(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) **1-0051126**

(51)[2022.01] **C12N 15/113**; C12R 1/15; C12N 15/77; C12P 13/08; C12N 1/21; C12N 15/53

(13) **B**

(21) 1-2023-01669

(22) 15/07/2021

(86) PCT/CN2021/106501 15/07/2021

(87) WO 2022/037338 24/02/2022

(30) 202010838604.9 19/08/2020 CN

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/06/2023 423A

(73) TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (CN)
32 West 7th Avenue, Tianjin Airport Economic Area, Tianjin 300308 China

(72) ZHENG, Ping (CN); LIU, Jiao (CN); SUN, Jibin (CN); ZHOU, Wenjuan (CN); SHI, Tuo (CN); GUO, Xuan (CN); MA, Yanhe (CN).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT TÍNH TRÌNH TỰ KHỞI ĐẦU VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT AMIN SỬ DỤNG POLYNUCLEOTIT NÀY

(21) 1-2023-01669

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu. Sáng chế cũng đề cập đến caset biểu hiện phiên mã, vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và tế bào chủ tái tổ hợp chứa polynucleotit, và phương pháp tăng cường sự biểu hiện gen đích, phương pháp điều chế protein, và phương pháp sản xuất axit amin. Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu là thể đột biến của polynucleotit có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9. So với polynucleotit có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, hoạt tính trình tự khởi đầu của thể đột biến được tăng cường đáng kể, bằng cách đó thúc đẩy sự biểu hiện gen đích một cách ổn định và hiệu quả.

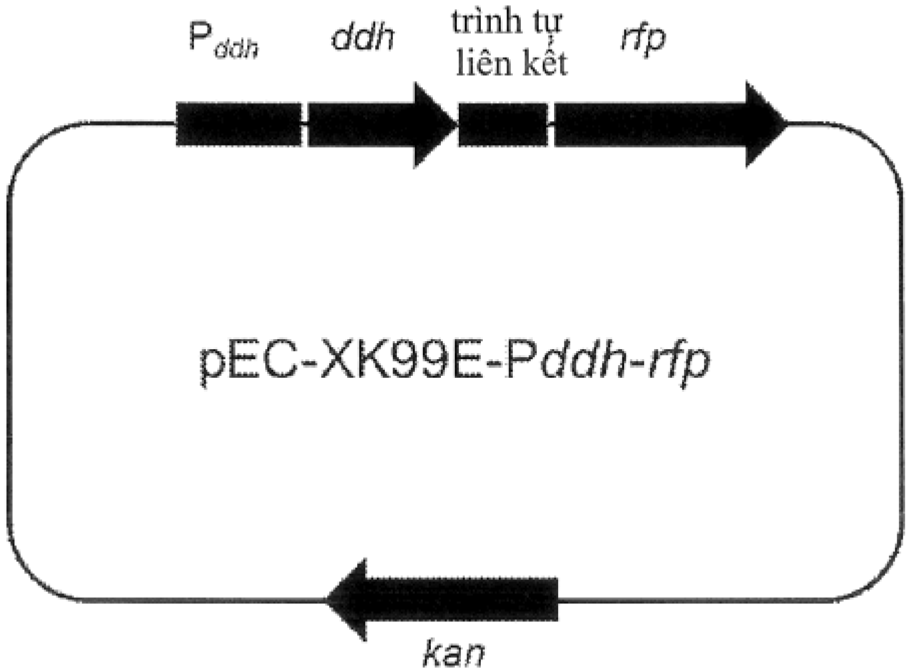

FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc về lĩnh vực sinh học phân tử và công nghệ sinh học, và đặc biệt là đề cập đến polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, caset biểu hiện phiên mã, vectơ biểu hiện tái tổ hợp và tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, cũng như phương pháp tăng cường sự biểu hiện gen đích, phương pháp điều chế các protein và phương pháp sản xuất các axit amin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lysin, tên hóa học của là axit 2,6-diaminpimelic, là axit amin thiết yếu cho động vật và con người. Nó có thể thúc đẩy sự phát triển của con người, tăng cường khả năng miễn dịch và có tác dụng cải thiện chức năng của hệ thần kinh trung ương. Có ba chất đồng phân quang học hóa học của lysin: dạng L (quay trái), dạng D (quay phải) và dạng DL (dạng raxemic), trong đó chỉ có dạng L là có thể sử dụng được về mặt sinh học, và lysin thường được nhắc đến là L-lysin.

L-lysin là một trong số 20 axit amin thông thường tạo nên các protein. L-lysin là một axit amin cơ bản, giống như histidin và arginin. Do cơ thể người và cơ thể động vật không thể tự tổng hợp L-lysin, L-lysin chỉ có thể thu được từ thức ăn, do đó nó là một trong số tám axit amin thiết yếu. Hàm lượng của L-lysin trong thức ăn ngũ cốc chủ yếu của con người là thấp, và sự thiếu hụt nó sẽ gây ra các rối loạn chuyển hóa và chức năng của protein, ảnh hưởng bất lợi đến sự phát triển, và dễ bị phá hủy trong quá trình chế biến, do đó được gọi là axit amin giới hạn thứ nhất, đóng vai trò rất quan trọng trong y học, y tế, các ngành công nghiệp thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và mỹ phẩm.

Cho tới nay, có ba phương pháp chính để sản xuất L-lysin trong công nghiệp: phân giải protein, tổng hợp hóa học và lên men vi khuẩn. Trong số chúng, lên men vi khuẩn là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để sản xuất L-lysin trong công nghiệp vì các ưu điểm của nó như chi phí sản xuất thấp, cường độ sản xuất cao, tính đặc hiệu cao và ô nhiễm môi trường thấp. *Corynebacterium* và *Escherichia* đã được sử dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất L-lysin trong công nghiệp. *Escherichia* thường được sử dụng là, chẳng hạn, *Escherichia coli*, và *Corynebacterium* thường được sử dụng bao gồm *Corynebacterium glutamicum* của giống *Corynebacterium*, *Brevibacterium flavum* của giống *Brevibacterium*, *Brevibacterium lactofermentus*, và một số loài của giống *Arthrobacterium* và một số loài của giống *Microbacterium*.

Trong số các vi sinh vật và các thực vật đã được biết đến là có con đường sinh tổng hợp L-lysin, các con đường tổng hợp L-lysin có thể được phân loại thành hai con đường riêng biệt, nghĩa là con đường axit alpha-aminglycolic (alpha- aminoglycolic acid, AAA) và con đường diaminpimelat (diaminopimelate, DAP). Con đường diaminpimelat (DAP) là một phần của con đường tổng hợp các axit amin của họ axit aspartic. Bằng cách sử dụng axit aspartic làm cơ chất, con đường DAP bao gồm con đường sucxinylaza, con đường axetylaza và con đường transaminaza tổng hợp axit meso-diaminpimelic, và con đường dehydrogenaza trực tiếp tổng hợp axit diaminpimelic raxemic mà không trải qua axit meso-diaminpimelic.

Corynebacterium glutamicum là vi sinh vật công nghiệp quan trọng, và lợi thế của nó nằm ở khả năng của nó trong quá trình sản xuất lên men các axit amin quy mô công nghiệp. *Corynebacterium glutamicum* sử dụng con đường dehydrogenaza để tổng hợp L-lysin với sáu enzym xúc tác phản ứng, nghĩa là, aspartat kinaza (AK, được mã hóa bởi gen *lysC)*, aspartat semialdehyt dehydrogenaza (ASADH, được mã hóa bởi gen *asd)*, dihydrodipicolinat synthaza (DHDPS, được mã hóa bởi gen *dapA)*, dihydrodipicolinat reductaza (DHDPR, được mã hóa bởi gen *dapB)*, diaminpimelat dehydrogenaza (DAPDH, được mã hóa bởi gen *ddh)* và diaminpimelat decarboxylaza (DAPDC, được mã hóa bởi gen *lysA*). Quy trình tổng hợp L-lysin bởi *Corynebacterium glutamicum* bằng cách sử dụng con đường sucxinylaza cũng liên quan đến bốn enzym tổng hợp axit meso-diaminpimelic: tetrahydrodipicolinat sucxinylaza (được mã hóa bởi gen *dapD*), N-sucxinyldiaminpimelat amintransferaza (được mã hóa bởi gen *dapC*), sucxinyl diaminpimelat deaxylaza (được mã hóa bởi gen *dapE*) và diaminpimelat epimeraza (được mã hóa bởi gen *dapF*). Như đã biết, việc tăng cường biểu hiện của một hoặc nhiều gen trong con đường tổng hợp L-lysin có thể làm tăng sản lượng L-lysin một cách hiệu quả.

Tài liệu tham khảo 1 bộc lộ vi khuẩn *Corynebacterium* có, ngoài ít nhất một bản sao, có mặt ở vị trí tự nhiên (locus), của khung đọc mở (open reading frame, ORF), gen hoặc alen mã hóa quá trình tổng hợp protein hoặc ARN, trong mỗi trường hợp bản sao thứ hai, tùy ý thứ ba hoặc thứ tư của khung đọc mở (ORF) này, gen hoặc alen ở vị trí thứ hai, tùy ý thứ ba hoặc thứ tư trong mỗi trường hợp ở dạng hợp nhất vào nhiễm sắc thể. Vi khuẩn *Corynebacterium* của phương pháp này có thể cải thiện mức biểu hiện gen bằng cách tăng số lượng bản sao của các gen, bằng cách đó tăng sản lượng các axit amin được sản xuất bởi vi khuẩn *Corynebacterium*. Tuy nhiên, việc tăng số lượng bản sao gen sẽ làm giảm độ ổn định của hệ gen của chủng, do đó không thể bảo đảm sản xuất L-lysin một cách ổn định và hiệu quả.

Tài liệu tham khảo 2 bộc lộ phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách nuôi cấy *Escherichia coli* có khả năng sản xuất L-lysin trong môi trường từ đó L-lysin được thu hồi, *Escherichia coli* được thường biến để làm giảm hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều enzym trong con đường tổng hợp axit meso α,ε-diaminpimelic, chẳng hạn, 2,3,4,5-tetrahydropyridin-2,6-dicarboxylat N-sucxinyltransferaza, sucxinyldiaminpimelat transaminaza, sucxinyldiaminpimelat desucxinylaza, và diaminpimelat epimeraza, và *Escherichia coli* được đưa vào bằng gen mã hóa diaminpimelat dehydrogenaza. Phương pháp này đòi hỏi phải tăng sự biểu hiện của diaminpimelat dehydrogenaza trong lúc ức chế hoạt tính enzym của con đường tổng hợp axit meso α,ε-diaminpimelic, vốn gặp phải các vấn đề về quy trình vận hành phức tạp, chi phí cao và không có khả năng sản xuất L-lysin một cách hiệu quả.

