



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0049821

(51)^{2020.01} C12N 15/77; C12P 13/04; C12N 9/04

(13) B

(21) 1-2022-01760

(22) 01/09/2020

(86) PCT/KR2020/011679 01/09/2020

(87) WO2021/045472 11/03/2021

(30) 10-2019-0108263 02/09/2019 KR

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/05/2022 410A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) YOON, Byoung Hoon (KR); CHANG, Jin Sook (KR); KIM, Seon Hye (KR); LEE, Ji Hye (KR); CHOI, Sun Hyung (KR); KIM, Kyungrim (KR); KIM, Hyung Joon (KR).

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

(54) POLYNUCLEOTIT, VÙNG GEN KHỞI ĐỘNG VÀ VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM, VECTƠ, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT ĐÍCH, VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH

(21) 1-2022-01760

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit, vùng gen khởi động và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, vector, phương pháp sản xuất chất đích bằng cách sử dụng vùng gen khởi động này, và phương pháp tăng cường sự biểu hiện của gen đích.

[FIG. 1]

M4	CCGTCTAATTGCAATGTGTGTGGTATAAT
M15	CCGTCTAATTGCAATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCAATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13032	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13869	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polynucleotit, vùng gen khởi động và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polynucleotit này, vector bao gồm vùng gen khởi động này, và phương pháp sản xuất chất đích bằng cách sử dụng vùng gen khởi động này, và phương pháp tăng cường sự biểu hiện của gen đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các vi sinh vật Coryneform là các vi sinh vật công nghiệp đã được sử dụng rộng rãi và truyền thống nhất để sản xuất các axit amin và các chất liên quan đến axit nucleic. Các vi sinh vật Coryneform là vi khuẩn gram dương chủ yếu được sử dụng để sản xuất các chất hóa học có các ứng dụng khác nhau trong lĩnh vực thức ăn chăn nuôi, thuốc, dược phẩm, thực phẩm, và các loại tương tự, bao gồm các axit amin và các loại axit nucleic khác nhau, và cần biotin cho sự tăng trưởng của chúng. Những vi khuẩn này có đặc điểm là uốn cong theo góc vuông trong quá trình phân chia tế bào (bẻ gãy), và một trong những ưu điểm của chúng là chúng có hoạt tính phân hủy thấp đối với các chất chuyển hóa được tạo ra.

Trong số các sản phẩm được sản xuất bởi các vi sinh vật coryneform, các L-axit amin là các đơn vị cấu trúc cơ bản của protein, và được sử dụng làm nguyên liệu quan trọng cho các nguyên liệu thô dược phẩm, phụ gia thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, chất bổ sung dinh dưỡng, thuốc trừ sâu, chất khử trùng, và các loại tương tự. Vì vậy, việc sản xuất công nghiệp các axit amin đã trở thành quá trình công nghiệp quan trọng về mặt kinh tế.

Nhiều nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để sản xuất hiệu quả các axit amin; ví dụ, những nỗ lực đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật hoặc công nghệ quá trình lên men để sản xuất các axit amin với hiệu quả cao. Cụ thể, các phương pháp tiếp cận cụ thể với các chất đích đã được phát triển, chẳng hạn như tăng sự biểu hiện của các gen mã hóa các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp của các axit amin hoặc xóa các gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp các axit amin trong

các chủng thuộc chi *Corynebacterium* (patent Hoa Kỳ số US 8030036 B2, v.v.). Ngoài các phương pháp này, phương pháp loại bỏ các gen không liên quan đến việc sản xuất các axit amin và phương pháp loại bỏ các gen có chức năng sản xuất các axit amin không được biết đến cụ thể cũng đã được sử dụng. Tuy nhiên, nhu cầu nghiên cứu các phương pháp sản xuất axit amin hiệu quả với năng suất cao vẫn đang ngày càng gia tăng.

Để phát triển các chủng chất lượng cao từ các vi sinh vật coryneform bằng kỹ thuật di truyền hoặc kỹ thuật trao đổi chất, sự biểu hiện của các gen liên quan đến một số con đường trao đổi chất ở các vi sinh vật cần được điều chỉnh một cách có chọn lọc. Đối với sự điều chỉnh này, điều quan trọng là phải điều chỉnh hoạt động của vùng gen khởi động, là gen điều hòa, tại đó quá trình phiên mã bắt đầu bằng cách gắn polymeraza ARN vào phân tử ADN.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả đã hoàn thiện sáng chế bằng cách phát triển vùng gen khởi động thể hiện hoạt tính cảm ứng biểu hiện mạnh mẽ, và kết quả là, các tác giả đã sửa đổi vùng gen khởi động của gen *ilvC* trên nhiễm sắc thể *Corynebacterium* bằng cách thay thế nucleotit và xác định rằng vùng gen khởi động đã sửa đổi có thể làm tăng sự biểu hiện của gen được liên kết chức năng với nó.

Sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động, trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Sáng chế đề xuất vùng gen khởi động bao gồm polynucleotit.

Sáng chế đề xuất vector bao gồm vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polynucleotit.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chất đích, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường nuôi cấy.

Sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường sự biểu hiện của gen đích, phương pháp bao gồm bước liên kết chức năng vùng gen khởi động với gen đích.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng polynucleotit làm vùng gen khởi động trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã

nhận biết SEQ ID NO: 1.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Các polynucleotit có hoạt tính của vùng gen khởi động mới theo sáng chế có thể được sử dụng để tăng sự biểu hiện của gen đích được liên kết với nó, và do đó có thể được sử dụng hữu ích trong việc sản xuất các chất đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.4 minh họa các vùng của vùng gen khởi động *ilvC* của các chủng sản xuất valin;

Các Fig.5 và Fig.6 là các hình vẽ minh họa các vùng của vùng gen khởi động *ilvC* của các chủng sản xuất isoleuxin; và

Các Fig.7 và Fig.8 là các hình vẽ minh họa các vùng của vùng gen khởi động *ilvC* của các chủng sản xuất leuxin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Mỗi phần mô tả và phương án của một khía cạnh được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho phần mô tả và phương án của khía cạnh khác với các nội dung giống nhau. Ngoài ra, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong phần mô tả chi tiết của sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

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

Theo một khía cạnh của sáng chế đề xuất polynucleotit trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và có hoạt tính vùng gen khởi động.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “polynucleotit” có nghĩa là polyme nucleotit bao gồm các đơn phân nucleotit được liên kết cộng hóa trị trong chuỗi dài, chẳng hạn

như sợi ADN có chiều dài định trước hoặc dài hơn.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động” có nghĩa là vùng ADN có mặt trong vùng lân cận của vị trí có liên quan đến quá trình phiên mã của gen đích, bao gồm vị trí tại đó polymeraza ARN, là chất tăng cường hoặc các liên kết tương tự cho sự biểu hiện của gen đích được liên kết phía sau của gen đó. Theo mục đích của sáng chế, polynucleotit có thể được sử dụng làm vùng gen khởi động được tăng cường cho mục đích sử dụng chung. Polynucleotit có thể được tạo cấu trúc để điều hòa sự biểu hiện của gen đích được liên kết chức năng với nó và sản xuất và/hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen đích và có thể được tạo cấu trúc để tăng sản xuất và/hoặc hoạt tính của sản phẩm đích (chất có hoạt tính sinh học, ví dụ, ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin, axit nucleic, vitamin, protein, axit béo và axit hữu cơ), trong đó quá trình sản xuất liên quan đến protein, trong tế bào, so với các vùng gen khởi động hoặc các vùng gen khởi động nội sinh tế bào thông thường, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo một phương án, polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế có thể được sử dụng làm vùng gen khởi động có khả năng tăng cường sự biểu hiện của axit axetohydroxy isomeroreductaza. Polynucleotit có thể là polynucleotit tham gia vào việc tăng sản xuất hoặc sản xuất số lượng axit amin bao gồm các axit amin, cụ thể là các axit amin chuỗi nhánh, cụ thể hơn là leuxin, valin và isoleuxin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây và các trình tự polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động được bao gồm trong sáng chế nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là trình tự có hoạt tính vùng gen khởi động, và trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể được xác định thông qua dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI: National Center for Biotechnology Information), và có thể có nguồn gốc từ *Corynebacterium* sp., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Bất kỳ trình tự nào có hoạt tính giống như trình tự nucleotit đều có thể được đưa vào, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trong khi đó, trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là vùng gen khởi động của axit axetohydroxy isomeroreductaza. Tuy nhiên, trình tự không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “axit axetohydroxy isomeroreductaza” có

nghĩa là enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-axit amin chuỗi nhánh. Đối với con đường sinh tổng hợp của các L-axit amin chuỗi nhánh, trước tiên, axit axetohydroxy synthaza xúc tác quá trình khử cacboxyl của axit pyruvic và phản ứng ngưng tụ của axit pyruvic với phân tử axit pyruvic khác để tạo ra axit axetolactic, tiền chất của valin, hoặc khử cacboxyl của axit pyruvic và phản ứng ngưng tụ của axit pyruvic với 2-ketobutyrate để tạo ra axetohydroxybutyrate, tiền chất của isoleuxin. Axit axetohydroxy isomerase thúc đẩy phản ứng sang bước tiếp theo bằng cách sử dụng axit axetolactic hoặc axetohydroxybutyrate được sản sinh như chất nền, nhờ đó sản sinh L-valin, L-leuxin và L-isoleuxin. Cụ thể, quá trình đồng phân hóa xảy ra bởi phản ứng của axit axetolactic hoặc axetohydroxybutyrate, được sản sinh bởi phản ứng của axit axetohydroxy synthaza, với axit axetohydroxy isomerase, và sau đó thông qua phản ứng khử, (2R)-2,3-dihydroxy-3-isovalerate hoặc (2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-methylvalerate được sản sinh từ mỗi chất nền. (2R)-2,3-dihydroxy-3-isovalerate được thực hiện các phản ứng được xúc tác bởi axit dihydroxy khử nước và transaminase B để sản sinh L-valin, và lần lượt thực hiện các phản ứng được xúc tác bởi axit dihydroxy khử nước, 2-isopropylmalate synthase, isopropylmalate isomerase, 3-isopropylmalate dehydrogenase và transaminase B để sản sinh L-leuxin. (2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-methylvalerate được thực hiện các phản ứng được xúc tác bởi axit dihydroxy khử nước và transaminase B để sản sinh L-isoleuxin. Do đó, axit axetohydroxy isomerase là enzym quan trọng trong con đường sinh tổng hợp của L-axit amin chuỗi nhánh.

Polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế đề cập đến polynucleotit trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và/hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Các trình tự nucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể là các trình tự nằm trong phạm vi ở trên, ngoại trừ trình tự có 100% đồng nhất, hoặc có thể là các trình tự có ít hơn 100% đồng nhất.

Cụ thể, polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động có thể bao gồm polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động trong đó ít nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc có thể được tạo cấu trúc bởi polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động trong đó ít

nhất một nucleotit được thay thế bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động có thể là polynucleotit được thể hiện bởi công thức chung X–Y–Z trong đó i) X là CNGN; ii) Y là CTAATTN; và iii) Z là CATGTGTGTGGTANAAN; và iv) N được chọn từ adenin (A), thymine (T), guanin (G), hoặc xytosin (C). Trong trình tự polynucleotit của công thức chung, Z có thể có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, Y có thể có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, hoặc X có thể có mã nhận biết SEQ ID NO: 4.

Cụ thể, trong công thức chung, X có thể được thể hiện bởi CN_1GN_2 , Y có thể được thể hiện bởi $CTAATTN_3$, và Z có thể được thể hiện bởi $CATGTGTGTGGTATAAT$, trong đó từng N_1 , N_2 , và N_3 là bất kỳ một trong số được chọn từ adenin (A), thymine (T), guanin (G), hoặc xytosin (C).

Cụ thể là, trong công thức chung, i) N_1 có thể là xytosin (C) hoặc guanin (G), ii) N_2 có thể là adenin (A) hoặc thymine (T), iii) N_3 có thể là adenin (A) hoặc guanin (G), hoặc iv) có thể có sự kết hợp của sự thay thế từ i) đến iii), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo một phương án, trong trình tự polynucleotit có công thức chung, ở Z, nucleotit N thứ 14 và nucleotit thứ 17 có thể là thymine (T) trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, trong đó ở X, nucleotit N thứ 2 có thể là xytosin (C) hoặc guanin (G) và nucleotit N thứ 4 có thể là adenin (A) hoặc thymine (T) trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 hoặc X có thể là bất kỳ một trong các mã nhận biết từ SEQ ID NO: 8 đến SEQ ID NO: 11; và ở Y, nucleotit N thứ 7 có thể là adenin (A) hoặc guanin (G) trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Cụ thể, trong Z, nucleotit N thứ 14 và nucleotit thứ 17 có thể là thymine (T) trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2; X có thể là bất kỳ một trong các mã nhận biết từ SEQ ID NO: 8 đến SEQ ID NO: 11; và Y có thể có mã nhận biết SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7.

Theo phương án khác nữa, polynucleotit có thể có bất kỳ một trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự có mã nhận biết từ SEQ ID NO: 13 đến SEQ ID NO: 20.

Mặc dù sáng chế sử dụng cụm từ “polynucleotit có trình tự nucleotit có số trình

tự cụ thể” hoặc “polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có số trình tự cụ thể”, rõ ràng là polynucleotit có trình tự polynucleotit được xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung vào một phần của chúng cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là polynucleotit có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự nucleotit có số trình tự tương ứng. Ví dụ, rõ ràng là các cụm tự này không loại trừ bất kỳ sự bổ sung nào của các trình tự vô nghĩa phía trước hoặc phía sau của trình tự nucleotit của số trình tự tương ứng, đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cam của chúng, miễn là polynucleotit có hoạt tính tương đồng hoặc tương đương với trình tự của polynucleotit, và các trình tự nucleotit có sự bổ sung hoặc đột biến trình tự này cũng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Tương đồng hoặc đồng nhất có nghĩa là 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 bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể lai hóa với nhau theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ chiều dài trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Trong các polynucleotit đã lai hóa, các polynucleotit bao gồm đơn vị mã hóa thoái biến thay vì đơn vị mã hóa cũng được xem xét.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa hai trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng bất kỳ thuật toán đã biết, ví dụ thuật toán “FASTA”, sử dụng các thông số mặc định được đưa ra bởi Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444. Thay vào đó, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453) đã được thực hiện trong thuật toán Needleman của Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite) (Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc mới hơn) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J. et al., Nucleic Acids

Research 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., et al., J MOLEC BIOL 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và CARILLO et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST, từ dữ liệu của Cơ sở dữ liệu Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, hoặc ClustalW.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự thông qua chương trình máy tính GAP, ví dụ Needleman et al., (1970), J Mol Biol. 48:443 như được mô tả bởi Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình máy tính GAP xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất như giá trị thu được bằng cách chia số ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau cho tổng số ký hiệu trong một đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa giá trị 1 cho sự đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14:6745 như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence và Structure, National Biomedical Research Foundation, các trang từ 353 đến 358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống (hoặc hàm phạt mở khoảng trống 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống 0,5); và (3) không có hàm phạt cho các khoảng trống cuối cùng. Thuật ngữ “tương đồng hoặc đồng nhất” trong phần mô tả này có nghĩa là mức độ kết hợp với hai trình tự.

Ngoài ra, bất kỳ trình tự polynucleotit có thể lai hóa với đầu dò được điều chế từ gen đã biết, ví dụ, có thể bao gồm trình tự nucleotit bổ sung toàn bộ hoặc một phần cho trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt mà không bị 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 tài liệu đã biết (ví dụ, J. Sambrook et al., supra). 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, các gen có ít nhất 40%, tốt hơn là ít nhất 70%, 80%, 85%, hoặc tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt nhất là ít nhất 95%, 97%, và 99% tương đồng hoặc đồng nhất mà không

lai hóa giữa các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên; hoặc điều kiện rửa thông thường của lai Southern, tức là rửa một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C , $1\times\text{SSC}$, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C , $0,1\times\text{SSC}$, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C , $0,1\times\text{SSC}$, và 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 nucleotit 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, sáng chế cũng có thể bao gồm các đoạn nucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như trình tự nucleotit 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 bao gồm bước lai được thực hiện với giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C và 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 người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Mức độ phù hợp của sự nghiêm ngặt trong lai hóa các polynucleotit có thể tùy thuộc vào các chiều dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit và các thông số của chúng đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (Sambrook et al., supra, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vùng gen khởi động bao gồm polynucleotit theo sáng chế.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vùng gen khởi động” đề cập đến trình tự nucleotit chưa được dịch mã, nằm ở phía trước của vùng mã hóa, chứa vị trí liên kết với polymeraza ARN, và có hoạt tính để bắt đầu phiên mã gen đích thành mARN, tức là vùng ADN mà polymeraza ARN liên kết với từ đó khởi động quá trình phiên mã của gen. Vùng gen khởi động có thể nằm ở vùng 5' của vị trí bắt đầu phiên mã thành mARN.

Vùng gen khởi động theo sáng chế có thể có hoạt tính vùng gen khởi động được

tăng cường so với các vùng gen khởi động thông thường. Tức là, vùng gen khởi động có thể làm tăng sự biểu hiện của gen đích cũng như sự biểu hiện và hoạt động của protein được mã hóa bởi gen đích.

Theo mục đích của sáng chế, gen đích để tăng cường sự biểu hiện có thể được thay đổi một cách thích hợp tùy thuộc vào sản phẩm được tạo ra, tức là “sản phẩm đích”, và vùng gen khởi động có thể được sử dụng làm vùng gen khởi động có mục đích chung để tăng cường gen đích.

Theo mục đích của sáng chế, thuật ngữ “gen đích” có nghĩa là gen có sự biểu hiện được điều hòa bởi trình tự vùng gen khởi động theo sáng chế. Protein được mã hóa bởi gen đích có thể được biểu thị là “protein đích”, và gen mã hóa “protein đích” có thể được biểu hiện là “gen đích”. Ví dụ, gen đích của vùng gen khởi động có thể là gen mã hóa axit axetohydroxy isomeroreductaza, tức là, có thể là *ilvC*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Polynucleotit mã hóa protein đích có thể có nhiều sửa đổi khác nhau trong vùng mã hóa nằm trong phạm vi ở trên trong đó trình tự polynucleotit không bị thay đổi, do sự thoái biến của đơn vị mã hóa (codon) hoặc xem xét đến các codon được sinh vật ưa thích trong đó polynucleotit được biểu hiện. Mô tả về trình tự polynucleotit được mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector bao gồm vùng gen khởi động.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector bao gồm vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích.

