đó được đặt tên tương ứng là pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplCvmetZ (*Chromobacterium violaceum metZ*), pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplHnemetZ (*Hyphomonas neptunium metZ*), pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ (*Rhodobacter sphaeroides metZ*).

Ví dụ 9-2: Điều chế vector để tăng cường các gen *metZ* ở các vị trí khác ngoài vị trí Ncgl1021

Ngoài ra, để kiểm tra xem việc sản xuất metionin có được tăng lên trong chủng được đưa vào gen *metZ* có ít nhất 99% sự tương đồng trình tự hay không, các vector đối với 5 gen *metZ* của ví dụ 3-2 được điều chế bổ sung.

Mỗi vector được đưa vào với một trong sáu gen *metZ* được điều chế theo cách giống với ví dụ 9-1.

Tổng số sáu vector được điều chế như sau: được đặt tên tương ứng là pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_dài,  $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_3, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_65, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_104, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_196, và pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRspmetZ\_3\_65\_104. Để điều chế các vector này,  $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_dài pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_65, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_104, pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_196, và pDCM2- $\Delta$ Ncgl1021-PsplRspmetZ\_3\_65\_104 đã điều chế trong ví dụ 4 được sử dụng tương ứng làm mạch khuôn ADN, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 57 thường được sử dụng. Các quá trình khác giống với ví dụ 9-1.

Ví dụ 10: Sự phát triển của chủng được tăng cường *metZ* ngoại lai dựa trên chủng sản sinh L-metionin có *mcbR* và sự sản xuất L-metionin sử dụng chủng này

Chủng CM02-0753 được biến nạp bằng sự tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể với các vector đã điều chế tương ứng pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplCv*metZ*, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplHn*metZ*, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_dài, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_3, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_65, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_104, pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_196, và pDCM2- $\Delta$ Ncgl2748-PsplRsp*metZ*\_3\_65\_104 bằng điện biến nạp, (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Sau đó, tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trong môi trường rắn chứa sucroza. Các chủng *Corynebacterium glutamicum* đã biến nạp trong đó sự tái tổ hợp thứ cấp đã hoàn thành được kiểm tra để đưa vào mỗi gen *metZ* ngoại lai ở vị trí Ncgl2748 sử dụng tương ứng các mã nhận biết SEQ ID NO: 58 và SEQ ID NO: 59 (bảng 16).

Bảng 16

| SEQ ID NO | Trình tự (5'–3')     |
|-----------|----------------------|
| 58        | TTCTCCGTGCCGAGAAAATC |
| 59        | GTAGATGATCTCGCCATTG  |

Các chủng tái tổ hợp được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* 13032/ $\Delta$ Ncgl2748, CM02-0765, CM02-0766, CM02-0767-1, CM02-0767-2, CM02-0767-3, CM02-0767-4, CM02-0767-5, CM02-0767-6, CM02-0767.

Để phân tích khả năng sản sinh L-metionin của các chủng đã điều chế, chúng được nuôi cấy tương ứng cùng với chủng bố mẹ *Corynebacterium glutamicum* CM02-0753 bằng phương pháp sau đây.

Mỗi chủng được cấy chuyển tương ứng trong bình tam giác 250 ml chứa 25 mL môi trường dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, mỗi 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển trong bình tam giác 250 ml chứa 24 mL môi trường sản xuất, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các chế phẩm của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 2000  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

glucoza 50 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  12 g, dịch chiết nấm men 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 g, biotin 100  $\mu\text{g}$ , thiamin HCl 1000  $\mu\text{g}$ , canxi pantothenat 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamit 3000  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CaCO}_3$  30 g, cobalamin (vitamin B12) 1  $\mu\text{g}$  (trong 1 L nước cất).

Các nồng độ của L-metionin trong môi trường nuôi cấy được nuôi cấy bởi phương pháp nuôi cấy nêu trên được phân tích và thể hiện ở bảng 17.

Bảng 17

Xác định khả năng sản sinh L-metionin bằng sự biểu hiện quá mức của *metZ* ngoại lai trong chủng có *mcbR*

| Chủng                                 | L-Metionin (g/L) |
|---------------------------------------|------------------|
| CM02-0753                             | 0,03             |
| CM02-0753/ $\Delta\text{Ncgl2748}$    | 0,03             |
| CM02-0765 ( <i>CvimetZ</i> )          | 0,10             |
| CM02-0766 ( <i>HnemetZ</i> )          | 0,09             |
| CM02-0767-1( <i>RspmetZ</i> )         | 0,10             |
| CM02-0767-2 ( <i>RspmetZ</i> _dài)    | 0,10             |
| CM02-0767-3 ( <i>RspmetZ</i> _3)      | 0,10             |
| CM02-0767-4 ( <i>RspmetZ</i> _65)     | 0,10             |
| CM02-0767-5 ( <i>RspmetZ</i> _104)    | 0,10             |
| CM02-0767-6 ( <i>RspmetZ</i> _196)    | 0,10             |
| CM02-0767 ( <i>RspmetZ</i> _3_65_104) | 0,11             |

Kết quả là, xác nhận rằng khi các gen *metZ* ngoại lai được đưa tương ứng vào chủng sản sinh metionin có *mcbR*, sản lượng metionin cũng được tăng lên.

CM02-0765, CM02-0766, và CM02-0767 được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế là Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc theo Hiệp ước Budapest và được xác nhận các số lưu chủng tương ứng KCCM12509P, KCCM12510P, và KCCM12511P vào ngày 02/05/2019.

Dựa trên phần mô tả ở trên, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh

vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả ở trên được coi là minh họa cho tất cả khía cạnh và không bị giới ở đây. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo mà không phải là mô tả chi tiết, và do đó tất cả các sửa đổi hoặc biến thể xuất phát từ nguyên lý kỹ thuật và phạm vi của sáng chế và phương án tương đương của chúng đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Vi sinh vật được đưa vào hoạt tính của protein được mã hóa bởi *metZ* theo sáng chế cho thấy năng suất cao bởi vì nó tạo ra ít sản phẩm phụ hơn, so với *metY*, và vi sinh vật không nhận ức chế phản hồi, không giống như *metB* nhận ức chế phản hồi bằng metionin, và do đó sản sinh L-metionin với năng suất cao, nhờ đó được ứng dụng hữu ích vào sản xuất công nghiệp L-metionin.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất L-metionin bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai, trong môi trường chứa thiosulfat.
2. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó protein có hoạt tính *O*-axylhomoserin transsulfuraza.
3. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó protein có nguồn gốc từ *Chromobacterium violaceum*, *Hyphomonas neptunium*, hoặc *Rhodobacter sphaeroides*.
4. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó protein bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều protein được chọn từ nhóm gồm có các trình tự polypeptit có các mã nhận biết SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, và SEQ ID NO: 62; và các trình tự polypeptit có ít nhất 90% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polypeptit này.
5. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó vi sinh vật bao gồm một hoặc nhiều sự biến đổi gen được chọn từ nhóm gồm có sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của xystathionin gamma synthaza; sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza; sự suy giảm hoặc bất hoạt hoạt tính của protein ức chế sinh tổng hợp metionin–xystein; sự tăng cường hoạt tính của metionin synthaza; và sự tăng cường hoạt tính của sulfit reductaza.
6. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu hồi L-metionin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.
8. Phương pháp sản xuất L-metionin theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc sản xuất homolanthionin được làm giảm.
9. Chế phẩm sản xuất L-metionin chứa vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* được đưa vào protein được mã hóa bởi gen *metZ* ngoại lai; và thiosulfat.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

|       |                                                                                                                                                              |      |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <110> | CJ CheilJedang Corporation                                                                                                                                   |      |
| <120> | VI SINH VẬT SẢN SINH L-METIONIN ĐƯỢC ĐƯA VÀO PROTEIN ĐƯỢC MÃ HÓA BỞI GEN METZ NGOẠI LAI, CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-METIONIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY |      |
| <130> | OPA20069                                                                                                                                                     |      |
| <150> | KR 10-2019-0134797                                                                                                                                           |      |
| <151> | 2019-10-28                                                                                                                                                   |      |
| <160> | 81                                                                                                                                                           |      |
| <170> | KoPatentIn 3.0                                                                                                                                               |      |
| <210> | 1                                                                                                                                                            |      |
| <211> | 2642                                                                                                                                                         |      |
| <212> | ADN                                                                                                                                                          |      |
| <213> | Corynebacterium glutamicum                                                                                                                                   |      |
| <400> | 1                                                                                                                                                            |      |
|       | ctcccgcgca ctgctgcaat ccgcaccgtg cccaatgatg gtggttcgcc cacctgagaa                                                                                            | 60   |
|       | gattaagaag tagtttcttt taagtttcga tgccccgggt tcctgatttt gtgcagggag                                                                                            | 120  |
|       | gccggggcat tgggtgtttgc gggttagttc gggccattcg aaagggagaa accaagggca                                                                                           | 180  |
|       | gccagacaga cgtgccaaga atctggattt ccgccagggt ttggcacgcc cgtctggttt                                                                                            | 240  |
|       | aggcaatgag ataccgaaca cacgtgccaa aagttcggct ttttcgccga tcttgtcacg                                                                                            | 300  |
|       | cctgcctggg ttgtcttgta aagagtgatt tcatggccga gactcctaaa agtttgacct                                                                                            | 360  |
|       | cacaggattg cttctaaggg cctctccaat ctccactgag gtacttaatc cttccgggga                                                                                            | 420  |
|       | attcggggcg ttaaatcgag aaattaggcc atcacctttt aataacaata caatgaataa                                                                                            | 480  |
|       | ttggaatagg tcgacacctt tggagcggag ccggttaaaa ttggcagcat tcaccgaaag                                                                                            | 540  |
|       | aaaaggagaa ccacatgctt gccctagggt ggattacatg gatcattatt ggtgggtctag                                                                                           | 600  |
|       | ctggttggtat tgctccaag attaaaggca ctgatgctca gcaaggaatt ttgctgaaca                                                                                            | 660  |
|       | tagtcgtcgg tattatcggg ggtttggttag gcggctgggt gcttggaatc ttcggagtgg                                                                                           | 720  |
|       | atggtgcccg tggcgggctt atcttcagct tcatcacatg tctgattggg gctgtcattt                                                                                            | 780  |
|       | tgctgacgat cgtgcagttc ttactcggga agaagtaatc tgctttaaat ccgtagggcc                                                                                            | 840  |
|       | tggtgatatt tcgatatcaa caggcctttt ggtcattttg gggtggaata agcgctagac                                                                                            | 900  |
|       | ttgcctgtgg attaaaacta tacgaaccgg tttgtctata ttgggtgttag acagttcgtc                                                                                           | 960  |
|       | gtatcttgaa acagaccaac ccgaaaggac gtggccgaac gtggctgcta gcgcttcagg                                                                                            | 1020 |
|       | caagagtaaa acaagtgccg gggcaaaccg tcgtcgcaat cgaccaagcc cccgacagcg                                                                                            | 1080 |
|       | tctcctcgat agcgcaacca accttttcac cacagaaggt attcgctca toggatttga                                                                                             | 1140 |
|       | tcgtatcctc cgtgaagctg acgtggcgaa ggcgagcctc tattcccttt toggatcgaa                                                                                            | 1200 |
|       | ggacgccttg gttattgcat acctggagaa cctcgatcag ctgtggcggtg aagcgtggcg                                                                                           | 1260 |