Tài liệu tham khảo 3 bộc lộ phân tử axit nucleic có thể được buộc bằng gen mã hóa diaminpimelat dehydrogenaza, và hoạt tính diaminpimelat dehydrogenaza có thể được tăng để bằng cách đó tăng hiệu suất L-lysin của chủng này. Mặc dù trong tài liệu này phân tử axit nucleic có hoạt tính cao hơn so với trình tự khởi đầu kiểu dại, không biết được liệu có một phân tử axit nucleic nào có hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn. Như đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này, hoạt tính diaminpimelat dehydrogenaza càng cao, thì càng thuận lợi cho việc sản xuất lysin. Do đó,việc phát triển một hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn sẽ có lợi cho việc gia tăng sự biểu hiện của diaminpimelat dehydrogenaza, do đó có tiềm năng hơn cho các ứng dụng công nghiệp.

Tài liệu tham khảo:

Tài liệu tham khảo 1: CN1748031A

Tài liệu tham khảo 2: CN101765659A

Tài liệu tham khảo 3: CN101939432A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Dựa vào vấn đề kỹ thuật tồn tại trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết, chẳng hạn, vi khuẩn *Corynebacterium* làm tăng hiệu suất bằng cách gia tăng số lượng bản sao của các gen có tính ổn định hệ gen kém, chủng có khả năng sản xuất L-lysin có các nhược điểm về quá trình biến nạp phức tạp và không có khả năng sản xuất L-lysin một cách ổn định và hiệu quả. Sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được cải thiện đáng kể so với trình tự khởi đầu của gen *ddh* kiểu dại. Bằng cách buộc theo cách có thể thực hiện được polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu với gen đích, cường độ biểu hiện gen đích có thể được cải thiện trong lúc duy trì tính ổn định của hệ gen.

Giải pháp để giải quyết vấn đề

(1) Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, trong đó polynucleotit này được chọn từ nhóm được thể hiện trong phần bất kỳ trong số các phần tử (i)-(ii) sau đây:

(i) thể đột biến của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, bao gồm nucleotit đột biến ở một hoặc nhiều vị trí trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9;

(ii) polynucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, tùy ý ít nhất 95%, tốt hơn là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, và tốt nhất là ít nhất 99% so với trình tự như được nêu trong phần (i) và không bao gồm trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9;

trong đó thể đột biến có hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn hoạt tính trình tự khởi đầu của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9;

và trình tự nucleotit của thể đột biến ở vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9 không được chọn từ ATGCATTGT.

(2) Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục (1), trong đó thể đột biến này có hoạt tính trình tự khởi đầu tăng gấp 18 lần hoặc hơn so với hoạt tính trình

tự khởi đầu của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

(3) Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục (1) hoặc (2), trong đó thể đột biến bao gồm các nucleotit đột biến ở các vị trí 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9; tốt hơn là, thể đột biến này bao gồm các nucleotit đột biến ở các vị trí 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục bất kỳ một trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó trình tự nucleotit ở vị trí 292 đến vị trí 300 của polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các nhóm sau đây:

(a) ACAAAAGGT;

(b) TCTTCATCT;

(c) GGAAAGTAT;

(d) TTATTATAT;

(e) TAATCCTCT;

(f) TCAATTTAT;

(g) GCGCAATCT;

(h) CAGTTCCGT;

(i) AAGTTTTAT;

(g) TAAATGTAT;

(k) GGATTGTAT;

(l) CAAACTCAT;

(m) TACAAATCT;

(n) TATCAGTCT;

(o) CGAGGATAT;

(p) CCTTGTTAT.

(5) Caset biểu hiện phiên mã bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4); tùy ý, caset biểu hiện phiên mã này còn bao gồm gen mã hóa protein, gen mã hóa protein này được buộc theo cách có thể thực hiện được với polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu.

(6) Vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) hoặc caset biểu hiện phiên mã theo mục (5).

(7) Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm caset biểu hiện phiên mã theo mục (5) hoặc vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo mục (6).

(8) Tế bào chủ tái tổ hợp theo mục (7), trong đó tế bào chủ này là từ giống *Corynebacterium*, giống *Brevibacterium*, giống *Arthrobacterium*, giống *Microbacterium* hoặc giống *Escherichia*; tốt hơn là, tế bào chủ này là *Corynebacterium glutamicum*; tốt hơn nữa là, tế bào chủ này là *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 hoặc các chủng dẫn xuất của chúng.

(9) Sử dụng polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), caset biểu hiện phiên mã theo mục (5), vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo mục (6), hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (8)

để điều chế chất phản ứng hoặc bộ kit tăng cường mức phiên mã gen.

(10) Sử dụng vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo mục (6), hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (8) để điều chế protein hoặc sản xuất axit amin và các dẫn xuất của nó; tùy ý, axit amin và các dẫn xuất của nó được chọn từ một axit amin hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều axit amin trong số các axit amin sau đây: prolin, hydroxyprolin, lysin, axit glutamic, arginin, ornithin, glutamin, threonin, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, xystein, methionin, axit aspartic, asparagin, histidin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit 5-aminlevulinic hoặc các dẫn xuất của axit amin bất kỳ trong số các axit amin nêu trên;

tốt hơn là, protein này là enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin; tốt hơn là, enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin là diaminpimelat dehydrogenaza;

tốt hơn là, axit amin này bao gồm L-lysin và các dẫn xuất của nó, trong đó các dẫn xuất này bao gồm ít nhất một loại trong số pentandiamin, axit 5-aminpentanoic và axit glutaric.

(11) Phương pháp tăng cường sự biểu hiện gen đích, trong đó phương pháp này bao gồm bước buộc theo cách có thể thực hiện được polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) với ARN đích hoặc gen đích; tùy ý, ARN đích bao gồm ít nhất một trong số ARN vận chuyển (transfer RNA, tRNA) và ARN ngắn (short RNA, sRNA), và gen đích bao gồm ít nhất một loại trong số gen mã hóa của protein liên quan đến sự tổng hợp sản phẩm đích, gen mã hóa của protein điều hòa sự biểu hiện gen và gen mã hóa của protein liên quan đến sự vận chuyển qua màng.

(12) Phương pháp điều chế protein, trong đó caset biểu hiện phiên mã theo mục (5), vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo mục (6), hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (8) được chọn để biểu hiện protein; tùy ý, protein là protein liên quan đến quá trình tổng hợp sản phẩm đích, protein liên quan đến sự vận chuyển qua màng hoặc protein điều hòa sự biểu hiện gen; tùy ý, protein là enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin; tùy ý, enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin bao gồm một enzym hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều enzym trong số aspartat kinaza, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, aspartat amoniac lyaza, dihydrodipicolinat synthaza, dihydrodipicolinat reductaza, sucxinyl diaminpimelat amintransferaza, tetrahydrodipicolinat sucxinylaza, sucxinyl diaminpimelat deaxylaza, axit diaminpimelic epimeraza, axit diaminpimelic deaxylaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, protein vận chuyển lysin, transketolaza, diaminpimelat dehydrogenaza và pyruvat carboxylaza; tốt hơn là, protein là diaminpimelat dehydrogenaza.

(13) Phương pháp sản xuất axit amin và các dẫn xuất của nó, trong đó caset biểu hiện phiên mã theo mục (5), vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo mục (6), hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (7) đến (8) được chọn để biểu hiện enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin và các dẫn xuất của nó, và enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin và các dẫn xuất của nó được sử dụng để sản xuất axit amin và các dẫn xuất của nó; tùy ý, axit amin và các dẫn xuất của nó được chọn từ một axit amin hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều axit amin trong số: prolin, hydroxyprolin, lysin, axit glutamic, arginin, ornithin, glutamin, threonin, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, xystein, methionin, axit aspartic, asparagin, histidin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit 5-aminlevulinic hoặc các dẫn xuất của axit amin bất kỳ trong số các axit amin nêu trên;

tốt hơn là, axit amin bao gồm L-lysin và các dẫn xuất của nó, trong đó các dẫn xuất bao gồm ít nhất một loại trong số pentandiamin, axit 5-aminpentanoic và axit glutaric;

tốt hơn là, enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin là diaminpimelat dehydrogenaza.

Hiệu quả của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, là thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza (gen *ddh*) với hoạt tính trình tự khởi đầu được cải thiện đáng kể. So với trình tự khởi đầu gen *ddh* kiểu dại, thể đột biến có hoạt tính trình tự khởi đầu được cải thiện đáng kể, và việc buộc theo cách có thể thực hiện được nó với gen đích có khả năng cải thiện đáng kể cường độ biểu hiện gen đích mà không phá hỏng tính ổn định của hệ gen, và gen đích có thể được biểu hiện một cách ổn định và hiệu quả, và có thể thực hiện việc sản xuất ổn định và hiệu quả các sản phẩm xuôi dòng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất caset biểu hiện phiên mã, vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và tế bào chủ tái tổ hợp, bao gồm polynucleotit đã nêu ở trên có hoạt tính trình tự khởi đầu. Trong caset biểu hiện phiên mã, vectơ biểu hiện tái tổ hợp và tế bào chủ tái tổ hợp, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được buộc theo cách có thể thực hiện được với gen mã hóa protein, cường độ biểu hiện của gen mã hóa protein có thể được cải thiện.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế axit amin, có thể tăng cường sự biểu hiện của enzym để tổng hợp axit amin bằng cách sử dụng polynucleotit đã nêu ở trên có hoạt tính trình tự khởi đầu, và sau đó axit amin có thể được sản xuất một cách ổn định và hiệu quả. Khi nó được sử dụng trong quá trình sản xuất L-lysin, có thể thu được L-lysin với sản lượng cao và ổn định.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ phác họa của plasmit pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp*.

Fig.2 thể hiện kết quả huỳnh quang biểu lộ các dòng vô tính đột biến phát triển trên đĩa nuôi cấy, và vị trí được đánh dấu bằng mũi tên trong hình vẽ cho biết một dòng vô tính riêng lẻ biểu lộ huỳnh quang đỏ có cường độ cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Khi được sử dụng phối hợp với thuật ngữ “bao gồm” trong các điểm yêu cầu bảo hộ và/hoặc bản mô tả, danh từ số ít có thể chỉ “một”, hoặc chỉ “một hoặc nhiều”, “ít nhất một”, và “một hoặc nhiều hơn một”.