Cụ thể, vector có thể là vector trong đó protein đích là axit axetohydroxy isomeroreductaza, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vector” có nghĩa là cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit mã hóa polynucleotit đích, được liên kết chức năng với vùng kiểm soát biểu hiện hoặc trình tự kiểm soát biểu hiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit đích trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để kiểm soát phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và các trình tự để điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, và cụ thể, trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm vùng gen

khởi động theo sáng chế. Khi tế bào vật chủ thích hợp được biến nạp với vector, vector có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chúng.

Ví dụ, có thể thực hiện thay thế polynucleotit đích trong nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng vector cho việc chèn nhiễm sắc thể vào các tế bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bởi bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để phát hiện việc chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc được sử dụng để chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận việc chèn thành công các phân tử nucleic đích, và sử dụng các chỉ dấu để truyền các kiểu hình có thể lựa chọn, chẳng hạn như khả năng chống chịu thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, khả năng chống lại các tác nhân gây độc tế bào, và biểu hiện của protein trên bề mặt. Chỉ các tế bào có khả năng biểu hiện các chỉ dấu chọn lọc mới có thể tồn tại hoặc biểu hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, và do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn lọc.

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

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật *Corynebacterium* sp. chứa polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật *Corynebacterium* sp. chứa polynucleotit theo sáng chế và gen mã hóa protein đích.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật” bao gồm tất cả các vi sinh vật kiểu dại, hoặc các vi sinh vật có biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và đề cập đến vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do sự chèn của gen ngoại

sinh hoặc sự tăng cường hoặc suy giảm của hoạt tính của gen nội sinh. Vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm vi sinh vật trong đó polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế được đưa vào hoặc bao gồm polynucleotit, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, vi sinh vật là vi sinh vật được điều chế bằng cách biến nạp với vector chứa polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế và gen mã hóa protein đích, hoặc vi sinh vật bao gồm polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích hoặc bao gồm vector chứa polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật bao gồm polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động và gen mã hóa protein đích, và do đó có khả năng tạo ra protein đích hoặc sản phẩm đích, trong đó quá trình sản xuất liên quan đến protein đích, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích một cách tự nhiên, hoặc vi sinh vật thu được bằng cách truyền khả năng sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích cho chủng bố mẹ mà không có khả năng sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích” bao gồm tất cả các vi sinh vật kiểu dại hoặc các vi sinh vật có biến đổi gen xảy ra tự nhiên hoặc nhân tạo, và đề cập đến vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do sự chèn gen ngoại sinh hoặc sự tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, trong đó vi sinh vật có thể có đột biến gen để tạo ra sản phẩm hoặc protein đích. Vi sinh vật tương ứng có thể là: vi sinh vật được biến đổi gen bằng cách sử dụng bất kỳ một trong số protein đích, polynucleotit mã hóa protein đích, và vector bao gồm polynucleotit; vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện protein hoặc polynucleotit mã hóa giống nhau; vi sinh vật tái tổ hợp biểu hiện protein đích hoặc polynucleotit mã hóa protein đích; hoặc vi sinh vật tái tổ hợp có hoạt tính của protein đích, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là polynucleotit hoặc vector chứa polynucleotit theo sáng chế và polynucleotit mã hóa protein đích được đưa vào tế bào vật chủ hoặc vi sinh vật để cho phép protein đích được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Bất kỳ tế bào vật chủ có thể được đưa vào miễn là protein đích có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, bất kể polynucleotit hoặc vector được chèn vào tế

bào vật chủ hoặc vi sinh vật được chèn và nằm bên trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể. Polynucleotit có thể được đưa vào ở bất kỳ dạng nào miễn là polynucleotit có thể được đưa vào và được biểu hiện trong tế bào vật chủ. 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 để tự sao chép. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng gen khởi động được liên kết chức năng với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã, và vùng gen khởi động có thể là polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế. Catxet biểu hiện có thể ở dạng biểu hiện tự sao chép vector. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được liên kết chức năng đến polynucleotit theo sáng chế và được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng ban đầu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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 vùng gen khởi động cho phép bắt đầu và trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích. Trình tự vùng gen khởi động có thể là vùng gen khởi động theo sáng chế.

Các phương pháp biến nạp với vector theo sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp đưa axit nucleic vào tế bào vật chủ, và bất kỳ kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được chọn và thực hiện phù hợp với tế bào vật chủ. Ví dụ về kỹ thuật có thể là điện biến nạp, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa clorua canxi (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, phương pháp liti axetat-DMSO, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật là vi sinh vật sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích, trong đó vi sinh vật này có khả năng tăng sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích bằng cách đưa vào polynucleotit theo sáng chế.

Theo một phương án, vi sinh vật bao gồm polynucleotit theo sáng chế có thể là vi sinh vật có hoạt tính tăng cường của protein đích do sự thay thế của ít nhất một nucleotit bằng nucleotit khác trong trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, vi sinh vật là vi sinh vật bao gồm polynucleotit có hoạt tính vùng gen

khởi động do sự thay thế của ít nhất một nucleotit bằng nucleotit khác trong trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, trong đó polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động có thể được thể hiện bởi công thức chung X–Y–Z, trong đó X là CNGN; Y là CTAATTN; và Z là CATGTGTGTGGTANAAN; và N được chọn từ adenin (A), thymin (T), guanin (G), hoặc xytosin (C). Polynucleotit đã được mô tả ở trên.

Theo một phương án, vi sinh vật theo sáng chế có thể có hoạt tính tăng cường của protein đích do sự biến đổi với vectơ bao gồm polynucleotit theo sáng chế và gen mã hóa protein đích.

Theo sáng chế, vi sinh vật sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất protein đích hoặc sản phẩm đích có thể là vi sinh vật trong đó một số gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp của protein đích hoặc sản phẩm được tăng cường hoặc suy giảm, hoặc một số gen liên quan đến con đường thoái biến của protein đích hoặc sản phẩm đích được tăng cường hoặc suy giảm.

Ví dụ, khi protein đích là protein tham gia vào việc sản xuất axit amin chuỗi nhánh, vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin chuỗi nhánh một cách tự nhiên hoặc vi sinh vật thu được bằng cách truyền khả năng sản xuất axit amin chuỗi nhánh cho chủng bố mẹ không có khả năng tạo ra axit amin chuỗi nhánh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo một phương án, khi protein đích là axit axetohydroxy isomeroreductaza, vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật trong đó polynucleotit theo sáng chế được liên kết chức năng với gen mã hóa axit axetohydroxy isomeroreductaza để tăng cường hoạt tính của axit axetohydroxy isomeroreductaza, và trong những trường hợp này, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin chuỗi nhánh thông qua protein đích.

Trong phần mô tả này, “vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin chuỗi nhánh” có thể được sử dụng thay thế cho “vi sinh vật sản xuất axit amin chuỗi nhánh” và “vi sinh vật có thể sản xuất axit amin chuỗi nhánh”.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “axit amin axit chuỗi nhánh” có nghĩa là axit amin có nhóm alkyl phân nhánh trên chuỗi bên của chúng, bao gồm valin, leuxin và isoleuxin. Cụ thể, theo sáng chế, axit amin chuỗi nhánh có thể là L-axit amin chuỗi nhánh, và L-axit amin chuỗi nhánh có thể là L-valin, L-isoleuxin hoặc L-leuxin, tuy

nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất axit amin chuỗi nhánh” bao gồm tất cả các vi sinh vật kiểu dại hoặc vi sinh vật có biến đổi gen xảy ra tự nhiên hoặc nhân tạo, và đề cập đến vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do sự chèn gen nội sinh hoặc tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, trong đó vi sinh vật có thể có đột biến di truyền hoặc hoạt tính tăng cường để sản xuất axit amin chuỗi nhánh đích. Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản xuất axit amin chuỗi nhánh có thể là vi sinh vật có khả năng tăng cường tạo ra axit amin chuỗi nhánh đích bằng cách đưa vào polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể, vi sinh vật sản xuất axit amin chuỗi nhánh hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin chuỗi nhánh có thể là vi sinh vật trong đó một số gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp của axit amin chuỗi nhánh được tăng cường hoặc suy giảm, hoặc một số gen liên quan đến con đường thoái biến của axit amin chuỗi nhánh được tăng cường hoặc suy giảm. Ví dụ, vi sinh vật sản sinh axit amin chuỗi nhánh có thể có sự biểu hiện tăng lên của *ilvC* mã hóa axit axetohydroxy isomeroreductaza nhờ đưa vào polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit amin chuỗi nhánh” có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh axit amin chuỗi nhánh tự nhiên hoặc bằng cách biến đổi. Cụ thể, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit amin chuỗi nhánh theo sáng chế có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm *ilvC* mã hóa axit axetohydroxy isomeroreductaza và có khả năng tăng cường tạo ra axit amin chuỗi nhánh bằng cách tăng cường hoạt tính vùng gen khởi động của *ilvC*. Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit amin chuỗi nhánh theo sáng chế có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polynucleotit có hoạt tính vùng gen khởi động theo sáng chế hoặc có khả năng tăng sản sinh axit amin chuỗi nhánh nhờ sự biến nạp với vectơ chứa polynucleotit và gen mã hóa protein đích.

“Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh axit amin chuỗi nhánh” là vi sinh vật có khả năng tăng sản sinh axit amin chuỗi nhánh so với chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật chưa biến đổi. “Vi sinh vật chưa biến đổi” có

nghĩa là chủng đại, vi sinh vật không bao gồm gen mã hóa axit axetohydroxy isomerase, hoặc vi sinh vật không bao gồm trình tự polynucleotit theo sáng chế hoặc không được biến nạp bằng vector chứa polynucleotit theo sáng chế và gen mã hóa protein đích.

