



(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)



1-0050443

(51)^{2021.01} C12P 19/32

(13) B

(21) 1-2022-06299

(22) 02/04/2021

(86) PCT/JP2021/014337 02/04/2021

(87) WO 2021/201282 07/10/2021

(30) PCT/JP2020/015388 03/04/2020 JP

(45) 25/08/2025 449

(43) 27/03/2023 420A

(73) 1. RENSSLAER POLYTECHNIC INSTITUTE (US)

110 8th Street Troy, New York, 121803590, United States of America

2. OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC. (JP)

115, Aza Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto-shi, Tokushima, 7728601, Japan

3. KIRIN BIOMATERIALS CO., LTD. (JP)

10-2, Nakano 4-chome, Nakano-ku, Tokyo, 1640001, Japan

(72) FUKUNAGA Kenta (JP); NISHIBARA Aki (JP); KATO Ryosuke (JP); KURATSU Masahiro (JP); HAYASHI Mikiro (JP); HASHIMOTO Shin-ichi (JP).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA POLYSACARIT ĐƯỢC SULFAT HÓA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA 3'-PHOSPHOADENOSIN 5'-PHOSPHOSULFAT

(21) 1-2022-06299

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra một cách dễ dàng polysacarit được sulfat hóa bằng cách phản ứng hệ thống tạo ra/tái sinh PAPS (3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat) sử dụng hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật hoặc chất được xử lý của nó với vi sinh vật biểu hiện sulfat hóa enzym hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của nó khi trộn nguyên liệu thô không đắt tiền như magie sulfat. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp thực tế để tạo ra PAPS từ các nguyên liệu thô không đắt tiền. Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa và phương pháp tạo ra PAPS, các phương pháp bao gồm bước điều chế chất biến nạp (a) của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, mà bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, và trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (a) là chất thấm, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp (a); và bước tiến hành phản ứng tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (ở đây được đề cập đến như là PAPS) từ các nguyên liệu thô không đắt tiền như glucose và adenin sử dụng vi khuẩn của giống *Corynebacterium* biểu hiện ATP sulfurylaza và APS kinaza (adenylylsulfat kinaza), và phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa sử dụng vi khuẩn của giống *Corynebacterium* và vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ biểu hiện sulfat hóa các enzym khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

PAPS là coenzym mà tồn tại rộng rãi từ các vi sinh vật đến các sinh vật cao hơn và hoạt động như chất cho của nhóm sulfat trong cơ thể. Trong các sinh vật cao hơn, PAPS được yêu cầu để sinh tổng hợp glycosaminoglycans như chondroitin sulfat và heparan sulfat. Được biết rằng các chất chuyển hóa được sulfat hóa trong cơ thể có nhiều chức năng sinh lý khác nhau, và bản thân PAPS được mong muốn được sử dụng như chất phục hồi tóc (Tài liệu sáng chế 1), dạng bào chế bên ngoài với da có tác dụng làm ẩm (Tài liệu sáng chế 2), và tương tự.

Đối với phương pháp tạo ra PAPS, phương pháp sử dụng ATP sulfurylaza được bắt nguồn từ nấm men được tinh sạch, APS kinaza được bắt nguồn từ mốc xanh, và pyrophosphatase được bắt nguồn từ *Escherichia coli*, với việc sử dụng ATP như nguyên liệu thô (Tài liệu sáng chế 1); phương pháp sử dụng ATP sulfurylaza có thể điều nhiệt được bắt nguồn từ vi khuẩn ưa nhiệt, APS kinaza, và pyrophosphatase được bắt nguồn từ nấm men, với việc sử dụng ATP như nguyên liệu thô như trong phương pháp trên (Tài liệu sáng chế 3); phương pháp sử dụng ATP sulfurylaza được bắt nguồn từ vi khuẩn điều nhiệt, APS kinaza, và polyphosphat kinaza được bắt nguồn từ *Pseudomonas aeruginosa*, với việc sử dụng adenosin 5'-monophosphat (ở đây được đề cập đến như là AMP) như nguyên liệu thô (Tài liệu sáng chế 4); và tương tự được biết.

Trong khi đó, phương pháp tạo ra ATP công nghiệp bằng cách sử dụng chủng đột biến của *Corynebacterium ammoniagens*, trong đó màng của các tế bào vi khuẩn được xử lý với xylen hoặc chất hoạt động bề mặt để truyền độ thẩm từ đó, với việc sử dụng các nguyên liệu thô không đắt như glucose và adenin được biết (Tài liệu sáng chế 2).

PAPS là hợp chất không ổn định. Thậm chí trong phương pháp sử dụng enzym thô, PAPS được tạo ra bằng cách điều chế enzym thô của APS kinaza và ATP sulfurylaza được bắt nguồn từ vi khuẩn điều nhiệt mà được biểu hiện tái tổ hợp bởi *Escherichia coli* như vật chủ, được theo bằng cách xử lý nhiệt trước phản ứng, do

đó ngăn chặn hoạt động của enzym nhiễm được bắt nguồn từ *Escherichia coli* (Tài liệu sáng chế 4).

Tài liệu sáng chế 8 bộc lộ rằng PAPS bị phân hủy trong dung dịch enzym thô của *Escherichia coli*. *Escherichia coli* có một số enzym liên quan đến việc suy thoái của PAPS và có thể ức chế sự suy thoái của PAPS bằng việc xóa gen của enzym như vậy.

Heparin, mà là polysacarit được sulfat hóa, là chất chống đông máu chính, và được sử dụng đối với thuyên tắc huyết khối và hội chứng đông máu nội mạch lan tỏa, và để ngăn cản sự đông máu trong suốt quá trình thẩm tách nhân tạo và trong tuần hoàn ngoài cơ thể, và tương tự. Về công nghiệp, phần lớn heparin được chiết và được tinh sạch từ niêm mạc ruột của lợn. Do tai nạn chết người xảy ra trong 2008 do sự nhiễm của heparin có nguồn gốc từ lợn với các tạp chất, nghiên cứu và phát triển heparin được kiểm soát về chất lượng/heparin được kiểm soát tạo ra không có nguồn gốc động vật được tiến hành.

Đối với ví dụ đặc biệt, phương pháp trong đó N-acetylheparosan được tạo ra và được tinh chế lên men (ở đây được đề cập đến như là heparosan), là polysacarit hình mũ của một số các vi sinh vật Gram âm, được N-deacetyl hóa và N-sulfat hóa được tổng hợp hóa học, sau đó là quá trình epime hóa bằng enzym và sulfat hóa để thu được heparin có cùng cấu trúc và hoạt tính đông máu as those được bắt nguồn từ lợn (các tài liệu sáng chế 5 đến 7, và các tài liệu phi sáng chế 3 và 4).

Chondroitin sulfat được biết như polysacarit hữu ích khác được sulfat hóa, và nó được sử dụng như thuốc chữa đau khớp và thuốc nhỏ mắt để bảo vệ lớp bề mặt giác mạc. Chondroitin sulfat được chiết suất và được tinh sạch từ nhiều mô động vật khác nhau được sử dụng, nhưng phương pháp sử dụng enzym sulfat hóa, với việc sử dụng polysacarit hình mũ được bắt nguồn từ *Escherichia coli* như nguyên liệu thô, trong cùng cách thức như heparin được báo cáo gần đây (Các tài liệu phi sáng chế 5 và 6).

Trong phương pháp thực hiện sulfat hóa sử dụng enzym được tinh sạch, với việc sử dụng polysacarit được bắt nguồn từ viên nang của vi sinh vật như nguyên liệu thô, PAPS hoạt động như chất cho của nhóm sulfat trong phản ứng của enzym sulfat hóa và được yêu cầu như coenzym. Trong phương pháp được đề cập ở trên tạo ra polysacarit được sulfat hóa sử dụng polysacarit hình mũ được bắt nguồn từ nang của vi sinh vật như nguyên liệu thô, 3'-phosphoadenosin 5'-phosphat (ở đây, được đề cập đến như PAP) được tạo ra bằng cách chuyển nhóm sulfat của PAPS vào polysacarit chất nền, nhóm sulfat của p-nitrophenyl sulfat được chuyển bằng enzym đến PAP, do đó tạo ra PAPS, và phản ứng sulfat hóa enzym của polysacarit là tốt (Tài liệu sáng chế 6 và tài liệu phi sáng chế 3).

Danh sách tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1
 WO2012/057336
 Tài liệu sáng chế 2
 JP-A-2012-201665
 Tài liệu sáng chế 3
 JP-A-H5-137588
 Tài liệu sáng chế 4
 Đơn Nhật Bản số 4505011
 Tài liệu sáng chế 5
 Đơn Nhật Bản số 5830464
 Tài liệu sáng chế 6
 Đơn Mỹ số 8771995
 Tài liệu sáng chế 7
 WO2018/048973
 Tài liệu sáng chế 8
 WO2020/013346
 Tài liệu phi sáng chế
 Tài liệu phi sáng chế 1
 Glycobiology vol. 21, no. 6, pp. 771-780, 2011
 Tài liệu phi sáng chế 2
 Biosci. Biotechnol. Biochem. 65 (3), 644-650, 2001
 Tài liệu phi sáng chế 3
 Carbohydrate Polymers 122 (2015) 399-407
 Tài liệu phi sáng chế 4
 Advanced Drug Delivery Reviews 97 (2016) 237-249
 Tài liệu phi sáng chế 5
 Metabolic Engineering 27 (2015) 92-100
 Tài liệu phi sáng chế 6
 Biotechnology và Bioengineering 115 (2018) 1561-1570

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các phương pháp thông thường để tạo ra PAPS được mô tả trong tài liệu phi sáng chế 1 và các tài liệu sáng chế 1 và 2 mỗi tài liệu sử dụng các nucleotit tương đối đắt như ATP và AMP như các nguyên liệu thô, và sử dụng enzym hoặc enzym thô mà được xử lý bằng cách nuôi cấy vi khuẩn, được theo bằng cách tách các tế bào vi khuẩn, phá hủy các tế bào vi khuẩn bằng siêu âm hoặc tương tự, và ly tâm. Do đó, không dễ dàng để thực hiện các phương pháp này trên quy mô công nghiệp.

Nói cách khác, như được mô tả trên, để tạo ra PAPS, phương pháp sử dụng enzym được tinh sạch hoặc enzym thô, với việc sử dụng ATP hoặc AMP như nguyên

liệu thô được biết, nhưng ví dụ tạo ra PAPS sử dụng vi sinh vật chưa được biết. Thêm vào đó, như được mô tả trên, PAPS là hợp chất không ổn định, và trong tài liệu trước đó, trong trường hợp mà enzym thô được sử dụng, các bước phức tạp như loại bỏ hoạt động của các enzym nhiễm bằng cách xử lý nóng được thực hiện.

Theo quan điểm trên, khó để dự đoán rằng PAPS có thể được tạo ra bởi phương pháp tương tự việc tạo ra ATP một cách công nghiệp đơn giản bằng cách biểu hiện ATP sulfurylaza và APS kinaza trong vi khuẩn của giống *Corynebacterium* như vật chủ. Đó là bởi vì, trong trường hợp của *Escherichia coli*, giống *Corynebacterium* cũng có một số enzym liên quan đến sự suy thoái của PAPS.

Thêm vào đó, như được mô tả trên, phương pháp thông thường để sulfat hóa polysacarit bằng enzym sử dụng nhiều enzymes sulfat hóa được tinh sạch từ dịch lọc tế bào mà được xử lý bằng cách nuôi cấy vi sinh vật biểu hiện enzym sulfat hóa, sau đó được thu thập, và ly tâm hoặc tương tự. Các phương pháp này không dễ dàng thực hiện trên quy mô công nghiệp. Thêm vào đó, PAPS và p-nitrophenyl sulfat đất được yêu cầu như các nguyên liệu thô.

Theo đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp để tạo ra một cách dễ dàng polysacarit được sulfat hóa bằng cách phản ứng hệ thống tạo ra/tái sinh PAPS sử dụng hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật hoặc chất được xử lý của nó với vi sinh vật biểu hiện enzym sulfat hóa hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của nó khi trộn nguyên liệu thô không đắt tiền như magie sulfat. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp thực tế để tạo ra PAPS từ các nguyên liệu thô không đắt tiền.

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả của sáng chế hoàn thành sáng chế dựa trên các phát hiện sau (1) và (2).

(1) PAPS có thể được tạo ra dễ dàng hơn và không tốn kém, như được so sánh với các phương pháp của tài liệu liên quan, bằng việc nuôi cấy chủng trong đó các hoạt động của ATP sulfurylaza và APS kinaza được tăng cường bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp sử dụng vi khuẩn của giống *Corynebacterium* có khả năng tạo ra ATP như vật chủ, truyền tính thấm màng của nó với các chất hoạt động bề mặt hoặc tương tự, và bổ sung các nguyên liệu thô như glucose và adenin.

(2) Polysacarit được sulfat hóa có thể được tạo ra sử dụng các tế bào vi khuẩn và các nguyên liệu thô không đắt như magie sulfat, mà không cần tinh sạch enzym hoặc bổ sung PAPS, bằng cách sử dụng chủng với ATP sulfurylaza được tăng cường và các hoạt động APS kinaza được mô tả trong (1) như tế bào vi khuẩn vi sinh chịu trách nhiệm đối với phản ứng tạo ra/tái sinh PAPS, truyền tính thấm màng đến vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ mà biểu hiện epimeraza và/hoặc enzym sulfat hóa, và thực hiện phản ứng được trộn.

Nghĩa là, sáng chế là như sau.

1. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm các bước sau (1-1) và (1-2):

(1-1) điều chế chất biến nạp (a) của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp (a); và

(1-2) tiến hành phản ứng tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng.

2. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục 1, phương pháp còn bao gồm các bước sau (2-1) và (2-2):

(2-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b); và

(2-2) tiến hành C5-epime hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

3. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục 1 hoặc 2, bao gồm tiến hành sulfat hóa bởi chất biến nạp bao gồm gen mã hóa sulfotransferaza, mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp.

4. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo 3, phương pháp còn bao gồm các bước sau (3-1) và (3-2):

(3-1) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c); và

(3-2) tiến hành 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

5. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo 3 hoặc 4, phương pháp còn bao gồm các bước sau (3'-1) đến (3'-3):

(3'-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b);

(3'-2) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c); và

(3'-3) tiến hành C5-epime hóa và 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó, và chất biến nạp (c) hoặc

chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

6. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục bất kỳ trong các mục từ 3 đến 5, phương pháp còn bao gồm các bước sau (4-1) và (4-2):

(4-1) điều chế chất biến nạp (d) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 6-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d); và

(4-2) tiến hành 6-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (d) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

7. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục bất kỳ trong các mục từ 3 đến 6, phương pháp còn bao gồm các bước sau (5-1) và (5-2):

(5-1) điều chế chất biến nạp (e) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 3-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e); và

(5-2) tiến hành 3-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (e) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

8. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm tạo ra polysacarit được sulfat hóa bằng cách tích hợp, trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và N-sulfoheparosan, chất biến nạp (a) của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp (a), và

ít nhất được chọn từ:

chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b),

chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c),

chất biến nạp (d) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 6-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d), và

chất biến nạp (e) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 3-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e).

9. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục 7, phương pháp còn bao gồm tạo ra polysacarit được sulfat hóa bằng cách tích hợp, trong dung dịch

phản ứng trong sự xuất hiện của ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và N-sulfoheparosan, chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, và các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng.

10. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo mục bất kỳ trong các mục từ 1 đến 9, mà tạo ra heparin.

11. Phương pháp tạo ra PAPS, phương pháp bao gồm các bước sau (i) và (ii):

(i) điều chế chất biến nạp của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp; và

(ii) tiến hành phản ứng tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp được điều chế trong bước (i) hoặc chất được xử lý của chúng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, polysacarit được sulfat hóa có thể được tạo ra một cách dễ dàng và không tốn kém bằng cách sử dụng hệ thống tạo ra/tái sinh PAPS sử dụng hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật, và vi sinh vật biểu hiện enzym sulfat hóa hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của nó. Thêm vào đó, theo phương pháp tạo ra PAPS của sáng chế, PAPS có thể được tạo ra một cách dễ dàng và không tốn kém bằng cách sử dụng hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật hoặc chất được xử lý của nó. Hơn nữa, bằng cách sử dụng giống *Corynebacterium* trong phương pháp của sáng chế, không cần thiết để cải biến gen trong cách phức tạp để tránh sự suy thoái của PAPS.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ dạng giản đồ của nhóm gen tổng hợp heparosan trên nhiễm sắc thể của chủng *Escherichia coli* K5.

Fig.2 thể hiện sơ đồ dạng giản đồ của enzym liên quan đến việc tạo ra heparosan.

Fig.3 thể hiện sơ đồ dạng giản đồ của con đường sinh tổng hợp heparosan.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong nồng độ của PAPS được chứa trong chất nền của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm phản ứng 2-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong tỷ lệ diện tích của delta-UA, 2S-GlcNS trong phân tích HPLC disaccarit không được bão hòa trong thử nghiệm phản ứng 2-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong nồng độ của PAPS được chứa trong chất nền của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm phản ứng 6-O-sulfat hóa của 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong tỷ lệ diện tích của delta-UA, 2S-GlcN, 6S trong phân tích HPLC disaccarit không được bão hòa trong thử nghiệm phản ứng 6-O-sulfat hóa của 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat.

Fig.8 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong nồng độ của PAPS được chứa trong chất nền của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm phản ứng ở vị trí 6-O và 3-O sulfat hóa của 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện các sự thay đổi phụ thuộc thời gian trong nồng độ của PAPS được chứa trong chất nền của dung dịch phản ứng trong thử nghiệm tạo ra PAPS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chất biến nạp

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế được đặc trưng ở bước 1) cung cấp/tái tạo PAPS được thực hiện bởi phản ứng sử dụng các tế bào vi khuẩn. Trong phương pháp của sáng chế, tốt hơn là, ít nhất một trong các bước của 2) epime hóa C5, 3) 2-O-sulfat hóa, 4) 6-O-sulfat hóa, và 5) 3-O-sulfat hóa cũng được thực hiện bằng phản ứng sử dụng các tế bào vi khuẩn. Ở đây, các chất biến nạp (a) đến (e) được sử dụng trong mỗi phản ứng sẽ được mô tả.

Chất biến nạp (a): cung cấp/tái tạo PAPS

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế, cung cấp/tái tạo PAPS được thực hiện sử dụng chất biến nạp (a) của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp (a).

Các ví dụ của các chủng vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium* gồm *Corynebacterium ammoniagens*, *Corynebacterium acetoaxitophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium crenatum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogens* (*Corynebacterium efficiens*), và *Corynebacterium herculis*.

Các ví dụ của các chủng của giống *Corynebacterium* gồm *Corynebacterium ammoniagens* (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871 và ATCC 6872, *Corynebacterium acetoaxitophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium crenatum* AS1,542, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, và FERM BP-734, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* (*Corynebacterium*

thermoaminogens) AJ12340 (FERM BP-1539), *Corynebacterium herculis* ATCC 13868, *Brevibacterium divaricatum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020, *Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826, ATCC 14067, và AJ12418 (FERM BP-2205), và *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869.

Vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium* cũng gồm vi khuẩn mà được phân loại một cách thông thường thành giống *Brevibacterium* nhưng hiện được tích hợp vào giống *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)). Thêm vào đó, *Corynebacterium stationis* cũng gồm vi khuẩn mà được phân loại một cách thông thường như *Corynebacterium ammoniagens* nhưng hiện được tái phân loại như *Corynebacterium stationis* bằng cách phân tích trình tự nucleotit 16S rRNA hoặc tương tự [Int. J Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879 (2010)].

Các chủng có sẵn từ, ví dụ, the American Type Culture Collection (địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Mỹ). Nghĩa là, số đăng ký được đưa cho mỗi chủng, và các chủng có thể được thu sử dụng số đăng ký (Tham khảo <https://www.atcc.org/>). Số đăng ký tương đương với mỗi chủng được mô tả trong danh mục của tổ chức thu thập chủng vi sinh của Mỹ. Thêm vào đó, các chủng có sẵn từ, ví dụ, kho lưu ký trong đó mỗi chủng được ký gửi. Vi khuẩn của giống *Corynebacterium* có thể là chủng dạng thuần chủng, chủng đột biến của nó, hoặc tái tổ hợp nhân tạo.

Trong sáng chế, gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza được đưa vào vi khuẩn của giống *Corynebacterium* theo cách dễ hiểu.

ATP sulfurylaza tạo ra adenosin 5'-phosphosulfat (APS) từ sulfat bằng công thức phản ứng sau.

Công thức hóa học 1



(Trong công thức trên, ATP đại diện cho adenosin 5'-triphosphat)

Một khía cạnh của ATP sulfurylaza là MET3, nguồn gốc của ATP sulfurylaza không được giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ của nó gồm ATP sulfurylaza được bắt nguồn từ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Kluyveromyces lactis*, *Fusarium fujikuroi*, *Aspergillus oryzae*, hoặc *Ashbya gossypii*, và trong số chúng, ATP sulfurylaza được bắt nguồn từ *Saccharomyces cerevisiae* là tốt hơn.

Các ví dụ của gen mã hóa ATP sulfurylaza gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 22. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính ATP sulfurylaza, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit

được thể hiện trong SEQ ID NO: 22; và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính ATP sulfurylaza, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên. Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến các điều kiện được gọi là các phép lai đặc hiệu được tạo thành và các phép lai không đặc hiệu không được tạo thành. Các ví dụ của nó gồm các điều kiện trong đó các ADN tương tự với nhau ở mức độ cao, ví dụ, các ADN mà tương tự 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 97% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 99% hoặc tương tự nhau nhiều hơn lai với nhau, và các ADN tương tự tương tự nhau ở mức độ thấp không lai với nhau; hoặc các điều kiện, mà là các điều kiện để rửa trong phép lai Southern thông thường, trong đó rửa được thực hiện một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60 độ C, 1 x SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60 độ C, 0,1 x SSC, và 0,1% SDS, và còn tốt hơn là 68 độ C, 0,1 x SSC, và 0,1% SDS.