Như được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ và bản mô tả, thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “gồm”, hoặc “chứa” nhằm mục đích tính toàn bộ hoặc không giới hạn, và không loại trừ các yếu tố hoặc các bước phương pháp bổ sung hoặc không được trích dẫn.

Từ đầu đến cuối tài liệu sáng chế, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị bao gồm độ lệch chuẩn của lỗi của thiết bị hoặc phương pháp được sử dụng để đo giá trị.

Có thể áp dụng cho nội dung được bộc lộ ở đây rằng thuật ngữ “hoặc” chỉ được định nghĩa là các lựa chọn và “và/hoặc”, nhưng thuật ngữ “hoặc” được sử dụng ở đây dùng để chỉ “và/hoặc”, trừ khi có quy xác định ràng khác, đơn thuần là các lựa chọn hoặc loại từ lẫn nhau giữa các lựa chọn.

"Khoảng số" được chọn/tùy ý/được ưu tiên khi được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ và bản mô tả, bao gồm không chỉ các điểm cuối bằng số ở cả hai đầu của khoảng này, mà còn bao gồm tất cả các số tự nhiên được bao gồm giữa các điểm cuối bằng số trước đó đối với các điểm cuối bằng số này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ polyme gồm các nucleotit. Polynucleotit có thể ở dạng của một đoạn riêng lẻ hoặc một thành phần của cấu trúc trình tự nucleotit lớn hơn, và nó có nguồn gốc từ trình tự nucleotit được tách ra ít nhất một lần về số lượng hoặc nồng độ và có thể được nhận biết, thao tác và khôi phục từ trình tự và các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng các phương pháp sinh học phân tử chuẩn (như bằng cách sử dụng vectơ tách dòng). Khi trình tự nucleotit được biểu thị bằng trình tự ADN (nghĩa là, A, T, G, C), trình tự này còn bao gồm trình tự ARN (nghĩa là, A, U, G, C), trong đó "U" thay thế "T". Nói cách khác, "polynucleotit" dùng để chỉ polyme nucleotit đã được loại bỏ khỏi các nucleotit khác (một đoạn riêng lẻ hoặc toàn bộ đoạn), hoặc có thể là một phần hoặc thành phần cấu thành của cấu trúc nucleotit lớn hơn, như vectơ biểu hiện hoặc trình tự đa xistron. Polynucleotit bao gồm các trình tự ADN, ARN và ADN bổ trợ (complementary DNA, cDNA).

Theo sáng chế, thuật ngữ "đột biến" dùng để chỉ nucleotit bao gồm các đột biến ở một hoặc nhiều (chẳng hạn, một vài) vị trí của polynucleotit, và duy trì hoạt tính trình tự khởi đầu của polynucleotit. Theo sáng chế, đột biến (bao gồm thay thế, xen và/hoặc xóa) đặc biệt dùng để chỉ đột biến thay thế, có nghĩa là sự thay thế nucleotit chiếm một vị trí bằng một nucleotit khác. Đột biến xóa dùng để chỉ việc loại bỏ nucleotit chiếm một vị trí nhất định. Đột biến xen dùng để chỉ việc bổ sung một nucleotit liền kề và ngay sau một nucleotit chiếm một vị trí.

Theo một số phương án cụ thể, "đột biến" theo sáng chế bao gồm các nucleotit được thế ở một hoặc nhiều vị trí trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, và không bao gồm nucleotit được thế bởi ATGCATTGT trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9. Các thể đột biến với các nucleotit được thế ở các vị trí nêu trên có hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn hoạt tính trình tự khởi đầu của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Ví dụ, "đột biến" theo sáng chế bao gồm các nucleotit được thế ở các vị trí 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án cụ thể, "đột biến" theo sáng chế bao gồm các nucleotit bao gồm các đột biến ở các vị trí 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, tốt hơn là các nucleotit chứa các đột biến ở các vị trí 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9. Các thể đột biến với các nucleotit được thế ở các vị trí nêu trên có hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn các thể đột biến với các nucleotit được thế ở các vị trí khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ "độ đồng nhất trình tự" và "tỷ lệ phần trăm đồng nhất" dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc các axit amin giống nhau (nghĩa là, giống hệt) giữa hai hoặc nhiều polynucleotit hoặc polypeptit. Độ đồng nhất trình tự giữa hai hoặc nhiều polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng các trình tự nucleotit hoặc axit amin của các polynucleotit hoặc các polypeptit, cho điểm số lượng các vị trí ở đó các gốc nucleotit hoặc axit amin giống hệt nhau trong các polynucleotit hoặc các polypeptit đã được sắp thẳng hàng, và so sánh số lượng của các vị trí này với số lượng của các vị trí tại đó các gốc nucleotit hoặc axit amin khác nhau trong các polynucleotit hoặc các polypeptit đã được sắp thẳng hàng. Các polynucleotit có thể khác nhau ở một vị trí, chẳng hạn, bằng cách chứa một nucleotit khác (nghĩa là, thay thế hoặc đột biến) hoặc xóa nucleotit (nghĩa là, xen nucleotit hoặc xóa nucleotit trong một hoặc hai polynucleotit). Các polypeptit có thể khác nhau ở một vị trí, chẳng hạn, bằng cách chứa một axit amin khác (nghĩa là, thế hoặc đột biến) hoặc xóa axit amin (nghĩa là, xen axit amin hoặc xóa axit amin trong một hoặc hai polypeptit). Độ đồng nhất trình tự có thể được tính bằng cách chia số lượng của các vị trí tại đó các gốc nucleotit hoặc axit amin giống hệt nhau cho tổng số lượng của các gốc nucleotit hoặc axit amin trong polynucleotit hoặc polypeptit. Chẳng hạn, tỷ lệ phần trăm đồng nhất có thể được tính bằng cách chia số lượng của các vị trí tại đó các gốc nucleotit hoặc axit amin giống hệt nhau cho tổng số lượng của các gốc nucleotit hoặc axit amin trong polynucleotit hoặc polypeptit, và nhân kết quả với 100.

Theo một số phương án cụ thể, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu bao gồm các trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% và 100% so với thể đột biến của polynucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo sáng chế, có một tỷ lệ phần trăm cụ thể của độ đồng nhất trình tự có nghĩa là trong thể đột biến của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9 có trình tự đột biến có thể duy trì hoặc cải thiện hoạt tính phiên mã của thể đột biến.

Theo sáng chế, thuật ngữ "trình tự khởi đầu" dùng để chỉ phân tử axit nucleic, thường nằm ngược dòng của trình tự mã hóa của gen đích, cung cấp vị trí nhận biết cho polymeaza của ARN, và nằm ngược dòng theo hướng 5' của của vị trí khởi đầu phiên mã của ARN thông tin (messenger, mRNA). Đó là trình tự axit nucleic chưa được dịch mã gắn kết với polymeaza của ARN và khơi mào quá trình phiên mã của gen đích. Trong quá trình tổng hợp axit ribonucleic (RNA), trình tự khởi đầu có thể tương tác với các yếu tố phiên mã và điều hòa sự phiên mã gen và kiểm soát thời gian bắt đầu và mức độ biểu hiện gen (phiên mã), và nó bao gồm vùng trình tự khởi đầu lõi và vùng điều hòa, có chức năng giống như “công tắc”, xác định hoạt tính của gen và sau đó kiểm soát loại protein mà tế bào bắt đầu sản xuất.

Theo sáng chế, thuật ngữ “vùng trình tự khởi đầu lõi” dùng để chỉ trình tự axit nucleic nằm trong vùng trình tự khởi đầu của các sinh vật chưa có nhân điển hình, và đó là vùng trình tự lõi đóng vai trò của trình tự khởi đầu, chủ yếu bao gồm vùng -35, vùng -10, và vùng giữa vùng -35 và vùng -10, và vị trí khởi đầu phiên mã, vùng -35 là vị trí nhận biết polymeaza của ARN, và vùng -10 là vị trí gắn kết của polymeaza của ARN.

Theo một số phương án cụ thể, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể được sử dụng để bắt đầu quá trình biểu hiện các gen mã hóa protein. Theo một số phương án khác, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể được sử dụng để bắt đầu quá trình biểu hiện các gen không mã hóa.

Theo sáng chế, thuật ngữ “biểu hiện” bao gồm bước bất kỳ tham gia vào quá trình sản xuất ARN và sản xuất protein, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở quá trình phiên mã, thường biến hậu phiên mã, dịch mã, thường biến hậu dịch mã và tiết.

Theo sáng chế, thuật ngữ “gen mã hóa protein” dùng để chỉ phân tử ADN có khả năng điều khiển quá trình tổng hợp protein bởi một số quy tắc, và quá trình nhờ đó gen mã hóa protein điều khiển sự tổng hợp protein thường bao gồm quá trình phiên mã sử dụng ADN sợi kép làm khuôn và quá trình dịch mã sử dụng ARN thông tin làm khuôn. Gen mã hóa protein chứa trình tự mã hóa (Coding Sequence, CDS) điều khiển quá trình sản xuất ARN thông tin mã hóa protein. Gen mã hóa protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gen được sử dụng để mã hóa enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin. Theo một số phương án, gen mã hóa protein liên quan đến việc việc mã hóa enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin. Enzym này tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin bao gồm một hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều loại trong số: aspartat kinaza, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, aspartat amoniac lyaza, dihydrodipicolinat synthetaza, dihydrodipicolinat reductaza, sucxinyl diaminpimelat amintransferaza, tetrahydrodipicolinat sucxinylaza, sucxinyl diaminpimelat deaxylaza, axit diaminpimelic epimeraza, axit diaminpimelic deaxylaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, protein vận chuyển lysin, và transketolaza, diaminpimelat dehydrogenaza và pyruvat carboxylaza. Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu của sáng chế thích hợp để điều hòa quá trình biểu hiện gen đích và thực hiện quá trình sản xuất hiệu quả sản phẩm đích.