“Chủng bố mẹ” có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh axit amin chuỗi nhánh. Cụ thể, chủng bố mẹ có thể là vi sinh vật sản xuất axit amin chuỗi nhánh có biến đổi gen xảy ra tự nhiên hoặc nhân tạo. Ví dụ, chủng bố mẹ có thể là chủng có khả năng sản sinh L-valin được cải thiện nhờ đưa sự biến đổi (ilvN(A42V); *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, June 2014, Volume 19, Issue 3, pp. 456–467) vào vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, hoặc chủng có khả năng sản sinh L-isoleuxin được cải thiện nhờ đưa sự biến đổi của biến thể lysC(L377K) và biến thể hom(G378E) (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 612–620 (1996)) vào vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* và đưa sự biến đổi của ilvA(V383A) (*World J Microbiol Biotechnol* (2015) 31:1369–1377) vào gen mã hóa dehydratase L-threonin. Hơn nữa, chủng bố mẹ có thể là chủng có khả năng sản sinh L-leuxin được cải thiện nhờ đưa sự biến đổi (leuA(R558H, G561D); US 2020-0032305 A1) vào vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể bao gồm tất cả các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể, các ví dụ có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris*, *Corynebacterium flavescens*, và loại tương tự, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chất đích, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường nuôi cấy.

Chất đích cụ thể có thể là axit amin, và cụ thể hơn là axit amin chuỗi nhánh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong phương pháp này, việc nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy hàng loạt, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng, hoặc tương tự, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Các điều kiện nuôi cấy có thể là nhưng không bị giới hạn ở sự điều chỉnh đến độ pH thích hợp (ví dụ, độ pH từ 5 đến 9, cụ thể là độ pH từ 6 đến 8, và cụ thể hơn là độ pH 6,8) có thể đạt được bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit hoặc amoniac) hoặc hợp chất có tính axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric), và điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách thêm oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là từ 25°C đến 40°C, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện từ 10 giờ đến 160 giờ tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Axit amin được sản xuất bằng cách nuôi cấy có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc vẫn còn trong tế bào mà không cần giải phóng.

Trong môi trường nuôi cấy được sử dụng như nguồn carbon bao gồm đường và các hydrat carbon (ví dụ, glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), các axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), các rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và các axit hữu cơ (axit axetic) và tương tự có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp, tuy nhiên nguồn carbon không bị giới hạn ở đây. Đối với nguồn nitơ, hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, cao thịt, cao mạch nha, dịch chiết ngô, bột đậu nành và ure), hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat) và tương tự có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp, tuy nhiên nguồn nitơ không bị giới hạn ở đây. Đối với nguồn phospho, kali dihydrogen phosphat, dikali hydrogen phosphat, muối chứa natri tương ứng và tương tự có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp, tuy nhiên nguồn phospho không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các nguyên liệu thúc đẩy sự tăng trưởng cần thiết chẳng hạn như các muối kim loại khác (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), các axit amin, và các vitamin.

Phương pháp sản xuất chất đích theo sáng chế có thể còn bao gồm việc thu hồi chất đích từ môi trường nuôi cấy.

Đối với việc thu hồi chất đích trong bước nuôi cấy, chất đích có thể được thu hồi

từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), và tương tự, và chất đích có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh chế, có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, khi chất đích là axit amin, axit amin đã thu hồi có thể có dạng tinh khiết hoặc có thể là dịch lên men vi sinh vật chứa axit amin (*Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering*, A. J. Nair., 2008).

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường sự biểu hiện của gen đích, phương pháp bao gồm liên kết chức năng vùng gen khởi động bao gồm polynucleotit theo sáng chế với gen đích.

Polynucleotit, gen đích, vùng gen khởi động, và chất tương tự đã được mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng polynucleotit làm vùng gen khởi động có sự thay thế ít nhất một nucleotit bằng nucleotit khác trong trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Polynucleotit đã được 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 1: Lựa chọn chủng đột biến với khả năng sản sinh valin tăng cường bằng cách đột biến ngẫu nhiên

Ví dụ 1-1: Đột biến ngẫu nhiên bằng cách chiếu xạ tia cực tím (UV: Ultraviolet)

Để lựa chọn các chủng đột biến với khả năng sản sinh valin tăng cường, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P (patent Hoa Kỳ số US 8465962 B2) là chủng sản sinh valin, được cấy chuyển trên môi trường dinh dưỡng chứa aga và được

nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 36 giờ. Do đó, hàng trăm khuẩn lạc thu được được chiếu xạ tia UV ở nhiệt độ phòng để thực hiện đột biến ngẫu nhiên trên bộ gen của chúng.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

glucoza 10 g, nước thịt 5 g, polypepton 10 g, natri clorua 2,5 g, dịch chiết nấm men 5 g, aga 20 g, và ure 2 g (trong 1 L nước cất).

Ví dụ 1-2: Thử nghiệm độ chuẩn lên men trên các chủng đột biến và chọn lọc các chủng

Để lựa chọn các chủng đột biến với khả năng sản sinh L-valin tăng so với *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P được sử dụng như chủng bố mẹ, thử nghiệm độ chuẩn lên men được thực hiện trên các chủng đột biến. Mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy truyền thể hệ trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó mỗi chủng được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 mL môi trường sản xuất, và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau đó, nồng độ của L-valin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ của L-valin đã phân tích được lập bảng trong bảng 1.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

glucoza 10 g, nước thịt 5 g, polypepton 10 g, natri clorua 2,5 g, dịch chiết nấm men 5 g, aga 20 g, và ure 2 g (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

glucoza 100 g, amoni sunfat 40 g, protein đậu nành 2,5 g, dịch chiết ngô 5 g, ure 3 g, kali phosphat đibazơ 1 g, magie sulfat heptahydrat 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin-HCl 1 mg, canxi pantothenat 2 mg, nicotin amit 3 mg, canxi cacbonat 30 g (trong 1 L nước cất)

Bảng 1

	Tên chủng	L-Valin (g/L)
Đối chứng	KCCM11201P	2,7
Nhóm thử nghiệm	M1	3,0
	M2	2,8
	M3	2,5

	M4	4,8
	M5	3,5
	M6	3,3
	M7	2,9
	M8	3,9
	M9	3,5
	M10	2,1
	M11	1,1
	M12	2,9
	M13	2,5
	M14	3,1
	M15	4,7
	M16	3,2

Tham chiếu trong bảng 1, các chủng M4 và M15 được chọn trong đó lượng sản sinh valin tăng lên tương ứng 178% và 174% so với chủng KCCM11201P làm đối chứng.

Ví dụ 2: Kiểm tra sự biến đổi bằng cách giải trình tự gen

Các gen chính trong con đường sinh tổng hợp valin trong các chủng M4 và M15 với khả năng tăng sản sinh valin được giải trình tự, và so sánh với các gen trong chủng KCCM11201P, và các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, ATCC13032, và ATCC13869 kiểu dại. Các kết quả xác định rằng các chủng M4 và M15 chứa các đột biến giống nhau tại các vị trí cụ thể trong vùng của vùng gen khởi động của *ilvC*, gen mã hóa axit axetohydroxy isomeroreductaza (AHAIR) (Fig.1). Cụ thể, trong các chủng M4 và M15, nucleotit G thứ 14 và 17 được thay thế với T trong trình tự của vùng của vùng gen khởi động bao gồm trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 5. Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 5 là trình tự thường được chứa trong vùng của vùng gen khởi động của *ilvC* của các chủng *Corynebacterium glutamicum* (ATCC14067, ATCC13032, và ATCC13869 kiểu dại). Trong các ví dụ sau, đã nghiên cứu xem liệu các đột biến có ảnh hưởng đến lượng sản sinh axit amin của các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Ví dụ 3: Điều chế các chủng được đưa vào đột biến và kiểm tra khả năng sản sinh valin

Ví dụ 3-1: Điều chế các chủng bằng cách đưa các đột biến vào *Corynebacterium*

glutamicum KCCM11201P và đánh giá khả năng sản sinh valin

Ví dụ 3-3-1: Điều chế các chủng

Để thay thế các nucleotit thứ 14 và 17 bằng T trong trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 5, vectơ chứa các đột biến đích để đưa các đột biến vào chủng sản sinh valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P được tạo ra.

Cụ thể, bộ gen ADN của ATCC14067, chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu dại, được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit nhỏ tách chiết tổng số ADN G-spin (Intron, Cat. No. 17045) theo chỉ lệnh của bộ kit. Phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: Polymerase Chain Reaction) được thực hiện sử dụng bộ gen ADN làm mạch khuôn. Để tạo ra vectơ để đưa các đột biến vào vùng của vùng gen khởi động của gen *ilvC*, các đoạn ADN (A và B) thu được sử dụng tương ứng cặp mồi của đoạn mồi 1 (mã nhận biết SEQ ID NO: 21) và đoạn mồi 2 (mã nhận biết SEQ ID NO: 22) và cặp mồi của đoạn mồi 3 (mã nhận biết SEQ ID NO: 23) và đoạn mồi 4 (mã nhận biết SEQ ID NO: 24).