tgagcgcacc gtcggtatga aggatccgga agataaaatc atcgcgttct ttgatcagtg 1320  
 cattgaggaa gaaccagaaa aagatttccg cggctcgac tttcagaatg cggctagtga 1380  
 gtaccctcgc cccgaaactg atagcgaaaa gggcattggt gcagcagtgtagtagcaccg 1440  
 cgagtgggtg cataagactc tgactgattt gctcactgag aagaacggct acccaggcac 1500  
 caccaggcg aatcagctgt tgggtgttct tgatgggtga cttgctggat ctcgattggt 1560  
 ccacaacatc agtcctcttg agacggctcg cgatttggct cggcagttgt tgtcggctcc 1620  
 acctgcggac tactcaattt agtttcttca ttttccgaag gggatatctt gttgggggag 1680  
 gcgtcgataa gccccttctt tttagcttta acctcagcgc gacgctgctt taagcgtgc 1740  
 atggcggcgc ggttcatttc acgttgcggt tcgcgcctct tgttcgcgat ttctttgcgg 1800  
 gcctgttttg cttcgttgat ttcggcagta cgggttttgg tgagttccac gtttggtgct 1860  
 tgaagcgttg aggcgttcca tggggtgaga atcatcaggg cgcggttttt gcgtcgtgct 1920  
 cacaggaaga tgcgcttttc tttttgtttt gcgcggtaga tgcgcgctg ctctaggtgg 1980  
 tgcactttga aatcgctcgtt aagtgggtat ttgcgttcca aaatgaccat catgatgatt 2040  
 gtttgaggga gcgtccacag gttgttgctg acccaataga gtgcgattgc tgtggggaat 2100  
 ggtcctgtga ggccaagga cagtgggaag atcggcgcca ggatcgacat cagcatcatg 2160  
 aacttcagca tgccgttaga gaatccgat gcgtaatcgt tggtttgga gctgcggtac 2220  
 atggacatcg ccatgttgat tgcggtgagg attgcggctg tgatgaacag tggcaaaacg 2280  
 aaactaagaa cttccgcctg cgtggtgctc aaatatatta gctgctcagt gggcatcgaa 2340  
 acataagcgg gcagaggcac attgctcacg cgaccagcga ggaaagattc cacttcctca 2400  
 ggagtttaga agccgatcga ctggaagacg ggattttcca aaccaccttc agggcgagcc 2460  
 atgctggagaa gtgcccagta aagaccaagg acaatcggtat tctggatcag cccaggcaca 2520  
 caacctgcca gcgggttaat gccgtattcc ttattcaaat cattctggcg cttctgcaac 2580  
 tcccgaatgg acgcttcacg gtactttccc ttgtattctt cccggagcgc agcgcggtga 2640  
 gg 2642

<210> 2  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mồi

<400> 2  
 tcgagctcgg taccctgcc tggtttgcct tgta

34

<210> 3

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 3  
 cggaatga agaaagttcg gccacgtcct ttcgg 35

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 4  
 aggacgtggc cgaactttct tcattttccg aaggg 35

<210> 5  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 5  
 ctctagagga tccccgtttc gatgcccact gagca 35

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 6  
 aatctggatt tccgccaggt 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 7  
 cttcctaact cctgaggaag 20

<210> 8  
 <211> 3311  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 8  
 ctcatccag cgtcacgacg ttccgaaggt actggttacc tggcattggg cactaccggt 60  
 tctgcagcac ttggaccagc cctagcactt tttgtcctag gaacatttga ttacgacatg 120  
 ctgtttatcg tggctttggc aacctcggtc atctctttga tcgccgtcgt gttcatgtac 180  
 tttaagacca gcgaccctga gccttctggg gaaccagcca agttcagctt caaatctatt 240  
 atgaacccaa agatcatccc catcggcac tttatcttgc ttatttgctt tgcttactct 300  
 ggcgtcattg cctacatcaa cgcatttgct gaagaacgcg atctgattac ggggtgctgga 360  
 ttgttcttca ttgcctacgc agtatcaatg tttgtgatgc gcagcttcc tggcaaaactg 420  
 caggaccgtc gcggagacaa cgtcgttatt tactttggat tgttcttctt cgttatttcc 480  
 ttgacgattt tgtcctttgc cacttccaac tggcacgttg tgttgctcgg agtcattgca 540  
 ggtctgggat acggcacttt gatgccagca gtgcagtcca tcgctggttg tgtagtagac 600  
 aaaaccgaat tcggtacggc cttctccact ttgttctgt ttgtggactt aggttttggc 660  
 tttggacctt ttatcctggg agcagtttct gcggcaattg gtttcggacc tatgtatgca 720  
 gcactggcag gtgtgggtgt gattgccgga atcttctacc tgttcacaca cgctcgcacc 780  
 gatcgagcta agaattggctt tgttaaacac ccagagcctg tcgctttagt tagctagtcc 840  
 tttcagcttt ccctcccgat cagcgtaaac cggcccttcc ggttttgggg tacatcacag 900  
 aacctgggct agcgggtgtag acccgaaaat aaacgagcct tttgtcaggg ttaagggtta 960  
 ggtatctaag ctaaccaaac accaacaata ggctctaccc atgaagtcta ccggcaacat 1020  
 catcgctgac accatctgcc gcaactgcga actaggactc accatcaccg gcgcttccga 1080  
 tgcaggtgat tacacctga tcgaagcaga cgcactcgac tacacctcca cctgcccaga 1140  
 atgctcccaa cctgggggtgt ttctgcatca caccacccg atgctcattg atttaccat 1200  
 cgtcgggttt ccaccaaac tgtttatccg tctacctgc taccgtgca ccaacccac 1260  
 atgtaagcaa aagtatttcc aagcagaact aagctgcgct gaccacggtt aaaaggtcac 1320  
 ccacgggtc acccgctgga ttttacaacg ccttgctatt gaccggatga gtgttcacgc 1380  
 aaccgcgaaa gcaattgggc taggggtgga tttaacctgc caactagccc tcgatatgtg 1440  
 ccgtgagctg gtctataacg atcctcacca tcttgatgga gtgtatgtca ttgggggtgga 1500  
 tgagcataag tggtcacata atagggctaa gcatggtgat gggtttgtca ccgtgattgt 1560  
 cgatatgacc gggcatcggg atgactcacg gtgtcctgcc cggttattag atgtcgtccc 1620  
 aggtcgtagt gctgatgctt tacggtcctg gcttggctcc cgcgggtgaac agttccgcaa 1680  
 tcagatacgg atcgtgtcca tggatggatt ccaaggctac gccacagcaa gtaaagaact 1740

cattccttct gctcgtcgcg tgatggatcc attccatggt gtgcggccttg ctggtgacaa 1800  
 gctcaccgcc tgccggcaac gcctccagcg ggagaaatac cagcgtcgtg gtttaagcca 1860  
 ggatccgttg tataaaaacc ggaagacott gttgaccacg cacaagtggg tgagtcctcg 1920  
 tcagcaagaa agcttgagc agttgtgggc gtatgacaaa gactacgggg cgtaaagct 1980  
 tgcgtggctt gcgtatcagg cgattattga ttgttatcag atgggtaata agcgtgaagc 2040  
 gaagaagaaa atgcggacca ttattgatca gcttcgggtg ttgaaggggc cgaataagga 2100  
 actcgcgcag ttgggtcgta gtttgtttaa acgacttggg gatgtgttg cgtatttcga 2160  
 tgttggtgtc tccaacggtc cggtcgaagc gatcaacgga cgggttgagc atttgctgg 2220  
 gattgctcta ggtttccgta atttgaacca ctacattctg cgggtgcctta tccattcagg 2280  
 gcagttgggtc cataagatca atgcactcta aaacaggaag agcccgtaaa cctctgacta 2340  
 gcgtcaccct ctgattaagg cgaccgcgga tttaagagca gaggtcgcca cgagcgcac 2400  
 ttcacggctg tgtgtgttac taaaagtaca gcgcacagcc gttcgtgctt gatcctctc 2460  
 aagccccaac gccagcaaca catgggatac ctctccgga ccacaggcag aaccagggga 2520  
 gcacacaatg ccttggcggt ccaattccag aagaacagtt tcagatccta tgctgtcgaa 2580  
 gagaaaagat gcgtgtccat caatgcgcac cctaggatgt ccagtcaggt gtgctcccgg 2640  
 gatagtgaga acttcctcga tgaattcgcc aagatctgga taggattccg ccctggccaa 2700  
 ttccaaggca gtggcaaagg cgatagcccc cgcaacgttt tccgtgccac tacgccgcc 2760  
 tttttcctgg ccgccgccat ggattaccgg ctccagggga agctttgacc ataacaactc 2820  
 aatcccttta ggcgaccga atttatgacc cgacaaactt aacgcgtcaa ctcccaagtc 2880  
 aaagggtaaa tgtgcagctt gcaactgcac ggtgtgaaaa ggcgtactgc ttaccgccgc 2940  
 caactcagct atcggctgaa tggttccac ctcatgttg gcataaccaa tgctgatcaa 3000  
 tgtggtgtcc ggctgactg ctttgccgag accctccggg gagatcagcc cagtgtgatc 3060  
 gggggatagg taggtgatct cgaaatcatg aaacctttca agataagcag cagtttctag 3120  
 gacactgtca tgctcgatcg ggggtggtgat gaggtgccgg ccacgaggat tagctaagca 3180  
 cgctcctttg atagcgaggt tgttggttc tgatccacc gacgtaaagc tcacctgtgt 3240  
 ggggcgtcct ccgataatgc gggccaccgg agttcgagca tctccagcc ccgcagaggc 3300  
 gagtcttccc a 3311

<210> 9  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 9  
 acccggggat cctctagaat gtttgtgatg cgcag 35

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 10  
 gtcagagagt acttacgctg atcgggaggg aaagc 35

<210> 11  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 11  
 atcagcgtaa gtactctctg actagcgta cctc 35

<210> 12  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 12  
 ctgcaggtcg actctagaaa agggattgga gtgtt 35

<210> 13  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 13  
 atcaaaacag atatcatggc atccgacgcg ccgca 35

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 14  
cgctagtcag agagtttagt caaggccccg caaca 35

<210> 15  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 15  
atcaaaacag atatcatggc ggatgcaccc ggcgg 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 16  
cgctagtcag agagttcaca agctgttaag cgaag 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 17  
atcaaaacag atatcatgac gaaggactgg aagac 35

<210> 18  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 18  
cgctagtcag agagttcaga tcaccgcgag cgcct 35

<210> 19  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 19  
ccgatcagcg taagtggcgc ttcattgtcaa caatc 35

<210> 20  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 20  
cgctgcggat gccatgatct ctgttttgat ctcct 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 21  
gggtgcatcc gccatgatct ctgttttgat ctcct 35

<210> 22  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 22  
ccagtccttc gtcattgatct ctgttttgat ctcct 35

<210> 23  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 23  
aatggtccag gagctcat 18

<210> 24  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 24

gatcacctac ctatcccc

18

<210> 25

<211> 3161

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 25

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cggtggacga tgagggaaaa cgtttcctcg ccgcccacag aatcataaaa attttctgag  | 60   |
| gttgtcatgg gtaccagtct aagccctggc cttacgccag taaggtgtta cccatgcgcg  | 120  |
| aactagcact caacatggcc ggcgtcaccg tgcggcgcg cgagaaattg cttctcgacg   | 180  |
| atatctccct ctcaattccg caagggtcgc actgggcccgt acttggtcca aatggcgccg | 240  |
| gtaaaaccac catgctgaag atcgcagcca ctttgcgtga cccatcggaa ggcaccgtgg  | 300  |
| acatcctggg gcatcgcttt ggtcgggtgg atactcgtga gctgcggaaa acaatcggcc  | 360  |
| tggtggaccc gaagcaaaga ttaccaacc tgccggccca cgaaattgtg ctgtcggggg   | 420  |
| taaccgcctc caacgggttg ttgccacggg ggtcggcttc ggcttcggag ttggagcgg   | 480  |
| gcgctttgat gttggagttg gtgggcatga cagcgcgtgc cgatcgttac tgggccgata  | 540  |
| tgagccaggg cgaaaaagcc cgcacctga ttgctcgtgc gctgattatc tcaccgaccc   | 600  |
| tactgctgct tgatgaaccc accaccggcc ttgacctgcc cggacgtgaa actttgctca  | 660  |
| gtgtgattga tggtttgca gccgctcttc ctggctctgac gacagtgatg atcaccaccc  | 720  |
| acgtcgaaga gatcgccgcc tccacgacag atatcctcat gatcaaggac gcccgcatat  | 780  |
| tggcttcggg gactgtttca gaagtgatga ctccgaaaaa tttgggcgcg ctgtatgaca  | 840  |
| tgtcgggtgc gttggaaact gtgcgcagcc ggtggttcgc gttcgtatgct ctgcattaaa | 900  |
| aggggctagt ttacacaaa agtggacagc ttggtctatc attgccagaa gaccggtcct   | 960  |
| tttagggcca tagaattctg attacaggag ttgatctacc ttgtcttttg acccaaacac  | 1020 |
| ccagggtttc tccactgcat cgattcacgc tgggtatgag ccagacgact actacggttc  | 1080 |
| gattaacacc ccaatctatg cctccaccac cttcgcgcag aacgctccaa acgaactgcg  | 1140 |
| caaaggctac gagtacaccc gtgtgggcaa cccaccatc gtggcattag agcagaccgt   | 1200 |
| cgcagcactc gaaggcgcaa agtatggccg cgcattctcc tccggcatgg ctgcaaccga  | 1260 |
| catcctgttc cgcacatcc tcaagccggg cgatcacatc gtccctcggca acgatgctta  | 1320 |
| cggcggaacc taccgcctga tcgacaccgt attcaccgca tggggcgctcg aatacaccgt | 1380 |
| tgttgatacc tccgtcgtgg aagaggtcaa ggcagcgatc aaggacaaca ccaagctgat  | 1440 |
| ctgggtggaa accccaacca acccagcact tggcatcacc gacatcgaag cagtagcaaa  | 1500 |
| gctcaccgaa ggcaccaacg ccaagctggg tgttgacaac accttcgcat ccccatacct  | 1560 |