Hoạt tính ATP sulfurylaza trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách tăng các giá trị hoạt tính ATP sulfurylaza trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính ATP sulfurylaza có thể được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Medina DC et al., Temperature effects on the allosteric transition of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. 1; 393 (1): 51-60 (2001)].

Các giá trị số liên quan đến định danh trong sáng chế có thể là các giá trị số được tính sử dụng chương trình tìm kiếm tương đồng được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật trừ khi có quy định khác. Các ví dụ của các giá trị số cho các trình tự nucleotit gồm các giá trị số được tính sử dụng các tham số mặc định trong BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)], và các ví dụ của các giá trị số đối với các trình tự amino axit gồm các giá trị số được tính sử dụng các tham số mặc định trong BLAST2 [Nucleic acids Res., 25, 3389 (1997), Genome Res., 7, 649 (1997),

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>].

APS kinaza tạo ra PAPS từ APS theo công thức phản ứng sau.

Công thức hóa học 2

APS+ATP $\longrightarrow$ PAPS+ADP

(Trong công thức trên, ADP là adenosin 5'-diphosphat)

Một khía cạnh của APS kinaza gồm MET14, nguồn gốc của APS kinaza không được giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ của nó gồm APS kinaza được bắt nguồn từ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Kluyveromyces lactis*, *Fusarium fujikuroi*, *Aspergillus oryzae*, hoặc *Ashbya gossypii*, và trong số chúng, APS kinaza được bắt nguồn từ *Saccharomyces cerevisiae* là tốt hơn.

Các ví dụ của gen mã hóa APS kinaza gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 23. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính APS kinaza, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 23; và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính APS kinaza, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 23 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên.

Hoạt tính APS kinaza trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách tăng các giá trị hoạt tính trong APS kinaza trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính APS kinaza có thể được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Renosto F. et al., adenosin 5'-phosphosulfat kinase from *Penicillium chrysogenum*. Sự tinh sạch và các đặc tính động học. *J. Biol. Chem.* 259 (4): 2113-2123 (1984)].

Việc đưa gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza vào vi khuẩn của giống *Corynebacterium* có thể được thực hiện bằng cách tích hợp tương ứng ADN được mô tả trên vào nhiễm sắc thể của vật chủ, hoặc bằng cách nhân bản ADN được mô tả trên vào vectơ plasmid thích hợp mà có thể được khuếch đại trong vật chủ và đưa vectơ vào vật chủ.

Vectơ plasmid có thể là bất kỳ vectơ plasmid nào miễn là nó có gen kiểm soát chức năng tự nhân đôi trong vi khuẩn của giống *Corynebacterium*. Các ví dụ đặc hiệu của nó gồm pAM330 được bắt nguồn từ *Brevibacterium lactofermentum* 2256 [JP-A-S58-67699], [Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing vi khuẩn. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2901-2903 (1984)], và [Yamaguchi, R. et al., Determination của complete nucleotide trình tự của *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. *Nucleic acids Symp. Ser.* 16: 265-267 (1985)]; pHM1519 [Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2901-2903 (1984)] và pCRY30 [Kurusu, Y. et al., Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 759-764 (1991)] mà được bắt nguồn từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 3058; pCG4 [JP-A-S57-183799] và [Katsumata, R. et al., Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria với plasmid ADN. *J. Bacteriol.*, 159: 306-311 (1984)], pAG1, pAG3, pAG14, và pAG50 [JP-A-S62-166890], và pEK0, pEC5, và pEKEx1 [Eikmanns, B.J. et al., A family of *Corynebacterium glutamicum*/ *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*, 102: 93-98 (1991))] mà được bắt nguồn từ *Corynebacterium glutamicum* T250, và tương tự.

Promotor có thể là promotor được bắt nguồn từ vật chủ hoặc promotor khác loại. Các ví dụ của nó gồm promotor PgapA của gen A glyceraldehyt 3-phosphat

dehydrogenaza (gapA), promotor Pmdh của gen malat dehydrogenaza (mdh), promotor PldhA của gen lactat dehydrogenaza A (ldhA), và tương tự mà được bắt nguồn từ *Corynebacterium glutamicum* R.

Các ví dụ của tín hiệu kết thúc gồm tín hiệu kết thúc rrnB T1T2 của *Escherichia coli* rRNA operon, tín hiệu kết thúc trpA của *Escherichia coli*, tín hiệu kết thúc trp của *Brevibacterium lactofermentum*, và tương tự.

Như một khía cạnh của sáng chế, sự biểu hiện gen của enzym liên quan đến việc suy thoái của PAPS được làm yếu đi. Các ví dụ của gen của enzym liên quan đến sự suy thoái của PAPS gồm gen cysQ và gen CP01850. Như một khía cạnh của chất biến nạp (a), sự biểu hiện của ít nhất một gen được chọn từ cysQ gen và CP01850 gen được làm yếu đi.

Chất biến nạp (b): Epime hóa C5

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế, epime hóa C5 của N-sulfoheparosan được thực hiện sử dụng chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b).

C5-epimeraza không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có thể xúc tác sự đồng phân hóa của các gốc axit glucuronic (GlcUA) đến các gốc axit iduronic (IdoA). C5-epimeraza có thể là được bắt nguồn từ bất kỳ động vật, thực vật, vi sinh vật, và tương tự. Ví dụ, C5-epimeraza của người có thể được sử dụng như C5-epimeraza.

Các ví dụ của gen mã hóa C5-epimeraza gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 24. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính C5-epimeraza, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính C5-epimeraza, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên.

Hoạt tính C5-epimeraza trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách sự tăng trong các giá trị hoạt tính C5-epimeraza trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính C5-epimeraza có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Babu P. et al., A rapid, nonradioactive assay for measuring heparan sulfate C-5 epimerase activity using hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry. *Methods. Mol. Biol.* 1229: 209-219 (2015)].

Ở đây, chất biến nạp biểu hiện sulfotransferaza sẽ được mô tả. Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, sulfat hóa được thực hiện sử

dụng chất biến nạp bao gồm gen mã hóa sulfotransferaza, mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp. Trong sáng chế, sulfotransferaza không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó chuyển nhóm sulfat đến polysacarit để tạo ra polysacarit được sulfat hóa. Các ví dụ của sulfotransferaza gồm 2-O-sulfotransferaza (2-OST), 6-O-sulfotransferaza (6-OST), và 3-O-sulfotransferaza (3-OST).

Chất biến nạp (c): 2-O-sulfat hóa

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, 2-O-sulfat hóa được thực hiện sử dụng chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza (2-OST) mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c).

2-OST không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có thể xúc tác sulfat hóa của các gốc IdoA ở vị trí O-2, Thêm vào đó, 2-OST có thể là được bắt nguồn từ bất kỳ động vật, thực vật, vi sinh vật, và tương tự. Ví dụ, 2-OST được bắt nguồn từ chuột đồng có thể được sử dụng như 2-OST.

Các ví dụ của gen mã hóa 2-OST gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 19. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 2-OST, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 19; và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 2-OST, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên.

Hoạt tính 2-OST trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách sự tăng trong các giá trị hoạt tính 2-OST trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính 2-OST có thể được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Zhang J. et al., High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* strains expressing 2-O-sulfotransferase and C5-epimerase for the production of bioengineered heparin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175(6): 2986-2995 (2015)].

Chất biến nạp (d): 6-O-sulfat hóa

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, 6-O-sulfat hóa được thực hiện sử dụng chất biến nạp (d) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 6-O-sulfotransferaza (6-OST) mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d).

6-OST không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có thể xúc tác sulfat hóa của các gốc glucosamin được N-sulfat hóa (GlcNS) ở vị trí O-6, 6-OST có thể

là được bắt nguồn từ bất kỳ động vật, thực vật, vi sinh vật, và tương tự. Các ví dụ của 6-OST gồm 6-OST-1 được bắt nguồn từ chuột đồng và 6-OST-3 được bắt nguồn từ chuột.

Các ví dụ của gen mã hóa 6-OST gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 25. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 6-OST, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 25; và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 6-OST, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 25 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên.

Hoạt tính 6-OST trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách sự tăng trong các giá trị hoạt tính 6-OST trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính 6-OST có thể được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Zhang J. et al., High cell density cultivation of a recombinant Escherichia coli strain expressing a 6-O-sulfotransferase for the production of bioengineered heparin. J. Appl. Microbiol. 118(1): 92-98 (2015)].

Chất biến nạp (e): 3-O-sulfat hóa

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, 3-O-sulfat hóa được thực hiện sử dụng chất biến nạp (e) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 3-O-sulfotransferaza (3-OST) mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e).

3-OST không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có thể xúc tác sulfat hóa của các gốc glucosamin được N-sulfat hóa/6-O-sulfat hóa ở vị trí O-3, 3-OST có thể là được bắt nguồn từ bất kỳ động vật, thực vật, vi sinh vật, và tương tự. Ví dụ, 3-OST-1 được bắt nguồn từ chuột có thể được sử dụng như 3-OST.

Các ví dụ của gen mã hóa 3-OST gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26. Các ví dụ của nó còn gồm ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 3-OST, và bao gồm trình tự nucleotit nghĩa là tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26; và ADN mà mã hóa polypeptit có hoạt tính 3-OST, và bao gồm trình tự nucleotit mà lai tạo dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 hoặc trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit trên.

Hoạt tính 3-OST trong chất biến nạp được kiểm tra bằng cách sự tăng trong các giá trị hoạt tính 3-OST trong dịch chiết tế bào của chất biến nạp. Hoạt tính 3-

OST có thể được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu [Jin W. et al., Increased soluble heterologous expression of a rat brain 3-O-sulfotransferase 1 - A key enzyme for heparin biosynthesis. *Protein Expr. Purif.* 151:23-29 (2018)].

Vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ

Vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ được sử dụng như vật chủ của chất biến nạp trong sáng chế không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có thể biểu hiện gen được xác định trước của sáng chế. Các ví dụ của nó gồm vi khuẩn như các vi sinh vật thuộc giống *Escherichia*, giống *Serratia*, giống *Bacillus*, giống *Corynebacterium*, giống *Microbacterium*, và giống *Pseudomonas*, và vi khuẩn của giống *Escherichia* là tốt hơn được sử dụng.

Vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* được sử dụng trong sáng chế không được giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ của nó gồm vi khuẩn được phân loại thành giống *Escherichia* bằng việc phân loại được biết bởi các chuyên gia trong vi sinh vật học. Các ví dụ của vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* gồm vi khuẩn được mô tả trong tài liệu [Backmann, BJ 1996, Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC].

Các ví dụ của vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* gồm *Escherichia coli*. Các ví dụ của *Escherichia coli* gồm các chủng *Escherichia coli* K-12 như chủng W3110 (ATCC 27325) và chủng MG1655 (ATCC 47076); chủng *Escherichia coli* K5 (ATCC 23506); các chủng *Escherichia coli* B như chủng BL21 (DE3); chủng *Escherichia coli* Nissle 1917 (DSM 6601); và các chủng dẫn xuất của chúng.

Các chủng có sẵn từ, ví dụ, the American Type Culture Collection (địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Mỹ). Nghĩa là, số đăng ký được đưa cho mỗi chủng, và các chủng có thể được thu sử dụng số đăng ký (Tham khảo <https://www.atcc.org/>). Số đăng ký tương đương với mỗi chủng được mô tả trong danh mục của tổ chức thu thập chủng vi sinh của Mỹ. Thêm vào đó, chủng BL21 (DE3) là có sẵn từ, ví dụ, Life Technologies (số sản phẩm C6000-03).

Đối với mục đích đưa gen vào theo cách dễ hiểu, có thể sử dụng vectơ mà có thể tự nhân lên trong vật chủ như là vectơ được sử dụng để biến đổi vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ. Vectơ tốt hơn là vectơ đa bản. Thêm vào đó, vectơ tốt hơn là có đánh dấu như gen kháng kháng sinh hoặc gen khác được mô tả trong tài liệu [Karl Friehs, Plasmid Copy Number and Plasmid Stability, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 86: 47-82 (2004)] để chọn chất biến nạp. Hơn nữa, vectơ có thể có promoter hoặc tín hiệu kết thúc để biểu hiện gen được chèn. Các ví dụ của vectơ gồm vectơ được bắt nguồn từ plasmid của vi khuẩn, vectơ được bắt nguồn từ plasmid

của nấm men, vector được bắt nguồn từ thể thực khuẩn, cosmid, phagemid, và tương tự.

Các ví dụ đặc hiệu của vector có khả năng tự nhân lên trong vi khuẩn của giống *Escherichia coli* gồm pUC19, pUC18, pHS299, pHS399, pHS398, pBR322, và pSTV29 (Tất cả từ Takara Bio Inc.), pACYC184 và pMW219 (Nippon gen), pTrc99A (Pharmacia), vector pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), vector pET (Novagen), vector pQE (Qiagen), và vector khoảng vật chủ rộng RSF1010.

Promotor có thể là promotor được bắt nguồn từ vật chủ hoặc promotor khác loại. Promotor có thể là promotor nội tại của gen được đưa vào hoặc promotor của các gen khác.

Các ví dụ của tín hiệu kết thúc gồm tín hiệu kết thúc T7, tín hiệu kết thúc T4, tín hiệu kết thúc pha fd, tín hiệu kết thúc tet, và tín hiệu kết thúc trpA.

Trong các chất biến nạp được đề cập ở trên (b) đến (e), hai hoặc nhiều hơn các gen mà được đưa vào vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có thể được đưa vào thành một chất biến nạp. Cụ thể hơn, ví dụ, gen mã hóa C5-epimeraza và gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza có thể được đưa vào một vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ để tạo thành một chất biến nạp.

Vấn đề được xử lý của chất biến nạp

Vấn đề được xử lý của chất biến nạp trong sáng chế đề cập đến vấn đề trong đó màng tế bào chất của tế bào vi khuẩn là thấm. Trong sáng chế, khi màng sinh chất tế bào được đề cập là chất thấm, có nghĩa là các phân tử nhỏ (các ion và tương tự) và các phân tử lớn (các protein và tương tự) thấm thông qua màng tế bào bằng cách khuếch tán và do đó có thể vào và ra một cách tự do màng tế bào. Chất được xử lý của chất biến nạp trong sáng chế tốt hơn là tế bào vi khuẩn không hoạt động mà mất khả năng phát triển do xử lý để truyền tính thấm màng.

Các ví dụ của chất được xử lý của chất biến nạp gồm chất hoạt động bề mặt-chất được xử lý của tế bào vi khuẩn nghĩa là chất biến nạp, dung môi-chất được xử lý của tế bào vi khuẩn, enzym-chất được xử lý của tế bào vi khuẩn, chất được xử lý chứa các tế bào vi khuẩn sống mà giữ lại cùng chức năng như nuôi cấy tế bào vi khuẩn như nguồn enzym như sản phẩm cố định của tế bào vi khuẩn, chất được xử lý qua siêu âm của các tế bào vi khuẩn, và chất được xử lý cơ học của tế bào vi khuẩn.

Các ví dụ của các phương pháp tạo màng sinh chất tế bào chất thấm gồm xử lý hóa học và xử lý cơ học. Phương pháp tạo ra theo sáng chế, thời điểm mà màng sinh chất tế bào của chất biến nạp mà tạo thành chất thấm không được giới hạn một cách cụ thể miễn là hiệu quả đạt được của sáng chế được thể hiện. Màng tế bào chất của mỗi chất biến nạp có thể được tạo chất thấm trước, hoặc nó có thể là khi phản ứng được tạo thành bằng cách mang các chất biến nạp được sử dụng trong phản ứng tiếp xúc với nhau.

Các ví dụ của xử lý hóa học gồm phương pháp sử dụng chất hoạt động bề mặt, phương pháp sử dụng dung môi hữu cơ, và phương pháp sử dụng enzym. Đối với chất hoạt động bề mặt, chất hoạt động bề mặt không ion là tốt hơn bởi vì hoạt động của nó trên các protein hoặc tương tự là nhẹ hơn (khi được so sánh với các chất hoạt động bề mặt ion). Các ví dụ của chất hoạt động bề mặt gồm digitonin, saponin, Triton X100, Triton X114, Tween 20, Tween 80, N,N-bis(3-D-gluconamidopropyl) cholamit [BIGCHAP], N,N-bis(3-D-gluconamidopropyl) deoxycholamit [Deoxy-BIGCHAP], NIKKOLBL-9EX [Polyoxyetylen (9) LaurylEther], octanoyl-N-metylglucamit [MEGA-8], benzalkonium clorua, và tương tự.

Các ví dụ của dung môi hữu cơ gồm benzen, toruen, xylen, các alcohol khác, và tương tự. Các ví dụ của enzym gồm lysozym, achromopeptidaza, và tương tự.

Các điều kiện như nồng độ, nhiệt độ, thời gian, và tương tự xử lý với các chất được đề cập ở trên khác phụ thuộc vào dạng tế bào, và các điều kiện phù hợp cần được đặt để thực hiện sự phân tích mong muốn, nhưng nồng độ xử lý chung là 10 đến 1000 microgram/ml, và thông thường hơn 20-200 microgram/ml ở nhiệt độ 2 độ C đến 37 độ C và thời gian 1 đến 30 phút.

Các ví dụ của xử lý cơ học gồm xử lý siêu âm và xử lý nghiền cơ học.

Tách chất biến nạp

Các ví dụ của tách chất biến nạp trong sáng chế gồm tách enzym thô được thu từ tế bào vi khuẩn nghĩa là chất biến nạp, enzym được tinh sạch được thu từ tế bào vi khuẩn được xử lý như trên (ví dụ hóa học hoặc cơ học), nồng độ của môi trường nuôi cấy được thu bằng việc nuôi cấy chất biến nạp hoặc chất được xử lý của chúng được mô tả trên, và sản phẩm khô của môi trường nuôi cấy. Các ví dụ của việc tách chất biến nạp cũng gồm các tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm hoặc lọc môi trường nuôi cấy, làm khô các tế bào vi khuẩn, và làm khô lạnh các tế bào vi khuẩn.

Phương pháp biến nạp và phương pháp nuôi cấy chất biến nạp

Các phương pháp biến nạp được biết có thể được sử dụng mà không có sự giới hạn. Các ví dụ của các phương pháp được biết như vậy gồm phương pháp canxi clorua/rubidi clorua, phương pháp canxi phosphat, truyền qua trung gian DEAE-dextran, phương pháp xung điện, và tương tự. trong số chúng, phương pháp xung điện là phù hợp với vi khuẩn coryneform, và phương pháp xung điện có thể được thực hiện bởi phương pháp đã biết [Kurusu, Y. et al., Electroporation-transformation system for Coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric Biol. Chem. 54: 443-447 (1990)].

Tốt hơn là chất biến nạp được phát triển bằng việc nuôi cấy sử dụng môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật trước mỗi phản ứng. Đối với

môi trường, có thể thường được sử dụng môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, các muối vô cơ, và các chất dinh dưỡng khác.

Nguồn cacbon có thể là nguồn ATP. Các ví dụ của nguồn cacbon gồm cacbonhydrat hoặc rượu đường như glucose, fructose, sucrose, mannose, maltose, mannitol, xylose, arabinoza, galactose, tinh bột, molasses, sorbitol, và glycerin; các axit hữu cơ như axetic axit, citric axit, lactic axit, fumaric axit, maleic axit, và gluconic axit; và rượu như ethanol và propanol. Đối với nguồn cacbon, một dạng có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều hơn các dạng của chúng có thể được trộn. Nói chung, đủ để nồng độ của các nguồn cacbon trong môi trường là khoảng 0,1 đến 10 (% khối lượng/thể tích).

Các ví dụ của nguồn nitơ gồm các hợp chất amoni vô cơ hoặc hữu cơ như amoni clorua, amoni sulfat, amoni nitrat, và amoni axetat, urea, amoni lỏng, natri nitrat, kali nitrat, và tương tự. Thêm vào đó, cũng có thể để sử dụng rượu ngô, dịch chiết thịt, pepton, NZ-amin, protein hydrolyzat, nitrogen-chứa các hợp chất hữu cơ như các amino axit, và tương tự. Đối với nguồn nitơ, một dạng có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều hơn các dạng của chúng có thể được trộn và được sử dụng. Nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường thay đổi phụ thuộc vào hợp chất nitơ được sử dụng, nhưng thường khoảng 0,1 đến 10 (% khối lượng/thể tích).

Các ví dụ của muối vô cơ gồm phosphat kali đơn bazơ, phosphat kali hai bazơ, sắt nitrat, natri clorua, canxi cacbonat, và tương tự thêm vào các nguồn ion sulfat như magie sulfat, mangan sulfat, zinc sulfat, và cobalt sulfat. Đối với các muối vô cơ, một dạng có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều hơn các dạng của chúng có thể được trộn và được sử dụng. Nồng độ của các muối vô cơ trong môi trường thay đổi phụ thuộc vào muối vô cơ được sử dụng, nhưng thường khoảng 0,01 đến 1 (% khối lượng/thể tích).