PCR trùng lặp sử dụng hai đoạn làm mạch khuôn cùng với đoạn mồi 1 (mã nhận biết SEQ ID NO: 21) và đoạn mồi 4 (mã nhận biết SEQ ID NO: 24) được thực hiện để thu được sản phẩm PCR khoảng 1,4 kb (sau đây được gọi là “đoạn được đưa vào đột biến”). Các đoạn mồi đã sử dụng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO
Đoạn mồi 1	CTATTCTAGAGTGATGAATCTGCAGCAGAAGATC	21
Đoạn mồi 2	GACAACTACATTATTATTATACCACACACATGCA	22
Đoạn mồi 3	TGCATGTGTGTGGTATAATAATAATGTAGTTGTC	23
Đoạn mồi 4	CTATTCTAGAGAAGAGGTCGGTGACGGTCTCAGC	24

Các đoạn gây đột biến thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được liên kết sử dụng vectơ pDZ (WO 2008-033001 A1) được xử lý với cùng một enzym giới hạn và ligaza T4 (New England Biolabs, Beverly, MA). Gen đã điều chế được biến nạp thành *E coli* DH5 α , sau đó được chọn từ môi trường LB chứa kanamycin, và ADN thu được sử dụng bộ kit tinh chế plasmid ADN ADN-spin (iNtRON) để tạo ra plasmid tái tổ hợp pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067. Quy trình tương tự được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen của

ATCC13869 và ATCC13032 thay vì bộ gen ADN của ATCC14067, *Corynebacterium glutamicum* kiểu dại, và do đó tạo ra các plasmid tái tổ hợp tương ứng được gọi là pDZ-*ilvC*(Pm3)-13869 và pDZ-*ilvC*(Pm3)-13032.

Trong số ba plasmid tái tổ hợp được tạo ra ở trên, pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 được biến nạp thành *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, chủng sản sinh L-valin, bằng cách tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Chủng trong đó vectơ được chèn vào nhiễm sắc thể bằng sự tái tổ hợp của các trình tự đồng nhất được chọn từ môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Sau đó, chủng biến nạp của *Corynebacterium glutamicum* để hoàn thành việc tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện PCR sử dụng đoạn mồi 1 và đoạn mồi 4 để tạo ra chủng KCCM11201P-*ilvC*(Pm3) trong đó các đột biến được đưa vào vùng gen khởi động *ilvC* trên nhiễm sắc thể (Fig.2). Chủng tái tổ hợp được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CA08-1063, được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế, Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21/08/2019, với số lưu chủng KCCM12574P.

Ví dụ 3-1-2: Đánh giá khả năng sản sinh valin

Để so sánh khả năng sản sinh valin giữa các chủng sản sinh valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P và KCCM11201P-*ilvC*(Pm3), việc đánh giá độ chuẩn lên men được thực hiện. Mỗi chủng được nuôi cấy truyền thể hệ trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 mL môi trường sản xuất, và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau đó, nồng độ của L-valin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ của L-valin đã phân tích được lập bảng trong bảng 3.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

glucoza 10 g, nước thịt 5 g, polypepton 10 g, natri clorua 2,5 g, dịch chiết nấm men 5 g, aga 20 g, và ure 2 g (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

glucoza 100 g, amoni sunfat 40 g, protein đậu nành 2,5 g, dịch chiết ngô 5 g, ure 3 g, kali phosphat đibazơ 1 g, magie sulfat heptahydrat 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin-

HCl 1 mg, canxi pantothenat 2 mg, nicotin amit 3 mg, canxi cacbonat 30 g (trong 1 L nước cất)

Bảng 3

Khả năng sản sinh L-valin của KCCM11201P và KCCM11201P-*ilvC*(Pm3)

	Chủng	L-Valin (g/L)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Đối chứng	KCCM11201P	2,8	2,6	2,7	2,7
Nhóm thử nghiệm	KCCM11201P- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,2	2,9	2,9	3,0

Như được thể hiện trong các kết quả ở trên, khả năng sản sinh L-valin của chủng KCCM11201P-*ilvC*(Pm3) tăng lên 11% so với khả năng sản sinh L-valin của chủng đối chứng. Do đó, khả năng sản sinh L-valin có thể được cải thiện thông qua sự đột biến của vùng gen khởi động của gen *ilvC*.

Ví dụ 3-2: Điều chế các chủng với việc đưa đột biến vào *Corynebacterium glutamicum* CJ7V và đánh giá khả năng sản sinh valin

Ví dụ 3-2-1: Điều chế chủng sản sinh valin-CJ7V

Để kiểm tra xem liệu hiệu quả tương tự ở trên có đạt được ở các chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-valin khác hay không, loại đột biến (*ilvN*(A42V); *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6/2014, tập 19, tái bản lần 3, trang 456–467) được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại để điều chế các chủng có khả năng tăng sản sinh L-valin.

Cụ thể, bộ gen ADN của chủng ATCC14067, *Corynebacterium glutamicum* kiểu dại, được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit nhỏ tách chiết tổng số ADN G-spin (Intron, Cat. No. 17045) theo chỉ lệnh của bộ kit. PCR được thực hiện sử dụng bộ gen ADN làm mạch khuôn. Để tạo ra vector để đưa đột biến A42V vào gen *ilvN*, các đoạn gen (A và B) thu được sử dụng tương ứng cặp mồi của đoạn mồi 5 (mã nhận biết SEQ ID NO: 25) và đoạn mồi 6 (mã nhận biết SEQ ID NO: 26) và cặp mồi của đoạn mồi 7 (mã nhận biết SEQ ID NO: 27) và đoạn mồi 8 (mã nhận biết SEQ ID NO: 28). Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Các đoạn mồi được sử dụng như thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO
Đoạn mồi 5	AATTTCTAGAGGCAGACCCTATTCTATGAAGG	25
Đoạn mồi 6	AGTGTTTCGGTCTTTACAGACACGAGGGAC	26
Đoạn mồi 7	GTCCCTCGTGTCTGTAAAGACCGAAACACT	27
Đoạn mồi 8	AATTTCTAGACGTGGGAGTGTCACTCGCTTGG	28

Kết quả là, các polynucleotit 537 bp có thể thu được cả các đoạn A và B. PCR trùng lặp sử dụng hai đoạn làm mạch khuôn cùng với đoạn mồi 5 (mã nhận biết SEQ ID NO: 25) và đoạn mồi 8 (mã nhận biết SEQ ID NO: 28) được thực hiện để thu sản phẩm PCR khoảng 1044 (sau đây được gọi là “đoạn được đưa vào đột biến”).

Các đoạn gây đột biến thu được được xử lý với enzyme giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được liên kết sử dụng vector pDZ được xử lý với cùng enzyme giới hạn và ligaza T4 (New England Biolabs, Beverly, MA). Gen đã điều chế được biến nạp thành *E coli* DH5 α , sau đó được chọn từ môi trường LB chứa kanamycin, và ADN thu được sử dụng bộ kit tách chiết plasmid ADN ADN-spin (iNtRON). Vector nhằm mục đích đưa A42V vào gen *ilvN* được gọi là pDZ-*ilvN*(A42V).

Do đó, plasmid tái tổ hợp pDZ-*ilvN*(A42V) được tạo ra ở trên được biến nạp thành *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại bằng cách tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Chúng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp các trình tự đồng nhất được chọn từ môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, chủng biến nạp *Corynebacterium glutamicum* để hoàn thành việc tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện PCR sử dụng đoạn mồi 5 và đoạn mồi 8 để đạt được sự khuếch đại đoạn gen, và sau đó chủng được đưa vào đột biến được xác định bằng giải trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V.

Ví dụ 3-2-2: Đánh giá khả năng sản sinh valin

pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 được biến nạp thành *Corynebacterium glutamicum* CJ7V có khả năng sản sinh L-valin được điều chế trong ví dụ 3-2-1 bằng phương pháp giống với ví dụ 3-1 để điều chế chủng có đột biến trong vùng gen khởi động của gen *ilvC*, được gọi là CJ7V-*ilvC*(Pm3) (Fig.3). Để so sánh khả năng sản sinh L-valin giữa các chủng được điều chế, các chủng được nuôi cấy và nồng độ của L-valin được phân tích

bằng phương pháp giống với ví dụ 3-1, và các nồng độ L-valin đã phân tích được lập bảng trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Khả năng sản sinh L-valin của CJ7V và CJ7V-*ilvC*(Pm3)

	Chủng	L-Valin (g/L)			
		Mé 1	Mé 2	Mé 3	Trung bình
Đối chứng	CJ7V	3,4	3,5	3,5	3,5
Nhóm thử nghiệm	CJ7V- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,8	3,9	3,8	4,0

Như được thể hiện trong các kết quả trên, khả năng sản sinh L-valin của chủng CJ7V-*ilvC*(Pm3) được tăng lên 14% so với khả năng sản sinh L-valin của chủng đối chứng. Tức là, xác định lại rằng khả năng sản sinh L-valin có thể được cải thiện bằng đột biến của vùng gen khởi động của gen *ilvC*.

Ví dụ 3-3: Điều chế các chủng với việc đưa đột biến vào *Corynebacterium glutamicum* CJ8V và đánh giá khả năng sản sinh L-valin

Ví dụ 3-3-1: Điều chế chủng sản sinh valin CJ8V

Để kiểm tra xem liệu hiệu quả tương tự ở trên có đạt được ở các chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-valin khác hay không, loại đột biến (*ilvN*(A42V)) được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 kiểu dại để điều chế các chủng có khả năng sản sinh L-valin bằng phương pháp giống với ví dụ 3-2, và chủng tái tổ hợp được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CJ8V.