gcagcagcca ctaaaactcg gcgcacacgc agtcctgcac tccaccacca agtacatcgg 1620  
 aggacactcc gacgttggtg gcggccttgt ggttaccaac gaccaggaaa tggacgaaga 1680  
 actgctgttc atgcagggcg gcatcggacc gatcccatca gttttcgatg catacctgac 1740  
 cgcccggtggc ctcaagaccc ttgcagtgcg catggatcgc cactgcgaca acgcagaaaa 1800  
 gatcgcgga ttcctggact cccgcccaga ggtctccacc gtgctctacc caggtctgaa 1860  
 gaaccaccca ggccacgaag tcgcagcgaa gcagatgaag cgcttcggcg gcatgatctc 1920  
 cgtccgtttc gcaggcggcg aagaagcagc taagaagttc tgtacctcca ccaaactgat 1980  
 ctgtctggcc gagtccctcg gtggcgtgga atccctcctg gagcaccag caaccatgac 2040  
 ccaccagtca gctgccggct ctgagctcga ggttccccgc gacctcgtgc gcatctccat 2100  
 tggatttgaa gacattgaag acctgctcgc agatgtcgag caggccctca ataaccttta 2160  
 gaaactatth ggcggaagc agcttttcaa tataagcaat gcgagcctcc accatgtagc 2220  
 cgaagagttc gtcagaagtt gagacggact cttcgactgc ttacgggtc agtggcgctt 2280  
 ccacatctgg gttctcatca agccatggct taggaaccgg agcaaacaca tccggctttt 2340  
 cgccctctgg acgattgtca aagggtgtagt cagaagtcag ggtgaagctg aagacatcag 2400  
 ccatcatcat ctcccgatg atggttgctt ccttgaggga cagcccgata tcagtcaaga 2460  
 acttcaagga ctctccgca cccgcgattc gcagtgggga agtgccctga gtagagatct 2520  
 gttcatccag cgcgaccaga agaacacgtg gagtctcacg gaattggctg cgcaatgagc 2580  
 tccacagcgt atgaatagat tgccgccaat tgtccggatc aagatcgggc accttgatat 2640  
 catcgatgat gcgcacccag acgcatcaa tgattttctg acgatttagc acatggttat 2700  
 acagtgcgag aggggtgaca cccatgtctc gggcgaggcg gttcatggtc acggcagcga 2760  
 atccttcgag gccggcaatg tttaaagtgc gctccactat ggattcgacg gaaaggatac 2820  
 gttgggtggg gcgtccagga cgacgtcccg tggaagtggc cgccagagtt gacgctacgg 2880  
 ctggtttcat agtttcgcta ggcatgttat atgacgttac gcctttttct acaagacaac 2940  
 cagcgttttc agcgagatac tggacatatc aactaaaatc cctgaataaa acatctaaca 3000  
 tgggttttat acagaaaatt catacgaaag gttgatcatg aagaagaaga ttgcggtcgt 3060  
 taccggagcg accggaggca tgggaattga gatcgtcaaa gacctctccc gcgaccacat 3120  
 tgtctacgcc ttgggcccga atccagagca tctggcagct c 3161

<210> 26  
 <211> 3314  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26  
 gataccggca gctccaccga ccgtgcccac ttcattcacga accatctggc caagtgagcg

60

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| tccacgccta cgagtagaca cccacagcac taggtagtcc tgcaactgcac cggcgaaaat  | 120  |
| cacaccgagg ataatccaca aggtgcctgg caggtagccc atctgcgcgg ccatgacagg   | 180  |
| tccaaccaat ggaccggcac ctgcaatagc tgcaaagtgg tggccaaaaa gcacacgacg   | 240  |
| atccgttggg acatagtcct tgccgtcatt aacgtattcc gccgggggtg ctcgctgac    | 300  |
| tttcggctta acaactttgt attcaatcag tcgggcatag aaagaaaacg caatgatata   | 360  |
| ggaaccaact gccgcaaaa ccagccacac agagttgatt gtttcgccac gggagaaagc    | 420  |
| gattgctccc caaccaccg ccgcgataac cccaaagaca aggagaccaa cgcggggcgt    | 480  |
| cgtgacatt ttaggggact tcttcacgcc tactggaagg tcagtagcgt tgctgtacac    | 540  |
| caaatcatcg tcattgatgt tgtcagtctg ttttatggtc acgatcttta ctgttttctc   | 600  |
| ttcgggtcgt ttcaaagcca ctatgcgtag aaacagcggg cagaaactgt gtgcagaaat   | 660  |
| gcatgcagaa aaaggaaagt tcggccagat ggggtgtttct gtatgccgat gatcggatct  | 720  |
| ttgacagctg ggtatgcgac aaatcaccga gagttgttaa ttcttaacaa tggaaaagta   | 780  |
| acattgagag atgatttata ccctctgca ccatttagag tggggctagt cataccccca    | 840  |
| taaccctagc tgtacgcaat cgatttcaaa tcagttggaa aaagtcaaga aaattaccg    | 900  |
| agaataaatt tataccacac agtctattgc aatagaccaa gctgttcagt aggggtgcatg  | 960  |
| ggagaagaat ttcttaataa aaactcttaa ggacctcaa atgccaaagt acgacaattc    | 1020 |
| caatgctgac cagtggggct ttgaaaccg ctccattcac gcaggccagt cagtagacgc    | 1080 |
| acagaccagc gcacgaaacc ttccgatcta ccaatccacc gctttcgtgt tcgaactccgc  | 1140 |
| tgagcacgcc aagcagcgtt tcgcacttga ggatctaggc cctgtttact cccgcctcac   | 1200 |
| caaccacaacc gttgaggctt tggaaaaccg catcgcttcc ctogaagggtg gcgtccacgc | 1260 |
| tgtagcgttc tctccggac aggccgcaac caccaacgcc attttgaacc tggcaggagc    | 1320 |
| gggcgaccac atcgtcacct cccacgcct ctacgggtggc accgagactc tattccttat   | 1380 |
| cactcttaac cgcctgggta tcgatgtttc cttcgtggaa aaccccgacg accctgagtc   | 1440 |
| ctggcaggca gccgttcagc caaacaccaa agcattcttc ggcgagactt tcgccaaccc   | 1500 |
| acaggcagac gtcttgata ttctgcggt ggctgaagtt gcgcaccgca acagcgttcc     | 1560 |
| actgatcatc gacaacacca tcgtaccgc agcgtcgtg cgcgcgtcg agctcggcgc      | 1620 |
| agacgttgtc gtgcgttccc tcaccaagtt ctacaccggc aacgggtccg gactgggagg   | 1680 |
| cgtgcttata gacggcgga agttcgattg gactgtcgaa aaggatggaa agccagtatt    | 1740 |
| ccctacttc gtcaactccag atgtgctta ccacggattg aagtacgcag accttggtgc    | 1800 |
| accagccttc ggctcaagg ttgcggttg cttctacgc gacaccggct ccaccctctc      | 1860 |
| cgcattcaac gcatgggctg cagtccagg catcgacacc ctttcctgc gcctggagcg     | 1920 |
| ccacaacgaa aacgccatca aggttgaga attcctcaac aaccacgaga aggtggaaaa    | 1980 |

ggtaaacttc gcaggcctga aggattcccc ttggtacgca accaaggaaa agcttggcct 2040  
 gaagtacacc ggctccgttc tcaccttcga gatcaagggc ggcaaggatg aggcttgggc 2100  
 atttatcgac gccctgaagc tacactccaa ctttgcaaac atcggcgatg ttcgctccct 2160  
 cgttgttcac ccagcaacca ccaccattc acagtccgac gaagctggcc tggcacgcgc 2220  
 gggcgttacc cagtccaccg tccgcctgtc cgttggcatc gagaccattg atgatatcat 2280  
 cgctgacctc gaaggcggct ttgctgcaat ctagctttaa atagactcac cccagtgcct 2340  
 aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 2400  
 tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccaccag aacaggcggg tattttcatg 2460  
 cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccacggaa 2520  
 gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctggggtga atacgcgta 2580  
 gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 2640  
 gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 2700  
 tgcgtgatct gtaccaacgt catcggtggg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 2760  
 catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc tccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 2820  
 aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgcgc agtacttggg 2880  
 ggttccatgg gtgggtgccg caccctagag tgggcccga tgtaccaga aactggtggc 2940  
 gcagctgctg ttcttgagcgt ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatcgg cattcaatcc 3000  
 gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 3060  
 ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 3120  
 ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 3180  
 ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttga ctaccaagca 3240  
 gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tcctacgtct tgctcacga cgcctcaac 3300  
 cgccacgaca ttgg 3314

<210> 27  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 27  
 gaattcgagc tcggtacccg ggccagtaag gtgttaccca tgc

43

<210> 28  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 28  
 ctgcttgccg ccaaatagtt tagtactggg agatcaactc ctgtaatcag aattcta 57

<210> 29  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 29  
 tagaattctg attacaggag ttgatctacc agtactaaac tatttggcgg caagcag 57

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 30  
 tcgactctag aggatccccg ggcgatctca attcccatgc ctc 43

<210> 31  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 31  
 tcgagctcgg tacccttgca atagctgcaa agtgg 35

<210> 32  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 32  
 tgagtctatt taaagcgggt aattttcttg acttt 35

<210> 33  
 <211> 35  
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 33

caagaaaaatt acccgcttta aatagactca cccca

35

<210> 34

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 34

ctctagagga tccccgcctt aatttgggog gattg

35

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 35

ttcctggtct gacgacagtg

20

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 36

gatgtcttca gcttcaccct g

21

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 37

ccgaggataa tccacaaggt

20

<210> 38

<211> 20

<212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 38  
 cgaagcggttc gtcgattttct