Các ví dụ của chất dinh dưỡng gồm dịch chiết thịt, pepton, polypepton, dịch chiết nấm men, nấm men được làm khô, rượu ngô, sữa bột tách kem, thủy phân hydroclorua đậu nành được khử chất béo, dịch chiết của động vật và thực vật hoặc các tế bào vi khuẩn vi sinh và các sản phẩm được phân hủy của chúng, và tương tự, và nồng độ của chúng nói chung khoảng 0,1 đến 10 (% khối lượng/thể tích). Thêm vào đó, các vitamin có thể được bổ sung nếu cần thiết. Các ví dụ của các vitamin gồm biotin, thiamin (vitamin B1), pyridoxin (vitamin B6), pantothenic axit, inositol, nicotinic axit, và tương tự. pH của môi trường là tốt hơn khoảng 6 đến 8.

Các ví dụ tốt hơn của môi trường nuôi cấy đối với vi sinh vật gồm môi trường A [Inui, M. et al., *Metabolic analysis of Corynebacterium glutamicum during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)], a BT medium [Omumasaba, C.A. et al., *Corynebacterium glutamicum glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase isoforms với opposite, ATP-dependent regulation*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103

(2004)], và tương tự. Đối với các điều kiện nuôi cấy đặc biệt, ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy là khoảng 15 độ C đến 45 độ C, và thời gian nuôi cấy là khoảng 1 đến 7 ngày.

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa

Một khía cạnh của phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế là phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm tạo ra polysacarit được sulfat hóa bằng cách tích hợp, trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và N-sulfoheparosan, chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, và ít nhất được chọn từ các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng.

Đối với một khía cạnh của phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế, các ví dụ của nó gồm phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm tạo ra polysacarit được sulfat hóa bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, và các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng, trong sự xuất hiện của ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và N-sulfoheparosan.

Thêm vào đó, một khía cạnh của phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế là phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm tạo ra polysacarit được sulfat hóa bằng cách tích hợp ít nhất được chọn từ các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của PAPS và N-sulfoheparosan.

Phương pháp tạo ra theo sáng chế, mỗi chất biến nạp có thể được bổ sung thêm vào dung dịch phản ứng, có thể được bổ sung vào đó một cách tuần tự, hoặc có thể được bổ sung vào đó ban đầu và tuần tự. Các ví dụ đặc hiệu về các khía cạnh ban đầu bổ sung mỗi chất biến nạp to dung dịch phản ứng gồm khía cạnh trong đó polysacarit được sulfat hóa được tạo ra bằng cách bổ sung ban đầu chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, và các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng đến dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và N-sulfoheparosan.

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế, sử dụng chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng và các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất đã được xử lý hoặc chiết suất của chúng, có thể thực hiện 1) cung cấp/tái tạo PAPS với chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, 2) epime hóa C5 với chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó, 3) 2-O-sulfat hóa với chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó, 4) 6-O-sulfat hóa với chất biến nạp (d) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó, và 5) 3-O-sulfat hóa với chất biến nạp (e) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó.

Ở đây, mỗi trong các bước sẽ được mô tả riêng biệt, nhưng thứ tự của 2) epime hóa C5, 3) 2-O-sulfat hóa, 4) 6-O-sulfat hóa, và 5) 3-O-sulfat hóa không được

giới hạn một cách cụ thể miễn là polysacarit được sulfat hóa mong muốn có thể được thu.

Thêm vào đó, ở đây, mỗi phản ứng của 1) cung cấp/tái tạo PAPS, 2) epime hóa C5, 3) 2-O-sulfat hóa, 4) 6-O-sulfat hóa, và 5) 3-O-sulfat hóa sẽ được mô tả riêng biệt, nhưng hai hoặc nhiều hơn các phản ứng của chúng có thể được thực hiện ở cùng thời gian. Ví dụ, các phản ứng này có thể được thực hiện ở cùng thời gian sử dụng dung dịch phản ứng chứa tất cả chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng và các chất biến nạp (b) đến (e) hoặc các chất hoặc các chiết suất được xử lý của chúng.

Các ví dụ của polysacarit được sulfat hóa được tạo ra bởi phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế gồm heparin.

Cung cấp/tái tạo PAPS

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế được đặc trưng bởi bao gồm các bước sau (1-1) và (1-2):

(1-1) điều chế chất biến nạp (a) của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp (a); và

(1-2) tiến hành phản ứng tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng.

ATP sulfurylaza và APS kinaza được biểu hiện bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng phản ứng với ATP hoặc nguồn ATP và nguồn ion sulfat trong chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng, và do đó PAPS được tạo ra. PAPS hoạt động như chất cho của nhóm sulfat trong việc tạo ra polysacarit được sulfat hóa. Thêm vào đó, PAPS được tạo ra bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng được sử dụng trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, và do đó PAP được thu. PAPS có thể được tạo ra từ PAP này bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng. Theo đó, PAPS có thể được cung cấp/được tạo ra bằng cách tích hợp chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng trong dung dịch phản ứng.

Epime hóa C5

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước sau (2-1) và (2-2):

(2-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b); và

(2-2) tiến hành C5-epime hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

Trong bước (2-2), epime hóa C5 của N-sulfoheparosan được thực hiện bởi chất biến nạp (b) biểu hiện C5-epimeraza hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó.

2-O-sulfat hóa

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước sau (3-1) và (3-2):

(3-1) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách dễ hiểu, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c); và

(3-2) tiến hành 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

Trong bước (3-2), 2-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan được thực hiện bởi chất biến nạp (c) biểu hiện 2-O-sulfotransferaza hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó sử dụng PAPS được tạo ra bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng như chất cho của nhóm sulfat.

Khi polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước (2-2) tồn tại trong dung dịch phản ứng, 2-O-sulfat hóa của polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước được tiến hành. Ví dụ, khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5 tồn tại, 2-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 được tiến hành.

Epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa được đề cập trên có thể được thực hiện ở cùng thời điểm. Nghĩa là, một khía cạnh của phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước sau (3'-1) đến (3'-3):

(3'-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b);

(3'-2) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c); và

(3'-3) tiến hành C5-epime hóa và 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó, và chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

6-O-sulfat hóa

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước sau (4-1) và (4-2):

(4-1) điều chế chất biến nạp (d) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 6-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d); và

(4-2) tiến hành 6-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (d) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

Trong bước (4-2), 6-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan được thực hiện bởi chất biến nạp (d) biểu hiện 6-O-sulfotransferaza hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó sử dụng PAPS được tạo ra bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng như chất cho của nhóm sulfat.

Khi polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước (2-2), (3-2) hoặc (3'-3) tồn tại trong dung dịch phản ứng, 6-O-sulfat hóa của polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước được tiến hành.

Ví dụ, khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5 tồn tại, 6-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 được tiến hành. Khi N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa tồn tại, 6-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa được tiến hành.

Khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa tồn tại, 6-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa được tiến hành.

3-O-sulfat hóa

Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa của sáng chế tốt hơn là bao gồm các bước sau (5-1) và (5-2):

(5-1) điều chế chất biến nạp (e) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 3-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e); và

(5-2) tiến hành 3-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (e) hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

Trong bước (5-2), 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan được thực hiện bởi chất biến nạp (e) biểu hiện 3-O-sulfotransferaza hoặc chất hoặc chiết suất được xử lý của nó sử dụng PAPS được tạo ra bởi chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng như chất cho của nhóm sulfat.

Khi polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước (2-2), (3-2), (3'-3) hoặc (4-2) tồn tại trong dung dịch phản ứng, 3-O-sulfat hóa của polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong bước được tiến hành.

Ví dụ, khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5 tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 được tiến hành. Khi N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa được tiến hành. Khi N-sulfoheparosan với 6-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với 6-O-sulfat hóa được tiến hành.

Khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa được tiến hành. Khi

N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 6-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5 và 6-O-sulfat hóa được tiến hành. Khi N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa và 6-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với 2-O-sulfat hóa và 6-O-sulfat hóa được tiến hành.

Khi N-sulfoheparosan với epime hóa C5, 2-O-sulfat hóa và 6-O-sulfat hóa tồn tại, 3-O-sulfat hóa của N-sulfoheparosan với epime hóa C5, 2-O-sulfat hóa và 6-O-sulfat hóa được tiến hành.

Các điều kiện phản ứng

Các điều kiện phản ứng của 1) được đề cập trên cung cấp/tái tạo PAPS, 2) epime hóa C5, 3) 2-O-sulfat hóa, 4) 6-O-sulfat hóa, và 5) 3-O-sulfat hóa sẽ được mô tả dưới đây.

pH của dung dịch phản ứng là tốt hơn khoảng 6 đến 8, Trong suốt quá trình phản ứng, tốt hơn là để thực hiện phản ứng sử dụng dung dịch lỏng của amoniac, dung dịch lỏng của natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc tương tự với bộ điều khiển pH để đối chứng pH của dung dịch phản ứng đến gần trung hòa, cụ thể khoảng 7.

Nhiệt độ phản ứng, nghĩa là, nhiệt độ tồn tại của chất biến nạp trong suốt quá trình phản ứng tốt hơn là 20 độ C đến 50 độ C, và còn tốt hơn là 25 độ C đến 47 độ C. thời gian phản ứng là tốt hơn khoảng 1 đến 7 ngày và còn tốt hơn là khoảng 1 đến 3 ngày. Nuôi cấy có thể là bất kỳ dạng nuôi cấy mẻ, dạng nuôi cấy mẻ có cung cấp dinh dưỡng, và dạng nuôi cấy liên tục. Trong số chúng, dạng nuôi cấy mẻ là tốt hơn.

Phản ứng điều kiện sục khí có thể được thực hiện dưới các điều kiện khử hoặc các điều kiện vi hiếu khí. Các điều kiện khử được xác định bởi tiềm năng oxy hóa-khử của dung dịch phản ứng. Tiềm năng oxy hóa-khử của dung dịch phản ứng là tốt hơn khoảng -200 mV đến -500 mV và còn tốt hơn là -250 mV đến -500 mV.

Trạng thái khử của dung dịch phản ứng có thể được ước tính một cách dễ dàng sử dụng chỉ thị resazurin, và có thể đo lường một cách chính xác sử dụng thiết bị phân thể oxy hóa-khử. Đối với phương pháp để điều chế dung dịch phản ứng dưới các điều kiện khử, phương pháp đã biết có thể được sử dụng mà không có sự giới hạn.

Đặc biệt, dung dịch lỏng cho dung dịch phản ứng dưới các điều kiện khử có thể được thu bằng cách loại bỏ khí được hòa tan bằng cách đưa nước cất hoặc tương tự để xử lý nhiệt hoặc xử lý áp lực giảm. Thêm vào đó, chất khử phù hợp (ví dụ, thioglycolic axit, ascorbic axit, cystin hydroclorua, mercaptoaxetic axit, thiolaxetic axit, glutathion, natri sulfide, hoặc tương tự) có thể được bổ sung để điều chế dung dịch lỏng cho dung dịch phản ứng dưới các điều kiện khử. Sự kết hợp phù hợp của các phương pháp này cũng là phương pháp hiệu quả để điều chế dung dịch lỏng cho dung dịch phản ứng dưới các điều kiện khử.

Trong trường hợp mà các điều kiện khử được duy trì trong suốt quá trình phản ứng, mong muốn để ngăn trộn oxy từ hệ thống phản ứng bên ngoài càng nhiều càng tốt, và các ví dụ đặc hiệu của phương pháp này gồm phương pháp trong đó hệ phản ứng được gắn với khí trơ như khí nitơ hoặc khí cacbon dioxide.

Trong trường hợp mà các điều kiện vi hiếu khí được duy trì trong suốt quá trình phản ứng, phản ứng có thể được thực hiện dưới các điều kiện trong đó tốc độ sục khí được đặt giá trị dưới của 0,5 vvm hoặc tương tự hoặc giá trị thấp hơn, và tốc độ khuấy được đặt giá trị dưới của 500 vòng/phút hoặc tương tự hoặc giá trị thấp hơn. Trong một số trường hợp, phản ứng có thể được thực hiện trong sự kết hợp với trạng thái trong đó sự sục khí ngừng ở thời điểm thích hợp sau khi bắt đầu phản ứng, và mức độ trạng thái kỵ khí được tăng dưới các điều kiện tốc độ khuấy 100 vòng/phút hoặc ít hơn.

Sự thu thập của polysacarit được sulfat hóa

Polysacarit được sulfat hóa được tạo ra trong dung dịch phản ứng bằng việc nuôi cấy như được mô tả trên. Polysacarit được sulfat hóa có thể được thu thập bằng cách khôi phục dung dịch phản ứng, và hơn nữa, polysacarit được sulfat hóa có thể được tách từ dung dịch phản ứng bởi phương pháp đã biết. Các ví dụ của các phương pháp được biết như vậy gồm phương pháp chưng cất, phương pháp thẩm qua màng, phương pháp tách dung môi hữu cơ, và tương tự.

Điều chế N-sulfoheparosan

N-sulfoheparosan được sử dụng trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế được thu bằng cách khử chất béo, depolyme hóa, và N-sulfat hóa heparosan. tạo ra heparosan và tạo ra N-sulfoheparosan từ heparosan có thể được thực hiện bởi phương pháp đã biết (ví dụ, WO2018/048973).

Các ví dụ của phương pháp tạo ra heparosan gồm phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có sự cải biến gen của (a1) sau và có khả năng tạo ra heparosan trong môi trường để tạo ra heparosan trong môi trường, và thu thập heparosan từ môi trường:

(a1) sự cải biến gen mà tăng mức độ biểu hiện của gen kpsS.

Vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có thể còn có ít nhất một trong các sự cải biến gen sau (a2) và (a3) thêm vào (a1):

(a2) sự cải biến gen mà tăng mức độ biểu hiện của ít nhất một gen được chọn từ các gen kfiA, kfiB, kfiC, và kfiD; và

(a3) sự cải biến gen mà gây ra sự mất chức năng của gen gen yhbJ

kpsS là gen được mã hóa bởi vùng I giữa nhóm gen của vùng I, vùng II, và vùng III. kpsS được liên quan trong việc bắt đầu tổng hợp heparosan. Trong việc tạo ra heparosan, kpsS, cùng với kpsC, đóng vai trò trong việc bổ sung nhiều môi liên kết Kdo đến phosphatidylglycerol trong màng trong.

Đối với gen *kpsS*, gen *kpsS* được bắt nguồn từ giống *Escherichia* là tốt hơn. Các ví dụ đặc hiệu của nó gồm gen *kpsS* của chủng *Escherichia coli* K5. Trình tự nucleotit của gen *kpsS* của chủng *Escherichia coli* K5 và trình tự amino axit của protein được mã hóa bởi gen có thể được thu từ các dữ liệu được công bố. Gen *kpsS* của chủng *Escherichia coli* K5 được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen CAA52659.1.

Các ví dụ của gen *kpsS* gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 27, hoặc ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 27 và có khả năng tạo ra heparosan.

KfiA, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD* là các gen được mã hóa bởi vùng II giữa nhóm gen của vùng I, vùng II, và vùng III. Như được thể hiện trong Fig.2, *kfiA*, *kfiB*, *kfiC* và *kfiD* được liên quan trong việc tổng hợp heparosan, và đóng vai trò bổ sung saccharit và do đó tổng hợp heparosan.

Đối với gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC* hoặc *kfiD*, gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, hoặc *kfiD* được bắt nguồn từ giống *Escherichia* là tốt hơn. Các ví dụ đặc hiệu của nó gồm gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, hoặc *kfiD* của chủng *Escherichia coli* K5. Trình tự nucleotit của gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, hoặc *kfiD* thuộc chủng *Escherichia coli* K5 và trình tự amino axit của protein được mã hóa bởi gen có thể được thu từ các dữ liệu được công bố. *kfiA* được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen CAA54711,1; *kfiB* được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen CAE55824,1; *kfiC* được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen CAA54709.1; và *kfiD* được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen CAA54708,1.

Các ví dụ của gen *kfiA* gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 28, hoặc ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 28 và có khả năng tạo ra heparosan.

Các ví dụ của gen *kfiB* gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 29, hoặc ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 29 và có khả năng tạo ra heparosan.

Các ví dụ của gen *kfiC* gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 30, hoặc ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 30 và có khả năng tạo ra heparosan.

Các ví dụ của gen kfiD gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, hoặc a ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 và có khả năng tạo ra heparosan.

FIG.3 thể hiện sơ đồ dạng giản đồ của con đường sinh tổng hợp heparosan. GlmS là enzym thứ nhất trong con đường cung cấp UDP-N-acetylglucosamin mà là tiền thân của heparosan và là enzym mà xúc tác phản ứng từ fructose-6-phosphat đến glucosamin-6-phosphat. YhbJ là enzym đối chứng âm tính GlmS.

Đối với gen yhbJ, gen yhbJ được bắt nguồn từ giống *Escherichia* là tốt hơn. Các ví dụ đặc hiệu của nó gồm gen yhbJ của chủng *Escherichia coli* K-12, Trình tự nucleotit của gen yhbJ của chủng *Escherichia coli* K-12 và trình tự amino axit của protein được mã hóa bởi gen có thể được thu từ các dữ liệu được công bố. Gen yhbJ của chủng *Escherichia coli* K-12 được đăng ký như sự truy cập ngân hàng gen BAE77249.1.

Các ví dụ của gen yhbJ gồm ADN có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 32, hoặc ADN có đặc tính tăng khả năng tạo ra heparosan của vi sinh vật khi mức độ biểu hiện được tăng trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có trình tự nucleotit 90% hoặc nhiều hơn tương tự trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 và có khả năng tạo ra heparosan.

Mỗi gen trong (a1) đến (a3) trên có thể dễ dàng được thu từ các dữ liệu được công bố bởi, ví dụ, tìm kiếm BLAST hoặc tìm kiếm FASTA sử dụng trình tự nucleotit của mỗi gen được mô tả trên. Thêm vào đó, sự tương đồng của mỗi gen có thể được thu bởi, ví dụ, PCR sử dụng nhiễm sắc thể của vi sinh vật như vi khuẩn như khuôn mẫu và sử dụng oligonucleotit được tạo ra được dựa trên các trình tự gen đã biết như môi.

Mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể là các gen khác nhau miễn là các chức năng chính (ví dụ, hoạt động hoặc đặc tính) của protein được mã hóa bởi các gen được duy trì. Hoặc là có hoặc là không có protein được mã hóa bởi các biến thể của gen duy trì chức năng chính của chúng có thể được kiểm tra; đặc biệt, ví dụ, khi chức năng chính là để cải thiện khả năng tạo ra heparosan, bằng việc đưa các biến thể của gen vào vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có khả năng tạo ra heparosan.

Các biến thể của mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể được thu theo phương pháp đột biến hướng đích bằng việc cải biến vùng mã hóa của gen như các gốc amino axit ở các vị trí đặc hiệu của protein được mã hóa được thể, xóa, chèn hoặc bổ sung. Thêm vào đó, các biến thể của mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể cũng được thu bởi, ví dụ, xử lý đột biến.

Miễn là các chức năng chính của chúng được duy trì, mỗi trong các gen (a1) đến (a3) trên có thể là các gen mã hóa protein có trình tự amino axit trong đó một hoặc một vài các amino axit ở một hoặc một vài các vị trí được thế, xóa, chèn hoặc bổ sung. Ví dụ, trong protein được mã hóa, đầu N và/hoặc đầu C có thể được mở rộng hoặc được thu ngắn lại. Cụm từ "một hoặc một vài" khác nhau phụ thuộc vào vị trí và dạng gốc amino axit trong cấu trúc ba chiều của protein. Các ví dụ đặc hiệu của nó gồm 1 đến 50, 1 đến 40, 1 đến 30, và tốt hơn là 1 đến 20, còn tốt hơn là 1 đến 10, thậm chí còn tốt hơn là 1 đến 5, và cụ thể tốt hơn là 1 đến 3.

Sự thay thế, xóa, chèn, hoặc bổ sung của một hoặc một vài các amino axit như được mô tả trên là đột biến bảo toàn mà duy trì chức năng của protein một cách thông thường. Đại diện của các đột biến bảo toàn là sự thay thế bảo toàn. Sự thay thế bảo toàn là đột biến trong đó sự thay thế xảy ra giữa Phe, Trp, và Tyr trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit thơm, sự thay thế xảy ra giữa Leu, Ile, và Val trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit kỵ nước, sự thay thế xảy ra giữa Gln và Asn trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit phân cực, sự thay thế xảy ra giữa Lys, Arg, và His trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit có tính bazơ, sự thay thế xảy ra giữa Asp và Glu trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit có tính axit, và sự thay thế xảy ra giữa Ser và Thr trong trường hợp mà vị trí thay thế là amino axit có các nhóm hydroxyl. Các ví dụ đặc hiệu của các sự thay thế được xem như sự thay thế bảo toàn gồm sự thay thế của Ala với Ser hoặc Thr; sự thay thế của Arg với Gln, His, hoặc Lys; sự thay thế của Asn với Glu, Gln, Lys, His, hoặc Asp; sự thay thế của Asp với Asn, Glu, hoặc Gln; sự thay thế của Cys với Ser hoặc Ala; sự thay thế của Gln với Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg; sự thay thế của Glu với Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp; sự thay thế của Gly với Pro; sự thay thế của His với Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr; sự thay thế của Ile với Leu, Met, Val, hoặc Phe; sự thay thế của Leu với Ile, Met, Val, hoặc Phe; sự thay thế của Lys với Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg; sự thay thế của Met với Ile, Leu, Val, hoặc Phe; sự thay thế của Phe với Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu; sự thay thế của Ser với Thr hoặc Ala; sự thay thế của Thr với Ser hoặc Ala; sự thay thế của Trp với Phe hoặc Tyr; sự thay thế của Tyr với His, Phe, hoặc Trp; và sự thay thế của Val với Met, Ile, hoặc Leu. Thêm vào đó, các sự thay thế, xóa, chèn, bổ sung của các amino axit như được mô tả trên, sự đảo của nó, và tương tự gồm các sự thay thế, xóa, chèn, và bổ sung, sự đảo, và tương tự mà được gây ra bởi các đột biến (các đột biến hoặc các biến dị) mà xuất hiện một cách tự nhiên như các đột biến được dựa trên các sự khác biệt cá thể hoặc các sự khác biệt loài trong sinh vật mà gen được bắt nguồn.