Ví dụ 3-3-2: Đánh giá khả năng sản sinh valin

Các chủng trong đó đột biến vùng gen khởi động *ilvC* được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* CJ8V có khả năng sản sinh L-valin được điều chế trong ví dụ 3-3-1 được điều chế. Mỗi chủng của vector tái tổ hợp pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 và pDZ-*ilvC*(Pm3)-13869 được điều chế trong ví dụ 3-1-1 được biến nạp thành CJ8V (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Chủng trong đó vector được chèn vào nhiễm sắc thể bằng sự tái tổ hợp của các trình tự đồng nhất được chọn trên môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, chủng biến nạp *Corynebacterium glutamicum* để hoàn thành việc tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện PCR sử dụng đoạn mồi 1 và đoạn mồi 4 để tạo ra các chủng CJ8V-*ilvC*(Pm3) và CJ8V-

ilvC(Pm3)-2, trong đó sự đột biến được đưa vào vùng gen khởi động *ilvC* trên nhiễm sắc thể (Fig.4). Đối với các chủng tái tổ hợp, CJ8V-*ilvC*(Pm3)-2 được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CA08-2034, được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế, Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21/08/2019, với số lưu chủng KCCM12575P.

Để so sánh khả năng sản sinh L-valin của các chủng đã điều chế, các chủng được nuôi cấy và nồng độ của L-valin được phân tích bằng phương pháp giống với ví dụ 3-1, và các nồng độ của L-valin đã phân tích được lập bảng trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Khả năng sản sinh L-valin của CJ8V, CJ8V-*ilvC*(Pm3), và CJ8V-*ilvC*(Pm3)-2

	Chủng	L-Valin (g/L)			
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Trung bình
Đối chứng	CJ8V	3,5	3,4	3,4	3,5
Nhóm thử nghiệm	CJ8V- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,9	3,9	3,8	3,8
Nhóm thử nghiệm	CJ8V- <i>ilvC</i> (Pm3)-2	3,8	3,8	3,8	3,8

Như được thể hiện trong các kết quả ở trên, khả năng sản sinh L-valin của từng chủng CJ8V-*ilvC*(Pm3) và CJ8V-*ilvC*(Pm3)-2 được tăng lên 8,6% so với khả năng sản sinh L-valin của chủng đối chứng. Tức là, xác định lại rằng khả năng sản sinh L-valin có thể được cải thiện thông qua sự đột biến của vùng gen khởi động của gen *ilvC*.

Ví dụ 4: Điều chế các chủng sản sinh isoleuxin và đánh giá khả năng sản sinh isoleuxin

Ví dụ 4-1: Điều chế các chủng với đột biến vùng gen khởi động *ilvC* được đưa vào chủng KCCM11248P *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-isoleuxin

Các chủng trong đó các plasmit tái tổ hợp pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 và pDZ-*ilvC*(Pm3)-13869 được tạo ra trong ví dụ 3-1 được đưa vào chủng sản sinh L-isoleuxin, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11248P (patent Hàn Quốc số 10-1335789), bằng tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể, bởi phương pháp giống với ví dụ 3, và các chủng này tương ứng được gọi là KCCM11248P::*ilvC*(Pm3) và KCCM11248P::*ilvC*(Pm3)-2 (Fig.5). Các chủng được điều chế được nuôi cấy bằng phương pháp dưới đây, và sau đó khả năng sản sinh isoleuxin được so sánh.

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

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, ure 1,5 g, KH_2PO_4 4g, K_2HPO_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 (độ pH 7,0)

glucoza 50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12,5 g, protein đậu nành 2,5 g, dịch chiết ngô 5 g, ure 3 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin hydroclorua 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 3000 μg , CaCO_3 30 g (trong 1 L nước cất)

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, đo được khả năng sản sinh L-isoleuxin. Các nồng độ của L-isoleuxin trong môi trường nuôi cấy cho từng chủng đã thử nghiệm được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

	Chủng	L-Isoleuxin (g/L)			
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Trung bình
Đối chứng	KCCM11248P	1,3	1,5	1,2	1,33
Nhóm thử nghiệm	KCCM11248P- <i>ilvC</i> (Pm3)	1,8	1,5	2,0	1,76
Nhóm thử nghiệm	KCCM11248P- <i>ilvC</i> (Pm3)-2	1,7	1,6	1,8	1,70

Như được thể hiện trong bảng 7 ở trên, các nồng độ của L-isoleuxin được sản sinh bởi KCCM11248P::*ilvC*(Pm3) và KCCM11248::*ilvC*(Pm3)-2, trong đó sự đột biến tăng cường của vùng gen khởi động *ilvC* được đưa vào, tăng lên tương ứng khoảng 32,3% và 27,8% so với nồng độ của chủng sản sinh L-isoleuxin KCCM11248P. Do đó, xác định rằng khả năng sản sinh L-isoleuxin được cải thiện bằng đột biến vùng gen khởi động của gen *ilvC*. Các kết quả ở trên thể hiện rằng việc đưa đột biến vùng gen khởi động *ilvC* vào các chủng sản sinh L-isoleuxin thuộc chi *Corynebacterium* có hiệu quả trong việc sản sinh L-isoleuxin.

Ví dụ 4-2: Điều chế chủng sản sinh L-isoleuxin với đột biến vùng gen khởi động *ilvC* được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại và đánh giá khả năng sản sinh L-isoleuxin

Để kiểm tra hiệu quả của việc đưa vào đột biến vùng gen khởi động *ilvC* đối với khả năng sản sinh L-isoleuxin, các chủng được điều chế bằng cách đưa biến thể *lysC*(L377K) (KR 10-2019-0003019 A) và biến thể *hom*(G378E) (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 612–620 (1996)) vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (sau đây được gọi là WT), và đột biến *ilvA*(V383A) (*World J Microbiol Biotechnol* (2015) 31:1369–1377) được đưa vào gen mã hóa dehydrataza L-threonin đã biết, và so sánh khả năng sản sinh L-isoleuxin. Các đoạn môi được sử dụng như thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8

Đoạn môi	Trình tự nucleotit (5'–3')	SEQ ID NO
9	TCCTCTAGAGCTGCGCAGTGTGAATACG	29
10	TGGAAATCTTTTCGATGTTACGTTGACAT	30
11	ACATCGAAAAGATTTCACCTCTGAGATTC	31
12	GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATTA	32

Ví dụ 4-2-1: Đưa vào đột biến L377K

PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn cùng với cặp môi 9 và 10 hoặc cặp môi 11 và 12. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng đoạn ADN 509 bp của vùng phía trước 5' của đột biến của gen *lysC* và đoạn ADN 520 bp của vùng phía sau 3'.

PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN khuếch đại làm mạch khuôn cùng với cặp môi 9 và 12. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 1011 bp bao gồm đột biến của gen *lysC* mã hóa biến thể aspartokinaza trong đó leuxin thứ 377 đã thay thế với lysin được khuếch đại.

Vectơ pDZ mà không thể được sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, và

đoạn ADN 1011 bp được xử lý với enzym giới hạn XbaI và liên kết sử dụng ligaza ADN, và sau đó nhân bản để thu được plasmit, được gọi là pDZ-*lysC*(L377K).

Vector pDZ-*lysC*(L377K) thu được ở trên được đưa vào chủng WT bằng phương pháp xung điện (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999), 52:541–545), và sau đó biến nạp các chủng thu được từ môi trường chứa 25 mg/L kanamycin đã chọn. Chủng thu được trong đó sự đột biến nucleotit được đưa vào gen *lysC* bằng đoạn ADN được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp lần thứ hai (trao đổi chéo).

Ví dụ 4-2-2: Đưa vào đột biến G378E

Để tạo ra vector để đưa vào đột biến *hom*(G378E), PCR được thực hiện sử dụng bộ gen ADN WT làm mạch khuôn cùng với cặp mồi 13 và 14 và cặp mồi 15 và 16. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng đoạn ADN 220 bp của vùng phía trước 5' của đột biến gen *hom* và đoạn ADN 220 bp của vùng phía sau 3'. PCR được thực hiện sử dụng hai sản phẩm PCR làm mạch khuôn cùng với cặp mồi 13 và 16. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 440 bp bao gồm đột biến gen *hom* được khuếch đại. Các đoạn mồi được sử dụng như thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit (5'–3')	SEQ ID NO
13	TCCTCTAGACTGGTCGCCTGATGTTCTAC	33
14	GCCAAAACCTCCACGCGATC	34
15	ATCGCGTGGAGGTTTTGGCT	35
16	GACTCTAGATTAGTCCCTTTCGAGGCGGA	36

Vector pDZ và đoạn ADN 440 bp đã sử dụng trước đó được xử lý với enzym giới hạn XbaI, liên kết sử dụng ligaza ADN, và sau đó nhân bản để thu được plasmit, được gọi là pDZ-*hom*(G378E).

Vector pDZ-*hom*(G378E) thu được được đưa vào chủng WT::*lysC*(L377K) được

điều chế trong ví dụ 4-2-1 bằng phương pháp xung điện, và sau đó các chủng đã biến nạp thu được từ môi trường chứa 25 mg/L kanamycin đã chọn. WT::*lysC*(L377K)-*hom*(G378E), chủng thu được trong đó đột biến nucleotit được đưa vào gen *hom* bởi đoạn ADN được chèn trong nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp lần thứ hai (trao đổi chéo).