20

<210> 39  
 <211> 5666  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 39  
 tgtcatgctt ccggaggtgc gcagggctcg agactccgga aagctatattg ccactccgat 60  
 gtttgggtca ctcgacgaga tacgtgctga tcacctaat tgggtgcacag ggtttcggcc 120  
 ggcgattagg ccagttcgtc aacttctcaa acacggacaa ccaaaggttc ctggtcttta 180  
 tttagtaggc tacggagatt ggacgggacc tgggtctgcy actatcacag gggtcgggct 240  
 ttatgccaaag cgagcagcca aagagattgc cgcgtcagtc ggcaaagtcg ttaaatagtt 300  
 tgaaggctaa gaacttaatg ttaaagcgaa aattgttttg acacctcaac taatgcagcg 360  
 atgcgttctt tccagaatgc tttcatgaca gggatgctgt cttgatcagg caggcgtctg 420  
 tgctggatgc cgaagctgga tttattgtcg cctttggagg tgaagttgac gctcactcga 480  
 gaatcatcgg ccaaccattt ggcattgaat gttctagggt cggaggcgga ggtttttctca 540  
 attagtgcgg gatcgagcca ctgcgccgc aggtcatcgt ctccgaagag cttccacact 600  
 ttttcgaccg gcaggttaag ggttttggag gcattggccg cgaaccatc gctgggtcatc 660  
 ccgggtttgc gcatgccacg ttcgtattca taaccaatcg cgatgccttg agcccaccag 720  
 ccactgacat caaagttgtc cacgatgtgc tttgcgatgt ggggtgtgagt ccaagaggtg 780  
 gctttttacgt cgtcaagcaa ttttagccac ttttcccacg gctttccggt gccgttgagg 840  
 atagcttcag gggacatgcc tgggtgttgag ccttgccggag tggagtcagt catgcgaccg 900  
 agactagtgg cgctttgcct gtgttgctta ggcggcggtg aaaatgaact acgaatgaaa 960  
 agttcgggaa ttgtctaata cgtactaagc tgtctacaca atgtctactt cagttacttc 1020  
 accagcccac aacaacgcac attcctccga atttttggat gcgttggtcaa accatgtgtt 1080  
 gatcggcgac ggcgccatgg gcacccagct ccaaggcttt gacctggacg tggaaaagga 1140  
 tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat totcaacgac acccgccctg atgtgttgag 1200  
 gcagattcac cgcgcctact ttgagggcgg agctgacttg gttgagacca atacttttgg 1260  
 ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat cgttgccgtg agcttgccca 1320  
 caagggcact gcagtggcta gggaaagtggc tgatgagatg gggccggggc gaaacggcat 1380  
 gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag cttccatcgc tgggccatgc 1440

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| accgtatgca gatttgctg ggactacaa ggaagcagcg cttggcatca tcgacggtgg    | 1500 |
| tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt caggtcaagg ctgcggttca  | 1560 |
| cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg cccattatth gccacgtcac  | 1620 |
| cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc ggtgccgcgt tgacagcgct  | 1680 |
| gcagccactg ggtatcgaca tgatttgtct gaactgcgcc accggcccag atgagatgag  | 1740 |
| cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct gtgtcgggtga tgcctaacgc | 1800 |
| aggtcttcct gtcctgggta aaaacggtgc agaataccca cttgaggctg aggatttggc  | 1860 |
| gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc atgggtgggtg gttgttgtgg | 1920 |
| caccacacct gagcacatcc gtgcggtccg cgatgcggtg gttggtgttc cagagcagga  | 1980 |
| aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag caggcctccc gcgaggtgga  | 2040 |
| gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctgcgtgccca ttgtcccagg aaaccggcat | 2100 |
| ttccatgatc ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag gcattccgtg aggcaatgct  | 2160 |
| gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag caaaccgcg atggtgcaca   | 2220 |
| catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc accgccgata tggcgacctt  | 2280 |
| ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg attgactcca ccgagccaga  | 2340 |
| ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc atcgttaact ccgtcaactt  | 2400 |
| tgaagacggc gatggccctg agtcccgtca ccagcgcata atgaaaactgg taaagcagca | 2460 |
| cggtgcggcc gtggttgccg tgaccattga tgaggaaggc caggcacgta ccgctgagca  | 2520 |
| caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc ggcagctacg gcctggatat  | 2580 |
| caaagacata gttgtggact gcctgacctt cccgatctct actggccagg aagaaaccag  | 2640 |
| gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg aagaagctct acccagaaat  | 2700 |
| ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg aaccctgctg cacgccaggt  | 2760 |
| tcttaactct gtgttcctca atgagtgcac tgaggctggt ctggactctg cgattgcgca  | 2820 |
| cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc cagcgcgaag tggcgttggc  | 2880 |
| tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg cagggaattca tgcagctgtt | 2940 |
| tgagggcggt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct gaacagctgg ccgctatgcc  | 3000 |
| tttgtttgag cgtttgccac agcgcacat cgacggcgat aagaatggcc ttgaggatga   | 3060 |
| tctggaagca ggcataagga agaagtctcc tattgcgac atcaacgagg accttctcaa   | 3120 |
| cggcatgaag accgtgggtg agctgttttg ttccggacag atgcagctgc cattcgtgct  | 3180 |
| gcaatcgcca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg gaaccgttca tggaagagga  | 3240 |
| agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc aaaatcgctg tggccaccgt  | 3300 |
| caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac atcattttgt ccaacaacgg  | 3360 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc gccatgttgg aagcagcgga  | 3420 |
| agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt gtgaagtcca ccgtggtgat  | 3480 |
| gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc aattaccag tcattttggg   | 3540 |
| tggcgctgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc aacgaggtgt acaccggtga  | 3600 |
| ggtgtactac gcccgatgat ctttcgaggg cctgcgcttg atggatgagg tgatggcaga  | 3660 |
| aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct attgagcagg cgaagaagaa  | 3720 |
| ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt gccgcggagc gtaaagctaa  | 3780 |
| tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc accgatactc caaccgcggc  | 3840 |
| accaccgttc tggggaacct gcattgtcaa gggctctgcc ttggcggagt tottgggcaa  | 3900 |
| ccttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggctctg aaatccacct gcggcaacga | 3960 |
| gggtccaagc tatgaggatt tgggtgaaac tgaaggccga ccacgcctgc gctactggct  | 4020 |
| ggatcgcttg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc ttggtgtatg gctacttccc  | 4080 |
| agcggctcgc gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc ccgcatccac acgcagccga  | 4140 |
| acgcatgcgc tttagcttcc cacgccagca gcgcggcagg ttcttgtgca tcgcggattt  | 4200 |
| cattcgccca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg gacgtcatgc cattccagct  | 4260 |
| ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag ttgttcgcag ccaatgaata  | 4320 |
| ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc accgaagcat tggccgagta  | 4380 |
| ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac ggtggatctg tcgctgattt  | 4440 |
| tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac cgcggcgccc gcttctcctt  | 4500 |
| tggttacggg tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag ctggtggaat tgctcgagcc  | 4560 |
| aggccgtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg caccagagc agtccacaga   | 4620 |
| cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac gtctaacacc tttgagaggg  | 4680 |
| aaaactttcc cgcacattgc agatcgtgcc actttaacta aggttgacgg catgattaag  | 4740 |
| gcgattttct gggacatgga cggcacgatg gtggactctg agccacagtg gggcattgct  | 4800 |
| acctacgagc tcagcgaagc catgggcccgc cgctcacc cggagctccg ggaactcacc   | 4860 |
| gtcggctcga gcctgccgcg caccatgcgc ttatgcgcag agcacgcagg cattacattg  | 4920 |
| agcgacgcgg actacgagcg ctaccgggct ggcattgtcg cccgggtcca tgagcttttc  | 4980 |
| gacgaatccc tcgtcccaaa tcagggcgtc accgaactcc tgacagagtt gaaggccctc  | 5040 |
| gagatoccca tgttggtcac caccaacaca gagcgcgatc tcgcgacctg ttcagtcgca  | 5100 |
| gccgtgggaa atgagttctt catcggttct atcgctggtg atgaagtccc aacagcaaag  | 5160 |
| ccagcccccg acatgtacct cgaagcagca cgacgtgtgg gctttgacct atcagagtgc  | 5220 |
| ctcgtgttcg aagattccta caacggcatg ctgggcgctg ttactgcagg ttgccgcgtc  | 5280 |

attggtctgc acccagaaga agtccaagcg ccagaagggtg tagtgccctt gcgttcctc 5340  
cacggtaaaa actctttcga aggtgtcacc gctgagatgg tcaactgcctg gtaccaccag 5400  
atcgagccgg caggtgtcgc aaaataaaac caggtggggg agtgaaatta ttcgactaat 5460  
atcctcccc aaacacacat tgataactgt tgtgtggaag aatgtaccga gtgaagacat 5520  
ttgactcgct gtacgaagaa cttcttaacc gtgctcagac ccgccctgaa gggctcggaa 5580  
ccgtggccgc cttggataaa ggcatccatc atctaggtaa gaaggtcac gaagaagccg 5640  
gagaggctctg gattgcagcc gagtat 5666

<210> 40  
<211> 3613  
<212> ADN  
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 40  
tcctgtgggg tgaacttgac ctgtgctggg ccacgacgtc cgaaaacgtg cacttcagtg 60  
gccttgtttt ctttgaggga gtcgtagacg ttgtcggaaa tttcgggtgac tttgagctcg 120  
tcgcctgtct tagccaggat gcgggctacg tcgaggccga cgttaccaac gccgataaca 180  
gcgacggact gtgcagacag atcccaggag cgctcgaagc gtgggttgcc gtcgtagaag 240  
ccaacgaact cgccggcacc gaaggagcct tctgcttcaa ttccggggat gttgaggtcg 300  
cggctctgcaa ctgcgccggg ggagaacacg actgcatcgt agtagtcgcg gagttcttcg 360  
acggtgatgt ctttgccgat ttcaatgtta ccgagcaggc gcaggcgtgg cttgtccaac 420  
acgttggtgca gggacttaac gatgcccttg atgcgtgggt ggtctggagc aacgccgtaa 480  
cggatgagtc cgaacgggtg aggcatttgc tcgaaaaggc caacgaacac ttgcgctct 540  
tcattgcgga tgaggaggtc ggatgcgtaa atgccagcag ggccagctcc gatgacggct 600  
acgcgcaggg gagttgtcat gtgtttgaag ttgcctttcg tgagcccttt tatggaaaca 660  
aggggtgtgaa aatcaagtag ttaaagggtg ttcaagtcca ggctgtttta cactcctaga 720  
ccgcttggtc tgtaaacgta gcagcgaaat gcgacaatgc gaagactttt gcttaattaa 780  
attcaaaact catgaaaaaa ctagacagat cggcttatta tattcacggg gaacctaacc 840  
taatatcccc aggttaattc atttaaacgg gcattaggtg actccattgc tttcagtctc 900  
atgaatctaa tggttggtct agacagagcg gtacgtctaa gtttgcggt agatcaaacc 960  
gagtgacatg tacttcacta gctctttaag gattaactcc ccatgacaac aaccaccgga 1020  
agtgcccggc cagcacgtgc cgccaggaag cctaagcccg aaggccaatg gaaaatcgac 1080  
ggcaccgagc cgcttaacca tgccgaggaa attaagcaag aagaaccgc ttttgctgtc 1140  
aagcagcggg tcattgatat ttactccaag cagggttttt cttccattgc accggatgac 1200  
attgccccac gctttaagtg gttgggcatt tacaccagc gtaagcagga tctgggcggg 1260