Thêm vào đó, miễn là các chức năng chính của chúng được duy trì, mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể là các gen mã hóa protein nghĩa là 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, thậm

chỉ còn tốt hơn là 97% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 99% hoặc nhiều hơn tương tự toàn bộ trình tự amino axit.

Thêm vào đó, miễn là các chức năng chính của chúng được duy trì, mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể là ADN lai, dưới các điều kiện nghiêm ngặt, với đầu dò có thể được tạo ra từ các trình tự gen đã biết, như trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit. Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến các điều kiện được gọi là các phép lai đặc hiệu được tạo thành và các phép lai không đặc hiệu không được tạo thành. Các ví dụ của nó gồm các điều kiện trong đó các ADN tương tự với nhau ở mức độ cao, ví dụ, các ADN mà tương tự 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, thậm chí còn tốt hơn là 97% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 99% hoặc tương tự nhau nhiều hơn lai với nhau, và các ADN tương tự tương tự nhau ở mức độ thấp không lai với nhau; hoặc các điều kiện, mà là các điều kiện để rửa trong phép lai Southern thông thường, trong đó rửa được thực hiện một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60 độ C, 1 x SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60 độ C, 0,1 x SSC, và 0,1% SDS, và còn tốt hơn là 68 độ C, 0,1 x SSC, và 0,1% SDS.

Đoạn dò được sử dụng để lai có thể là một phần của trình tự bổ sung của mỗi gen. Đoạn dò như vậy có thể được tạo ra bởi PCR sử dụng oligonucleotit tạo ra được dựa trên trình tự gen đã biết như mỗi và sử dụng mảnh ADN chứa mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên như khuôn mẫu. Ví dụ, mảnh ADN có chiều dài khoảng 300 bp có thể được sử dụng như đoạn dò. Trong trường hợp mà mảnh ADN có chiều dài khoảng 300 bp được sử dụng như đoạn dò, các ví dụ của các điều kiện để rửa trong phép lai gồm các điều kiện 50 độ C, 2 x SSC, và 0,1% SDS.

Thêm vào đó, bởi vì sự thoái hóa mã bộ ba khác nhau phụ thuộc vào các vật chủ, mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên có thể là các gen được thu bằng cách thay thế bất kỳ mã bộ ba với mã bộ ba tương đương miễn là các chức năng chính của chúng được duy trì. Ví dụ, các gen trong các bảng 1 đến 3 có thể được cải biến để mà chúng có các mã bộ ba tối ưu phụ thuộc vào tần suất sử dụng mã bộ ba của vật chủ được sử dụng.

Các ví dụ của xử lý đột biến gồm phương pháp xử lý trong ống nghiệm phân tử ADN có trình tự nucleotit mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên với hydroxylamin hoặc tương tự; phương pháp xử lý các vi sinh vật mang mỗi trong các gen trong (a1) đến (a3) trên với các tia X, các tia cực tím, hoặc đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG), etyl metanesulfonat (EMS), và metyl metanesulfonat (MMS); và tương tự.

Sự cải biến gen để tăng sự biểu hiện gen

Cụm từ "tăng sự biểu hiện gen" có nghĩa là sự biểu hiện gen được tăng lên so với sự biểu hiện gen của chủng không được cải biến. Các ví dụ của một khía cạnh

tăng sự biểu hiện của gen gồm khía cạnh trong đó sự biểu hiện của gen tốt hơn là được tăng 1,5-lần hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là được tăng 2-lần hoặc nhiều hơn, và thậm chí còn tốt hơn là được tăng 3-lần hoặc nhiều hơn, như được so sánh với sự biểu hiện gen của chủng không được cải biến.

Thêm vào đó, cụm từ "biểu hiện gen được tăng" có nghĩa là không chỉ sự tăng trong sự biểu hiện của gen đích trong chủng trong đó gen đích được biểu hiện ban đầu, mà có nghĩa là gen đích được biểu hiện trong chủng trong đó gen đích không được biểu hiện ban đầu. Nghĩa là, cụm từ "biểu hiện gen được tăng" gồm, ví dụ, trường hợp trong đó gen đích được đưa vào chủng không có gen đích, và gen đích được biểu hiện ở đây. Hơn nữa, cụm từ "biểu hiện gen được tăng" cũng được đề cập đến như các cụm từ "biểu hiện gen được tăng" hoặc "biểu hiện gen được tăng."

Sự tăng trong biểu hiện gen có thể đạt được bằng cách, ví dụ, tăng số lượng bản sao của gen. Tăng số lượng bản sao của gen có thể đạt được bằng cách đưa gen vào nhiễm sắc thể của vật chủ. Việc đưa gen vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện sử dụng, ví dụ, sự tái tổ hợp đồng nhất (Miller I, J.H. *Experiments in Molecular genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Chỉ một bản sao của gen có thể được đưa vào, hoặc hai hoặc nhiều hơn các bản sao của nó có thể được đưa vào.

Ví dụ, nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào nhiễm sắc thể bằng cách thực hiện sự tái tổ hợp đồng nhất trong khi trình tự đích có nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể. Các ví dụ của trình tự có nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể gồm trình tự ADN lặp lại (ADN lặp lại), và các đoạn lặp được đảo xuất hiện ở cả hai đầu của gen nhảy.

Ngoài ra, sự tái tổ hợp đồng nhất có thể được thực hiện trong khi nhắm đích trình tự phù hợp trên nhiễm sắc thể, như gen không cần thiết để tạo ra chất đích. Sự tái tổ hợp đồng nhất có thể được thực hiện bởi, ví dụ, phương pháp sử dụng ADN mạch thẳng, phương pháp sử dụng plasmid chứa gốc sao chép nhạy cảm với nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmid có khả năng chuyển liên hợp, phương pháp sử dụng vectơ tự sát không có gốc sao chép mà có chức năng trong vật chủ, hoặc phương pháp tải nạp sử dụng thể thực khuẩn. Thêm vào đó, gen cũng có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể sử dụng gen nhảy hoặc Mini-Mu (JP-A-H2-109985).

Liệu rằng gen đích được đưa vào vào nhiễm sắc thể có thể được kiểm tra bằng phép lai Southern sử dụng đoạn dò có trình tự bổ sung với tất cả hoặc một phần của gen, PCR sử dụng mồi được tạo ra được dựa trên trình tự của gen, hoặc tương tự.

Thêm vào đó, số lượng bản sao của gen cũng có thể được tăng bằng cách đưa vectơ chứa gen vào vật chủ. Ví dụ, có thể tăng số lượng bản sao của gen bằng cách tạo vectơ biểu hiện gen bằng cách thất mảnh ADN chứa gen đích đến vectơ mà có chức năng trong vật chủ, và biến nạp vật chủ với vectơ biểu hiện. Mảnh ADN

chứa gen đích có thể được thu bởi, ví dụ, PCR sử dụng hệ gen ADN của vi sinh vật có gen đích như khuôn mẫu. Phương pháp biến nạp không được giới hạn một cách cụ thể, và phương pháp thông thường được biết có thể được sử dụng.

Đối với vector, vector mà có thể tự nhân lên trong tế bào vật chủ có thể được sử dụng. Vector tốt hơn là vector đa bản. Thêm vào đó, vector tốt hơn là có đánh dấu như gen kháng kháng sinh hoặc gen khác được mô tả trong tài liệu [Karl Friehs, Plasmid Copy Number and Plasmid Stability, Adv Biochem Engin/Biotechnol 86: 47-82 (2004)] để chọn chất biến nạp. Hơn nữa, vector có thể có promoter hoặc tín hiệu kết thúc để biểu hiện gen được chèn. Các ví dụ của vector gồm vector được bắt nguồn từ plasmid của vi khuẩn, vector được bắt nguồn từ plasmid của nấm men, vector được bắt nguồn từ thể thực khuẩn, cosmid, phagemid, và tương tự.

Các ví dụ đặc hiệu của các vector có khả năng tự nhân lên trong vi khuẩn của Enterobacteriaceae như *Escherichia coli* gồm pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, pBR322, và pSTV29 (Tất cả từ Takara Bio Inc.), pACYC184 và pMW219 (Nippon gen), pTrc99A (Pharmacia), vector pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), vector pET (Novagen), vector pQE (Qiagen), và vector khoảng vật chủ rộng RSF1010.

Trong trường hợp đưa gen vào, đủ để gen được giữ trong vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ có sự cải biến gen trong sáng chế. Đặc biệt, hiệu quả để gen được đưa vào mà nó được biểu hiện khi kiểm soát promoter trình tự mà có chức năng trong vi khuẩn của sáng chế. Promoter có thể là promoter được bắt nguồn từ vật chủ hoặc promoter khác loại. Promoter có thể là promoter nội tại của gen được đưa vào hoặc promoter của các gen khác. Đối với promoter, ví dụ, promoter mạnh hơn sẽ được mô tả sau có thể được sử dụng.

Tín hiệu kết thúc để kết thúc sự phiên mã có thể được bố trí hạ lưu của gen. Tín hiệu kết thúc không được giới hạn một cách cụ thể miễn là chức năng của nó trong vi khuẩn của sáng chế. Tín hiệu kết thúc có thể là tín hiệu kết thúc được bắt nguồn từ vật chủ hoặc tín hiệu kết thúc không đồng nhất. Tín hiệu kết thúc có thể là tín hiệu kết thúc đặc biệt đối với gen được đưa vào, hoặc có thể là tín hiệu kết thúc của các gen khác. Các ví dụ đặc hiệu của các tín hiệu kết thúc gồm tín hiệu kết thúc T7, tín hiệu kết thúc T4, tín hiệu kết thúc pha fd, tín hiệu kết thúc tet, và tín hiệu kết thúc trpA.

Các vector, các promoter, và các tín hiệu kết thúc mà có thể được sử dụng trong các vi sinh vật khác nhau được mô tả chi tiết trong, ví dụ, "Basic Lecture 8 on Microbiology, Gene Engineering, KYORITSU SHUPPAN, 1987," và chúng có thể được sử dụng.

Thêm vào đó, trong trường hợp mà hai hoặc nhiều hơn các gen được đưa vào, đủ để mỗi gen được giữ trong vi khuẩn của sáng chế theo cách dễ hiểu. Ví dụ, mỗi gen có thể được giữ lại trên vector biểu hiện duy nhất, hoặc tất cả có thể được

giữ lại trên nhiễm sắc thể. Hơn nữa, mỗi gen có thể được giữ lại riêng biệt trên nhiều vector biểu hiện, hoặc có thể được giữ lại riêng biệt trên một hoặc nhiều vector biểu hiện và trên nhiễm sắc thể. Hơn nữa, hai hoặc nhiều hơn các gen có thể tạo thành operon và được đưa vào. Các ví dụ của "các trường hợp mà hai hoặc nhiều hơn các gen được đưa vào" gồm trường hợp đưa gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều hơn enzym, trường hợp đưa gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều hơn các tiểu đơn vị mà tạo thành enzym đơn, và các sự tổ hợp của chúng.

Gen được đưa vào không được giới hạn một cách cụ thể miễn là nó mã hóa protein mà có chức năng trong vật chủ. Gen được đưa vào có thể là gen được bắt nguồn từ vật chủ hoặc gen khác loại. Gen được đưa vào có thể được thu bởi, ví dụ, PCR sử dụng các mồi được thiết kế được dựa trên trình tự nucleotit của gen và sử dụng hệ gen ADN của sinh vật có gen hoặc plasmid hoặc tương tự mang gen như khuôn mẫu. Thêm vào đó, gen được đưa vào có thể được tổng hợp hoàn toàn, ví dụ, được dựa trên trình tự nucleotit của gen [gen, 60 (1), 115-127 (1987)].

Hơn nữa, sự tăng trong biểu hiện gen có thể đạt được bằng cách cải thiện tính hiệu quả phiên mã của gen. Cải thiện tính hiệu quả phiên mã của gen có thể đạt được bằng cách, ví dụ, thay thế promotor của gen trên nhiễm sắc thể với promotor mạnh hơn. "Promotor mạnh hơn" đề cập đến promotor mà tăng cường sự phiên mã của gen hơn promotor dạng thuần xuất hiện một cách tự nhiên.

Các ví dụ của "promotor mạnh hơn" gồm các promotor biểu hiện cao được biết như promotor *uspA*, promotor T7, promotor *trp*, promotor *lac*, promotor *thr*, promotor *tac*, promotor *trc*, promotor *tet*, promotor *araBAD*, promotor *rpoH*, promotor PR, và promotor PL.

Thêm vào đó, đối với promotor mạnh hơn, promotor thông thường của dạng hoạt tính cao có thể được thu sử dụng các gen chỉ thị khác nhau. Ví dụ, hoạt động của promotor có thể được tăng bằng cách mang các vùng -35 và -10 trong vùng promotor gần hơn trình tự đồng thuận (WO2000/18935).

Các ví dụ của các dạng promotor hoạt hóa cao gồm các promotor khác nhau như *tac* (Katashkina JI et al. Russian Federation Patent application 2006134574) và promotor *pnlp8* (International WO2010/027045). Các phương pháp để đánh giá độ bền của promotor, và các ví dụ của các promotor mạnh được mô tả trong tài liệu được biết [Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995) và tương tự].

Thêm vào đó, sự tăng trong mức độ biểu hiện gen có thể đạt được bằng cách cải thiện hiệu quả dịch mã của gen. Sự cải thiện hiệu quả dịch mã của gen có thể đạt được bằng cách, ví dụ, thay thế trình tự Shine-Dalgarno (SD) (cũng được gọi là vị trí liên kết ribosome (RBS)) của gen trên nhiễm sắc thể với trình tự SD mạnh hơn.

"Trình tự SD mạnh hơn" đề cập đến trình tự SD trong đó sự dịch mã mRNA được cải thiện hơn trình tự SD dạng thuần xuất hiện tự nhiên. Các ví dụ của trình tự

SD mạnh hơn gồm RBS của gen 10 từ thể thực khuẩn T7 [Olins P.O. et al, gen, 1988, 73, 227-235]. Thêm vào đó, sự thay thế, chèn, hoặc xóa một vài nucleotit trong vùng đệm giữa RBS và mã bộ ba mở đầu, cụ thể trong trình tự ngay upstream của mã bộ ba mở đầu (5'-UTR), được biết ảnh hưởng một cách đáng kể tính hiệu quả dịch mã và sự ổn định của mARN, và do đó, hiệu quả dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng việc cải biến chúng.

Trong sáng chế, các vị trí mà ảnh hưởng sự biểu hiện của gen, như promotor, trình tự SD, và vùng đệm giữa RBS và mã bộ ba mở đầu, cũng được đề cập chung đến như "các vùng đối chứng biểu hiện." Các vùng đối chứng biểu hiện có thể được xác định sử dụng phần mềm tìm kiếm gen như vector tìm kiếm gen hoặc GENETYX. Sự cải biến của các vùng đối chứng biểu hiện có thể được thực hiện bởi, ví dụ, phương pháp sử dụng vector nhảy với nhiệt độ hoặc phương pháp tích hợp từ Red (WO2005/010175).

Sự cải thiện trong tính hiệu quả dịch mã của gen có thể cũng thu được bởi, ví dụ, sự cải biến mã bộ ba. Đặc biệt, ví dụ, trong trường hợp mà sự biểu hiện của gen dị hợp được thực hiện, và tương tự, tính hiệu quả dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách thay thế các mã bộ ba hiếm xuất hiện trong gen với các mã bộ ba đồng nghĩa được sử dụng phổ biến hơn.

Sự thay thế mã bộ ba có thể được thực hiện bởi, ví dụ, phương pháp đột biến hướng điểm trong đó đột biến đích được đưa vào vị trí đích trong ADN. Các ví dụ của phương pháp đột biến hướng điểm gồm phương pháp sử dụng PCR [Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. Trong Enzymol., 154, 382 (1987)], và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn [Kramer, W. và Frits, H.J., Meth. Trong Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. Trong Enzymol., 154, 367 (1987)]. Ngoài ra, mảnh gen trong đó các mã bộ ba được thay thế có thể được tổng hợp hoàn toàn. Tần suất sử dụng mã bộ ba ở các sinh vật khác nhau được mô tả trong "Codon usage database" [<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)].

Thêm vào đó, sự biểu hiện của gen cũng có thể được tăng bằng cách khuếch đại bộ điều hòa mà tăng sự biểu hiện của gen, hoặc bằng cách xóa hoặc làm yếu bộ điều hòa mà giảm sự biểu hiện của gen. Các kỹ thuật như vậy để tăng sự biểu hiện của gen như được mô tả trên có thể được sử dụng một mình hoặc có thể được sử dụng trong bất kỳ sự kết hợp nào.

Sự tăng trong sự biểu hiện của gen có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách kiểm tra sự tăng trong lượng phiên mã của gen hoặc bằng cách kiểm tra sự tăng trong lượng protein được biểu hiện từ gen. Thêm vào đó, sự tăng trong sự biểu hiện của gen có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách kiểm tra hoạt động tăng của protein được biểu hiện từ gen.

Kiểm tra sự tăng trong lượng phiên mã của gen có thể được thực hiện bằng cách so sánh lượng mARN được phiên mã từ gen với chủng không được cải biến như chủng thuần hoặc chủng gốc. Các ví dụ của các phương pháp đánh giá lượng mARN gồm phép lai Northern, RT-PCR, và tương tự [Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition*, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001]. Sự tăng trong lượng mARN đề cập đến, ví dụ, trường hợp trong đó lượng mARN tốt hơn là được tăng 1,5-lần hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là được tăng 2-lần hoặc nhiều hơn, và thậm chí còn tốt hơn là được tăng 3-lần hoặc nhiều hơn, như được so sánh với lượng mARN của chủng không được cải biến.

Sự tăng trong lượng protein có thể được kiểm tra bằng, ví dụ, Western blot sử dụng kháng thể. Sự tăng trong lượng protein đề cập đến, ví dụ, trường hợp trong đó lượng protein tốt hơn là được tăng 1,5-lần hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là được tăng 2-lần hoặc nhiều hơn, và thậm chí còn tốt hơn là được tăng 3-lần hoặc nhiều hơn, như được so sánh với lượng protein của chủng không được cải biến.

Sự tăng trong hoạt động của protein có thể được kiểm tra bằng, ví dụ, đo hoạt tính của protein. Việc tăng trong hoạt tính của protein đề cập đến, ví dụ, trường hợp trong đó hoạt động của protein tốt hơn là được tăng 1,5-lần hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là được tăng 2-lần hoặc nhiều hơn, và thậm chí còn tốt hơn là được tăng 3-lần hoặc nhiều hơn, như được so sánh với hoạt tính protein của chủng không được cải biến.

Các kỹ thuật được mô tả trên để tăng sự biểu hiện của gen có thể được sử dụng để tăng biểu hiện của mỗi trong các gen (a1) và (a2) trên.

Sự cải biến gen mà tăng biểu hiện của gen *kpsS* tốt hơn là ít nhất một trong các sự cải biến của các vùng đối chứng biểu hiện của gen *kpsS* và sự cải biến gen mà tăng số lượng bản sao. Gen *kpsFEDUCS* xuất hiện như nhóm gen tạo ra heparosan, nhưng sẽ được mô tả sau trong các ví dụ, các tác giả của sáng chế tìm thấy rằng tác dụng cụ thể cải thiện tạo ra heparosan được thu bằng cách tăng sự biểu hiện của chỉ gen *kpsS* trong số chúng. Theo đó, đối với sự cải biến gen mà tăng biểu hiện của gen *kpsS*, sự cải biến gen để tăng số lượng bản sao của gen *kpsS* là tốt hơn.

Sự cải biến gen mà tăng sự biểu hiện của ít nhất một gen được chọn từ các gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD* tốt hơn là ít nhất một trong các sự cải biến của các vùng đối chứng biểu hiện ít nhất một trong các gen được chọn từ các gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD*, và tăng số lượng bản sao các gen. Như được thể hiện trong Fig.1, các gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD* tạo thành operon. Sự cải biến gen mà tăng toàn bộ operon được tạo thành bởi các gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD* là tốt hơn, và sự cải biến của các vùng đối chứng biểu hiện của các gen *kfiA*, *kfiB*, *kfiC*, và *kfiD* là tốt hơn.

Sự cải biến gen mà gây ra sự mất chức năng gen

Các ví dụ của các sự cải biến gen mà gây sự mất chức năng gen yhbJ của (a3) trên gồm sự cải biến gen trong đó chức năng của protein được mã hóa bởi một phần tương ứng với yhbJ được giảm hoặc ngừng hoàn toàn bằng việc cải biến ADN mã hóa một phần tương ứng với yhbJ trong hệ gen ADN của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ như vật chủ.

Trong phương pháp của sáng chế, dạng của sự cải biến được bổ sung vào ADN mã hóa một phần tương ứng với yhbJ không được giới hạn một cách cụ thể miễn là chức năng của protein được mã hóa bởi gen tương ứng với yhbJ được giảm hoặc ngừng hoàn toàn, và phương pháp đã biết có thể được sử dụng phù hợp.