Ví dụ 4-2-3: Đưa vào đột biến vùng gen khởi động *ilvC*

Bằng các phương pháp giống với phương pháp của các ví dụ ở trên, các chủng trong đó các plasmit tái tổ hợp pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 và pDZ-*ilvC*(Pm3)-13032 được điều chế trong ví dụ 3-1 được đưa vào chủng WT::*lysC*(L377K)-*hom*(G378E) được điều chế trong ví dụ 4-2-2 bằng cách tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể, và các chủng này tương ứng được gọi là WT::*lysC*(L377K)-*hom*(G378E)-*ilvC*(Pm3) và WT::*lysC*(L377K)-*hom*(G378E)-*ilvC*(Pm3)-3.

Ví dụ 4-2-4: Đưa vào đột biến *ilvA*

Để tạo ra vector trong đó sự đột biến *livA*(V383A) (*World J Microbiol Biotechnol* (2015) 31:1369–1377) đã biết được đưa vào gen *ilvA*, sắp xếp cặp mồi (cặp mồi 17 và 18) để khuếch đại vùng phía trước 5' của vị trí đột biến và cặp mồi (cặp mồi 19 và 20) để khuếch đại vùng phía sau 3'. Vị trí enzyme BamHI (gạch chân) được chèn vào một đầu của mỗi cặp mồi 17 và 20, và sự đột biến thay thế nucleotit (gạch chân) nằm ở vị trí được sắp xếp chéo nhau trong cặp mồi 18 và 19. Các cặp mồi đã sử dụng được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit (5'–3')	SEQ ID NO
17	ACGGATCCCAGACTCCAAAGCAAAAGCG	37
18	GCGCTTGAGGTACTCtgcCAGCGTGATGTC	38
19	GACATCACGCTGgcaGAGTACCTCAAGCGC	39
20	ACGGATCCAACCAAACTTGCTCACACTC	40

PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể WT làm mạch khuôn cùng với cặp mồi 17 và 19 và cặp mồi 19 và 20. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được tương ứng đoạn ADN 627 bp của

vùng phía trước 5' của sự đột biến gen *ilvA* và đoạn ADN 608 bp của vùng phía sau 3'. PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN khuếch đại làm mạch khuôn cùng với cặp mồi 17 và 20. Các điều kiện PCR là: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 1217 bp bao gồm sự đột biến gen *ilvA* mã hóa biến thể IlvA trong đó valin thứ 383 đã thay thế bằng alanin được khuếch đại.

Vectơ pECCG117 (patent Hàn Quốc số 10-0057684) và đoạn ADN 1011 bp được xử lý với enzym giới hạn BamHI, liên kết sử dụng ADN ligaza, và sau đó nhân bản để thu được plasmit, được gọi là pECCG117-*ilvA*(V383A).

Các chủng trong đó vectơ pECCG117-*ilvA*(V383A) được đưa vào tương ứng ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3) và ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3)-3 được điều chế, và các chủng này được gọi tương ứng là ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3)/pECCG117-*ilvA*(V383A) và ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3)-3/pECCG117-*ilvA*(V383A) (Fig.6). Hơn nữa, chủng trong đó chỉ đột biến *ilvA*(V383A) đã đưa vào ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K) cũng được điều chế làm đối chứng.

Ví dụ 4-2-5: Đánh giá khả năng sản sinh isoleuxin

Các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp giống với ví dụ 4-1, và nồng độ của L-isoleuxin trong khi nuôi cấy được phân tích.

Bảng 11

	Chủng	L-Isoleuxin (g/L)			
		Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
Đối chứng	ATCC13032:: <i>hom</i> (G378E)- <i>lysC</i> (L377K)/pECCG117- <i>ilvA</i> (V383A)	4,1	4,3	4,3	4,23
Nhóm thử nghiệm	ATCC13032:: <i>hom</i> (G378E)- <i>lysC</i> (L377K)- <i>ilvC</i> (Pm3)/pECCG117- <i>ilvA</i> (V383A)	5,2	5,1	5,6	5,30
Nhóm thử nghiệm	ATCC13032:: <i>hom</i> (G378E)- <i>lysC</i> (L377K)- <i>ilvC</i> (Pm3)-3/pECCG117- <i>ilvA</i> (V383A)	5,1	5,3	5,4	5,26

Như được thể hiện trong bảng 11, các nồng độ của L-isoleuxin trong từng chủng ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3)/pECCG117-*ilvA*(V383A) và

ATCC13032::*hom*(G378E)-*lysC*(L377K)-*ilvC*(Pm3)-3/pECCG117-*ilvA*(V383A) bao gồm sự đột biến *ilvC* được tăng lên tương ứng khoảng 25% và 24% so với nồng độ của chủng L-isoleuxin ATCC13032::*-hom*(G378E)-*lysC*(L377K)/pECCG117-*ilvA*(V383A) kiểu dại. Các kết quả ở trên thể hiện rằng việc đưa đột biến vùng gen khởi động *ilvC* vào các chủng sản sinh L-isoleuxin thuộc chi *Corynebacterium* có hiệu quả trong sản xuất L-isoleuxin.

Ví dụ 5: Điều chế các chủng sản sinh leuxin và kiểm tra khả năng sản sinh

Ví dụ 5-1: Điều chế chủng với sự đột biến vùng gen khởi động *ilvC* được đưa vào các chủng sản sinh L-isoleuxin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11661P và KCCM11662P và đánh giá khả năng sản sinh leuxin

Plasmid tái tổ hợp pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 đã tạo ra trong ví dụ 3-1 được biến nạp thành *Corynebacterium glutamicum* KCCM11661P (US 10351859 B2) và KCCM11662P (US 10351859 B2), là các chủng sản sinh L-leuxin, bằng tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Chủng trong đó vectơ được chèn vào nhiễm sắc thể bởi sự tái tổ hợp của các trình tự đồng nhất được chọn từ môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Do đó, chủng biến nạp *Corynebacterium glutamicum* để hoàn thành việc tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện PCR sử dụng đoạn mồi 1 và đoạn mồi 4 để tạo ra các chủng trong đó sự đột biến được đưa vào vùng gen khởi động *ilvC* trên nhiễm sắc thể. Các chủng tái tổ hợp được gọi tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11661P-*ilvC*(Pm3) và KCCM11662P-*ilvC*(Pm3) (Fig.7). Để so sánh khả năng sản sinh leuxin giữa các chủng sản sinh leuxin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11661P-*ilvC*(Pm3) và KCCM11662P-*ilvC*(Pm3), việc đánh giá độ chuẩn lên men được thực hiện. Mỗi chủng được nuôi cấy truyền thể hệ trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó được cấy chuyển vào trong 250 ml bình tam giác chứa 25 mL môi trường sản xuất, và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Do đó, nồng độ của L-leuxin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ của L-valin đã phân tích được lập bảng trong bảng 12 dưới đây.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

glucoza 10 g, nước thịt 5 g, polypepton 10 g, natri clorua 2,5 g, dịch chiết nấm men 5 g, aga 20 g, và ure 2 g (trong 1 L nước cất).

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

glucoza 50 g, amoni sunfat 20 g, dịch chiết ngô 20 g, kali phosphat đibazơ 1 g, magie sulfat heptahydrat 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin-HCl 1 mg, canxi cacbonat 15 g (trong 1 L nước cất)

Bảng 12

Khả năng sản sinh L-leuxin của KCCM11661P, KCCM11661P-*ilvC*(Pm3), KCCM11662P, và KCCM11662P-*ilvC*(Pm3)

	Chủng	L-Leuxin (g/L)			
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Trung bình
Đối chứng	KCCM11661P	2,8	2,6	2,7	2,7
Nhóm thử nghiệm	KCCM11661P- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,1	2,9	2,9	3,0
Đối chứng	KCCM11662P	3,0	3,1	2,9	3,0
Nhóm thử nghiệm	KCCM11662P- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,3	3,3	3,2	3,3

Như được thể hiện trong các kết quả ở trên, các khả năng sản sinh L-leuxin của các chủng KCCM11661P-*ilvC*(Pm3) và KCCM11662P-*ilvC*(Pm3) được tăng lên 11% và 10% so với khả năng sản sinh L-leuxin của chủng đối chứng. Do đó, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-leuxin có thể được cải thiện thông qua đột biến vùng gen khởi động của gen *ilvC*.

Ví dụ 5-2: Điều chế chủng với sự đột biến được đưa vào chủng sản sinh leuxin *Corynebacterium glutamicum* CJL8001 và đánh giá khả năng sản sinh L-leuxin

Để kiểm tra xem liệu hiệu quả tương tự ở trên có đạt được ở các chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-leuxin khác hay không, loại đột biến (*leuA*(R558H, G561D); US 2020-0032305 A1) được đưa vào chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại để điều chế các chủng có khả năng sản sinh L-leuxin được cải thiện.

Cụ thể, plasmit tái tổ hợp pDZ-*leuA*(R558H, G561D) đã tạo ra ở trên được biến nạp thành chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu dại bằng cách tái tổ hợp đồng nhất trên nhiễm sắc thể (van der Rest *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541–545, 1999). Do đó, chủng biến nạp *Corynebacterium glutamicum* để hoàn thành việc tái tổ hợp lần thứ hai được thực hiện giải trình tự gen để xác định chủng được đưa vào sự đột biến. Chủng tái tổ hợp được gọi là *Corynebacterium glutamicum*

CJL8001.