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaactgaccg gtcagcttcc tgatgatgag ctgcaggatg agtacttcat gatgcggtgtg | 1320 |
| cgttttgatg gcggaactggc ttcccctgag cgctgcggtg ccgtgggtga aatttctagg | 1380 |
| gattatgctc gttccaccgc ggacttcacc gaccgccaga acattcagct gcactggatt  | 1440 |
| cgtattgaag atgtgcctgc gatctgggag aagctagaaa ccgtcggact gtccaccatg  | 1500 |
| cttggttgcg gtgacgttcc acgtgttatc ttgggctccc cagtttctgg cgtagctgct  | 1560 |
| gaagagctga tcgatgccac cccggctatc gatgcgattc gtgagcgcta cctagacaag  | 1620 |
| gaagagttcc acaaccttcc tcgtaagttt aagactgcta tcaactggca ccagcgccag  | 1680 |
| gatgttacc acgaaatcca ggacgtttcc ttcggttctt cgattcacc agaattcggc    | 1740 |
| ccaggatttg agtgctttgt gggcggtggc ctgtccacca acccaatgct tgctcagcca  | 1800 |
| cttggttctt ggattccact tgatgaggtt ccagaagtgt gggctggcgt cgccggaatt  | 1860 |
| ttccgcgact acggcttccg acgcctgctg aaccgtgctc gcctcaagtt cttggtggca  | 1920 |
| cagtggggtg ttgagaagtt ccgtgaagtt cttgagaccg aatacctcga gcgcaagctg  | 1980 |
| atcgatggcc cagttgttac caccaaccct ggctaccgtg accacattgg cattcaccca  | 2040 |
| caaaaggacg gcaagttcta cctcgggtgtg aagccaaccg ttggacacac caccggtgag | 2100 |
| cagctcattg ccattgctga tgttgacaga aagcacggca tcaccaggat tcgtaccacg  | 2160 |
| gcggaaaagg aactgctctt cctcgatatt gagagaaaga accttactac cgttgcacgc  | 2220 |
| gacctggatg aaatcggact gtactcttca ccttccgagt tccgccgcgg catcatttcc  | 2280 |
| tgcaccggct tggagttctg caagcttgcg cacgcaacca ccaagtcacg agcaattgag  | 2340 |
| cttgtcgacg aactggaaga gcgcctcggc gatttggtatg ttcccatcaa gattgcactg | 2400 |
| aacggttgcc ctaactottg tgcaacgacc caggtttccg acatcggatt caagggacag  | 2460 |
| accgtcactg atgctgacgg caaccgcgtt gaagggttcc aggttcacct gggcggttcc  | 2520 |
| atgaacttgg atccaaactt cggacgcaag ctcaagggcc acaaggttat tgccgatgaa  | 2580 |
| gtgggagagt acgtcactcg cgttgttacc cacttcaagg aacagcgcca cgaggacgag  | 2640 |
| cacttccgcg attgggtcca gcgggccgct gaggaagatt tgggtgtgagt cttcggagga | 2700 |
| aaccaatcc caaccgcaac caccctctgt actgcccata ctgcgcggga gaagttcttt   | 2760 |
| tcccgatga gcaaacagaa ttgcggtggt tgtgtgcgga ttgcaccaga gtttttgaag   | 2820 |
| tgaaatatca cggccaggac gatccagtgc acaggccagc accagcaaag tccacatcgc  | 2880 |
| aagcattaaa agaactctctc gaaagacaca aaagaggtga gtcgcaaca tgagctttca  | 2940 |
| actagttaac gccctgaaaa atactggttc ggtaaaagat ccgagatct caccggaagg   | 3000 |
| acctcgacg accacaccgt tgtcaccaga ggtagcaaaa cataacgagg aactcgtcga   | 3060 |
| aaagcatgct gctgcgttgt atgacgccag cgcgcaagag atcctggaat ggacagccga  | 3120 |
| gcacgcgccg ggcgctattg cagtgcctt gagcatggaa aacaccgtgc tggcggagct   | 3180 |

ggctgcgcgg cacctgccgg aagctgattt cctcttttttg gacaccggtt accacttcaa 3240  
 ggagaccctt gaagttgccc gtcaggtaga tgagcgctat tcccagaagc ttgtcaccgc 3300  
 gctgccgata ctcaagcgca cggagcagga ttccatttat ggtctcaacc tgtaccgcag 3360  
 caaccacgag gcgtgctgcc gaatgcgcaa agttgaaccg ctggcggcgt cgtaagccc 3420  
 atacgctggc tggatcaccg gcctgcgcgg cgctgatggc ccaaccgtg ctcaagcccc 3480  
 tgcgctgagc ttggatgcca ccggcaggct caagatttct ccaattatca cctggtcatt 3540  
 ggaggaaacc aacgagttca ttgcggacaa caacctcatc gatcaccac ttaccatca 3600  
 gggttatcca tca 3613

<210> 41  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 41 35  
 caacgaaagg aaacaatgtc tacttcagtt acttc

<210> 42  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 42 35  
 tagtcagaga gtgatttaga cgtaaagta ctttg

<210> 43  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 43 35  
 atcaaaacag atatcatgac aacaaccacc ggaag

<210> 44  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 44  
cgctagtcag agagttcaca ccaaattcttc ctacg 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 45  
ccgatcagcg taagtagaaa catcccagcg ctact 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 46  
aactgaagta gacattgttt cctttcggtg ggtac 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 47  
tactttaacg tctaaggtac cggcgcttca tgtca 35

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

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 48  
gggtggttggt gtcattgatat ctgttttgat ctccct 35

<210> 49  
<211> 3261  
<212> ADN  
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 49  
cctcactggc gaacacggcc gactcctgga acagcgcaac atggcatgga cgaaactcaa

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cgaaatccca ggtgtcagct gtgtgaaacc aatgggagct ctatacgctg tccccaagct  | 120  |
| cgaccccaac gtgtacgaaa tccacgacga cacccaactc atgctggatc ttctccgtgc  | 180  |
| cgagaaaatc ctcatggttc agggcactgg cttcaactgg ccacatcacg atcacttccg  | 240  |
| agtggtcacc ctgccatggg catcccagtt ggaaaacgca attgagcgcc tgggtaactt  | 300  |
| cctgtccact tacaagcagt agtagttgtt aggattcacc acgaatctca ggatttttga  | 360  |
| gattcgtggt gaatttttgc gttttccagt caggctcctg caactttcgg accgatttca  | 420  |
| gaggggcgga gctggtttgt ggtggatcct tgaaatggaa cctcgcagga agctttcagg  | 480  |
| aagaccaagt tgggcctagg ggtggcgga ttgcaaaaat ccgtccccgg ttcgccatga   | 540  |
| aatgctgatt ttgatcgaat ctttgcgcta actgtagggc gggttcaggg ggtgaatgca  | 600  |
| ccacgagcaa cccgaagggt gcgaagtggg cattcgtaga acaatcccag aggaaagccg  | 660  |
| tacggctttc ctcgacatga tcaatcaagg tatgtcaggt cttgctgcgt ctacagcgg   | 720  |
| cggggtcagt gaattcaccg ggcgaaagtg ggcgaaggcc gccggggtga aactgaccg   | 780  |
| cggcccgca ggtggcaatg cttttgacac cgccgagaaa cttgagattg cagccagcat   | 840  |
| gctagagaaa ggatgcctac cccgagaaat cggcgagtat gtcggcatga ctcgggccaa  | 900  |
| tatatcccta tggcgcaaac aaggcccaga caagcttcgc caacgcgcag ccaccttgcg  | 960  |
| caccggcaag cgagcagctg aattcatcca cgcgccggtg atgggccctt attatgggcc  | 1020 |
| acgcacactc catcaagtgt tgcgtgagga ctacacaaca ctgtttgacg agttatctgc  | 1080 |
| gttgggggtt ccagcacagg tgtgtggggc cttacttcat cttgctccac caccatcatt  | 1140 |
| acgcttttct tatatgtcgt gtgtagtgcc gttatttgcg gatgaaatca aagtcgtagg  | 1200 |
| acaaggcaca cgattatcgt tagaagagaa aatgatgatc caacgtttcc atgacaccgg  | 1260 |
| ggtcagtgca gcagaaatcg gtcgacgcct gggtcggtgt cggcaaacia tttccaggg   | 1320 |
| acttcgacgt ggtcaagatg atgatggacg ttatcgtgca cgcgactcct atgaaggtgc  | 1380 |
| gatcaggaaa ctagecgcgtc cgaaaacacc gaaacttgat gccaatcgta ggcttcgggc | 1440 |
| tgtggtggtc gaggcgttga ataataaatt atctccggag cagatttctg gtcttttagc  | 1500 |
| caccgagcat gctaacgata gctctatgca gattagtcac gaaactatct accaggcggt  | 1560 |
| atatgttcaa ggtaaagggg cgttgcgtga tgaattgaag gtggagaaat ttcttcgtac  | 1620 |
| cggtcggaag ggacgtaaac cgcagtcgaa gttgccatcg agaggtaagc cgtgggtgga  | 1680 |
| gggtgcgttg attagtcaac gccagcaga agttgctgat cgtgctgtgc ctgggcactg   | 1740 |
| ggagggcgat ttagtaattg gtggtgaaaa ccaagcgaca gcgttggtga cgttggtgga  | 1800 |
| gcgcacgagc cggttgacgt tgattaagcg gttgggggtt aatcatgagg cgtcgactgt  | 1860 |
| gacggatgcg ttggtggaga tgatgggtga tttgccgcag gcgttgcgtc ggagtttgac  | 1920 |
| gtgggatcag ggtgtggaga tggcagagca tgcgcggttt agcgtggtga ccaagtgtcc  | 1980 |

ggtgttttttc tgtgatcctc attcgccgtg gcagcgtggg tcgaatgaga atacgaatgg 2040  
 attggtcagg gatttttttcc cgaagggcac taatttttgc aaagtaagtg acgaagaagt 2100  
 tcagcgggca caggatctgc tgaattaccg gccgcggaaa atgcatgggt ttaaaagcgc 2160  
 gacgcaggta tatgaaaaaa tcgtagttgg tgcattccacc gattgaattc gcctaggaga 2220  
 ttgtacgaaa attcgttcgg ctttcggatt tcctggcgat ctgagacgag aagttgaaca 2280  
 gctaacctgc agaaaccttg caagaatcac aacagcccca atggcctcaa aagtcacgcc 2340  
 ctcagaatcg ctgccaggcg tctaaatccc ctaaaacggg acaataggtc actgggcat 2400  
 cccaagccct taaaacgtga tccttaaata cccactgtcc tctattctgg gttaggcttc 2460  
 actgggtaaa agtgcctgcc tatgcctgaa acttgagcat ggcaacagca aggagacacc 2520  
 gtgggaaaac atgcagctga aacatcggaa ccgaagaaaa attcacgtg gcgcattgggt 2580  
 ttgttgacgt ttttgatttc ttcagttgtc gtgacgtgg tgggcatgggt gatgctgtgg 2640  
 ccggattctg atgatgtgggt gttggcggat aacttttcgc agacgtttgc gggaaatcat 2700  
 gagcagggtg atggaacgat cacgctcggt gataattctg cgtgtaattc gccagacacc 2760  
 ggccgagttt ttgcggaaag cccacgatt tctgcggagc cggcaacggt ggagtgcgtg 2820  
 cgtgcactcg tagacatcac atcgggtgcc aatgaggggc agaaaactca gctgatcact 2880  
 tacgcgcaac ctggtgatcc ggagttttcc gagggcgaca agatccgcat ggtggaaaca 2940  
 ccggatacaa atggcgagat catctacacc tttgctgatt accagcgcgg accggcgttg 3000  
 atcatttggg gtgtggttct cattgtggcg atgggagctt tcgcggcgtg gcgaggtgtg 3060  
 cgtgcgctgg ttggtttgggt cgtcaccttg ggaattgttg gtattttctt gctgccagga 3120  
 ttggccagcg ggcacgatgc gatgtggttg gcgctggtgt gtggcgcggc gatcttgttg 3180  
 attgtggtgc cgatggttca cggaatcaac tggaaatcgg cagctgcgtt ggcgggcacg 3240  
 ctggtggcat tgttgttgc g 3261

<210> 50  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 50  
 gtacccgggg atcctctaga cctgggtaac ttctgtcca

40

<210> 51  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 51  
 caggttagca gtactttctca agttttctcgg cgggtg 35

<210> 52  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 52  
 aacttgagaa gtactgctaa cctgcagaaa ccttg 35

<210> 53  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 53  
 gcctgcaggt cgactctaga ctccgcagaa atcgtggggc 40

<210> 54  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 54  
 cgccgagaaa cttgagaagt ggcgcttcac gtaaa 35

<210> 55  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 55  
 ctgcaggtta gcagtttagt caaggccccg caaca 35

<210> 56  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 56  
ctgcaggtta gcagttcaca agctgttaag cgaag 35

<210> 57  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 57  
ctgcaggtta gcagttcaga tcaccgcgag cgcct 35

<210> 58  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 58  
ttctccgtgc cgagaaaatc 20

<210> 59  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn mỗi

<400> 59  
gtagatgatc tcgccatttg 20

<210> 60  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Chromobacterium violaceum

<400> 60  
Met Ala Ser Asp Ala Pro His Leu Pro Leu His Pro Glu Thr Leu Ala  
1 5 10 15