Các ví dụ của dạng mà giảm hoặc ngừng hoàn toàn chức năng của protein được mã hóa bởi một phần tương ứng với yhbJ gồm bất kỳ một trong số các sự cải biến sau (I) đến (III):

(I) Tất cả hoặc một phần của ADN mã hóa một phần tương ứng với yhbJ được loại bỏ.

(II) Một hoặc một vài các sự thay thế, xóa hoặc bổ sung tạo thành ADN mã hóa một phần tương ứng với yhbJ.

(III) ADN mã hóa một phần tương ứng với yhbJ được thay thế với trình tự ADN có ít hơn 80% tương tự trình tự ADN trước sự cải biến.

Các ví dụ của sự mất chức năng của gen yhbJ gồm trường hợp trong đó hoạt động của gen yhbJ tốt hơn là 20% hoặc ít hơn, còn tốt hơn là 10% hoặc ít hơn, và thậm chí còn tốt hơn là 5% hoặc ít hơn, như được so sánh với sự mất chức năng của chúng không được cải biến. Hoạt động của yhbJ có thể được kiểm tra bằng thử nghiệm mức độ biểu hiện của glmS bằng phương pháp lai Northern, bằng phương pháp lai Western, hoặc tương tự [Kalamorz F. et al, (2007) "Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in Escherichia coli." Mol Microbiol. 65 (6):1518-33].

Trong phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo sáng chế, có thể dễ sử dụng, đối với dung dịch phản ứng, N-sulfoheparosan được thu bằng cách cải biến hóa học heparosan bởi phương pháp đã biết, mà heparosan được thu bởi phương pháp tạo ra heparosan được mô tả trên.

Phương pháp tạo ra PAPS

Phương pháp tạo ra PAPS theo sáng chế được đặc trưng ở phản ứng tạo ra PAPS được thực hiện bằng cách tích hợp nguồn ATP, nguồn ion sulfat, chất biến nạp được mô tả ở trên (a) hoặc chất được xử lý của chúng vào dung dịch phản ứng. Nghĩa là, phương pháp tạo ra PAPS theo sáng chế bao gồm các bước sau (i) và (ii):

(i) điều chế chất biến nạp của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, mà bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được

đưa vào theo cách biểu hiện được, trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp là chất thấm, hoặc chất đã được xử lý của chất biến nạp; và

(ii) tiến hành phản ứng tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp được điều chế trong bước (i) hoặc chất được xử lý của chúng.

Theo phương pháp tạo ra PAPS theo sáng chế, PAPS có thể được tạo ra bởi phản ứng tế bào vi khuẩn sử dụng chất biến nạp của vi khuẩn của giống *Corynebacterium* biểu hiện ATP sulfurylaza và APS kinaza hoặc chất được xử lý của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được thể hiện dưới đây, nhưng sáng chế không được giới hạn đến các ví dụ sau.

Ví dụ 1

Cấu trúc của *Corynebacterium ammoniagens* DE3 plasmid

Plasmid để chèn lambda DE3 chứa gen T7 RNA polymeraza giữa *gltD*-*purT* trên nhiễm sắc thể của chủng hiếm *Corynebacterium ammoniagens* ATCC 6872 được tạo cấu trúc như sau. Hai dạng môi để khuếch đại phía *gltD* [*gltD*-*purT*_1 (SEQ ID NO: 1) và *gltD*-*purT*_2BX (SEQ ID NO: 2)], và hai dạng môi để khuếch đại phía *purT* [*gltD*-*purT*_3BX (SEQ ID NO: 3) và *gltD*-*purT*_4 (SEQ ID NO: 4)] được thiết kế.

Ở thời điểm này, để thực hiện PCR thứ hai (PCR dung hợp) để liên kết mảnh sườn *gltD* và mảnh sườn *purT* được khuếch đại trong PCR thứ nhất, trình tự mà được bổ sung với trình tự của khoảng 25 bazơ trên phía 3' của môi 5' (*gltD*-*purT*_4; SEQ ID NO: 4) để khuếch đại mảnh sườn *purT* được bổ sung trên phía 5' của môi 3' (*gltD*-*purT*_2BX; SEQ ID NO: 2) để khuếch đại mảnh sườn *gltD*. Thêm vào đó, trình tự để nhân dòng In-Fusion được bổ sung vào phía 5' của môi 5' (*gltD*-*purT*_1) để khuếch đại mảnh sườn *gltD* và môi 3' (*gltD*-*purT*_4) để khuếch đại mảnh sườn *purT*. Hơn nữa, các trình tự nhận dạng BglII và XhoI được bổ sung vào phần liên kết trên phía *gltD* và phía *purT* để chèn lambda DE3.

ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium ammoniagens* ATCC 6872 (ở đây được đề cập đến như là ATCC 6872), mà là chủng dạng thuần của *Corynebacterium ammoniagens*, được tạo ra theo phương pháp Saito et al. [Biochim. Biophys. Acta 72, 619 (1963)].

Sử dụng ADN nhiễm sắc thể như khuôn mẫu, PCR thứ nhất để khuếch đại mảnh sườn *gltD* và mảnh sườn *purT* được thực hiện, và do đó khoảng 0,8 kb mảnh ADN trên mảnh sườn *gltD* và khoảng 0,8 kb của mảnh ADN trên mảnh sườn *purT* được thu. Tiếp, PCR thứ hai được thực hiện để liên kết mảnh sườn *gltD* của chúng và mảnh sườn *purT*, và do đó khoảng 1,6 kb của mảnh ADN (*gltD*-BX-*purT*) được thu.

Plasmid pESB30, trong đó 2,6 kb của mảnh ADN PstI [Mol. Microbiol., 6, 1195 (1992)] chứa gen *sacB* levansucraza của *Bacillus subtilis* được thu ở vị trí phân mảnh PstI của vector pHSG299 của *Escherichia coli* [gen, 61, 63, (1987)] có gen kháng kanamycin, được cắt với BamHI. Do đó, mảnh *gltD*-BX-*purT* được thu trên được liên kết sử dụng kit nhân dòng In-Fusion (Takara Bio Inc.). Sử dụng sản phẩm phản ứng, *Escherichia coli* DH5 alpha [được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD.] được biến nạp theo phương pháp thông thường [Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press].

Chủng thu được được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin [môi trường chứa 10 g bactotrypton (được sản xuất bởi Difco), 5 g dịch chiết nấm men (được sản xuất bởi Difco), 10 g natri clorua, và 16 g thạch Bacto (được sản xuất bởi Difco) trong 1 L nước, và trong đó pH được điều chỉnh đến pH 7,0], và chủng biến nạp được chọn. Sau khi chọn dòng đích bằng PCR khuẩn lạc, chủng biến nạp được ủ vào môi trường LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin (môi trường có cùng chế phẩm như môi trường thạch LB ngoại trừ không có thạch được chứa), và được nuôi cấy qua đêm, và do đó plasmid được điều chế từ môi trường nước dùng được thu sử dụng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Phân tích trình tự nucleotit được xác nhận rằng plasmid có cấu trúc trong đó khoảng 1,6 kb của mảnh *gltD*-BX-*purT* được chèn vào pESB30.

Sau đó, 4,5 kb của mảnh DE3 lambda được khuếch đại bởi PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể được chiết từ *Escherichia coli* BL21 (DE3) như khuôn mẫu và sử dụng các môi của DE3-for_Xho (SEQ ID NO: 5) và DE3-rev_Bgl (SEQ ID NO: 6). Trình tự nhận biết XhoI được bổ sung vào DE3-for_Xho, và trình tự nhận biết BglII được bổ sung vào DE3-rev_Bgl. Mảnh này và plasmid có cấu trúc trong đó khoảng 1,6 kb của mảnh *gltD*-BX-*purT* được chèn vào pESB30 được tiêu hóa với XhoI và BglII, và sau đó được liên kết với kit nối ADN (Takara Bio Inc.).

Escherichia coli DH5 alpha được biến nạp trong cùng cách thức như được mô tả trên, chủng do đó được thu được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin, và chủng biến nạp được chọn. Chủng biến nạp được ủ vào môi trường LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin và được nuôi cấy qua đêm, và do đó plasmid được điều chế từ môi trường nước dùng được thu được sử dụng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Phân tích trình tự nucleotit được xác nhận rằng plasmid có cấu trúc trong đó 4,5 kb của mảnh lambda DE3 được chèn giữa khoảng 1,6 kb của *gltD*-*purT* trên pESB30, Plasmid này được thiết kế như pC-DE3,

Ví dụ 2

Cấu trúc của chủng được chèn lambda DE3 của *Corynebacterium ammoniagens*

PC-DE3 được chèn vào chủng ATCC 6872 bởi điện di theo phương pháp của Rest et al. [Appl. Microbiol. Biotech., 52, 541 (1999)], và các chủng kháng

kanamycin được chọn. Khi cấu trúc của nhiễm sắc thể được thu từ một trong các chủng kháng kanamycin được kiểm tra bởi phép lai Southern [Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press], được xác nhận rằng pC-DE3 được tích hợp vào nhiễm sắc thể bởi sự tái tổ hợp đồng nhất dạng Campbell.

Chủng biến nạp (sự tái tổ hợp đơn) được áp dụng với môi trường đường Suc [môi trường chứa 100 g sucrose, 7 g dịch chiết thịt, 10 g pepton, 3 g natri clorua, 5 g dịch chiết nấm men (được sản xuất bởi Difco), và 15 g thạch Bacto (được sản xuất bởi Difco) trong 1 L nước, và pH được điều chỉnh đến pH 7,2], và được nuôi cấy ở 30 độ C khoảng 1 ngày, và các khuẩn lạc phát triển được chọn. Chủng trong đó gen sacB xuất hiện không phát triển trên môi trường này bởi vì nó chuyển sucroza thành chất nền tự sát [J. Bacteriol., 174, 5462 (1991)]. Nói cách khác, chủng, trong đó gen sacB được xóa bởi sự tái tổ hợp đồng nhất thứ hai giữa dạng chèn lambda DE3 và dạng thuần xuất hiện gần nhiễm sắc thể, có thể phát triển trên môi trường mà không tạo ra chất nền tự sát. Trong suốt sự tái tổ hợp đồng nhất này, hoặc là cấu trúc dạng thuần hoặc chủng trong đó mảnh lambda DE3 được chèn giữa gltD-purT được thả cùng với sacB. Ở thời điểm này, trong chủng trong đó cấu trúc dạng thuần được thả cùng với sacB, sự thay thế gen đối với dạng chèn lambda DE3 xuất hiện.

Chủng trong đó lambda DE3 được chèn giữa gltD-purT của ATCC 6872 được thu bằng cách PCR khuẩn lạc sử dụng tái tổ hợp thứ hai do đó được thu với các môi của DE3-for_Xho và DE3-rev_Bgl. Chủng này được thiết kế như ATCC 6872 (DE3).

Ví dụ 3

Cấu trúc của plasmid có mảnh ADN để biểu hiện MET3-MET14

Plasmid pCS299P [Appl. Microbiol. Biotech., 63, 592 (2004)] được tiêu hóa với BamHI. PCR được thực hiện với pCET_Fw2 (SEQ ID NO: 7) và pCET_Rv2 (SEQ ID NO: 8) và sử dụng pET21b như khuôn mẫu để thu được mảnh ADN chứa lacI-PT7. Chúng được tinh sạch bởi QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) và được liên kết sử dụng kit nhân dòng In-Fusion (Takara Bio Inc.). Sử dụng sản phẩm phản ứng, Escherichia coli DH5 alpha (được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD.) được biến nạp theo phương pháp thông thường và được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa 20 microgram/ml kanamycin, và chủng biến nạp được chọn. Sau khi chọn dòng đích bằng PCR khuẩn lạc, chủng biến nạp được ủ vào môi trường LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin và được nuôi cấy qua đêm, và do đó plasmid được điều chế từ môi trường nước dùng thu được sử dụng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Phân tích trình tự nucleotit được xác nhận rằng plasmid là plasmid có cấu trúc trong đó khoảng 1,9 kb của mảnh ADN lacI-PT7 được bắt nguồn từ pET21b được chèn vào pCS299P. Plasmid này được thiết kế như pCET212,

Sau đó, plasmid được tạo cấu trúc trong đó MET3 và MET14 được bắt nguồn từ *Saccharomyces cerevisiae* được chèn vào downstream của promoter T7 của pCET212. Hai dạng mồi (MET3_1 (SEQ ID NO: 9) và MET3_2 (SEQ ID NO: 10)) để khuếch đại MET3 từ ADN nhiễm sắc thể của chủng *Saccharomyces cerevisiae* S288C (ở đây được đề cập đến như là S288C), và hai dạng mồi (MET14_3 (SEQ ID NO: 11) và MET14_4 (SEQ ID NO: 12)) để khuếch đại MET14 được thiết kế.

Ở thời điểm này, để thực hiện PCR thứ hai (PCR dung hợp) mà liên kết mảnh MET3 và mảnh MET14 được khuếch đại trong PCR thứ nhất, trình tự mà bổ sung với trình tự của khoảng 15 bazơ trên phía 5' của mồi 5' (MET14_3; SEQ ID NO: 11) để khuếch đại MET14 được bổ sung vào phía 5' của mồi 3' (MET3_2; SEQ ID NO: 10) để khuếch đại MET3, và trình tự which is bổ sung với trình tự của khoảng 15 bazơ trên phía 5' của MET3_3 được bổ sung vào phía 5' của MET14_3, Thêm vào đó, trình tự để nhân dòng In-Fusion được bổ sung vào phía 5' của mồi 5' (MET3_1) để khuếch đại MET3 và mồi 3' (MET14_4) để khuếch đại MET13, Sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng S288C như khuôn mẫu, PCR thứ nhất để khuếch đại MET3 và MET14 được thực hiện, và do đó khoảng 1,5 kb của mảnh ADN của MET3 và khoảng 0,6 kb của mảnh ADN trong vùng downstream được thu. Tiếp, PCR thứ hai được thực hiện để liên kết mảnh MET3 của chúng và mảnh MET14, và do đó khoảng 2,1 kb của mảnh ADN (MET3-MET14) được thu. Mảnh ADN này được tinh sạch sử dụng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) và sau đó được nối với pCET212 được thủy phân với NdeI và XhoI sử dụng kit nhân dòng In-Fusion (Takara Bio Inc.). Sử dụng sản phẩm phản ứng, *Escherichia coli* DH5 alpha (được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD.) được biến nạp theo phương pháp thông thường. Chúng do đó được thu được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin, và chủng biến nạp được chọn. Sau khi chọn dòng đích bằng PCR khuẩn lạc, chủng biến nạp được ủ vào môi trường LB chứa 20 microgram/ml của kanamycin và được nuôi cấy qua đêm, và do đó plasmid được điều chế từ môi trường nước dùng thu được sử dụng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Phân tích trình tự nucleotit được xác nhận rằng plasmid có cấu trúc trong đó khoảng 2,1 kb của mảnh MET3-MET14 được chèn vào pCET212. Plasmid này được thiết kế như pSC-3-13, Bằng cách biến nạp pSC-3-13 vào ATCC 6872 (DE3), chủng ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13 tạo ra PAPS của *Corynebacterium ammoniagens* được thu.

Ví dụ 4

Cấu trúc của plasmid có mảnh ADN để biểu hiện chaperon protein

PCR được thực hiện sử dụng Gro_F (SEQ ID NO: 13) và Gro_R (SEQ ID NO: 14) và sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3) như khuôn mẫu, và do đó mảnh ADN chứa GroES-GroEL được thu. Tiếp, PCR được thực hiện sử dụng pKD46 [Datsenko, K.A., Warner, B.L., Proceedings của National Academy of Science của Mỹ, Vol. 97, 6640-6645 (2000)] như khuôn mẫu, và sử

dụng AraC_ParaB_F (SEQ ID NO: 15) và AraC_ParaB_R (SEQ ID NO: 16), và do đó mảnh ADN chứa AraC_ParaB được thu. PCR được thực hiện sử dụng pCDF-SmOri-F (SEQ ID NO: 17) và pCDF-SmOri-R (SEQ ID NO: 18) và sử dụng pCDF-Duet1 (Novagen) như khuôn mẫu, và do đó mảnh ADN chứa gen kháng streptomycin và gốc sao chép ColdDF được thu. Chúng được tinh sạch bởi QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) và được liên kết sử dụng kit nhân dòng In-Fusion (Takara Bio Inc.). Sử dụng sản phẩm phản ứng, *Escherichia coli* DH5 alpha (được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD.) được biến nạp theo phương pháp thông thường và được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa 50 microgram/ml của streptomycin, và chủng biến nạp được chọn. Sau khi chọn dòng đích bằng PCR khuẩn lạc, chủng biến nạp được ủ vào môi trường LB chứa 50 microgram/ml của streptomycin và được nuôi cấy qua đêm, và do đó plasmid được điều chế từ môi trường nước dùng thu được sử dụng QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Phân tích trình tự nucleotit được xác nhận rằng plasmid có cấu trúc trong đó khoảng 1,2 kb AraC-ParaB mảnh ADN được bắt nguồn từ pKD46 và khoảng 2,0 kb của mảnh ADN GroES-GroEL được bắt nguồn từ BL21 (DE3) được chèn vào pCDF-Duet1. Plasmid được thiết kế như pGro (Sm).

Ví dụ 5

Cấu trúc của *Escherichia coli* biểu hiện C5-epimeraza, 2OST, 6OST-3, và 3OST-1

Vùng miền xúc tác của C5-epimeraza của người (E53-N609) được nhân dòng thành vector pMAL-C2X (New England Biolabs) theo phương pháp được mô tả trong tài liệu [Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 339, Issue 2, 13 January 2006, pages 597-602] để tạo MBP-C5. MBP-C5 được biến nạp vào Origami-B (DE3) (Novagen) cùng với pGro7 (Takara Bio Inc.), và do đó chủng Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7 của *Escherichia coli* biểu hiện C5-epimeraza được tạo cấu trúc.

SEQ ID NO: 19 thể hiện trình tự nucleotit của miền xúc tác (R51-N356) of 2-O-sulfotransferaza isoform 1 mà được bắt nguồn từ chuột đồng Trung Quốc và được tối ưu hóa mã bộ ba cho biểu hiện trong *Escherichia coli*. PCR được thực hiện sử dụng trình tự được tổng hợp một cách nhân tạo được mô tả trên như khuôn mẫu và các mồi của SEQ ID NOS: 20 và 21. Mảnh PCR này được nhân dòng thành pET-His6-MBP-TEV-LIC (Addgen) bởi phương pháp nhân dòng phụ thuộc sự buộc [Methods Mol Biol. 2009; 498: 105-115] để tạo H-MBP-2OST. H-MBP-2OST được biến nạp vào Origami-B (DE3) (Novagen) với pGro (Sm), và do đó chủng Origami-B (DE3)/H-MBP-2OST_pGro (Sm) của *Escherichia coli* biểu hiện 2OST được tạo cấu trúc.

Miền xúc tác (P120-L424) của 6-O-sulfotransferaza isoform 3 được bắt nguồn từ chuột được nhân dòng thành vector pMAL-C2X (New England Biolabs)

bởi phương pháp được mô tả trong tài liệu [Chemistry & Biology Volume 14, Issue 9, 21 September 2007, pages 986-993] để tạo MBP-6OST3, MBP-6OST3 được biến nạp vào Origami-B (DE3) (Novagen) cùng với pGro7 (Takara Bio Inc.), và do đó chủng Origami-B (DE3)/MBP-6OST3_pGro7 của *Escherichia coli* biểu hiện 6OST-3 được tạo cấu trúc.

Miền xúc tác (G48-H311) của 3-O sulfotransferaza được bắt nguồn từ chuột được nhân dòng thành vectơ pET28a (Novagen) bởi phương pháp được mô tả trong tài liệu [J Biol Chem. 2004 Jun 11; 279 (24): 25789-97] để tạo HIS-3OST1, HIS-3OST1 được biến nạp vào BL21-Codon tài liệu phi sáng chếu (DE3) -RIL (Agilent Technologies) cùng với pGro (Sm), và do đó chủng RIL/HIS-3OST1_pGro(Sm) của *Escherichia coli* biểu hiện 3OST1 được tạo cấu trúc.

Ví dụ 6

Điều chế N-sulfoheparosan và 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa

Heparosan được tạo ra bằng cách lên men sử dụng chủng *Escherichia coli* K5 hoặc chủng Nissle theo phương pháp được mô tả trong tài liệu sáng chế [WO2018/048973 A1]. Theo tài liệu, heparosan được thu được deacetyl hóa và được giải trùng hợp hóa học, và sau đó được N-sulfat hóa về mặt hóa học. Do đó, sự phân đoạn được thực hiện bởi kết tủa ethanol để thu được N-sulfoheparosan. N-sulfoheparosan được thu được đưa vào epime hóa vị trí C5 và sulfat hóa vị trí 2-O trong các gốc axit uronic bởi phản ứng enzym theo cùng tài liệu, và sau đó được đưa vào sự phân đoạn bởi kết tủa ethanol, và do đó 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa được thu.

Ví dụ 7

Nuôi cấy ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13

Chủng ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13 được thu trong ví dụ 3 được ủ trên môi trường thạch BY-Glucose chứa 50 microgram/ml của kanamycin [môi trường chứa 10 g glucose, 20 g môi trường bouillon thông thường (được sản xuất bởi Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.), 5 g dịch chiết nấm men (được sản xuất bởi Difco), và 20 g thạch Bacto (được sản xuất bởi Difco) trong 1 L nước], và được nuôi cấy ở 30 độ C qua đêm.