Theo sáng chế, thuật ngữ "caset biểu hiện phiên mã" dùng để chỉ loại yếu tố biểu hiện bao gồm yếu tố điều hòa phiên mã và gen đích, và sử dụng yếu tố điều hòa phiên mã để điều hòa quá trình biểu hiện gen đích. Theo sáng chế, yếu tố điều hòa phiên mã bao gồm trình tự khởi đầu, và có thể còn bao gồm các yếu tố như trình tự tăng cường, trình tự làm câm, trình tự cách ly. Theo sáng chế, cụ thể là gen đích là gen mã hóa protein. "Buộc theo cách có thể thực hiện được" gen đích bằng polynucleotit có nghĩa là polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được buộc về mặt chức năng với gen đích để bắt đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã gen đích, và việc buộc theo cách có thể thực hiện được có thể theo cách bất kỳ trong số các cách được mô tả bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "vectơ" dùng để chỉ cấu trúc ADN chứa trình tự ADN được buộc theo cách có thể thực hiện được với các trình tự điều hòa thích hợp, để biểu hiện gen đích trong vật chủ thích hợp. "Vectơ biểu hiện tái tổ hợp" dùng để chỉ cấu trúc

ADN được sử dụng để biểu hiện, chẳng hạn, polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp có thể bao gồm, chẳng hạn, i) tập hợp gồm các yếu tố di truyền có các chức năng điều hòa quá trình biểu hiện gen, như các trình tự khởi đầu và các trình tự tăng cường; ii) trình tự cấu trúc hoặc mã hóa được phiên mã vào trong ARN thông tin và được dịch mã vào trong protein; và iii) các tiểu đơn vị phiên mã phiên mã và dịch mã một cách thích hợp các trình tự bắt đầu và kết thúc. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp được xây dựng theo cách thích hợp bất kỳ. Đặc tính của vectơ không bị giới hạn, và vectơ bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm các plasmit, các virut, các phagơ và các gen nhảy. Các vectơ có thể để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các trình tự nhiễm sắc thể, không phải là nhiễm sắc thể và ADN tổng hợp, như các plasmit vi khuẩn, ADN phagơ, các plasmit nấm men và các vectơ có nguồn gốc từ các tổ hợp của các plasmit và ADN phagơ, và ADN từ các virut như virut vacxinia, virut adeno, virut bệnh đậu gà, virut baculo, SV40 và virut pseudorabies, v.v..

Ví dụ, vectơ liên quan đến sáng chế là plasmit xác định đặc tính cường độ trình tự khởi đầu gen *ddh* pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp* được xây dựng dựa trên plasmit pEC-XK99E-*rfp* [1], và bản đồ của plasmit pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp* được thể hiện trên Fig.1. Trên Fig.1, P_{ddh} đại diện cho một trình tự khởi đầu của gen *ddh* ; *ddh* đại diện cho gen diaminpimelat dehydrogenaza kiểu dại; trình tự liên kết đại diện cho peptit liên kết nằm giữa gen *ddh* và protein *rfp* ; *rfp* đại diện cho protein huỳnh quang đỏ (Red Fluorescent Protein, RFP); Kan đại diện cho kháng Kanamyxin. Sau khi được biến nạp vào vật chủ thích hợp, pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp* có thể sao chép và thực hiện chức năng một cách độc lập của hệ gen vật chủ, hoặc trong một số trường hợp sẽ hợp nhất vào trong bản thân hệ gen của tế bào chủ.

Theo sáng chế, thuật ngữ "tế bào chủ" dùng để chỉ loại tế bào bất kỳ dễ dàng được biến nạp, chuyển nhiễm, tải nạp, v.v., bằng yếu tố khởi đầu phiên mã hoặc vecto biểu hiện bao gồm polynucleotit của sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" bao hàm tế bào chủ khác biệt với tế bào mẹ sau khi đưa vào yếu tố khởi đầu phiên mã hoặc vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và tế bào chủ tái tổ hợp thu được cụ thể bằng cách biến nạp.

Theo sáng chế, thuật ngữ "biến nạp" có ý nghĩa thường được hiểu bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này, nghĩa là, quá trình đưa ADN ngoại sinh vào trong vật chủ. Phương pháp biến nạp bao gồm phương pháp bất kỳ để đưa axit nucleic vào trong tế bào, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở phương pháp điện di, kết tủa canxi phosphat ($CaPO_4$), kết tủa canxi clorua ($CaCl_2$), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp vi thể mỡ cation và phương pháp lithi axetat-DMSO.

Tế bào chủ của sáng chế có thể là tế bào chưa có nhân điển hình hoặc tế bào có nhân điển hình, miễn là nó là tế bào mà polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu của sáng chế có thể được đưa vào. Theo một phương án, tế bào chủ dùng để chỉ tế bào chưa có nhân điển hình. Cụ thể là, tế bào chủ có nguồn gốc từ vi sinh vật thích hợp sản xuất ra các axit amin bằng cách lên men, như giống *Corynebacterium*, giống *Brevibacterium*, giống *Arthrobacterium*, giống *Microbacterium* hoặc giống *Escherichia*. Tốt hơn là, tế bào chủ là *Corynebacterium glutamicum* từ giống *Corynebacterium*. Trong số chúng, Corynebacterium glutamicum có thể là *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 hoặc các chủng dẫn xuất của chúng.

Theo sáng chế, việc nuôi cấy tế bào chủ có thể được thực hiện theo các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở nuôi cấy trong đĩa có lỗ, nuôi cấy bằng cách lắc, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy theo mẻ được cung cấp chất dinh dưỡng, v.v., và các điều kiện nuôi cấy khác nhau như nhiệt độ, thời gian và giá trị pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp theo các tình huống thực tế.

Trừ khi được định nghĩa hoặc được chỉ ra rõ ràng theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học trong sáng chế có cùng các ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế.

Thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza

Sáng chế sử dụng trình tự khởi đầu của gen diaminpimelat dehydrogenaza (*ddh*) kiểu dại để gây đột biến trình tự khởi đầu lõi của gen *ddh*, và để thu được các thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza. Trình tự khởi đầu của gen diaminpimelat dehydrogenaza là như được nêu trong SEQ ID NO: 9, và các thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza bao gồm các nucleotit đột biến ở một hoặc nhiều vị trí trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, và các trình tự nucleotit của các thể đột biến trong vị trí 290 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9 không được chọn từ ATGCATTGT.

Đã phát hiện ra rằng các thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza là polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, và các thể đột biến trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza đã cải thiện hoạt tính trình tự khởi đầu so với trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án cụ thể, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% (bao gồm tất cả các khoảng và các tỷ lệ phần trăm nằm giữa các giá trị này) so với trình tự đột biến của trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza, và không bao gồm trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án cụ thể, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu bao gồm các nucleotit đột biến ở các vị trí 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9 và có hoạt tính trình tự khởi đầu cao hơn hoạt tính trình tự khởi đầu của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, tốt hơn là các nucleotit đột biến ở các vị trí 6, 7, 8 hoặc 9 trong vị trí 292 đến vị trí 300 của trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án cụ thể, trình tự nucleotit của vị trí 292 đến vị trí 300 của polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các nhóm sau đây: (a) ACAAAAGGT; (b) TCTTCATCT; (c) GGAAAGTAT; (d) TTATTATAT; (e) TAATCCTCT; (f) TCAATTTAT; (g) GCGCAATCT; (h) CAGTTCCGT; (i) AAGTTTTAT; (g) TAAATGTAT; (k) GGATTGTAT; (l) CAAACTCAT; (m) TACAAATCT; (n) TATCAGTCT; (o) CGAGGATAT; (p) CCTTGTTAT. Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu bao gồm các trình tự như được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 10-25. So với trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 9, các thể đột biến có hoạt tính trình tự khởi đầu gia tăng 18 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 19 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 20 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 22 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 23 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 24 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 25 lần hoặc cao hơn, tốt hơn là 26 lần hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 27 lần hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 28 lần hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 30 lần hoặc cao hơn và tốt hơn nữa là 31 lần hoặc cao hơn.

Xây dựng vectơ biểu hiện tái tổ hợp

Theo một số phương án cụ thể, vectơ tái tổ hợp bao gồm trình tự khởi đầu gen diaminpimelat dehydrogenaza được xây dựng trước tiên, và sau đó vùng trình tự khởi đầu lõi của gen *ddh* được gây đột biến để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu.

Để xây dựng vectơ tái tổ hợp, các đoạn mồi ddh-F và ddh-R được thiết kế theo thông tin hệ gen đã được công bố của *Corynebacterium glutamicum*, và hệ gen của *Corynebacterium glutamicum* được khuếch đại PCR bằng ddh-F và ddh-R để thu được trình tự khởi đầu của gen *ddh*.

Các đoạn mồi pEC-F và pEC-R được thiết kế bằng cách sử dụng thông tin của plasmit pEC-XK99E-*rfp*[1]. Với plasmit pEC-XK99E-*rfp* dùng làm khuôn, các đoạn mồi pEC-F và PEC-R được sử dụng để thực hiện khuếch đại để thu được các đoạn ADN của khung pEC-XK99E, các peptit liên kết và protein huỳnh quang đỏ.

Các đoạn đã được khuếch đại tạo ra từ các đoạn mồi *ddh*-F và *ddh*-R và các đoạn đã được khuếch đại tạo ra từ các đoạn mồi pEC-F và pEC-R được buộc theo cách tái tổ hợp, để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp được liên kết với polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu (nghĩa là, trình tự đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh*).

Nguồn *Corynebacterium glutamicum* cụ thể là *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (ID gen: 2830649).

Quy trình sản xuất các axit amin

(1) Theo sáng chế, polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được buộc theo cách có thể thực hiện được với gen mã hóa của enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin, để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp có khả năng tổng hợp enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin, và vectơ biểu hiện tái tổ hợp được sử dụng để biến nạp tế bào chủ để thu được tế bào chủ tái tổ hợp.

(2) Tế bào chủ tái tổ hợp được nuôi cấy lên men, và các axit amin được thu hồi từ tế bào chủ tái tổ hợp hoặc các môi trưởng lỏng nuôi cấy của tế bào chủ tái tổ hợp để hoàn thành quá trình sản xuất các axit amin.

Trong quá trình sản xuất nêu trên, do polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu cải thiện, trong tế bào chủ tái tổ hợp, hoạt tính phiên mã của gen mã hóa của enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin được tăng lên, và mức biểu hiện của enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin được tăng lên, bằng cách đó sản lượng các axit amin tăng đáng kể.