Ile Arg Ala Gly Leu Glu Thr Ser Gln Phe Asn Glu His Ser Gln Gly  
20 25 30

Leu Phe Leu Thr Ser Ser Phe Thr Tyr Glu Ser Ala Ala Gln Ala Ala  
35 40 45

Ala Met Phe Leu Gly Glu Ile Asp Gly Tyr Thr Tyr Ser Arg Phe Thr

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

<210> 61  
 <211> 399  
 <212> PRT  
 <213> Chưa biết

<220>  
 <223> Hyphomonas neptunium

<400> 61  
 Met Ala Asp Ala Pro Gly Gly Asp Lys Lys Gly Trp Lys Pro Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Val Arg Gly Gly Leu Met Arg Ser Gln His Gly Glu Ile Ser  
 20 25 30  
 Glu Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Gly Tyr Ala Tyr Asp Ser Ala Glu Gln  
 35 40 45  
 Ala Met Arg Arg Met Ala Gly Glu Glu Glu Gly Phe Val Tyr Ser Arg  
 50 55 60  
 Tyr Gly Ser Pro Thr Asn Glu Met Leu Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Ala Glu Ala Cys Arg Val Thr Gly Ser Gly Met Gly Ala Ile  
 85 90 95  
 Ser Ser Ala Ile Leu Ala Pro Leu Lys Ala Gly Asp Arg Val Val Ala  
 100 105 110  
 Ala Thr Ala Leu Phe Gly Ser Cys Arg Trp Ile Ile Ala Asn Gln Met  
 115 120 125  
 Pro Lys Phe Gly Ile Glu Ala Val Phe Val Asp Gly Ala Asp Leu Asp  
 130 135 140  
 Ala Trp Lys Arg Glu Ile Asp Lys Gly Cys Gln Leu Val Leu Ile Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Pro Ala Asn Pro Leu Leu Asp Gly Val Asp Ile Glu Ala Val Ala  
 165 170 175  
 Arg Leu Ala Lys Ala Ala Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Asn Val Phe  
 180 185 190  
 Ala Thr Pro Val Leu Gln Arg Pro Leu Glu Met Gly Ala Asp Val Ile  
 195 200 205  
 Ala Tyr Ser Ala Thr Lys His Met Asp Gly Gln Gly Arg Val Leu Leu  
 210 215 220  
 Gly Ala Ile Leu Thr Asp Ala Lys Arg Met Ser Asp Val Tyr Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Trp Leu Arg His Met Gly Pro Ala Ala Ser Pro Phe Asn Ala Trp Val  
 245 250 255  
 Val Leu Lys Gly Leu Glu Thr Met Gln Leu Arg Val Glu Ala Gln Ser  
 260 265 270  
 Arg Thr Ala Ala Arg Leu Ala Asp Val Leu Ala Asp His Pro Ala Val

275                      280                      285  
 Asn Ala Val Arg Tyr Pro His Arg Lys Asp His Pro His Tyr Glu Val  
 290                      295                      300  
 His Lys Arg Gln Met Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Ala Leu Ser Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Gly Gly Gln Asp Ala Ala Phe Arg Phe Leu Asn Gly Leu Gln Leu  
 325                      330                      335  
 Val Asp Ile Cys Asn Asn Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Ala Cys His  
 340                      345                      350  
 Pro Ser Thr Thr Thr His Arg Ala Leu Ser Asp Glu Asp Gln Ala Ala  
 355                      360                      365  
 Met Gly Leu Asp Arg Ser Trp Val Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp  
 370                      375                      380  
 Ala Asp Asp Leu Glu Ala Asp Leu Leu Ala Ser Leu Asn Ser Leu  
 385                      390                      395  
  
 <210>    62  
 <211>    393  
 <212>    PRT  
 <213>    Rhodobacter sphaeroides  
  
 <400>    62  
 Met Thr Lys Asp Trp Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Arg Ser Gln Tyr Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln  
 20                      25                      30  
 Gly Phe Val Tyr Asp Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu  
 35                      40                      45  
 Thr Gly Ala Asp Glu Phe Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr  
 50                      55                      60  
 Arg Met Phe Glu Glu Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala  
 65                      70                      75                      80  
 Phe Ala Thr Ala Ser Gly Met Ala Ala Ile His Gly Val Leu Thr Ser  
 85                      90                      95  
 Ile Val Arg Ala Gly Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly  
 100                      105                      110  
 Ser Cys Ile Tyr Ile Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu  
 115                      120                      125  
 Val Thr Phe Val Asp Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val  
 130                      135                      140  
 Arg Pro Gly Thr Lys Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Glu Val Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Glu Ile Ala His Ala Val  
 165                      170                      175  
 Gly Ala Leu Val Ile Val Asp Asn Val Phe Ala Thr Pro Val Phe Ser

| 180                                                                    | 185 | 190     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Thr Ala Val Arg Gln Gly Ala Asp Val Val Ile Tyr Ser Ala Thr Lys<br>195 | 200 | 205     |
| His Ile Asp Gly Gln Gly Arg Ala Leu Gly Gly Val Val Cys Ala Ser<br>210 | 215 | 220     |
| Gln Ala Phe Ile Arg Lys Val Leu Glu Pro Phe Met Lys His Thr Gly<br>225 | 230 | 235 240 |
| Gly Ser Met Ser Pro Phe Asn Ala Trp Leu Met Leu Asn Gly Met Ala<br>245 | 250 | 255     |
| Thr Leu Asp Leu Arg Cys Arg Ala Met Ala Asp Thr Ala Glu Lys Ile<br>260 | 265 | 270     |
| Ala Arg Ala Leu Glu Gly His Pro Gln Leu Gly Arg Val Ile His Pro<br>275 | 280 | 285     |
| Ala Leu Glu Ser His Pro Gln His Glu Met Ala Lys Ala Gln Met Glu<br>290 | 295 | 300     |
| Arg Pro Gly Thr Met Ile Ala Leu Asp Leu Ala Gly Gly Lys Glu Ala<br>305 | 310 | 315 320 |
| Ala Phe Arg Phe Leu Asp Ala Leu Arg Ile Val Lys Ile Ser Asn Asn<br>325 | 330 | 335     |
| Leu Gly Asp Ala Arg Ser Ile Ala Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His<br>340 | 345 | 350     |
| Gln Arg Leu Ser Asp Ala Gln Lys Ala His Leu Gly Ile Thr Pro Gly<br>355 | 360 | 365     |
| Leu Val Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp Ala Asp Asp Leu Ile Ala<br>370 | 375 | 380     |
| Asp Leu Lys Gln Ala Leu Ala Val Ile<br>385                             | 390 |         |

<210> 63  
 <211> 1185  
 <212> ADN  
 <213> Chromobacterium violaceum

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 63                                                           |     |
| atggcatccg acgcgccgca tcttcgctg caccctgaaa ccctggccat ccgggcccggg  | 60  |
| ttggaaacca gccagttcaa cgagcacagc cagggcctgt tctgacgtc cagcttcacc   | 120 |
| tacgaatcgg ccgcgcaggc ggccggcgatg ttctggggcg agatcgacgg ctacacctat | 180 |
| tcccgttca ccaatccgac cgtcgccgcg ttccagcata ggctggcgca gatggagggc   | 240 |
| ggggagcgcg ccatcgccac cgccaccggc atggcggcga tccaggccat catgatgact  | 300 |
| ttgctgcagg ctggcgacca catcgtgtcg tcgcaaagcc tgttcggtc caccaccaat   | 360 |
| ctgttcgcca accagttggc caagttcgcc gtggccaccg acttcgtcga cgcgcgcgac  | 420 |
| ctgtccgcct ggccggaggc gctgcggccg aacaccaagc tgctgttcct ggagacgccg  | 480 |

tccaatccct tgaccgaagt ggccgacatc gcggccatcg ccgacatcg ccacgcgcat 540  
 ggcgcgctgc tgggtggtgga caacagcttc tgttcgccgg ccttgacgca gccgttgaaa 600  
 ctggggcgccg atctggtcat gcattccgcc accaagttca tcgacggcca tggccgggtg 660  
 atggggcgggg cgggtggtcgg cagcgacaag ctgggtcgagc aggtctatctt gcacgtgcgc 720  
 gccgccgggtc cctcgctggc gccgttcaat gcctggacgc tgctgtccgg tttggagacg 780  
 ctgcacctgc ggatggagaa gcacagcgcc aacgcgctgg agctggcgcg ctggctggag 840  
 gcgcagccca atgtggagcg cgtctattac ccgggcctgg agagccaccc ccagcacgag 900  
 ctggcgctgc gccagcagaa gagcggcgga gcggtggtgt ccttcgtggt caagggcgggc 960  
 cgcaaggccg cgtggaaagt ggtggacgcg gtcaggggtga tctcgcgcac cgccaatctg 1020  
 ggcgatgtga aaaccaccct cactcatccg gccagcacca cccacgcccg cgtgacgcag 1080  
 gaggcgcgcg agcgcgccgg catcgtcgag gggctgttg gcgtcagcgt cggcctggaa 1140  
 aatgtacggg accttcaaca agatctgttg cggggccttg actaa 1185

<210> 64  
 <211> 1200  
 <212> ADN  
 <213> Chưa biết

<220>  
 <223> Hyphomonas neptunium

<400> 64  
 atggcgcatg caccggcgcg cgacaagaag ggctggaagc ctgcgacca ggcggtacgc 60  
 ggcggcctga tgcggtccca gcatggggag atttccgagg cgctgtatct gacctccggc 120  
 tacgcttacg actcgccga gcaggcgatg cgccggatgg cggcgagga agaaggcttc 180  
 gtctattccc gctatggcag cccgaccaat gagatgctgc aacagcgcc cgcgctgatt 240  
 gaaggcgccg aagcgtgccg ggtgacgggc tctggcatgg gcgcgatttc gtcgccatc 300  
 ctggcgccgc ttaaagcggg cgaccgggtg gtggcgcgga ccgcgctgtt tggctcgtgc 360  
 cgctggatca ttgccacca gatgccgaag tttggcatcg aggcagtgtt cgtggacggg 420  
 gccgatcttg atgcttgaa gcgcgagatc gacaagggct gccagctggt gctgatcgaa 480  
 agcccggcca atccgttgct cgacggcggtg gacatogaag cggctcgccag gctcgccaag 540  
 gcggcgggcg cgctgctggt ggtggacaat gtgtttgcca cgccggtgct tcagcgggcg 600  
 ctggaaatgg gcgcgcatgt gatgcctat toggccacca aacatatgga cgggcagggc 660  
 cgcgttctgc tgggcgcgat cctgacggac gccaaagcga tgagtgatgt gtatgatccg 720  
 tggctgcgcc atatggggcc ggccggcctcg ccgtttaacg cctgggtagt gctgaagggc 780  
 cttgagacga tgcagctgcg cgtggaagcg cagagccgca cggcggcgcg gctggcggat 840  
 gttctggccg atcatccggc ggtcaatgcc gtgcgctatc cccaccgcaa ggatcaccgg 900

cattatgagg tgcacaagcg ccagatgaaa tcgggcgga cgctgctcgc gctgtcgtc 960  
aagggcgggc aggcgcggc gttccgcttc ctcaacgggc tgcagctggt cgacatctgc 1020  
aacaaccttg gcgatacgaa atcgctggcc tgtcatccct ccaccacgac gcaccgcgcg 1080  
ttgagtgatg aggatcaggc ggcgatggg cttgaccgca gctgggtccg gctctctgtt 1140  
ggtcttgaag acgcagatga tctggaagct gatcttctcg cttcgcttaa cagcttgtga 1200  
1200