Cuối cùng, các vectơ pDZ-*ilvC*(Pm3)-14067 và pDZ-*ilvC*(Pm3)-13032 được biến nạp thành *Corynebacterium glutamicum* CJL8001 có khả năng sản sinh L-leuxin bằng phương pháp giống với ví dụ 5-1 để điều chế CJL8001-*ilvC*(Pm3) và CJL8001-*ilvC*(Pm3)-3, các chủng trong đó các đột biến được đưa vào gen *ilvC* (Fig.8), trong đó CJL8001-*ilvC*(Pm3)-3 được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CA13-8101, được nộp lưu chủng ở cơ quan lưu chủng quốc tế, Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21/08/2019, với số lưu chủng KCCM12576P.

Để so sánh khả năng sản sinh L-leuxin giữa các chủng được điều chế, các chủng được nuôi cấy và nồng độ của L-valin được phân tích bằng phương pháp giống với ví dụ 5-1, và các nồng độ của L-leuxin đã phân tích được lập bảng trong bảng 13 dưới đây.

Bảng 13

Khả năng sản sinh L-leuxin của CJL8001, CJL8001-*ilvC*(Pm3), và CJL8001-*ilvC*(Pm3)-3

	Chủng	L-Leuxin (g/L)			
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3	Trung bình
Đối chứng	CJL8001	3,4	3,3	3,5	3,4
Nhóm thử nghiệm	CJL8001- <i>ilvC</i> (Pm3)	3,8	3,9	4,0	3,9
Nhóm thử nghiệm	CJL8001- <i>ilvC</i> (Pm3)-3	3,9	3,9	3,9	3,9

Như được thể hiện trong các kết quả ở trên, khả năng sản sinh L-leuxin của từng chủng CJL8001-*ilvC*(Pm3) và CJL8001-*ilvC*(Pm3)-3 được tăng lên 15% so với khả năng sản sinh L-leuxin của chủng đối chứng. Tức là, đã xác định lại rằng khả năng sản sinh L-leuxin có thể được cải thiện thông qua đột biến vùng gen khởi động của gen *ilvC* trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium glutamicum*.

Từ phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không vượt quá nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả ở trên cần được hiểu là chỉ làm ví dụ và không giới hạn sáng chế. Phạm vi bảo hộ của sáng chế nên được hiểu sao cho tất cả những thay

đổi hoặc sửa đổi có nguồn gốc từ các định nghĩa và phạm vi bảo hộ của các yêu cầu bảo hộ và các nội dung tương đương đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bởi công thức chung 1 dưới đây:

[công thức chung 1]

X-Y-Z

trong đó,

X là CN_1GN_2 ,

Y là $CTAATTN_3$, và

Z là CATGTGTGTGGTATAAT,

trong đó mỗi N_1 , N_2 , và N_3 là bất kỳ một trong số được chọn từ adenin (A), thymine (T), guanin (G), hoặc xytosin (C).

2. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó N_1 của X là xytosin (C) hoặc guanin (G).

3. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó N_2 của X là adenin (A) hoặc thymine (T).

4. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó N_3 của Y là adenin (A) hoặc guanin (G).

5. Polynucleotit theo điểm 3, trong đó X có một trong số các mã nhận biết SEQ ID NO: 8 đến SEQ ID NO: 11, và Y là SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7.

6. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit có một trong số trình tự polynucleotit được chọn từ các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 đến SEQ ID NO: 20.

7. Vùng gen khởi động bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6.

8. Vectơ bao gồm vùng gen khởi động theo điểm 7 và gen mã hóa protein đích.

9. Vectơ theo điểm 8, trong đó protein đích là axit axetohydroxy isomeroreductaza.

10. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6.

11. Vi sinh vật theo điểm 10, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

12. Phương pháp sản xuất chất đích, trong đó phương pháp bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 10 trong môi trường

nuôi cấy; và

thu hồi chất đích trong môi trường nuôi cấy.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó chất đích là axit amin.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó axit amin là L-axit amin chuỗi nhánh.

15. Phương pháp tăng cường sự biểu hiện của gen đích, trong đó phương pháp bao gồm bước liên kết chức năng vùng gen khởi động bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6 với gen đích.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ CheilJedang Corporation	
<120>	POLYNUCLEOTIT, VÙNG GEN KHỎI ĐỘNG VÀ VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM, VECTO, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT ĐÍCH, VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH	
<130>	OPA20073-PCT	
<150>	KR 10-2019-0108263	
<151>	2019-09-02	
<160>	40	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	chưa biết	
<220>		
<223>	Corynebacterium glutamicum	
<400>	1 ccgtcttaatt gcatgtgtgt ggtagaac	28
<210>	2	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức chung vùng gen khởi động Z	
<400>	2 catgtgtgtg gtanaan	17
<210>	3	
<211>	7	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức chung vùng gen khởi động Y	
<400>	3 ctaatttn	7
<210>	4	
<211>	4	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức chung vùng gen khởi động X	

<400>	4	
cngn		4
<210>	5	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức vùng gen khởi động Z	
<400>	5	
catgtgtgtg gtagaac		17
<210>	6	
<211>	7	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức vùng gen khởi động Y	
<400>	6	
ctaattg		7
<210>	7	
<211>	7	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức vùng gen khởi động Y	
<400>	7	
ctaatta		7
<210>	8	
<211>	4	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức vùng gen khởi động X	
<400>	8	
ccgt		4
<210>	9	
<211>	4	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	công thức vùng gen khởi động X	

<400> cgga	9	4
<210> <211> <212> <213>	10 4 ADN Trình tự nhân tạo	
<220> <223>	 công thức vùng gen khởi động X	
<400> cggt	10	4
<210> <211> <212> <213>	11 4 ADN Trình tự nhân tạo	
<220> <223>	 công thức vùng gen khởi động X	
<400> ccga	11	4
<210> <211> <212> <213>	12 17 ADN Trình tự nhân tạo	
<220> <223>	 công thức vùng gen khởi động Z	
<400> catgtgtgtg gtataat	12	17
<210> <211> <212> <213>	13 28 ADN Trình tự nhân tạo	
<220> <223>	 vùng gen khởi động	
<400> ccgtctaatt gcatgtgtgt ggtataat	13	28
<210> <211> <212> <213>	14 28 ADN Trình tự nhân tạo	
<220>		

<223> vùng gen khởi động

<400> 14
ccgtctaatt acatgtgtgt ggtataat 28

<210> 15
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng gen khởi động

<400> 15
cggactaatt gcatgtgtgt ggtataat 28

<210> 16
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng gen khởi động

<400> 16
cggactaatt acatgtgtgt ggtataat 28

<210> 17
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng gen khởi động

<400> 17
ccgactaatt gcatgtgtgt ggtataat 28

<210> 18
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng gen khởi động

<400> 18
ccgactaatt acatgtgtgt ggtataat 28

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng gen khởi động

<400> 19

cgggtctaatt gcatgtgtgt ggtataat

28

<210> 20

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng gen khởi động

<400> 20

cgggtctaatt acatgtgtgt ggtataat

28

<210> 21

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 21

ctattctaga gtgatgaatc tgcagcagaa gatc

34

<210> 22

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 22

gacaactaca ttattattat accacacaca tgca

34

<210> 23

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 23

tgcgtgtgtg tgggtataata ataatgtagt tgtc

34

<210> 24

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 ctatttctaga gaagaggtcg gtgacggtct cagc 34

<210> 25
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 aatttctaga ggcagaccct attctatgaa gg 32

<210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 agtgttttcgg tctttacaga cacgagggac 30

<210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 27
 gtccctcgtg tctgtaaaga ccgaaacact 30

<210> 28
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 28
 aatttctaga cgtgggagtg tcactcgctt gg 32

<210> 29
 <211> 29
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 29

tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg

29

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 30

tggaaatctt ttcgatgttc acgttgacat

30

<210> 31

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 31

acatcgaaa gatttccacc tctgagattc

30

<210> 32

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 32

gactctagag ttcacctcag agacgatta

29

<210> 33

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 33

tcctctagac tggtcgcctg atgttctac

29

<210> 34

<211> 20

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 34
 gccaaaacct ccacgcatc 20

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 35
 atcgcggtgga ggttttggtc 20

<210> 36
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 36
 gactctagat tagtcccttt cgaggcgga 29

<210> 37
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 37
 acgatccca gactccaaag caaaagcg 28

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 38
 gcgcttgagg tactctgcca gcgtgatgtc 30

<210> 39

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 39
gacatcacgc tggcagagta cctcaagcgc 30

<210> 40
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 40
acggatccaa ccaaacttgc tcacactc 28

[FIG. 1]

M4	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
M15	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13032	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13869	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 2]

KCCM11201P-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
KCCM11201P	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 3]

CJ7V-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
CJ7V	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 4]

CJ8V	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13869	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
CJ8V-ilvC_Pm3_-2	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTATAAT
CJ8V-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 5]

KCCM11248P	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13869	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
KCCM11248P__ilvC_Pm3_-2	CGGACTAATTACATGTGTGTGGTATAAT
KCCM11248P__ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 6]

ATCC13032_hom*lysC*	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13032	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13032_hom*lysC*ilvC_Pm3_-3	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTATAAT
ATCC13032_hom*lysC*ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 7]

KCCM11661P-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
KCCM11662P-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
KCCM11661P	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
KCCM11662P	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *

[FIG. 8]

CJL8001	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
ATCC13032	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTAGAAC
CJL8001-ilvC_Pm3_-3	CCGTCTAATTACATGTGTGTGGTATAAT
CJL8001-ilvC_Pm3_	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTATAAT
ATCC14067	CCGTCTAATTGCATGTGTGTGGTAGAAC
	* * * * *