Liên quan đến các axit amin sản xuất được, các axit amin bao gồm L-lysin và các dẫn xuất của nó. Tùy ý, axit amin được chọn từ một axit amin hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều axit amin trong số các axit amin sau đây: prolin, hydroxyprolin, lysin, axit glutamic, arginin, ornithin, glutamin, threonin, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, xystein, methionin, axit aspartic, asparagin, histidin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit 5-aminlevulinic hoặc các dẫn xuất của axit amin bất kỳ trong số các axit amin nêu trên. Tốt hơn là, các dẫn xuất bao gồm ít nhất một trong số pentandiamin, axit 5-aminpentanoic và axit glutaric.

Đối với enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin, enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin là enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin; tốt hơn là, enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin là diaminpimelat dehydrogenaza. Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu có thể làm tăng đáng kể hoạt tính phiên mã của diaminpimelat dehydrogenaza và làm tăng đáng kể mức biểu hiện của diaminpimelat dehydrogenaza.

Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế có thể là loại chủng bất kỳ có khả năng sản xuất sản phẩm đích, bao gồm các chủng kiểu dại và các chủng tái tổ hợp. Ví dụ, tế bào chủ có nguồn gốc từ các vi sinh vật thích hợp để sản xuất lên men sản phẩm đích như axit amin và các dẫn xuất của nó, chẳng hạn *Enterobacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacterium*, *Microbacterium*, v.v..

Theo một số phương án được ưu tiên, tế bào chủ là *Enterobacterium hoặc Corynebacterium*, tốt hơn nữa là *Corynebacterium glutamicum*, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* B253, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, và các chủng dẫn xuất sản xuất các L-axit amin được điều chế từ các chủng nêu trên.

Theo một số phương án cụ thể, tế bào chủ là *Corynebacterium glutamicum*, một chủng quan trọng để sản xuất L-lysin. Sau khi thường biến *Corynebacterium glutamicum* bằng cách sử dụng polynucleotit, caset biểu hiện phiên mã hoặc vectơ biểu hiện tái tổ hợp có hoạt tính trình tự khởi đầu, mức biểu hiện của enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin trong *Corynebacterium glutamicum* tăng đáng kể, cụ thể là mức biểu hiện diaminpimelat dehydrogenaza tăng đáng kể, dẫn đến khả năng sản xuất lên men L-lysin trong *Corynebacterium glutamicum* cao hơn nhiều.

Theo một số phương án cụ thể, tế bào chủ tái tổ hợp là *Corynebacterium glutamicum* được thường biến như sau: 1) trình tự mã hóa được đột biến bởi T311I được đưa vào trong gen mã hóa của aspartat kinaza trong *Corynebacterium glutamicum*; 2) vùng lõi từ vị trí 279 đến vị trí 317 của trình tự khởi đầu gen pyruvat carboxylaza trong *Corynebacterium glutamicum* là CGGGCCTTTGAAGACATTATTAGATTATTATTATTATTATTAG; 3) polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu được buộc theo cách có thể thực hiện được với gen mã hóa diaminpimelat dehydrogenaza, và sau đó được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum*. *Corynebacterium glutamicum* được thường biến như phương pháp nêu trên là chủng L-lysin có năng suất cao.

Cụ thể là, các gen mã hóa của aspartat kinaza, pyruvat carboxylaza và diaminpimelat dehydrogenaza có thể được tách ra và được xen vào trong vectơ biểu hiện đối với quá trình sản xuất biến nạp, trong đó trong tế bào chủ vectơ biểu hiện có thể sao chép và biểu hiện enzym một cách độc lập của tế bào chủ, hoặc trong một số trường hợp hợp nhất vào trong hệ gen của tế bào chủ. Trong lĩnh vực này, các phương pháp sử dụng các vi sinh vật là đã biết, như được giải thích trong các ấn phẩm như Current Protocols in Molecular Biology (Online ISBN: 9780471142720, John Wiley and Sons, Inc.), Microbial Metabolic Engineering: Methods and Protocols (Qiong Cheng Ed.,Springer) và Systems Metabolic Engineering: Methods and Protocols (Hal S.Alper Ed.,Springer).

Theo một số phương án khác, tế bào chủ có thể còn là các loại chủng sản xuất axit amin khác. “Chủng sản xuất axit amin” theo sáng chế dùng để chỉ chủng có thể sản xuất các axit amin và tích tụ các axit amin khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, hoặc tiết các axit amin vào trong môi trường nuôi cấy, nghĩa là, chủng có thể thu được các axit amin ngoại bào tự do. Chẳng hạn, nó có thể là chủng sản xuất axit amin xuất hiện trong tự nhiên hoặc chủng sản xuất axit amin được thao tác di truyền thu được bằng cách thường biến di truyền.

Ví dụ, tế bào chủ là tế bào chủ sản xuất lysin. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất lysin có thể chứa, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều gen được chọn từ các gen đã được giảm nhỏ hoặc giảm biểu hiện sau đây:

a. gen *adhE* mã hóa etanol dehydrogenaza;

b. gen *ackA* mã hóa axetat kinaza;

c. gen *pta* mã hóa phosphat axetyltransferaza;

d. gen *ldhA* mã hóa lactat dehydrogenaza;

e. gen *focA* mã hóa họ vận chuyển format;

f. gen *pflB* mã hóa pyruvat format lyaza;

g. gen *poxB* mã hóa pyruvat oxidaza;

h. gen *thrA* mã hóa enzym hai chức năng aspartat kinaza I/homoserin dehydrogenaza I;

i. gen *thrB* mã hóa homoserin kinaza;

j. gen *ldcC* mã hóa lysin decarboxylaza; và

h. gen *cadA* mã hóa lysin decarboxylaza.

Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất lysin có thể chứa, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều gen được chọn từ các gen đã được giảm nhỏ hoặc giảm biểu hiện sau đây:

a. gen *dapA* mã hóa dihydrodipyridin synthaza làm giảm sự ức chế phản hồi của lysin;

b. gen *dapB* mã hóa dihydrodipicolinat reductaza;

c. gen *ddh* mã hóa diaminpimelat dehydrogenaza;

d. *dapD* mã hóa tetrahydrodipicolinat sucxinylaza và dapE mã hóa sucxinyl diaminpimelat deaxylaza;

e. gen *asd* mã hóa aspartat-semialdehyt dehydrogenaza;

f. gen *ppc* mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza;

g. gen *pntAB* mã hóa nicotinamit adenin dinucleotit transhydrogenaza;

i. gen *lysE* mã hóa protein vận chuyển lysin.

Ví dụ, tế bào chủ là tế bào chủ sản xuất threonin. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất threonin là chủng biểu hiện gen *LysC* mã hóa aspartat kinaza làm giảm sự ức chế phản hồi trên cơ sở *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Theo một số phương án khác, tế bào chủ sản xuất threonin có thể cũng là các chủng khác có khả năng sản xuất threonin.

Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất lysin có thể chứa, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều gen được chọn từ các gen đã được tăng cường hoặc được biểu hiện quá mức sau đây:

a. gen *thrABC* mã hóa threonin operon;

b. gen *hom* mã hóa homoserin dehydrogenaza làm giảm sự ức chế phản hồi;

c. gen *gap* mã hóa glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza;

d. gen *pyc* mã hóa pyruvat carboxylaza;

e. gen *mqo* mã hóa malat: quinon oxidoreductaza;

f. gen *tkt* mã hóa transketolaza;

g. gen *gnd* mã hóa 6-phosphogluconat dehydrogenaza;

h. gen *thrE* mã hóa hệ xuất threonin;

i. gen *eno* mã hóa enolaza.

Ví dụ, tế bào chủ là tế bào chủ sản xuất isoleuxin. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất isoleuxin là chủng sản xuất L-isoleuxin bằng cách thay thế alanin cho axit amin ở vị trí 323 của gen ilvA của L-threonin dehydrataza. Theo một số phương án khác, tế bào chủ sản xuất isoleuxin có thể cũng là các loại khác của các chủng có khả năng sản xuất isoleuxin.

Ví dụ, tế bào chủ là tế bào chủ sản xuất O-axetylhomoserin. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất O-axetylhomoserin là chủng sản xuất O-axetylhomoserin bằng cách làm bất hoạt O-axetylhomoserin (thiol)-lyaza. Theo một số phương án khác, tế bào chủ sản xuất O-axetylhomoserin có thể cũng là các loại khác của các chủng có khả năng sản xuất O-axetylhomoserin.

Ví dụ, tế bào chủ là tế bào chủ sản xuất methionin. Theo một số phương án, tế bào chủ sản xuất methionin là chủng sản xuất methionin bằng cách làm bất hoạt các chất điều hòa phiên mã methionin và xystein. Theo một số phương án khác, tế bào chủ sản xuất methionin có thể cũng là các loại khác của các chủng có khả năng sản xuất methionin.

Theo một số phương án cụ thể, các điều kiện nuôi cấy của các tế bào chủ tái tổ hợp là như sau: trước tiên, *Corynebacterium glutamicum* được cấy vào trong môi trường lỏng TSB và được nuôi cấy trong 8 giờ, và giống nuôi cấy được cấy dưới dạng hạt vào trong đĩa 24 lỗ chứa 800µl môi trường lên men/lỗ và, với OD ban đầu được kiểm soát bằng khoảng 0,1, được nuôi cấy ở 30°C trong 17 giờ ở tốc độ quay của máy lắc đĩa là 800 vòng/phút (round per minute, rpm).

Các thành phần của môi trường lỏng TSB là như sau: glucoza: 5g/l; bột nấm men: 5g/l; pepton đậu nành: 9g/l; ure: 3g/l; axit sucxinic: 0,5g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 1g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1g/l; biotin: 0,01mg/l; vitamin B1: 0,1mg/l; MOPS: 20g/l.

Các thành phần của môi trường lên men là như sau: glucoza: 80g/l; bột nấm men: 1g/l; pepton đậu nành: 1g/l; NaCl: 1g/l; amoni sulfat: 1g/l; ure: 10g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 1g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,45g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,05g/l; biotin: 0,4mg/l; vitamin B1: 0,1mg/l; MOPS: 40g/l; độ pH ban đầu là 7,2.

Theo một số phương án cụ thể, các axit amin có thể được thu hồi từ các tế bào chủ tái tổ hợp hoặc các môi trường lỏng nuôi cấy của các tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực này, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh và sắc ký lỏng tính năng cao (high-performance liquid chromatography, HPLC).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các mục đích, các đặc điểm và các lợi ích của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết sau đây. Tuy nhiên, nên hiểu rằng việc mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể (mặc dù chỉ ra các phương án cụ thể của sáng chế) chỉ được đưa ra cho mục đích giải thích, vì các biến thể và sửa đổi khác nhau trong tinh thần và phạm vi của sáng chế sẽ trở nên hiển nhiên đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực này khi đọc phần mô tả chi tiết này.