<210> 65  
<211> 1182  
<212> ADN  
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 65  
atgacgaagg actggaagac aaggacgaa ctcgctccacg ggggcagccg ccggagccag 60  
tatggcgaaa tggccgaggc gatcttctcg acccagggtc tcgtctacga ctcggccgaa 120  
caggccgaag cgcgcttcat cgagaccggc gccgacgaat tcattctatgc ccgctacggc 180  
aaccaccaga cgcgatgtt cgaagagcgc atcgcgggccg tcgagggcac cgaggatgcg 240  
ttcgccaccg cctcgggcat ggccgcgatc cagggcgtgc tcacctcgat cgtgcggggc 300  
ggcgatcatc tgggtggcgc gcgcgctctg ttcggctcct gcattctacat cctcgaggag 360  
gtgctgggccc gattcggcgt cgaggtgacc ttcgtcgacg gcaccgatct cgatcagtgg 420  
cgcgcggcgg tgcggcccgg cacgaaggcc gtgtttcttcg agtcggtctc gaatccgacg 480  
ctcgagggtg ccgatatcgg cgccatcgcc gagatcgccc atgccgtggg cgcgctcgtc 540  
atcgtaggaca atgtcttcgc gacgcccgtc ttctcgacgg cggtagcggca gggcgcggat 600  
gtggtgatct attcggccac caagcacatc gacgggcaag ggcgcgcgct cggcggcgtg 660  
gtctgcgcct cgcaggcctt catccgcaag gtgctcgaa ccttcatgaa gcacaccggc 720  
ggctcgatga gcccttcaa cgctgggtc atgtgaacg ggatggcgac gctcgacctg 780  
cgctgccgcg cgatggccga cagggccgag aagatcgccc gcgcgctcga gggccatccg 840  
cagctcggcc gcgtgatcca tccgcgctg gaaagccacc cgcagcacga gatggccaag 900  
gcgcagatgg agcgtcccgg cacgatgatc gcgctcgacc tcgccggggg caaggaggcg 960  
gccttccgct tcctcgacgc cctgaggatc gtgaagatct ccaacaatct gggcgatgcc 1020  
cgctcgatcg cgaccacccc ggcaacgacc acccaccagc gtctttccga cgcgcagaag 1080  
gccatctcg gcatcagccc cgggctcgtg cggctgtcgg tggggctcga ggatgcggac 1140  
gacctgatcg ccgatctgaa acaggcgctc gcggtgatct ga 1182

<210> 66  
<211> 404  
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> RspmetZ\_dài

<400> 66

Met Gly Ile Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp  
1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr  
20 25 30

Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu  
50 55 60

Phe Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu  
65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser  
85 90 95

Gly Met Ala Ala Ile His Gly Val Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly  
100 105 110

Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly Ser Cys Ile Tyr Ile  
115 120 125

Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Thr Phe Val Asp  
130 135 140

Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val Arg Pro Gly Thr Lys  
145 150 155 160

Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr Leu Glu Val Ala Asp  
165 170 175

Ile Gly Ala Ile Ala Glu Ile Ala His Ala Val Gly Ala Leu Val Ile  
180 185 190

Val Asp Asn Val Phe Ala Thr Pro Val Phe Ser Thr Ala Val Arg Gln  
195 200 205

Gly Ala Asp Val Val Ile Tyr Ser Ala Thr Lys His Ile Asp Gly Gln  
210 215 220

Gly Arg Ala Leu Gly Gly Val Val Cys Ala Ser Gln Ala Phe Ile Arg  
225 230 235 240

Lys Val Leu Glu Pro Phe Met Lys His Thr Gly Gly Ser Met Ser Pro  
245 250 255

Phe Asn Ala Trp Leu Met Leu Asn Gly Met Ala Thr Leu Asp Leu Arg  
260 265 270

Cys Arg Ala Met Ala Asp Thr Ala Glu Lys Ile Ala Arg Ala Leu Glu  
275 280 285

Gly His Pro Gln Leu Gly Arg Val Ile His Pro Ala Leu Glu Ser His  
290 295 300

Pro Gln His Glu Met Ala Lys Ala Gln Met Glu Arg Pro Gly Thr Met  
 305 310 315 320

Ile Ala Leu Asp Leu Ala Gly Gly Lys Glu Ala Ala Phe Arg Phe Leu  
 325 330 335

Asp Ala Leu Arg Ile Val Lys Ile Ser Asn Asn Leu Gly Asp Ala Arg  
 340 345 350

Ser Ile Ala Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gln Arg Leu Ser Asp  
 355 360 365

Ala Gln Lys Ala His Leu Gly Ile Thr Pro Gly Leu Val Arg Leu Ser  
 370 375 380

Val Gly Leu Glu Asp Ala Asp Asp Leu Ile Ala Asp Leu Lys Gln Ala  
 385 390 395 400

Leu Ala Val Ile

<210> 67  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> RspmetZ\_3

<400> 67  
 Met Gly Asn Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp  
 1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr  
 20 25 30

Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp  
 35 40 45

Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu  
 50 55 60

Phe Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu  
 65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser  
 85 90 95

Gly Met Ala Ala Ile His Gly Val Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly  
 100 105 110

Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly Ser Cys Ile Tyr Ile  
 115 120 125

Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Thr Phe Val Asp  
 130 135 140

Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val Arg Pro Gly Thr Lys  
 145 150 155 160

Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr Leu Glu Val Ala Asp  
 165 170 175

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

<210> 68  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> RspmetZ\_65

<400> 68  
 Met Gly Ile Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr  
 20 25 30  
 Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp

| 35                                                              | 40  | 45  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Tyr Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Gly Met Ala Ala Ile His Gly Val Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly |     |     |
|                                                                 | 100 | 110 |
| Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly Ser Cys Ile Tyr Ile |     |     |
|                                                                 | 115 | 125 |
| Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Thr Phe Val Asp |     |     |
|                                                                 | 130 | 140 |
| Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val Arg Pro Gly Thr Lys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 160 |
| Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr Leu Glu Val Ala Asp |     |     |
|                                                                 | 165 | 175 |
| Ile Gly Ala Ile Ala Glu Ile Ala His Ala Val Gly Ala Leu Val Ile |     |     |
|                                                                 | 180 | 190 |
| Val Asp Asn Val Phe Ala Thr Pro Val Phe Ser Thr Ala Val Arg Gln |     |     |
|                                                                 | 195 | 205 |
| Gly Ala Asp Val Val Ile Tyr Ser Ala Thr Lys His Ile Asp Gly Gln |     |     |
|                                                                 | 210 | 220 |
| Gly Arg Ala Leu Gly Gly Val Val Cys Ala Ser Gln Ala Phe Ile Arg |     |     |
| 225                                                             | 230 | 240 |
| Lys Val Leu Glu Pro Phe Met Lys His Thr Gly Gly Ser Met Ser Pro |     |     |
|                                                                 | 245 | 255 |
| Phe Asn Ala Trp Leu Met Leu Asn Gly Met Ala Thr Leu Asp Leu Arg |     |     |
|                                                                 | 260 | 270 |
| Cys Arg Ala Met Ala Asp Thr Ala Glu Lys Ile Ala Arg Ala Leu Glu |     |     |
|                                                                 | 275 | 285 |
| Gly His Pro Gln Leu Gly Arg Val Ile His Pro Ala Leu Glu Ser His |     |     |
|                                                                 | 290 | 300 |
| Pro Gln His Glu Met Ala Lys Ala Gln Met Glu Arg Pro Gly Thr Met |     |     |
| 305                                                             | 310 | 320 |
| Ile Ala Leu Asp Leu Ala Gly Gly Lys Glu Ala Ala Phe Arg Phe Leu |     |     |
|                                                                 | 325 | 335 |
| Asp Ala Leu Arg Ile Val Lys Ile Ser Asn Asn Leu Gly Asp Ala Arg |     |     |
|                                                                 | 340 | 350 |
| Ser Ile Ala Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gln Arg Leu Ser Asp |     |     |
|                                                                 | 355 | 365 |
| Ala Gln Lys Ala His Leu Gly Ile Thr Pro Gly Leu Val Arg Leu Ser |     |     |
|                                                                 | 370 | 380 |

Val Gly Leu Glu Asp Ala Asp Asp Leu Ile Ala Asp Leu Lys Gln Ala  
 385 390 395 400

Leu Ala Val Ile

<210> 69  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> RspmetZ\_104

<400> 69  
 Met Gly Ile Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp  
 1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr  
 20 25 30

Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp  
 35 40 45

Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu  
 50 55 60

Phe Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu  
 65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser  
 85 90 95

Gly Met Ala Ala Ile His Gly Ala Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly  
 100 105 110

Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly Ser Cys Ile Tyr Ile  
 115 120 125

Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Thr Phe Val Asp  
 130 135 140

Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val Arg Pro Gly Thr Lys  
 145 150 155 160

Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr Leu Glu Val Ala Asp  
 165 170 175

Ile Gly Ala Ile Ala Glu Ile Ala His Ala Val Gly Ala Leu Val Ile  
 180 185 190

Val Asp Asn Val Phe Ala Thr Pro Val Phe Ser Thr Ala Val Arg Gln  
 195 200 205

Gly Ala Asp Val Val Ile Tyr Ser Ala Thr Lys His Ile Asp Gly Gln  
 210 215 220

Gly Arg Ala Leu Gly Gly Val Val Cys Ala Ser Gln Ala Phe Ile Arg  
 225 230 235 240

Lys Val Leu Glu Pro Phe Met Lys His Thr Gly Gly Ser Met Ser Pro

```
<210>      70
<211>      404
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> RspmetZ 196

```

<400>          70
Met Gly Ile Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp
  1                      5                      10                      15

Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr
          20                      25                      30

Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp
          35                      40                      45

Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu
          50                      55                      60

Phe Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu
  65                      70                      75                      80

Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser
          85                      90                      95