Các tế bào vi khuẩn của hai đĩa được ủ vào 350 ml của môi trường gieo sơ cấp [môi trường chứa glucose 50g/L, Polypepton cao (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.) 10g/L, dịch chiết nấm men (Asahi) 10g/L, KH_2PO_4 1g/L, K_2HPO_4 1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5g/L, urea 0,5g/L, L-xystin 0,03g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, D-canxi pantothenat 0,01 g/L, biotin 40 microgram/L, thiamin hydroclorua 0,005 g/L, và nicotinic axit 0,005g/L, mà pH được điều chỉnh đến pH 7,2 với natri hydroxit, và L-xystein 0,1 g/L, natri thiosulfat 1 g/L, và kanamycin 0,1 g/L được bổ sung riêng

biệt sau khi khử trùng ở 122 độ C khoảng 20 phút sử dụng nồi hấp] trong 2 L bình tam giác, và được nuôi cấy ở 30 độ C ở tốc độ khuấy 220 vòng/phút hoặc 24 giờ.

Trong 1700 ml môi trường nuôi cấy thứ cấp [môi trường chứa glucose 100g/L, fructose 4g/L, dịch chiết nấm men (được sản xuất bởi Asahi) 10g/L, KH_2PO_4 1,25g/L, K_2HPO_4 1g/L, natri glutamat monohydrat 2,1 g/L, L-xystin 0,02 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,25g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,002g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, D-canxi pantothenat 0,015 g/L, biotin 40 microgram/L, nicotinic axit 0,005 g/L, và ADEKA NOL LG-109 (được sản xuất bởi ADEKA) 1 ml/L, mà pH được điều chỉnh đến 7,2 với natri hydroxit, được khử trùng trong nồi hấp ở 122 độ C khoảng 20 phút sau khi bổ sung urea riêng biệt vào 3,2 g/L, và thiamin hydroclorua 0,1 g/L, L-xystein 0,3 g/L, natri thiosulfat 2,5 g/L, và kanamycin 0,2 g/L được thêm vào riêng biệt] trong 6 L bể nuôi cấy, 300 ml của dung dịch nuôi cấy trên được ủ và nuôi cấy khoảng 24 giờ dưới các điều kiện nuôi cấy 30 độ C, tốc độ khuấy 650 vòng/phút, và tốc độ sục khí 2 L/phút trong khi điều chỉnh pH của nó đến 6,8 với 18% amoni lỏng.

Trong 1700 ml môi trường nuôi cấy chính [môi trường chứa KH_2PO_4 10g/L, K_2HPO_4 10g/L, natri glutamat monohydrat 1g/L, L-xystin 0,02g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, biotin 150 microgram/L, nicotinic axit 0,005 g/L, urea 2 g/L, và ADEKA NOL LG-109 (được sản xuất bởi ADEKA) 1 ml/L, và mà glucose 125g/L, fructose 25g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, D-canxi pantothenat 0,015 g/L, thiamin hydroclorua 0,005 g/L, L-xystein 0,15 g/L, natri thiosulfat 2,5 g/L, và kanamycin 0,2 g/L được bổ sung riêng biệt sau khi khử trùng ở 122 độ C khoảng 20 phút trong nồi hấp] trong 6 L bể nuôi cấy, 300 ml của dung dịch nuôi cấy trên được ủ và nuôi cấy khoảng 25 giờ dưới các điều kiện nuôi cấy 30 độ C và tốc độ sục khí of 2 L/min trong khi điều chỉnh tốc độ khuấy giữa 650 vòng/phút và 900 vòng/phút sao cho lượng oxygen được hòa tan không nằm dưới 1 ppm, và trong khi điều chỉnh pH của nó đến 6,8 với 18% nước amoni.

Trong suốt giai đoạn này, IPTG được bổ sung sao cho nồng độ cuối cùng là 1 mM sau 6 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy, và biotin 100 microgram/L, nicotinic axit 0,015 g/L, canxi D-pantothenat 0,015 g/L, và thiamin hydroclorua 0,005 g/L cũng được bổ sung sau 10 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được tách thành các tế bào vi khuẩn và huyền phù nuôi cấy bằng cách ly tâm và do đó viên được thu là các tế bào vi khuẩn ướt và được đông lạnh ở -80 độ C.

Ví dụ 8

Nuôi cấy Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7, Origami-B (DE3)/H-MBP-2OST_pGro (Sm), Origami-B (DE3)/MBP-6OST3_pGro7, và RIL/HIS-3OST1_pGro (Sm)

Chủng Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7 được thu trong ví dụ 5 được cấy vào ống nghiệm lớn chứa 5 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 20 microgram/mL chloramphenicol, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy ở 30 độ C khoảng 16 giờ. 1,2% dung dịch nuôi cấy được cấy vào bình tam giác có vách ngăn chứa 500 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 20 microgram/mL chloramphenicol, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy lắc ở 37 độ C khoảng 6 giờ. Do đó, IPTG ở nồng độ cuối cùng 1 mM và arabinoza ở nồng độ cuối cùng 4 mM được bổ sung vào đó, và nuôi cấy được thực hiện ở 28 độ C khoảng 20 giờ. Do đó, dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và do đó viên được thu như các tế bào vi khuẩn ướt và được đông lạnh ở -80 độ C.

Chủng Origami-B(DE3)/H-MBP-2OST_pGro(Sm) được thu trong ví dụ 5 được cấy vào ống nghiệm lớn chứa 5 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 50 microgram/mL streptomycin, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy ở 30 độ C khoảng 16 giờ. 1,2% dung dịch nuôi cấy được cấy vào bình tam giác có vách ngăn chứa 500 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 50 microgram/mL streptomycin, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy lắc ở 30 độ C khoảng 12 giờ. Do đó, IPTG ở nồng độ cuối cùng 1 mM và arabinoza ở nồng độ cuối cùng 4 mM được bổ sung vào đó, và nuôi cấy được thực hiện ở 28 độ C khoảng 20 giờ. Do đó, dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và do đó viên được thu như các tế bào vi khuẩn ướt và được đông lạnh ở -80 độ C.

Chủng Origami-B(DE3)/MBP-6OST3_pGro7 được thu trong ví dụ 5 được cấy vào ống nghiệm lớn chứa 5 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 20 microgram/mL chloramphenicol, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy ở 30 độ C khoảng 16 giờ. 1,2% dung dịch nuôi cấy được cấy vào bình tam giác có vách ngăn chứa 500 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL ampicillin, 20 microgram/mL chloramphenicol, 15 microgram/mL tetracyclin, và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy lắc ở 37 độ C khoảng 4 giờ. Do đó, IPTG ở nồng độ cuối cùng 1 mM và arabinoza ở nồng độ cuối cùng 4 mM được bổ sung vào đó, và nuôi cấy được thực hiện ở 28 độ C khoảng 20 giờ. Do đó, dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và do đó viên được thu như các tế bào vi khuẩn ướt và được đông lạnh ở -80 độ C.

Chủng RIL/HIS-3OST1_pGro(Sm) được thu trong ví dụ 5 được cấy vào ống nghiệm lớn chứa 5 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL streptomycin, 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy ở 30 độ C khoảng 16 giờ. 1,2% dung dịch nuôi cấy được cấy vào bình tam giác có vách ngăn chứa 500 mL môi trường TB chứa 50 microgram/mL streptomycin và 15 microgram/mL kanamycin, và được nuôi cấy lắc ở 37 độ C khoảng 4 giờ. Do đó, IPTG ở nồng độ cuối cùng 1 mM và

arabinoza ở nồng độ cuối cùng 4 mM được bổ sung vào đó, và nuôi cấy được thực hiện ở 28 độ C khoảng 20 giờ. Do đó, dung dịch nuôi cấy được ly tâm, và do đó viên được thu là các tế bào vi khuẩn ướt và được đông lạnh ở -80 độ C.

Ví dụ 9

Thử nghiệm cho phản ứng sulfat hóa ở vị trí 2-O N-sulfoheparosan sử dụng ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13, Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7 và Origami-B (DE3)/H-MBP-2OST_pGro (Sm)

Mỗi trong các tế bào vi khuẩn được đông lạnh của ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13, Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7, và Origami-B (DE3)/H-MBP-2OST_pGro (Sm) được thu trong các ví dụ 7 và 8 được tạo huyền phù trong nước tinh khiết sao cho khối lượng của các tế bào vi khuẩn được làm đông lạnh là 333 g/L để điều chế huyền phù tế bào vi khuẩn. Do đó 30 ml được thu của huyền phù tế bào vi khuẩn ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13, 6 ml huyền phù tế bào vi khuẩn Origami-B (DE3)/MBP-C5_pGro7, và 6 mL huyền phù tế bào vi khuẩn Origami-B (DE3)/H-MBP-2OST_pGro (Sm) được bổ sung vào 18 ml dung dịch phản ứng [dung dịch lỏng chứa glucose 60g/L, KH_2PO_4 8,75g/L, K_2HPO_4 15g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20g/L, D-canxi pantothenat 0,3 g/L, nicotinic axit 0,2 g/L, adenin 4,05 g/L, benzalkonium clorua 1,25 g/L, ADEKA NOL LG-109 (được sản xuất bởi ADEKA) 1 ml/L, và N-sulfoheparosan 1 g/L (được tạo ra trong ví dụ 6)] trong 250 ml lò phản ứng sinh học, và được phản ứng khoảng 22 giờ dưới các điều kiện nuôi cấy 37 độ C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút, và tốc độ sục khí 0,75 mL/phút trong khi điều chỉnh pH của nó đến 6,5 với 2,8% dung dịch amoni lỏng. Trong suốt giai đoạn này, glucose 60 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 g/L, và adenin 2,7 g/L còn được bổ sung 6 giờ sau khi bắt đầu phản ứng.

Lấy mẫu được thực hiện phù hợp trong suốt quá trình phản ứng để thu dung dịch phản ứng. Dung dịch phản ứng được thu được pha loãng phù hợp và sau đó được ly tâm, và PAPS được phát hiện và được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ ở 254 nm với máy phát hiện UV sử dụng HPLC được sản xuất bởi Shimadzu Corporation. Các kết quả được thể hiện trong Fig.4. Thêm vào đó, việc tạo ra disaccarit không được bão hòa bằng cách phân hủy bằng enzym và phân tích bởi HPLC được thực hiện theo tài liệu sáng chế [WO2018/048973 A1].

Nghĩa là, dung dịch phản ứng được thu được ly tâm, và chất nổi thu được được làm nóng và được duy trì ở 80 độ C khoảng 10 phút để biến tính protein. Dung dịch sau khi biến tính protein được ly tâm, và chất nổi thu được được khử muối bằng cách siêu lọc sử dụng thiết bị lọc khối lượng phân tử 3 k (được sản xuất bởi Merck). Dung dịch sau khi khử muối được cấp vào dung dịch phản ứng heparinaza [được bao gồm 50 mM amoni axetat và 2 mM canxi clorua] chứa 0,5 U/ml của mỗi trong các heparinaza I, II, và III (được sản xuất bởi Sigma, nhưng các heparinaza khác có

thể cũng được sử dụng), và được đưa vào sự phân hủy enzym ở 35 độ C khoảng 2 giờ. Heparinaza bị bất hoạt bằng cách duy trì dung dịch sau khi phân hủy bằng enzym ở 95 độ C khoảng 15 phút.

Sự phân tích disaccarit không bão hòa được thực hiện bằng cách đưa dung dịch sau khi khử hoạt tính Heparinaza tới phân tích mô hình rửa giải gradient của pha động A [dung dịch lỏng mà chứa 1,8 mM natri dihydrogen phosphat và trong đó pH được điều chỉnh đến pH 3,0 với phosphoric axit] và pha động B [dung dịch lỏng mà chứa 1,8 mM natri dihydrogen phosphat và 1 M natri perchlorat, và trong đó pH được điều chỉnh đến pH 3,0 với phosphoric axit] sử dụng Shimadzu HPLC và cột trao đổi anion mạnh (cột sắc ký spherisorb-SAX, 4,0 x 250 mm, 5 micrometer, được sản xuất bởi Waters).

Disaccarit không bão hòa được phát hiện bằng cách đo độ hấp thụ ở 232 nm với máy phát hiện UV. Thời gian lưu giữ của delta-UA-GlcNS và delta-UA, 2S-GlcNS được kiểm tra bằng cách so sánh với chất chuẩn disaccarit không bão hòa (được sản xuất bởi Iduron). 2-O-sulfat hóa được kiểm tra bằng cách thu tỷ lệ diện tích của delta-UA, 2S-GlcNS tương ứng với tổng diện tích của delta-UA-GlcNS và delta-UA, 2S-GlcNS được phát hiện. Các kết quả được thể hiện trong Fig.5.

Ví dụ 10

Thử nghiệm cho phản ứng sulfat hóa ở vị trí 6-O của 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa sử dụng ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13 và Origami-B (DE3)/MBP-6OST3_pGro7

Mỗi trong các tế bào vi khuẩn được đông lạnh của ATCC 6872(DE3)/pSC-3-13 và Origami-B(DE3)/MBP-6OST3_pGro7 được thu trong các ví dụ 7 và 8 được tạo huyền phù trong nước tinh khiết sao cho khối lượng của các tế bào vi khuẩn được làm đông lạnh trở thành 333 g/L để điều chế huyền phù tế bào vi khuẩn. Do đó 30 ml được thu của ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13 huyền phù tế bào vi khuẩn và 6 ml của Origami-B(DE3)/MBP-6OST3_pGro7 huyền phù tế bào vi khuẩn cũng như 6 ml nước tinh khiết được bổ sung vào 18 ml dung dịch phản ứng [dung dịch lỏng chứa glucose 60g/L, KH_2PO_4 8,75g/L, K_2HPO_4 15g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20g/L, D-canxi pantothenat 0,3 g/L, nicotinic axit 0,2 g/L, adenin 4,05 g/L, benzalkonium clorua 1,25 g/L, ADEKA NOL LG-109 (được sản xuất bởi ADEKA) 1 ml/L, và 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa 0,5 g/L (được tạo ra trong ví dụ 6)] trong 250 ml lò phản ứng sinh học, và được phản ứng khoảng 22 giờ dưới các điều kiện nuôi cấy 32 độ C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút, và tốc độ sục khí 0,75 mL/phút trong khi điều chỉnh pH của nó đến 7,4 với dung dịch lỏng của 2N kali hydroxit.

Trong suốt giai đoạn này, glucose 60 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g/L, và adenin 2,7 g/L còn được bổ sung 6 giờ sau khi bắt đầu phản ứng. Lấy mẫu được thực hiện phù hợp trong suốt quá trình phản ứng để thu dung dịch phản ứng. Sử dụng cùng

phương pháp như trong ví dụ 9, sự phát hiện và định lượng PAPS được thực hiện. Các kết quả được thể hiện trong Fig.6

Thêm vào đó, chế phẩm được sulfat hóa được chứa trong chuỗi đường sau khi phản ứng được phân tích bởi cùng phương pháp như trong ví dụ 9. Thời gian lưu giữ của delta-UA, 2S-GlcNS và delta-UA, 2S-GlcN, 6S được kiểm tra bằng cách so sánh với chất chuẩn disaccarit không bão hòa (được sản xuất bởi Iduron). 6-O-sulfat hóa được kiểm tra bằng cách thu tỷ lệ diện tích của delta-UA, 2S-GlcN, 6S tương ứng với tổng diện tích của detected delta-UA, 2S-GlcNS và delta-UA, 2S-GlcN, 6S. Các kết quả được thể hiện trong Fig.7

Ví dụ 11

Thử nghiệm cho phản ứng sulfat hóa ở vị trí 6-O và vị trí 3-O của 2-O-N-sulfoheparosan được sulfat hóa sử dụng ATCC 6872 (DE3)/pSC-3-13, Origami-B (DE3)/MBP-6OST3_pGro7, và RIL/HIS-3OST1_pGro (Sm)

Phản ứng được thực hiện khoảng 22 giờ dưới các điều kiện được mô tả trong ví dụ 10. Trong suốt giai đoạn này, 3 giờ sau khi bắt đầu phản ứng, các tế bào vi khuẩn đông lạnh của IL/HIS-3OST1_pGro(Sm) được thu trong ví dụ 8 được tạo huyền phù trong nước tinh khiết sao cho khối lượng của các tế bào vi khuẩn được làm đông lạnh trở thành 333 g/L, và 6 ml của huyền phù tế bào vi khuẩn được điều chế được bổ sung. Lấy mẫu được thực hiện phù hợp trong suốt quá trình phản ứng để thu dung dịch phản ứng. Sử dụng cùng phương pháp như trong ví dụ 9, sự phát hiện và định lượng PAPS được thực hiện. Các kết quả được thể hiện trong Fig.8.

Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch phản ứng được ly tâm, chất nổi thu được được pha loãng phù hợp, và do đó, hoạt tính kháng IIa được đo lường sử dụng kit đo lường BIOPHEN (Trademark) ANTI-IIa (được sản xuất bởi Hyphen Biomed) để kiểm tra 3-O-sulfat hóa. Thêm vào đó, hoạt tính kháng IIa của dung dịch sau phản ứng của ví dụ 10 cũng được đo lường như đối chứng âm mà RIL/HIS-3OST1_pGro (Sm) không được bổ sung. Đường chuẩn được tạo ra sử dụng hiệu chuẩn BIOPHEN (Trademark) UFH (được sản xuất bởi Hyphen Biomed). Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Đo các kết quả của hoạt động kháng IIa

Bổ sung RIL/HIS-3OST1_pGro (Sm)	Hoạt động kháng IIa (IU/ml - chất nổi)
Bổ sung	375
Không bổ sung	-36

Ví dụ 12

Các tế bào vi khuẩn đông lạnh của ATCC 6872(DE3)/pSC-3-13 được thu trong các ví dụ 7 được tạo huyền phù trong nước tinh khiết sao cho khối lượng của

các tế bào vi khuẩn được làm đông lạnh là 333 g/L để điều chế huyền phù tế bào vi khuẩn. Do đó 30 ml được thu của huyền phù tế bào vi khuẩn được bổ sung vào 30 ml của dung dịch phản ứng [dung dịch lỏng chứa glucose 60g/L, KH_2PO_4 8,75g/L, K_2HPO_4 15g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20g/L, D-canxi pantothenat 0,3 g/L, nicotinic axit 0,2 g/L, adenin 4,05 g/L, benzalkonium clorua 0,625 g/L, ADEKA NOL LG-109 (được sản xuất bởi ADEKA) 1 ml/L] trong 250 ml lò phản ứng sinh học, và được phản ứng khoảng 22 giờ dưới các điều kiện nuôi cấy 32 độ C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút, và tốc độ sục khí 0,75 mL/phút trong khi điều chỉnh pH của nó đến 7,4 với dung dịch lỏng của 2N kali hydroxit.

Trong suốt giai đoạn này, glucose 60 g/L, KH_2PO_4 2,19 g/L, K_2HPO_4 3,75 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 g/L, và adenin 2,7 g/L còn được bổ sung 6 giờ sau khi bắt đầu phản ứng. Lấy mẫu được thực hiện phù hợp trong suốt quá trình phản ứng để thu dung dịch phản ứng.

Dung dịch phản ứng được thu được pha loãng phù hợp và sau đó được ly tâm, và PAPS được phát hiện và được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ ở 254 nm với máy phát hiện UV sử dụng HPLC được sản xuất bởi Shimadzu Corporation. Các kết quả được thể hiện trong Fig.9.

Như được mô tả trên, vi khuẩn của giống *Corynebacterium* có khả năng tạo ra và tái tạo PAPS, và vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ biểu hiện enzym sulfat hóa được bổ sung vào và được phản ứng với các nguyên liệu thô như glucose, adenin, và magie sulfat, và do đó polysacarit được sulfat hóa được tạo ra một cách hiệu quả từ polysacarits.

Trong khi sáng chế được mô tả chi tiết và với tham chiếu đến các phương án đặc biệt của nó, sẽ hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật các sự thay đổi và các sự cải biến có thể được tạo ra mà không rời khỏi phạm vi và tinh thần của sáng chế. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây được tích hợp trong toàn bộ của nó. Đơn này được dựa trên đơn quốc tế số PCT/JP2020/015388 được nộp vào 3 tháng 4 năm 2020, toàn bộ nội dung được tích hợp ở đây bằng cách tham chiếu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa, phương pháp bao gồm các bước sau (1-1) và (1-2):

(1-1) điều chế chất biến nạp (a) của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất được xử lý của chất biến nạp (a), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (a) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (a) là chất có thể thấm, và trong đó chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chúng có khả năng tạo ra PAPS (3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat); và

(1-2) tiến hành phản ứng để tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp (a) hoặc chất được xử lý của chất biến nạp (a),

trong đó phương pháp còn bao gồm tiến hành sulfat hóa bằng chất biến nạp bao gồm gen mã hóa sulfotransferaza, mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp, trong đó chất được xử lý của chất biến nạp là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp là chất có thể thấm, và trong đó chiết suất của chất biến nạp là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp có khả năng sulfat hóa.

2. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm 1, phương pháp còn bao gồm các bước sau (2-1) và (2-2):

(2-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (b) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (b) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (b) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (b), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b) có khả năng thực hiện quá trình epime hóa C5; và

(2-2) tiến hành Epime hóa C5 bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b) trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

3. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm 1 hoặc 2, phương pháp còn bao gồm các bước sau (3-1) và (3-2):

(3-1) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất một gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c), trong đó chất

được xử lý của chất biến nạp (c) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (c) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (c) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (c), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c) có khả năng thực hiện phản ứng 2-O; và

(3-2) tiến hành 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c) trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

4. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp còn bao gồm các bước sau (3'-1) đến (3'-3):

(3'-1) điều chế chất biến nạp (b) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa C5-epimeraza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (b) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (b) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (b) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (b), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b) có khả năng thực hiện quá trình epime hóa C5;

(3'-2) điều chế chất biến nạp (c) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất một gen mã hóa 2-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (c) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (c) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (c) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (c), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c) có khả năng thực hiện phản ứng 2-O; và

(3'-3) tiến hành Epime hóa C5 và 2-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (b) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (b), và chất biến nạp (c) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (c) trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

5. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, phương pháp còn bao gồm các bước sau (4-1) và (4-2):

(4-1) điều chế chất biến nạp (d) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân xơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 6-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (d) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (d) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (d) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (d), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d) có khả năng thực hiện phản ứng 6-O-sulfat hóa; và

(4-2) tiến hành 6-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (d) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (d) trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

6. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, phương pháp còn bao gồm các bước sau (5-1) và (5-2):

(5-1) điều chế chất biến nạp (e) của vi sinh vật thuộc sinh vật nhân sơ, bao gồm ít nhất gen mã hóa 3-O-sulfotransferaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e), trong đó chất được xử lý của chất biến nạp (e) là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp (e) là chất có thể thấm, trong đó chiết suất của chất biến nạp (e) là chiết xuất enzym thô hoặc enzym được tinh sạch, và trong đó chất biến nạp (e), hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e) có khả năng thực hiện phản ứng 3-O-sulfat hóa; và

(5-2) tiến hành 3-O-sulfat hóa bằng cách tích hợp chất biến nạp (e) hoặc chất hoặc chiết xuất được xử lý của chất biến nạp (e) trong dung dịch phản ứng trong sự xuất hiện của N-sulfoheparosan.

7. Phương pháp để tạo ra polysacarit được sulfat hóa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, để tạo ra heparin.

8. Phương pháp tạo ra PAPS, phương pháp bao gồm các bước sau (i) và (ii):

(i) điều chế chất biến nạp của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm ít nhất gen mã hóa ATP sulfurylaza và gen mã hóa APS kinaza mà được đưa vào theo cách biểu hiện được, hoặc chất được xử lý của chất biến nạp, trong đó chất được xử lý là chất trong đó màng tế bào chất của chất biến nạp là chất có thể thấm, và trong đó chất biến nạp hoặc chất được xử lý của chất biến nạp có khả năng tạo ra PAPS; và

(ii) tiến hành phản ứng để tạo ra PAPS bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng chứa ATP hoặc nguồn ATP, nguồn ion sulfat, và chất biến nạp được điều chế ở bước (i) hoặc chất được xử lý của chất biến nạp được điều chế ở bước (i).

Fig. 1

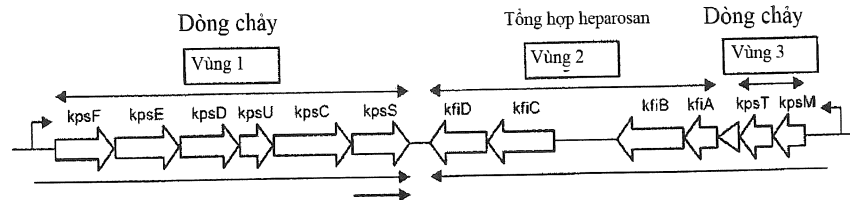


Fig. 2

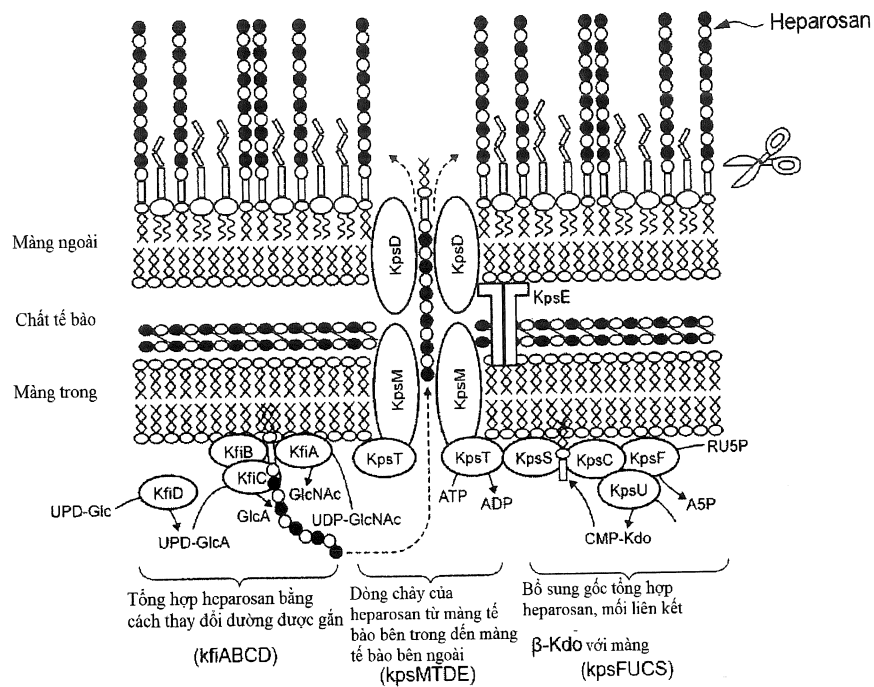


Fig. 3

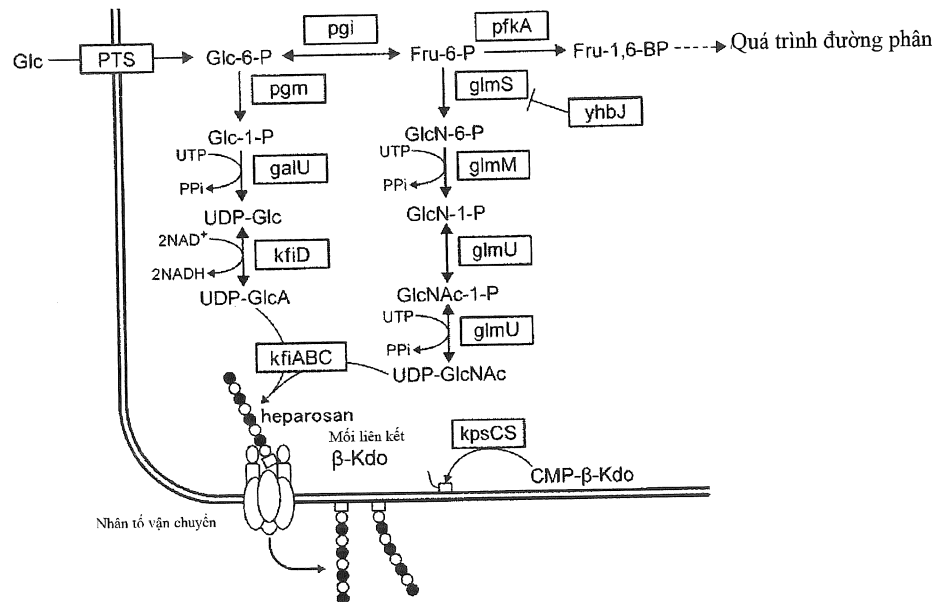


Fig. 4

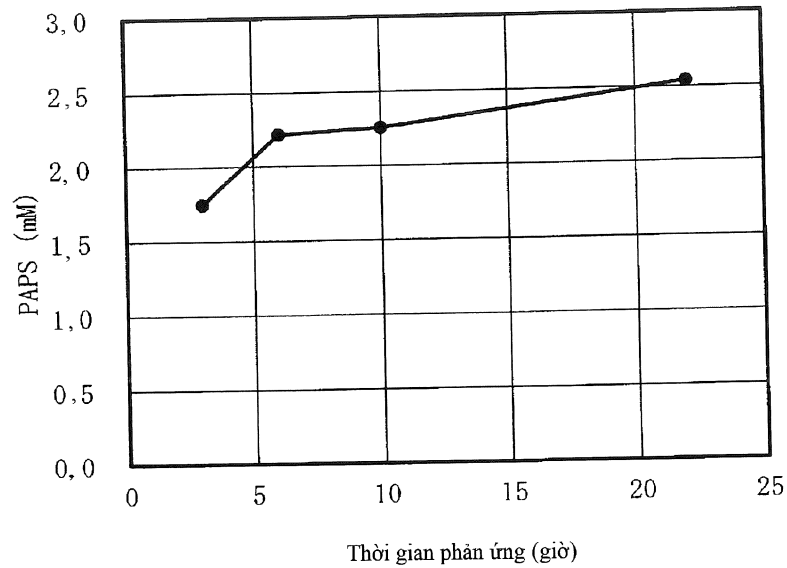


Fig. 5

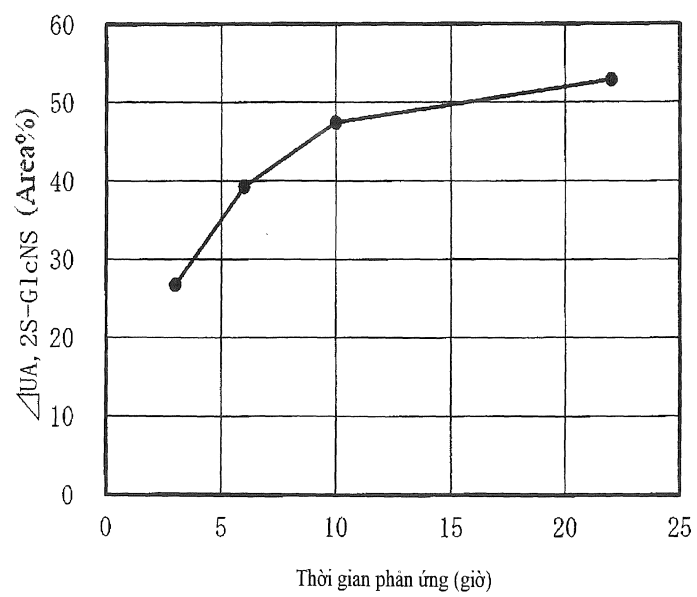


Fig. 6

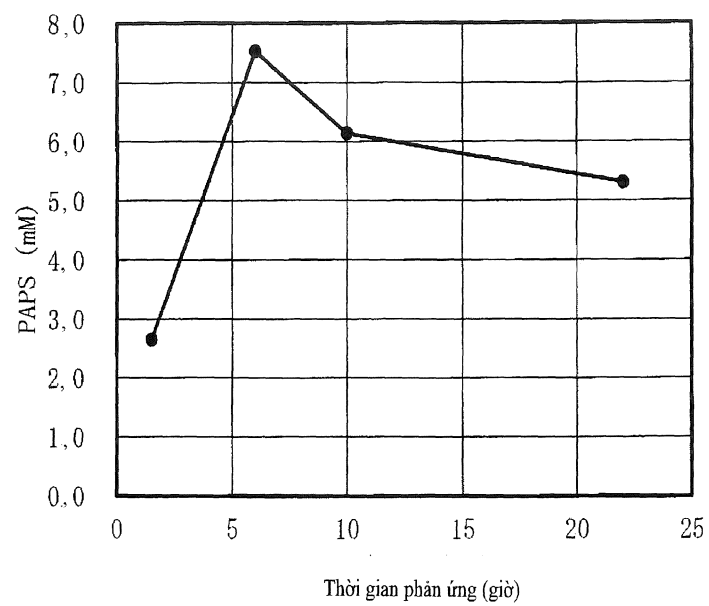


Fig. 7

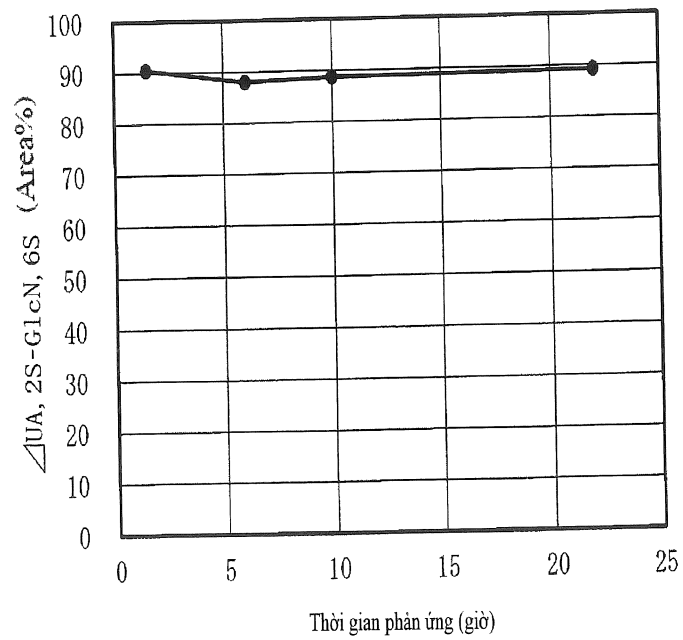


Fig. 8

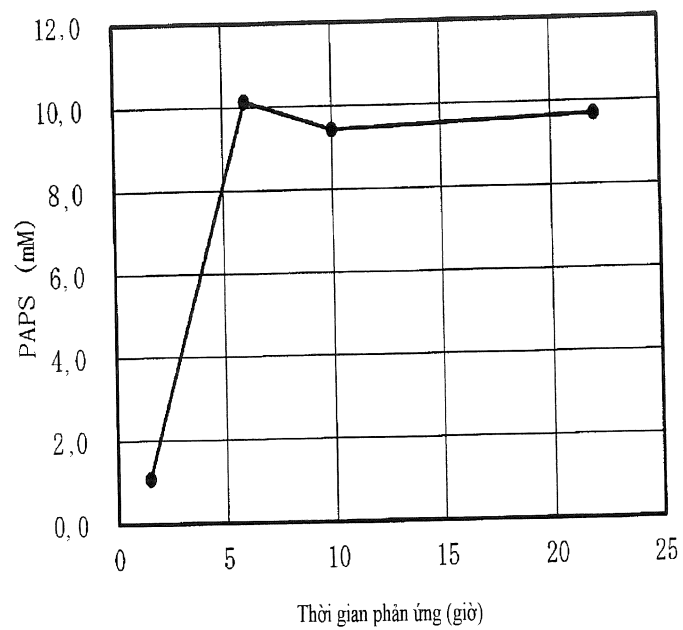
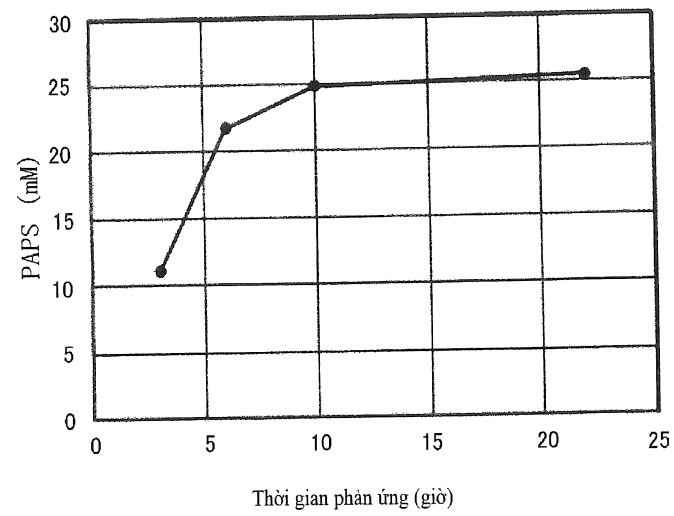


Fig. 9



Danh mục trình tự

<110> RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE
OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC
KIRIN BIOMATERIALS CO., LTD.

<120> Phương pháp tạo ra polysacarit được sulfat hóa và phương pháp tạo ra 3'-
phosphoadenosin 5'-phosphosulfat