Các kỹ thuật và và các phương pháp được sử dụng trong các ví dụ là các phương pháp kỹ thuật thông thường trừ khi có quy định khác. Chẳng hạn, các phương pháp thử nghiệm mà các điều kiện cụ thể không được chỉ ra trong các ví dụ sau đây thường theo các điều kiện thông thường, như các điều kiện được mô tả trong Molecular Cloning: Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), bởi Sambrook và các đồng tác giả, hoặc các điều kiện được đề xuất bởi các nhà sản xuất. Trừ khi có quy định khác, các nguyên liệu và các chất phản ứng được sử dụng trong các ví dụ có thể thu được qua các kênh thương mại chính thức.

Ví dụ 1. Xây dựng plasmit xác định đặc điểm cường độ của trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*

Để xác định đặc điểm cường độ của trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*, ví dụ của sáng chế trước tiên xây dựng vectơ xác định đặc điểm, buộc trình tự khởi đầu gen *ddh* và đoạn gen *ddh* dựa trên khung của plasmit pEC-XK99E, và gen *ddh*, peptit liên kết và gen protein huỳnh quang đỏ (red fluorescent protein, rfp) được biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu gen *ddh*. Các chi tiết là như sau.

(1) Các đoạn mồi *ddh*-F và *ddh*-R được thiết kế theo trình tự hệ gen đã được công bố của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (ID gen:2830649) và thông tin chú thích của gen *ddh,* bằng cách sử dụng hệ gen ATCC 13032 làm khuôn, trình tự khởi đầu gen *ddh* và đoạn gen *ddh* thu được bằng cách khuếch đại PCR. Trình tự nucleotit của đoạn khuếch đại là như được nêu trong SEQ ID NO: 34.

(2) Các đoạn ADN của khung plasmit pEC-XK99E, peptit liên kết và gen protein huỳnh quang đỏ được khuếch đại bằng cách sử dụng plasmit PEC-XK99E-*rfp* làm khuôn, và pEC-F và pEC-R làm các đoạn mồi. Trình tự nucleotit của đoạn khuếch đại được nêu trong SEQ ID NO: 35.

Đoạn hệ gen đã được khuếch đại của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và đoạn plasmit đã được khuếch đại của pEC-XK99E-*rfp* được tách dòng và được buộc nhờ bộ kít Vazyme's One Step Cloning Kit để thu được vectơ xác định đặc điểm pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp*, trong đó bản đồ plasmit của nó được thể hiện trên Fig.1. Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng ở trên được thể hiện trong bảng 1, và trình tự thông tin của peptit liên kết được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 1

Các đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
ddh-F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGTGCGTGGCGAGTTTTACAAAG	SEQ ID NO: 1
ddh-R	GACGTCGCGTGCGATCAGATC	SEQ ID NO: 2
pEC-F	ATCTGATCGCACGCGACGTCGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGGTCCGGCGGTGGCTCTGCTTCCTCCGAAGACGTTATCAAAG	SEQ ID NO: 3
pEC-R	GGAGAAAATACCGCATCAGGC	SEQ ID NO: 4

Bảng 2

	Trình tự axit amin	Trình tự nucleotit mã hóa peptit liên kết
Peptit liên kết	GGGSGGGGSGGGS (SEQ ID NO: 36)	GGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGGTCCGGCGGTGGCTCT (SEQ ID NO: 37)

Ví dụ 2. Sàng lọc và xác định đặc điểm cường độ của các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*

(1) Xây dựng thư viện đột biến của trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*

Trong ví dụ này, vùng lõi "TGATGAAAGAGATGTCCCTGAA <u>TCATCA</u>TCTAAGTATGCATCTCGG<u>TAAGCT</u>CGACCAGG" của trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum* được gây đột biến, trong đó các phần được gạch dưới là các trình tự chính của vùng -35 và vùng -10 của trình tự khởi đầu, tương ứng. Trong ví dụ này, việc gây đột biến "TGATGAAAGAGATGTCCCTGAA<u>TCATCA</u>TCTAAGTNNNNNNNNNNGG<u>TAAG CT</u>CGACCAGG" được thực hiện ở vị trí tương ứng của vùng lõi đã nêu ở trên, hai đoạn của plasmit được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi *ddh*-M1, *ddh*-M2, *ddh*-M3 và *ddh*-M4, tương ứng, và được tách dòng và buộc nhờ bộ kít Vazyme's One Step Cloning Kit. Tất cả các dòng vô tính thu được được tập hợp và các plasmit được chiết để thu được thư viện các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh*. Để so sánh với các thể đột biến trình tự khởi đầu của *ddh* đã được công bố trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết, chúng tôi xây dựng thể đột biến trình tự khởi đầu *ddh* giống như được bộc lộ trong tài liệu tham khảo 3 (CN101939432A) trên cơ sở plasmit pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp*. Cụ thể là, trình tự của vùng lõi của trình tự khởi đầu

"TGTGTGAAAAGAGAATGTCCGATCATAAGTATGCATtgtGGTAAGCTCCGAGG", trong đó phần được gạch dưới là các vị trí đột biến được bộc lộ bởi tài liệu tham khảo 3. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 được biến nạp bằng thư viện đã nêu ở trên, thể đột biến pEC-XK99E- P_{ddh}-x-*rfp* trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết và pEC-XK99E-P_{ddh}-*rfp* đối chứng kiểu dại thu được trong ví dụ 1, tương ứng, và được phủ trên đĩa TSB. Đĩa này, trên đó hàng trăm dòng vô tính đã được phát triển, được chụp ảnh huỳnh quang bằng hệ chụp ảnh huỳnh quang, và các thể đột biến với cường độ biểu hiện cải thiện được sàng lọc sơ bộ theo độ sáng huỳnh quang của các dòng vô tính. Fig.2 thể hiện ảnh chụp huỳnh quang của các dòng vô tính đột biến phát triển trên đĩa nuôi cấy, trong đó vị trí đánh dấu bởi mũi tên là một dòng vô tính riêng lẻ thể hiện huỳnh quang đỏ cường độ cao. Các thành phần (g/l) của môi trường đĩa TSB là như sau: glucoza: 5g/l; bột nấm men: 5g/l; pepton đậu nành: 9g/l; ure: 3g/l; axit sucxinic: 0,5g/l; $K_2HPO_4\cdot 3H_2O$: 1g/l; $MgSO4\cdot 7H_2O$: 0,1g/l; biotin: 0,01mg/l; vitamin B1: 0,1mg/l; MOPS: 20g/l; bột aga: 15g/l. Trong ví dụ này, hơn 10000 dòng vô tính được sàng lọc sơ bộ, và thu được khoảng 20 thể đột biến có cường độ huỳnh quang gia tăng đáng kể. Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng ở trên được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Các đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
ddh-M1	CCCTGAATCATCATCTAAGTNNNNNNNNNGGTAAGCTCGACCAGGACAGTG	SEQ ID NO: 5
ddh-M2	AACCTTCCATACGAACTTTGAAACG	SEQ ID NO: 6
ddh-M3	CAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCG	SEQ ID NO: 7
ddh-M4	ACTTAGATGATGATTCAGGGAC	SEQ ID NO: 8

(2) Xác định đặc điểm cường độ của thư viện của các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*

Tất cả các thể đột biến có cường độ huỳnh quang gia tăng quan sát được trên các đĩa nêu trên được nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ để xác định đặc điểm cường độ của các trình tự khởi đầu. Các thành phần (g/l) của môi trường lỏng TSB là như sau: glucoza: 5g/l; bột nấm men: 5g/l; pepton đậu nành: 9g/l; ure: 3g/l; axit sucxinic: 0,5g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 1g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1g/l; biotin: 0,01mg/l; vitamin B1: 0,1mg/l; MOPS: 20g/l. Các chủng tạo ra từ quá trình sàng lọc, đối chứng kiểu dại và đối chứng trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết được cấy bằng tăm vào trong đĩa 96 lỗ chứa 200μl môi trường nuôi cấy lỏng TSB trong mỗi lỗ, với ba chủng song song cho mỗi chủng. Ở tốc độ quay của máy lắc đĩa bằng 800vòng/phút, sau khi nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ, các cường độ huỳnh quang của các chủng được phát hiện, và các chủng có cường độ huỳnh quang cải thiện so với đối chứng kiểu dại được xác định trình tự. Một số thể đột biến trình tự khởi đầu có cùng trình tự, và cuối cùng thu được thành công 16 thể đột biến trình tự khởi đầu khác nhau với cường độ biểu hiện được cải thiện đáng kể, và các kết quả được thể hiện trong bảng 4, trong đó các trình tự khởi đầu thu được theo sáng chế được đánh số liên tiếp là P_{ddh}-1 đến P_{ddh}-16. Các hoạt tính trình tự khởi đầu của P_{ddh}-1 đến P_{ddh}-16 được tăng khoảng từ 18 đến 31 lần, cung cấp các yếu tố phong phú để thường biến sự biểu hiện của các gen như *ddh* v.v..

Cường độ huỳnh quang của thể đột biến trình tự khởi đầu *ddh* (P_{ddh}-x) của tài liệu tham khảo 3 được phát hiện bằng phương pháp nêu trên, và kết quả được thể hiện trong bảng 4. Hoạt tính của P_{ddh}-x chỉ tăng 15 lần so với hoạt tính của trình tự khởi đầu kiểu dại, và các cường độ biểu hiện của trình tự khởi đầu của sáng chế được cải thiện từ

15 đến 101% so với các cường độ biểu hiện của trình tự khởi đầu được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết, và do đó là một bước tiến quan trọng.