Gly Met Ala Ala Ile His Gly Val Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly
          100                      105                      110

```

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

<210> 71  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

&lt;223&gt; RspmetZ\_3\_65\_104

&lt;400&gt; 71

Met Gly Asn Ala Phe Arg Glu Gly Arg Thr Gly Met Thr Lys Asp Trp  
 1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Gln Leu Val His Gly Gly Ser Arg Arg Ser Gln Tyr  
 20 25 30

Gly Glu Met Ala Glu Ala Ile Phe Leu Thr Gln Gly Phe Val Tyr Asp  
 35 40 45

Ser Ala Glu Gln Ala Glu Ala Arg Phe Ile Glu Thr Gly Ala Asp Glu  
 50 55 60

Tyr Ile Tyr Ala Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Arg Met Phe Glu Glu  
 65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Val Glu Gly Thr Glu Asp Ala Phe Ala Thr Ala Ser  
 85 90 95

Gly Met Ala Ala Ile His Gly Ala Leu Thr Ser Ile Val Arg Ala Gly  
 100 105 110

Asp His Leu Val Ala Ala Arg Ala Leu Phe Gly Ser Cys Ile Tyr Ile  
 115 120 125

Leu Glu Glu Val Leu Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Thr Phe Val Asp  
 130 135 140

Gly Thr Asp Leu Asp Gln Trp Arg Ala Ala Val Arg Pro Gly Thr Lys  
 145 150 155 160

Ala Val Phe Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Thr Leu Glu Val Ala Asp  
 165 170 175

Ile Gly Ala Ile Ala Glu Ile Ala His Ala Val Gly Ala Leu Val Ile  
 180 185 190

Val Asp Asn Val Phe Ala Thr Pro Val Phe Ser Thr Ala Val Arg Gln  
 195 200 205

Gly Ala Asp Val Val Ile Tyr Ser Ala Thr Lys His Ile Asp Gly Gln  
 210 215 220

Gly Arg Ala Leu Gly Gly Val Val Cys Ala Ser Gln Ala Phe Ile Arg  
 225 230 235 240

Lys Val Leu Glu Pro Phe Met Lys His Thr Gly Gly Ser Met Ser Pro  
 245 250 255

Phe Asn Ala Trp Leu Met Leu Asn Gly Met Ala Thr Leu Asp Leu Arg  
 260 265 270

Cys Arg Ala Met Ala Asp Thr Ala Glu Lys Ile Ala Arg Ala Leu Glu  
 275 280 285

Gly His Pro Gln Leu Gly Arg Val Ile His Pro Ala Leu Glu Ser His  
 290 295 300

Pro Gln His Glu Met Ala Lys Ala Gln Met Glu Arg Pro Gly Thr Met  
 305 310 315 320

Ile Ala Leu Asp Leu Ala Gly Gly Lys Glu Ala Ala Phe Arg Phe Leu  
 325 330 335

Asp Ala Leu Arg Ile Val Lys Ile Ser Asn Asn Leu Gly Asp Ala Arg  
 340 345 350

Ser Ile Ala Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gln Arg Leu Ser Asp  
 355 360 365

Ala Gln Lys Ala His Leu Gly Ile Thr Pro Gly Leu Val Arg Leu Ser  
 370 375 380

Val Gly Leu Glu Asp Ala Asp Asp Leu Ile Ala Asp Leu Lys Gln Ala  
 385 390 395 400

Leu Ala Val Ile

<210> 72  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 72  
 atcaaaacag atatcatggg tatcgcgttt cgtga

35

<210> 73  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 73  
 ccttcacgaa acgcgttacc catgatatct g

31

<210> 74  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 74  
 cagatatcat gggtaacgag ttctcgtgaag g

31

<210> 75  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 75

tagcgggcat agatgtattc gtcggcgccg g

31

<210> 76

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 76

ccggcgccga cgaatacatc tatgcccgt a

31

<210> 77

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 77

acgatcgagg tgagcgcgcc gtggatcgcg g

31

<210> 78

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 78

ccgcgatcca cggcgcgctc acctcgatcg t

31

<210> 79

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 79

cgggcgtcgc gaagatatcg tccacgatga c

31

<210> 80

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi

<400> 80  
 gtcacgtgg acaatatctt cgcgacgccc g 31

<210> 81  
 <211> 5803  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pDCM2

<400> 81  
 gttcgccttg tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc ccaactgcaag 60  
 ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt cccttgtcca gatagcccag tagctgacat 120  
 tcatccgggg tcagcacgtt ttctgcgga cggctttcta cgtgttccgc ttcccttagc 180  
 agcccttgcg ccctgagtg cttgcggcgc gtgaagctag cttttatcgc cattcgccat 240  
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 300  
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 360  
 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcgagctcgg taccggggga tcctctagag 420  
 tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat 480  
 tggtatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 540  
 ggtgcctaata gaggtagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 600  
 tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg 660  
 ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttccctg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 720  
 ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac gggtatccac agaatacagg 780  
 gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 840  
 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 900  
 cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 960  
 ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 1020  
 tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 1080  
 gtgtaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc 1140  
 tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca 1200  
 ctggcagcag ccaactggtta caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 1260  
 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 1320  
 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 1380

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga   | 1440 |
| tctcaagaag atccttttgat cttttctacg gggctcgacg ctcaagtggaa cgaaaactca | 1500 |
| cgtaaagggga ttttgggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttgggg | 1560 |
| tgggcgaaga actccagcat gagatccccg cgctggagga tcatccagcc ctgatagaaa   | 1620 |
| cagaagccac tggagcacct caaaaacacc atcatacact aaatcagtaa gttggcagca   | 1680 |
| tcacccgacg cactttgctc cgaataaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa   | 1740 |
| ataaatcctg gtgtccctgt tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga   | 1800 |
| gacgttgatc ggcacgtaag aggttccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg   | 1860 |
| ggcgtatttt ttgagttatc gagattttca ggagctgata gaaacagaag ccaactggagc  | 1920 |
| acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcaccg gacgcacttt   | 1980 |
| gcgccgaata aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc   | 2040 |
| ctgttgatac cgggaagccc tgggccaaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg  | 2100 |
| taagaggttc caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt   | 2160 |
| tatcgagatt ttcaggagct ctttggcatc gtctctcgcc tgtccctca gttcagtaat    | 2220 |
| ttcctgcatt tgctgtttc cagtcggtag atattccaca aaacagcagg gaagcagcgc    | 2280 |
| ttttccgctg cataaccctg cttcggggtc attatagcga ttttttcggt atatccatcc   | 2340 |
| tttttcgcac gatatacagg attttgccaa agggttcgtg tagactttcc ttggtgtatc   | 2400 |
| caacggcgtc agccgggcag gataggtgaa gtaggccac ccgcgagcgg gtgttccttc    | 2460 |
| ttcactgtcc cttattcgca cctggcggtg ctcaacggga atcctgctct gcgaggctgg   | 2520 |
| ccggctaccg ccggcgtaac agatgagggc aagcggatgg ctgatgaaac caagccaacc   | 2580 |
| aggaagggca gccacctat caaggtgtac tgccttcag acgaacgaag agcgattgag     | 2640 |
| gaaaaggcgg cggcgccgg catgagcctg tcggcctacc tgetggccgt cggccagggc    | 2700 |
| tacaaaatca cgggcgtcgt ggactatgag cacgtccgcg agggcgctcc ggaaaacgat   | 2760 |
| tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg atggcaggtt   | 2820 |
| gggcgtcgtc ttggtcgtca tttcgaaaaa ggtaggaat acggttagcc atttgctgc     | 2880 |
| ttttatatag ttcantatgg gattcacctt tatgttgata agaaataaaa gaaaatgcca   | 2940 |
| ataggatata ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca    | 3000 |
| aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag gaagctcggc   | 3060 |
| gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg   | 3120 |
| acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaaggt tacatcgtaa   | 3180 |
| ggcggatcaa gatccatttt taacacaagg ccagttttgt tcagcggctt gtatgggcca   | 3240 |
| gttaaagaat tagaaacata accaagcatg taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc   | 3300 |

gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac aggtaccatt tgccgttcat tttaaagacg 3360  
 ttgcgcggtt caatttcacg tggtactgtg ttagatgcaa tcagcgggtt catcactttt 3420  
 ttcagtgtgt aatcatcggt tagctcaatc ataccgagag cgccgtttgc taactcagcc 3480  
 gtgcgttttt tatcgctttg cagaagtttt tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt 3540  
 ttgccatagt atgctttgtt aaataaagat tcttcgcctt ggtagccatc ttcagttcca 3600  
 gtgtttgctt caaataactaa gtatttggtg cttttatctt ctacgtagtg aggatctctc 3660  
 agcgtatggt tgcgcctga gctgtagtgt ctttcacgca tgaactgctg tacattttga 3720  
 tacgtttttc cgtcaccgtc aaagattgat ttataatcct ctacaccgtt gatgttcaaa 3780  
 gagctgtctg atgctgatac gttaacttgt gcagttgtca gtgtttgttt gccgtaatgt 3840  
 ttaccggaga aatcagtgtg gaataaacgg atttttccgt cagatgtaaa tgtggctgaa 3900  
 cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg atagaatcat ttgcacgaa tttgtcgtg 3960  
 tctttaaaga cgcgccagc gttttccag ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga 4020  
 tagaacatgt aaatcgatgt gtcacccgca tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg 4080  
 atgtggtagc cgtgatagtt tgcgacagt cgcgcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc 4140  
 caaacgtcca ggccttttgc agaagagata tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa 4200  
 acttgatatt tttcattttt ttgctgttca gggatttgca gcatatcatg gcgtgtaata 4260  
 tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc ttttggttcg tttctttcgc aaacgcttga 4320  
 gttgcgcctc ctgccagcag tgcggtagta aagggttaata ctgttgcttg ttttgcaaac 4380  
 tttttgatgt tcatcgttca tgtctcctt tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt 4440  
 ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta gttacgcaca ataaaaaag acctaaaata 4500  
 tgtaaggggt gacgccaaag tatacacttt gccctttaca catttttaggt cttgcctgct 4560  
 ttatcagtaa caaacccgcg cgatttactt ttgcacctca ttctattaga ctctcgtttg 4620  
 gattgcaact ggtctatttt cctcttttgt ttgatagaaa atcataaaaag gatttgcaga 4680  
 ctacgggcct aaagaactaa aaaatctatc tgtttctttt cattctctgt attttttata 4740  
 gtttctgttg catgggcata aagttgcctt tttaatcaca attcagaaaa tatcataata 4800  
 tctcatttca ctaaataata gtgaacggca ggtatatgtg atgggttaaa aaggatcacc 4860  
 ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc 4920  
 gggagcggcg ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc 4980  
 agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc 5040  
 acagtogatg aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc 5100  
 gccatgggtc acgacgagat cctcgcgcgc gggcatccgc gccttgagcc tggcgaacag 5160  
 ttcggctggc gcgagcccct gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc 5220

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgct tgggtggcga atgggcaggt  | 5280 |
| agccggatca agcgtatgca gccgccgcat tgcatacagcc atgatggata ctttctcggc | 5340 |
| aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgccaata gcagccagtc   | 5400 |
| ccttcccgct tcagtgacaa cgtcgagaca gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc  | 5460 |
| cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgaggt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg  | 5520 |
| acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg  | 5580 |
| attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct  | 5640 |
| gcgtgcaatc catcttggtc aatcatgcga aacgatcctc atcctgtctc ttgatcagat  | 5700 |
| cttgatcccc tgcgccatca gaccttggc ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag   | 5760 |
| ggcttcccaa ccttaccaga gggcgcccca gctggcaatt ccg                    | 5803 |

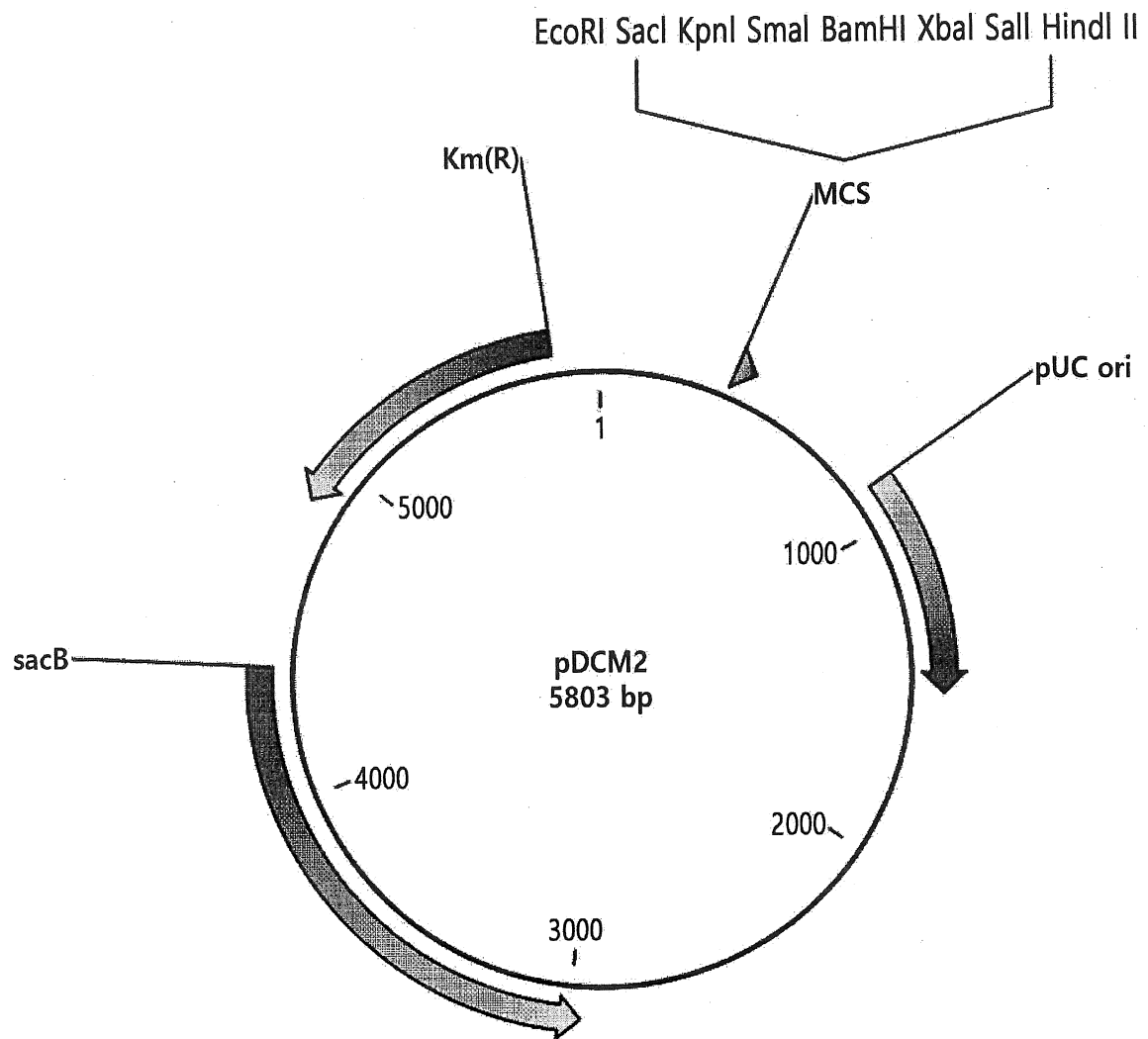


FIG.1