<130> W531376

<150> PCT/JP2020/015388

<151> 2020-04-03

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 1

cggtacccgg ggatccgact ggccagtaca ggctg 35

<210> 2

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 2

agcgactcga gtttagatct tcaatgctca acccgacctg 40

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 3

attgaagatc taaactcgag tcgcttgacg atgttcaact 40

<210> 4

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho môi

<400> 4

cgactctaga ggatcgtttg tcgcgggcga cgata

35

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho môi

<400> 5

tttctcgaga actgcgcaac tcgtgaaagg

30

<210> 6

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 6

tttagatctg ttacgcgaac gcgaagtc

28

<210> 7

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 7

cggtacccgg ggatcgctta atgcgccgct acaggg

36

<210> 8

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 8

atgcctgcag gtcgaggagc tgactgggtt gaagg

35

<210> 9

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 9

gaaggagata tacatatgcc tgctctcac ggtgg

35

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 10

gttgtgtctc ctctattaaa atacaaaaaa gccat 35

<210> 11

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 11

tagaggagac acaacatggc tactaatatt acttg 35

<210> 12

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 12

ggtgggtggtg ctcgattaca aatgcttacg gatga 35

<210> 13

<211> 61

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 13

ttgggaattc gagctctaag gaggtataa aaaatgaata ttcgtccatt gcatgatcgc 60

g

61

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 14

ttacatcatg ccgcccatgc cacc 24

<210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 15

ttatgacaac ttgacggcta catcattcac 30

<210> 16

<211> 61

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 16

cgcgatcatg caatggacga atattcattt ttataacct ccttagagct cgaattccca 60

a 61

<210> 17

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 17

ggcggcatga tgtaattatt tgccgactac cttggtgac tc

42

<210> 18

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 18

gtcaagttgt cataatctag agcgggtcag tagaaaagat caaag

45

<210> 19

<211> 918

<212> ADN

<213> Chuột đồng Trung Quốc

<400> 19

cgcgaaatcg aacagcgtca cacgatggat ggcccgcgcc aagatgcaac cctggacgaa 60

gaagaagata tggttatcat ctacaaccgc gtcccgaata ccgcttcaac gtcgtttacc 120

aatattgcgt acgacctgtg cgccaaaaac aaatatcatg tgctgcacat caataccacg 180

aaaaacaatc cggttatgag cctgcaggat caagtccgtt ttgtgaaaaa catcacctct 240

tggaaagaaa tgaaaccggg cttctaccat ggtcacgtta gttatctgga ctttgccaaa 300

ttcggcgtga agaaaaaacc gatctacatc aacgttatcc gtgatccgat cgaacgcctg 360

gtctcttatt actattttct gcgtttcggc gatgactatc gcccggtct gcgtcgccgt 420

aaacagggtg acaagaaaac ctttgatgaa tgcgtcgcag aaggcgggtc agattgtgct 480

ccggaaaaac tgtggctgca gatcccggtt ttctgcggcc atagctctga atgttggaac 540

gtgggttcgc gctgggcaat ggaccaagct aaatacaacc tgatcaacga atattttctg 600

gtgggtgtta ccgaagaact ggaagatttc atcatgctgc tggaagccgc actgccgcgc 660

ttttccgtg gcgcgacgga actgtaccgt accggcaaaa aatctcatct gcgcaaaacc 720

acggagaaaa aactgccgac gaaacagacc attgcgaaac tgcagcaatc cgacatctgg 780

aaaatggaaa acgaattcta cgaattcgcc ctggaacagt ttcaattcat tcgtgcgcac 840

gccgttcgcg aaaaagatgg tgacctgtat atcctggcac aaaacttctt ctatgaaaaa 900

atctatccga aatcaaat 918

<210> 20

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 20

tacttccaat ccaatcgcg aatcgaacag cgtca 35

<210> 21

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit được tổng hợp cho mỗi

<400> 21

ttatccactt ccaatatttg atttcggata gattt 35

<210> 22

<211> 1536

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 22

atgcctgctc ctcacgggtgg tattctacaa gacttgattg ctagagatgc gttaaagaag 60

aatgaattgt tatctgaagc gcaatcttcg gacattttag tatggaactt gactcctaga 120

caactatgtg atattgaatt gattctaaat ggtgggtttt ctctctgac tgggtttttg 180

aacgaaaacg attactcctc tgttggtaca gattcgagat tagcagacgg cacattgtgg 240

accatcccta ttacattaga tgttgatgaa gcatttgcta accaaattaa accagacaca 300

agaattgccc tttccaaga tgatgaaatt cctattgcta tacttactgt ccaggatgtt 360

tacaagccaa acaaaactat cgaagccgaa aaagtcttca gaggtgaccc agaacatcca 420

gccattagct atttatttaa cgttgccggg gattattacg tcggcgggtc ttagaagcg 480

attcaattac ctcaacatta tgactatcca ggtttgcgta agacacctgc ccaactaaga 540

cttgaattcc aatcaagaca atgggaccgt gtcgtagctt tccaaactcg taatccaatg 600

catagagccc acagggagtt gactgtgaga gccgccagag aagctaatagc taagggtgctg 660

atccatccag ttgttggaact aaccaaacca ggtgatatag accatcacac tcgtgttcgt 720

gtctaccagg aaattattaa gcgttatcct aatggtattg ctttcttate cctgttgcca 780

ttagcaatga gaatgagtgg tgatagagaa gccgtatggc atgctattat tagaaagaat 840

tatggtgcct cccacttcat tgttggtaga gaccatgcgg gccaggtaa gaactccaag 900

ggtgttgatt tctacgggcc atacgatgct caagaattgg tcgaatccta caagcatgaa 960

ctggacattg aagtgttcc attcagaatg gtcacttatt tgccagacga agaccgttat 1020

gctccaattg atcaaattga caccacaaag acgagaacct tgaacatttc aggtacagag 1080

ttgagacgcc gttaagagt tgggtgtgag attcctgaat gggtctcata tctgaagtg 1140

gttaaaatcc taagagaatc caaccacca agaccaaacc aagggttttc aattgtttta 1200

ggtaattcat taaccgttc tcgtgagcaa ttatccattg cttgtgtgc aacattcttg 1260

caattcgggtg gtggcaggta ttacaagatc ttgaacaca ataataagac agagttacta 1320

tctttgattc aagatttcat tggttctggt agtggactaa ttattccaaa tcaatgggaa 1380

gatgacaagg actctgttgt tggcaagcaa aacgtttact tattagatac ctcaagctca 1440

gccgatattc agctagagtc agcggatgaa cctatttcac atattgtaca aaaagttgtc 1500

ctattcttgg aagacaatgg ctttttgta ttttaa 1536

<210> 23

<211> 609

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 23

atggctacta atattacttg gcatccaaat cttacttacg acgaacgcaa ggcatgaga 60

aaacaggacg gttgtactat ttggtaaca ggtctaagtg cgtcaggtaa aagtacaatc 120

gcctgtgcgc tagaacagtt actgctccaa aaaaacttgt ctgcatatag attggatggt 180

gacaacattc gtttggatt gaacaaggat ttgggttct cagaaaagga cagaaatgaa 240

aacattcgta gaattagcga agtttctaag ctatttgctg attcatgtgc tatttcaatc 300

acctcattta tctctccata cagagttgac agagatagag ctcgtgaact acataaggag 360

gctgggttga agttcattga aatatttgtt gatgttccat tagaagtcgc tgagcaaagg 420

gaccctaagg gtttatacaa gaaagctagg gaggggtgtaa tcaaggagtt tacaggtatt 480

tctgccccat atgaagcgcc aaaagctcca gagctacatt tgagaaccga ccagaagacg 540

gttgaagaat gtgctacat tatttatgag tacttaatca gtgaaaaaat catccgtaag 600

catttgtaa 609

<210> 24

<211> 1695

<212> ADN

<213> Người tinh khôn

<400> 24

gaaaaaagag cagcagcatc tgagagtaac aactatatga accacgtggc caaacaacag 60

tctgaggaag cattccctca ggaacagcag aaagcacccc ctgttgttgg gggcttcaat 120

agcaatgtgg gaagtaaggt gttagggctc aaatatgaag aaattgactg ttcataaat 180

gatgaacaca caattaaagg gagacgagag gggaacgaag tctttcttcc attcacttgg 240

gttgagaaat attttgatgt ttatggaaag gtggttcagt atgatggcta tgatcggttt 300

gaattctctc atagctattc caaagtctat gcacagagag cccctatca ccccgatggt 360

gtgtttatgt ctttgaagg ctacaatgtg gaagtccgag acagagtcaa gtgcataagt 420

ggggttgaag gtgtgccatt atctacacaa tggggacctc aaggctattt ctatccaatc 480

cagattgcac agtatggatt aagtcattac agcaagaatc taactgagaa acctcctcac 540

atagaggtat atgaaacagc agaagacaga gacaaaaaca agcctaatga ctggactgtg 600

ccaaagggtc gctttatggc gaatgtggct gataagtcta gattcaccaa tgtcaaacag 660

tttattgcac cagaaaccag tgaagggtga tccttgcaac tgggaaacac aaaagatttt 720

attatttcac ttgacctcaa gttcttgaca aatggaagtg tgtccgtggt tctagagacc 780

acagaaaaga atcagctctt cactatacat tatgtctcaa atgctcagct aattgctttt 840

aaagaaagag atatatacta tggcattggg cccagaactt catggagcac agttaccagg 900

gacctggtca ctgacctcag gaaaggagtg ggtctttcaa acacaaaagc tgtcaagcca 960

acaaaaataa tgcccaagaa ggtgggttagg ttgattgcaa aaggtaaggg attcctcgac 1020

aacattacca tctctaccac agcccacatg gctgcatttt ttgctgctag tgattggcta 1080

gtaaggaacc aggatgagaa aggtggctgg ccaattatgg tgaccgtaa gtaggggaa 1140

gggttcaagt ctttagagcc aggatggtat tctgcatgg cccaagggca agccatttct 1200

acattagtca gggcctatct gttaacaaaa gaccatata tctcaattc agctttaagg 1260

gcaacagccc cttataagtt tctatctgag cagcatggag ttaaagctgt gtttatgaat 1320

aaacatgact ggtatgaaga atatccaacc acacctagct ctttgttt aaatggctt 1380

atgtattctt taattgggct gtatgactta aaagaaactg caggggaaaa actcgaaaa 1440

gaagcaaggt ccttgatga gcgtggcatg gaatctctta aagccatgct gcccttgat 1500

gacactggct caggaacat ctatgacctc cgctactca tgcttgcat cgctcctaac 1560

ctggtctgct gggactatca taccaccac atcaatcagt tgcagctact cagtaccatt 1620

gatgagtcct caatctcaa agaattgtc aagaggtgga aaagctacct taaaggcagc 1680

agggcaaagc acaac 1695

<210> 25

<211> 1695

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 25

gaaaaaagag cagcagcatc tgagagtaac aactatatga accacgtggc caaacaacag 60

tctgaggaag cattccctca ggaacagcag aaagcacccc ctgttggtgg gggcttcaat 120

agcaatgtgg gaagtaagggt gtagggctc aaatatgaag aaattgactg ttcataaat 180

gatgaacaca caattaaagg gagacgagag gggaacgaag tctttcttcc attcacttgg 240

gttgagaaat atttgatgt ttatggaaag gtggttcagt atgatggcta tgatcggttt 300

gaattctctc atagctattc caaagtctat gcacagagag cccctatca ccccgatgg 360

gtgtttatgt ctttgaagg ctacaatgtg gaagtccgag acagagtcaa gtgcataagt 420

ggggttgaag gtgtgccatt atctacacaa tggggacctc aaggctattt ctatccaatc 480

cagattgcac agtatggatt aagtcattac agcaagaatc taactgagaa acctcctcac 540

atagaggtat atgaaacagc agaagacaga gacaaaaaca agcctaataga ctggactgtg 600

ccaaagggtc gctttatggc gaatgtggct gataagtcta gattcaccaa tgtcaaacag 660

tttattgcac cagaaaccag tgaagggtga tccttgcaac tgggaaacac aaaagatttt 720

attatttcat ttgacctcaa gttcttgaca aatggaagtg tgtccgtggg tctagagacc 780

acagaaaaga atcagctctt cactatacat tatgtctcaa atgctcagct aattgctttt 840

aaagaaagag atatatacta tggcattggg cccagaactt catggagcac agttaccagg 900

gacctggtca ctgacctcag gaaaggagtg ggtctttcaa acacaaaagc tgtcaagcca 960

acaaaaataa tgccaagaa ggtggtagg ttgattgcaa aaggtaaggg attcctcgac 1020

aacattacca tctctaccac agcccacatg gctgcattt ttgctgctag tgattggcta 1080

gtaaggaacc aggatgagaa aggtggctgg ccaattatgg tgaccgtaa gtaggggaa 1140

gggttcaagt ctttagagcc aggatggat tctgccatgg cccaaggga agccatttct 1200

acattagtca gggcctatct gtaacaaaa gaccatatat tctcaattc agctttaagg 1260

gcaacagccc cttataagtt tctatctgag cagcatggag ttaaagctgt gtttatgaat 1320

aaacatgact ggtatgaaga atatccaacc acacctagct cttttgtttt aaatggcttt 1380

atgtattctt taattgggct gtatgactta aaagaaactg caggggaaaa actcgaaaa 1440

gaagcaaggc cttgtatga gcgtggcatg gaatctctta aagccatgct gcccttgat 1500

gacactggct caggaacct ctatgacctc cgtcacttca tgcttggcat cgctcctaac 1560

ctggctcgct gggactatca taccaccac atcaatcagt tgcagctact cagtaccatt 1620

gatgagtccc caatcttcaa agaattgtc aagaggtgga aaagctacct taaaggcagc 1680

agggcaaagc acaac 1695

<210> 26

<211> 792

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 26

ggcacagcat ccaatgggtc cacacagcag ctgccacaga ccatcatcat tggggtgcgc 60

aagggtggta cccgagccct gctagagatg ctcagcctgc atcctgatgt tgctgcagct 120

gaaaacgagg tccatttctt tgactgggag gagcattaca gccaaaggcct gggctggtag 180

ctcaccacaga tgcccttctc ctcccctcac cagctcaccg tggagaagac accgcctat 240

tteacttcgc ccaaagtgcc tgagagaatc cacagcatga accccacat ccgcctgctg 300

cttatectga gggacceatc agagcgcgtg ctgtccgact acaccaggt gttgtacaac 360

caccttcaga agcacaagcc ctatccaccc attgaggacc tctaatacg ggacggtcgg 420

ctgaacctgg actacaaggc tctcaaccgc agcctgtacc atgcacacat gctgaactgg 480

ctgcgtttt tcccgttggg ccacatccac attgtggatg gcgaccgcct catcagagac 540
cctttccctg agatccagaa ggtcgaaaga ttctgaagc tttctccaca gatcaacgcc 600
tcgaacttct actttaacaa aaccaagggc ttctactgcc tgcgggacag tggcaaggac 660
cgctgcttac acgagtccaa aggccgggcg caccgccagg tggatcccaa actacttgat 720
aaactgcacg aatactttca tgagccaaat aagaaattt tcaagctcgt gggcagaaca 780
ttcgactggc ac 792

<210> 27

<211> 1170

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 27

atgcaaggta atgcactaac cgttttatta tccggtaaaa aatatctgct attgcagggg 60
ccaatgggac ccttttcag tgatgttgcg gagtggctag agtcattagg tcgtaacgct 120
gtgaatgttg tattcaacgg tggggatcgt ttttactgcc gccatcgaca atacctagct 180
tactaccaga caccgaaaga gtttcccga tggttacggg atctccaccg gcaatatgac 240

tttgacacaa tcctctgctt tggcgactgc cgcccattgc ataaagaagc aaaacgctgg 300

gcaaagtcga aagggatccg cttcctggca ttgaagaag gatatttacg cccgcaattt 360

attaccgttg aagaaggcgg agtgaacgca tattcatcgc taccgcgcga tccggatttt 420

tatcgtaagt taccagatat gcctacgccg cacgttgaga acttaaaacc ttcaacgatg 480

aaacgtatag gccatgctat gtggtattac ctgatgggct ggcattaccg tcatgagttt 540

cctcgctacc gccaccacaa atcattttcc ccctggtatg aagcacgttg ctgggttcgt 600

gcatactggc gcaagcaact ttacaaggta acacagcgta aggtattacc gaggttaatg 660

aacgaactgg accagcgta ttatcttgct gtttgcagg tgtataacga tagccagatt 720

cgtaaccaca gcagttataa cgatgtgcgt gactatatta atgaagtcac gtactcattt 780

tcgcgtaaag cgccgaaaga aagttatttg gtgatcaaac atcatccgat ggatcgtggt 840

cacagactct atcgaccatt aattaaacgg ttgagtaagg aatatggctt aggtgagcga 900

atcctttatg tgcacgatct cccgatgccg gaattattac gccatgcaaa agcggtggtg 960

acgattaaca gtacggcggg gatctctgcg ctgattcata acaaaccact caaagtgatg 1020

ggcaatgccc tgtacgacat caagggcttg acgtatcaag ggcatttgca ccagttctgg 1080

caggctgatt ttaaaccaga tatgaaactg ttaagaagt ttcgtgggta ttattggtg 1140

aagacgcagg ttaatgcggt ttattattaa 1170

<210> 28

<211> 717

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 28

atgattgttg caaatatgtc atcatacca cctcgaaaaa aagagttggt gcattctata 60

caaagtttac atgctcaagt agataaaatt aatctttgcc tgaatgagtt tgaagaaatt 120

cctgaggaat tagatgggtt ttcaaaatta aatccagtta ttccagataa agattataag 180

gatgtgggca aatttatatt tccttgcgct aaaaatgata tgatcgact tacagatgat 240

gatattattt accctccga ttatgtagaa aaaatgctca atttttataa ttctttgca 300

atattcaatt gcattgttgg gattcatggc tgtatataca tagatgcatt tgatggagat 360

cagtctaaaa gaaaagtatt ttcatctact caagggctat tgcgaccgag agttgtaaat 420

caattaggta cagggactgt ttttctaag gcagatcaat taccatcttt aaaatatatg 480

gatggttctc aacgattcgt cgatgttaga tttctcgct atatgttaga gaatgaaatt 540

ggtatgatat gtgttcccag agaaaaaac tggctaagag aggtctcatc aggttcaatg 600

gaaggacttt ggaacacatt tacaaaaaaa tggccttag acatcataaa agaaacacaa 660

gcaatcgcag gatattcaaa acttaacctc gaattagtgt ataatgtgga agggtaa 717

<210> 29

<211> 1689

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 29

atgaataaat tagtgctagt cggacatcct ggctcaaagt atcagatagt tgaacatttt 60

ttgaaagaaa ttggcatgaa ctaccaaatt tattctacaa gtaataaaat ttcccagaa 120

tatatcaccg cttcattatg tcaattttat caaacaccag aagttaatga tgtagtagat 180

gagagagaat tctcagctgt tcaagtctca accatgtggg atagcatggg tcttgaacta 240

atgatgaaca atctaaataa caaactttgg ggggtgggcag atccatctat aatatttttt 300

cttgattttt ggaaaaatat agataaaagc ataaaattca tcatgatata tgatcacct 360

aaatataatt taatgcgttc agtaaataat gcccctctct ctftaaatat aaataatagt 420

gtagataact ggattgcata taataaaaga ttgcttgatt ttttttgga gaataaagaa 480

cgatgtgtgt tgattaattt tgaggcggtt caaagcaata agaaaaatat tataaagcca 540

ttgagtaata ttataaaaat agataatcta atgtctgcgc attacaaaaa ttcaatattg 600

tttgatgtgg ttgagaataa tgattataca aaatcaaag aaattgccct gcttgaaaaa 660

tatacaactt tattttcttt aagtgcaaat gagactgaaa ttacatttaa tgatacaaag 720

gttagtgagt acttagtata tgaattaata aaagaaagaa ccgagggttct gaagctttat 780

aatgagttac aagcctatgc aaacctacct tatatagaaa catcgaaaga taacgtttcg 840

gctgaggctg cattatggga ggtagtcgaa gagagaaatt ctatcttcaa tattgtatct 900

catttggtgc aagagtcaaa aaagaaggat gcagatattg aattgactaa atctatattt 960

aagaaaagac aatttttatt attgaacagg attaatgagc taaaaaaaga aaaggaagag 1020

gtaattaaac ttcaaaaat aaatcacaac gatgttgtga gacaagaaaa atatccagat 1080

gatattgaaa aaaaaataaa tgacatacag aaatatgaag aagagataag cgaaaaagaa 1140

tcaaaactca ctcaggcaat atcagaaaaa gaacagattt taaaacaatt gcataaatat 1200

gaagaagaga taagcgaaaa agaatacaaaa ctactcagg caatatcaga aaaagaacag 1260

attttaaac aattgcatat agtgcaagag cagttggaac actattttat agaaaatcag 1320

gaaattaaaa agaaacttc accgtgcta tatggagcag ctgagcagat aaaacaagag 1380

ttaggttatc gacttggtta tattatagtc tcgtattcta aatccctcaa ggggattatt 1440

accatgccat ttgcacttat ccgtgagtgt gttttgaaa aaaaacgtaa gaagagttat 1500

ggcgttgatg tgccactcta ttatatgct gatgctgata aggctgaaag agttaagaaa 1560

catttatctt atcaattagg gcaggetatt atctccagt ctaattcgat atttgattc 1620

attacccttc catttaagtt aattgttgtt gtttataaat ataggagagc taaaatcaag 1680

ggctgttaa 1689

<210> 30

<211> 1563

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 30

atgaacgcag aatatataaa tttagttgaa cgtaaaaaga aattagggac aaatattggt 60

gctcttgatt ttttattatc aattcataag gagaaagttg atcttcaaca taaaaactcg 120

cctttaaag gtaacgataa ccttattcac aaaagaataa acgaatacga caatgtactt 180

gaactatcta agaatgtatc agctcagaat tctggcaatg agttttctta tttattggga 240

tatgcagatt ctcttagaaa agttgggatg ttggatactt atattaaaat tgtttggtat 300

ctaacaattc aatctcgta ttttaaaaat ggccaacgag ttaagctttt tgaacatata 360

agtaacgctc tacggatttc aaggagtgat ttctcatta atcttatttt tgaacgatat 420

atcgaatata taaaccatct aaaattgtcg cccaacaaa aagattttta ttttgtacg 480

aagttttcaa aatttcatga ttatactaaa aatggatata aatatttagc atttgataat 540

caagccgatg cagggtatgg cctgacttta ttattaaatg caaacgatga tatgcaagat 600

agttataatc tactccctga gcaagaactt tttatttgta atgctgtaat agataatatg 660

aatatttata ggagtcaatt taacaaatgt ctacgaaaat acgatttate agaaataact 720

gatatatacc caaataaaat tatattgcaa ggaattaagt tcgataagaa aaaaaatgtt 780

tatggaaaag atcttgtag tataataatg tcagtattca attcagaaga tactattgca 840

tactcattac attcattgtt gaatcaaaca tatgaaaata ttgaaattct cgtgtgcat 900

gattgtcat cggacaaaag ccttgaaata attaagagca tagcttattc tgattcaaga 960

gtgaaagtat atagctcacg aaaaaaccaa ggcccttata atataagaaa tgagctaata 1020

aaaaaagcac acggtattt catcacctt caagatgcag atgatcttc tcatccggag 1080

agaatacaaa gacaagtga ggtcttcgc aataataagg ctgtaactg tatggctaac 1140

tggatccgtg ttgcgcaaa tggaaaaatt caattcttct atgatgataa agccacaaga 1200

atgtctgtg tatcgtaac gataaaaaa gatattttg cgacagttgg tggctataga 1260

caatctttaa ttggtgcaga tacggagttt tatgaaacag taataatgcg ttatgggcga 1320

gaaagtattg taagattact gcagccattg atattggggg tatggggaga ctccggactt 1380

accaggaata aaggaacaga agctctacct gatggatata taccacaatc tcgaagagaa 1440

tatagtata tcgaggcaag acaacgagtg ttagggaaaa gtatcgtaag tgataaagat 1500

gtacgtggtt tattatctcg ctatggttg tttaaagatg taccaggaat aattgaacaa 1560

tag 1563

<210> 31

<211> 1179

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 31

atgttcggaa cactaaaaat aactgtttca ggcgctgggtt acgttgggct ttcaaatgga 60

attctaattg ctcaaaatca tgaagtgggtt gcatttgata cccatcaaaa aaaagttgac 120

ttacttaatg ataaactctc tcctatagag gataaggaaa ttgaaaatta tctttcaact 180

aaaatactta attttcgcg cactactaac aaatatgaag cctataaaaa tgccaattac 240

gttattattg ctacaccaac gaattatgac ccaggttcaa attactttga tacatcaagc 300

gttgaagctg tcattcgtga cgtaacggaa atcaacccaa acgcaattat ggtggttaaa 360

tctacgggcc cagtaggttt cacaaaaaca attaaagaac atttaggtat taataatatt 420

atcttctctc cagaattttt acgagaagga agagccctat acgataatct ccatccatct 480

cgcattatta tcggtgaatg ttctgaacgg gcagaacgtt tggcagtgtt atttcaggaa 540

ggagcɡatta aacaaaatat acccgtttta ttacagatt ctacɡgaagc ggaagcgatt 600

aagttatfff caaatactta ttggctatg cgagttgcat ttttaatga attggatagt 660

tacgcagaaa gtttggctct gaatacgcgt cagattattg acggtgttg ttggatccg 720

cgcatggta attactacaa taatccttct ttggttatg gtggctactg ttgccaaaa 780

gataccaagc aattattagc caactatcag tctgttccga ataaacttat atctgcaatt 840

gttgatgcta accgtacacg taaggacttt atcactaatg ttatttgaa acatagacca 900

caagttgtgg gggtttatcg ttgattatg aaaagtgggt cagataattt tagagattct 960

tctattcttg gtattataaa gcgtatcaag aaaaaggcg tgaaagtaat tatttatgag 1020

ccgcttattt ctggagatac attctttaac tcaccttgg aacgggagct ggcatcttt 1080

aaagggaag ctgatattat taccactaac cgaatgtcag aggagtgaa cgatgtggc 1140

gacaaagtct atagtcgca ttgtttaaa tggactaa 1179

<210> 32

<211> 855

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 32

atggtactga tgatcgtagc cggacgttca gggtcaggta aatctgtcgc cctgcgtgcg 60

ctggaagata tgggttttta ctgcgtggat aaccttccc tagtggtgtt accgatctg 120

gctcgaactc tggccgatcg agagatttct gccgccgtca gcattgatgt tcgtaatatg 180

ccggagtcac cagaaatatt cgaacaggcg atgagtaacc tgectgacgc ttctcaccg 240

caactactgt tctggatgc cgaccgtaat accttaattc gtcgttacag tgacacgcgc 300

cgactgcac cgtttccag caaaaacctg tcgctggaaa gtgctatcga caaagaaagc 360

gatttgctgg agcctctgcg ttcgcgagcg gatctgattg tcgacacctc agaaatgtcc 420

gttcacgagc tggcagaaat gctgcgtacc cgtctgctgg gtaaactga acgtgaactg 480

accatggtct ttgagcttt cggcttcaaa cacggtatcc ctatcgatgc agattacgtc 540

tttgacgtgc gttcttggc gaaccgcac tgggatccga aactgcgtcc aatgacaggt 600

cttgataaac ctgtcgccgc gttctcgac cgccacacag aagtacacaa tttatctac 660

cagacgcgaa gctatcttga gctatggta cctatgctgg aaaccaacaa ccgtagctac 720

ctgacggteg ccattggttg taccggcggg aagcaccgtt cgggtatat tgacagagcaa 780

ctggcagact acttccgctc gcgcggtaaa aacgtccagt cacgccatcg gacgctggaa 840

aaacgtaaac catga

855