Bảng 4

Trình tự khởi đầu số	Cường độ huỳnh quang (RFU/OD_{600})	Trình tự của vùng đột biến của trình tự khởi đầu	Trình tự số của trình tự khởi đầu đầy đủ
Kiểu dại	609	ATGCATCTC	SEQ ID NO: 9
P_{ddh}-1	11134	ACAAAAGGT	SEQ ID NO: 10
P_{ddh}-2	11215	TCTTCATCT	SEQ ID NO: 11
P_{ddh}-3	11247	GGAAAGTAT	SEQ ID NO: 12
P_{ddh}-4	11264	TTATTATAT	SEQ ID NO: 13
P_{ddh}-5	11366	TAATCCTCT	SEQ ID NO: 14
P_{ddh}-6	11367	TCAATTTAT	SEQ ID NO: 15
P_{ddh}-7	11421	GCGCAATCT	SEQ ID NO: 16
P_{ddh}-8	11557	CAGTTCCGT	SEQ ID NO: 17
P_{ddh}-9	11792	AAGTTTTAT	SEQ ID NO: 18
P_{ddh}-10	11808	TAAATGTAT	SEQ ID NO: 19
P_{ddh}-11	11853	GGATTGTAT	SEQ ID NO: 20
P_{ddh}-12	12396	CAAACTCAT	SEQ ID NO: 21
P_{ddh}-13	12923	TACAAATCT	SEQ ID NO: 22
P_{ddh}-14	13799	TATCAGTCT	SEQ ID NO: 23
P_{ddh}-15	13860	CGAGGATAT	SEQ ID NO: 24
P_{ddh}-16	19417	CCTTGTTAT	SEQ ID NO: 25
P_{ddh}-x	9669	ATGCATTGT	SEQ ID NO: 38

Ví dụ 3. Ứng dụng của các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh của Corynebacterium glutamicum* trong quá trình sản xuất lysin

(1) Xây dựng các vectơ tái tổ hợp của các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh* của *Corynebacterium glutamicum*

Theo trình tự hệ gen đã được báo cáo của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, các nhánh tương đồng ngược chiều và xuôi chiều của các đột biến trình tự khởi đầu P_{ddh}-1, P_{ddh}-10 và P_{ddh}-16 được khuếch đại PCR bằng cách sử dụng hệ gen ATCC13032 làm khuôn, và sử dụng *ddh*-UF/*ddh*-UR và *ddh*-DF1/*ddh*-DR, *ddh*-UF/*ddh*-UR và *ddh*-DF10/*ddh*-DR, *ddh*-UF/*ddh*-UR và *ddh*-DF16/*ddh*-DR làm các đoạn mồi, tương ứng; trong lúc đó, khung pK18mobsacB (GenBank:FJ437239.1) được khuếch đại bằng cách sử dụng pK18-1/2 làm các đoạn mồi. Hai nhóm gồm các đoạn PCR nêu trên được thu hồi và sau đó được buộc nhờ bộ kít Vazyme's One Step Cloning Kit, và thu được các vectơ tái tổ hợp pK18-P_{ddh}-1, pK18-P_{ddh}-10 và pK18-P_{ddh}-16 có các trình tự khởi đầu đột biến, tương ứng. Các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng ở trên được liệt kê trong bảng 5.

Bảng 5

Các đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
ddh-UF	CAGGAAACAGCTATGACATGTTCCAGCCATCG CCAAATAAG	SEQ ID NO: 26
ddh-UR	ACTTAGATGATGATTCAGGGAC	SEQ ID NO: 27
ddh-DF1	CCCTGAATCATCATCTAAGTACAAAAGGTGGT AAGCTCGACCAGGACAGTG	SEQ ID NO: 28
ddh-DF10	CCCTGAATCATCATCTAAGTTAAATGTATGGTA AGCTCGACCAGGACAGTG	SEQ ID NO: 29
ddh-DF16	CCCTGAATCATCATCTAAGTCCTTGTTATGGTA AGCTCGACCAGGACAGTG	SEQ ID NO: 30
ddh-DR	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTGTACTGGACT GCCTTTTGAACG	SEQ ID NO: 31
pK18-1	GCACTGGCCGTCGTTTTAC	SEQ ID NO: 32
pK18-2	CATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG	SEQ ID NO: 33

(2) Xây dựng thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh* của chủng sản xuất lysin của *Corynebacterium glutamicum*

Trình tự mã hóa đột biến của chủng sản xuất lysin của *Corynebacterium glutamicum* SCgL37 (chủng trong đó T311I (bazơ được đột biến từ ACC thành ATC) được đưa vào trong gen mã hóa của aspartat kinaza trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, và vùng lõi ở vị trí 279 đến vị trí 317 của trình tự khởi đầu gen pyruvat carboxylaza được gây đột biến thành CGGGCCTTTGATGAGAGACATTATATATATATATATATATATATATAG) được biến nạp bằng các vectơ tái tổ hợp pK18-P$_{ddh}$-1, pK18-P$_{ddh}$-10, và pK18-P$_{ddh}$-16 đã được xây dựng ở trên, tương ứng, và được phủ lên môi trường rắn LBHIS chứa glucoza ở nồng độ 5g/l và kanamyxin ở nồng độ 25µg/ml, và được nuôi cấy ở 30°C để thu được thể biến nạp tái tổ hợp thứ nhất. Các thể biến nạp tái tổ hợp sơ cấp chính xác được cấy vào trong môi trường LB chứa glucoza ở nồng độ 5g/l, được nuôi cấy qua đêm, và được làm loãng và được phủ lên các đĩa chứa môi trường rắn LB đã được bổ sung sucroza ở nồng độ 100g/l, tương ứng, để sàng lọc, và thu được các chủng đột biến trình tự khởi đầu *ddh* SCgL38, SCgL39 và SCgL40, tương ứng.

(3) Đánh giá khả năng sản xuất L-lysin của các thể đột biến trình tự khởi đầu gen *ddh* của các chủng sản xuất lysin của *Corynebacterium glutamicum*

Để thử nghiệm tác dụng của sự đột biến trình tự khởi đầu *ddh* trong *Corynebacterium glutamicum* lên sự sản xuất L-lysin, các thử nghiệm lên men được thực hiện trên các chủng SCgL37, SCgL38, SCgL39 và SCgL40, tương ứng. Các thành phần của môi trường lên men là như sau: glucoza: 80g/l; bột nấm men: 1g/l; pepton đậu nành: 1g/l; NaCl: 1g/l; amoni sulfat: 1g/l; ure: 10g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 1g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,45g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,05g/l; biotin: 0,4mg/l; vitamin B1: 0,1mg/l; MOPS: 40g/l; độ pH ban đầu là 7,2. Trước tiên các chủng này được cấy vào trong môi trường lỏng TSB để nuôi cấy trong 8 giờ, và các giống nuôi cấy được cấy dưới dạng hạt vào trong đĩa 24 lỗ chứa 800µl môi trường lên men trong mỗi lỗ. OD_{600} ban đầu được kiểm soát ở khoảng 0,1, và việc nuôi cấy được thực hiện ở 30°C trong 17 giờ ở tốc độ quay của máy lắc đĩa bằng 800vòng/phút, với ba chủng song song đối với mỗi chủng. Sau khi lên men, sản lượng L-lysin và mức tiêu thụ glucoza được đo, và các tỷ lệ chuyển hóa của glucoza từ glucoza thành L-lysin được tính. Các kết quả được thể hiện trong bảng 6, thể hiện rằng các chủng có các trình tự khởi đầu *ddh* đột biến đã làm tăng sản lượng lysin và tăng tỷ lệ chuyển hóa glucoza-axit, và sự gia tăng này có ý nghĩa hơn với sự gia tăng cường độ trình tự khởi đầu. Các kết quả nêu trên cho thấy rằng các thể đột biến với cường độ biểu hiện gia tăng của trình tự khởi đầu *ddh* có thể được áp dụng để sản xuất L-lysin.

Bảng 6

Các chủng	Hiệu suất lysin (g/l)	Tỷ lệ chuyển hóa (%)
SCgL37	2,97±0,06	5,41±0,04
SCgL38	3,47±0,21	6,47±0,57
SCgL39	3,53±0,21	7,05±1,09
SCgL40	3,60±0,36	7,49±1,26

Do quá trình tổng hợp các sản phẩm xuôi dòng của L-lysin đều phụ thuộc vào các bước phản ứng được xúc tác bởi diaminpimelat dehydrogenaza, sản lượng các sản phẩm xuôi dòng có thể cũng được tăng lên bằng cách gia tăng sự biểu hiện của gen *ddh* bởi các thể đột biến của trình tự khởi đầu gen *ddh* của sáng chế. Do đó, giải pháp kỹ thuật được đề xuất bởi sáng chế có thể cũng được sử dụng để sản xuất các sản phẩm xuôi dòng của L-lysin, như pentandiamin, axit 5-aminvaleric, axit glutaric, v.v..

Tất cả các dấu hiệu kỹ thuật được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được phối hợp theo cách phối hợp bất kỳ. Mỗi dấu hiệu được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được thay thế bởi một dấu hiệu khác có chức năng giống nhau, tương đương hoặc tương tự. Do đó, trừ khi có quy định khác, mỗi dấu hiệu được bộc lộ ở đây chỉ là ví dụ của một loạt các dấu hiệu tương đương hoặc tương tự.

Ngoài ra, theo phần mô tả ở trên của sáng chế, người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể dễ dàng hiểu được các dấu hiệu chính của sáng chế, và nhiều sửa đổi có thể được thực hiện đối với sáng chế để thích ứng với các mục đích và các điều kiện sử dụng khác nhau mà không đi trệch khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế, và do đó các sửa đổi như vậy cũng được dự định nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Tài liệu tham khảo:

[1] Wang, YC et al. Screening efficient constitutive promoters in *Corynebacterium glutamicum* based on time-series transcriptome analysis. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(11):1760 - 1771

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu, trong đó polynucleotit này có trình tự như nêu trong trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID No: 10-25.

2. Caset biểu hiện phiên mã bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo điểm 1.

3. Caset biểu hiện phiên mã theo điểm 2, trong đó caset biểu hiện phiên mã này còn bao gồm gen mã hóa protein, gen mã hóa protein này được buộc theo cách có thể thực hiện được với polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu.

4. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo điểm 1 hoặc caset biểu hiện phiên mã theo điểm 2 hoặc 3.

5. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm caset biểu hiện phiên mã theo điểm 2 hoặc 3 hoặc vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 4.

6. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó tế bào chủ này là từ giống *Corynebacterium*, giống *Brevibacterium*, giống *Arthrobacterium*, giống *Microbacterium* hoặc giống *Escherichia*.

7. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó tế bào chủ này là *Corynebacterium glutamicum*.

8. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó tế bào chủ là *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067.

9. Phương pháp tăng cường sự biểu hiện gen đích, trong đó phương pháp này bao gồm bước buộc theo cách có thể thực hiện được polynucleotit có hoạt tính trình tự khởi đầu theo điểm 1 với gen đích.

10. Phương pháp điều chế protein, trong đó caset biểu hiện phiên mã theo điểm 2 hoặc 3, vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 4, hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8 được chọn để biểu hiện protein.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó protein này là enzym tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó enzym này tham gia vào quá trình tổng hợp L-lysin bao gồm một enzym hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều enzym trong số aspartat kinaza, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, aspartat amoniac lyaza, dihydrodipicolinat synthaza, dihydrodipicolinat reductaza, sucxinyl diaminpimelat amintransferaza, tetrahydrodipicolinat sucxinylaza, sucxinyl diaminpimelat deaxylaza, axit diaminpimelic epimeraza, axit diaminpimelic deaxylaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, protein vận chuyển lysin, transketolaza, diaminpimelat dehydrogenaza và pyruvat carboxylaza.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó protein này là diaminpimelat dehydrogenaza.

14. Phương pháp sản xuất axit amin, trong đó caset biểu hiện phiên mã theo điểm 2 hoặc 3, vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 4, hoặc tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8 được chọn để biểu hiện enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin, và enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin được sử dụng để sản xuất axit amin.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó axit amin bao gồm L-lysin và các dẫn xuất của nó, trong đó các dẫn xuất này bao gồm ít nhất một trong số pentandiamin, axit 5-aminpentanoic và axit glutaric.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó enzym tham gia vào quá trình tổng hợp axit amin là diaminpimelat dehydrogenaza.

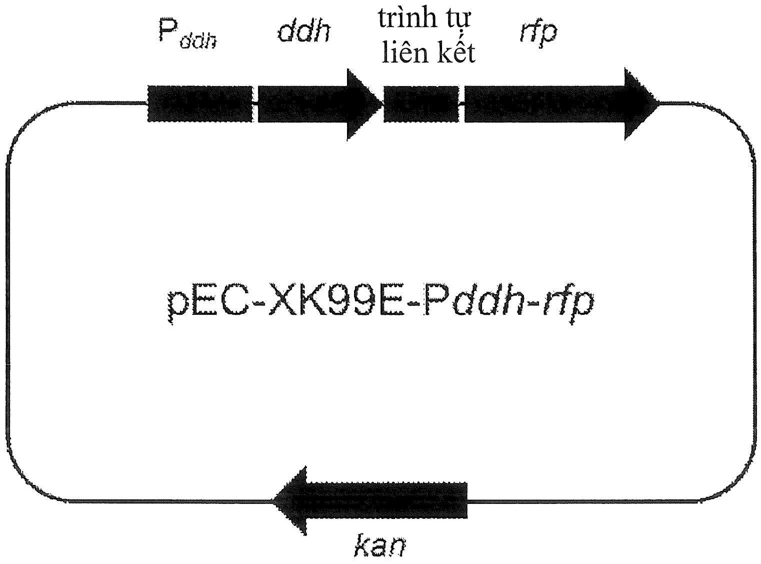

FIG. 1

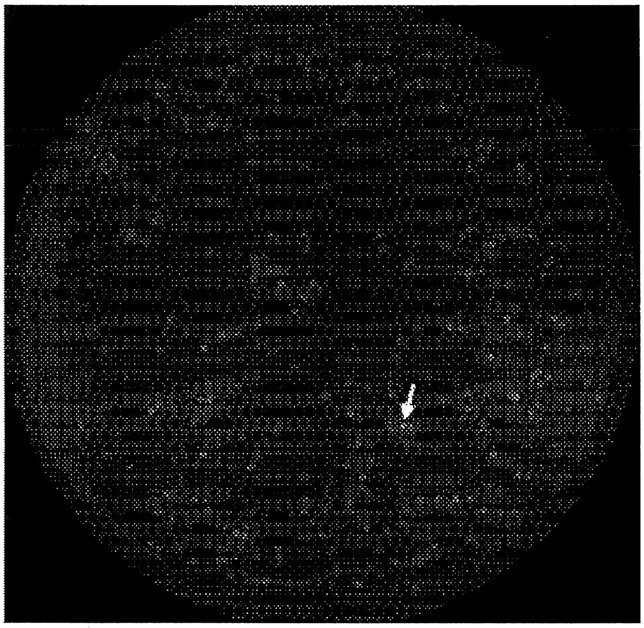

FIG. 2

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences

<120> POLYNUCLEOTIT CÓ HOẠT TÍNH TRÌNH TỰ KHỞI ĐẦU VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT AMIN SỬ DỤNG POLYNUCLEOTIT NÀY

<130> 6A17-2073508IB

<150> CN202010838604.9
<151> 2020-08-19

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 42
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1
cctgatgcgg tattttctcc gtgcgtggcg agttttacaa ag 42

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
gacgtcgcgt gcgatcagat c 21

<210> 3
<211> 84
<212> ADN
<213> Plasmit

<400> 3
atctgatcgc acgcgacgtc ggcggtggct ctggaggtgg tgggtccggc ggtggctctg 60
cttcctccga agacgttatc aaag 86

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Plasmit

<400> 4
ggagaaaata ccgcatcagg c 21

<210> 5
<211> 51
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5
ccctgaatca tcatctaagt nnnnnnnnng gtaagctcga ccaggacagt g 51

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
aaccttccat acgaactttg aaacg 25

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7
caaagttcgt atggaaggtt ccg 23

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8
acttagatga tgattcaggg ac 22

<210> 9
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 9
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tatgcatctc 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 10
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tacaaaaggt 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 11

<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 11
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttcttcatct 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 12
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tggaaagtat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 13
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 13
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tttattatat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 14
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 14
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttaatcctct 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 15
<211> 351
<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 15
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttcaatttat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 16
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tgcgcaatct 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 17
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 17
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tcagttccgt 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 18
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 18
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag taagttttat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 19
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 19
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttaaatgtat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 20
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tggattgtat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 21
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 21
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tcaaactcat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 22
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 22
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttacaaatct 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 23
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 23
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60

atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag ttatcagtct 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 24
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 24
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tcgaggatat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 25
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 25
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tccttgttat 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 361

<210> 26
<211> 41
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26
caggaaacag ctatgacatg ttccagccat cgccaaataa g 41

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 27
acttagatga tgattcaggg ac 22

<210> 28
<211> 51
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 28

ccctgaatca tcatctaagt acaaaaggtg gtaagctcga ccaggacagt g 51

<210> 29
<211> 51
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 29
ccctgaatca tcatctaagt taaatgtatg gtaagctcga ccaggacagt g 51

<210> 30
<211> 51
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 30
ccctgaatca tcatctaagt ccttgttatg gtaagctcga ccaggacagt g 51

<210> 31
<211> 43
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 31
tgtaaaacga cggccagtgc tgtactggac tgccttttga acg 43

<210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> Plasmit

<400> 32
gcactggccg tcgttttac 19

<210> 33
<211> 24
<212> ADN
<213> Plasmit

<400> 33
catgtcatag ctgtttcctg tgtg 24

<210> 34
<211> 1331
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 34
cctgatgcgg tattttctcc gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg 60
cctaaatggc gggtattttc atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc 120
ccatccggat aaaccaccat gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc 180
cccacagatc ctgactgctg ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca 240
aaaggctcaa caatacgaaa cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc 300
atcatctaag tatgcatctc ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg 360

attacaagaa catgaccaac atccgcgtag ctatcgtggg ctacggaaac ctgggacgca 420
gcgtcgaaaa gcttattgcc aagcagcccg acatggacct tgtaggaatc ttctcgcgcc 480
gggccaccct cgacacaaag acgccagtct ttgatgtcgc cgacgtggac aagcacgccg 540
acgacgtgga cgtgctgttc ctgtgcatgg gctccgccac cgacatccct gagcaggcac 600
caaagttcgc gcagttcgcc tgcaccgtag acacctacga caaccaccgc gacatcccac 660
gccaccgcca ggtcatgaac gaagccgcca ccgcagccgg caacgttgca ctggtctcta 720
ccggctggga tccaggaatg ttctccatca accgcgtcta cgcagcggca gtcttagccg 780
agcaccagca gcacaccttc tggggcccag gtttgtcaca gggccactcc gatgctttgc 840
gacgcatccc tggcgttcaa aaggcagtcc agtacaccct cccatccgaa gacgccctgg 900
aaaaggcccg ccgcggcgaa gccggcgacc ttaccggaaa gcaaacccac aagcgccaat 960
gcttcgtggt tgccgacgcg gccgatcacg agcgcatcga aaacgacatc cgcaccatgc 1020
ctgattactt cgttggctac gaagtcgaag tcaacttcat cgacgaagca accttcgact 1080
ccgagcacac cggcatgcca cacggtggcc acgtgattac caccggcgac accggtggct 1140
tcaaccacac cgtggaatac atcctcaagc tggaccgaaa cccagatttc accgcttcct 1200
cacagatcgc tttcggtcgc gcagctcacc gcatgaagca gcagggccaa agcggagctt 1260
tcaccgtcct cgaagttgct ccatacctgc tctccccaga gaacttggac gatctgatcg 1320
cacgcgacgt c 1331

<210> 35
<211> 5938
<212> ADN
<213> Plasmit

<400> 35
atctgatcgc acgcgacgtc ggcggtggct ctggaggtgg tgggtccggc ggtggctctg 60
cttcctccga agacgttatc aaagagttca tgcgtttcaa agttcgtatg gaaggttccg 120
ttaacggtca cgagttcgaa atcgaaggtg aaggtgaagg tcgtccgtac gaaggtaccc 180
agaccgctaa actgaaagtt accaaaggtg gtccgctgcc gttcgcttgg gacatcctgt 240
ccccgcagtt ccagtacggt tccaaagctt acgttaaaca cccggctgac atcccggact 300
acctgaaact gtccttcccg gaaggtttca aatgggaacg tgttatgaac ttcgaagacg 360
gtggtgttgt taccgttacc caggactcct ccctgcaaga cggtgagttc atctacaaag 420
ttaaactgcg tggtaccaac ttcccgtccg acggtccggt tatgcagaaa aaaaccatgg 480
gttgggaagc ttccaccgaa cgtatgtacc cggaagacgg tgctctgaaa ggtgaaatca 540
aaatgcgtct gaaactgaaa gacggtggtc actacgacgc tgaagttaaa accacctaca 600
tggctaaaaa accggttcag ctgccgggtg cttacaaaac cgacatcaaa ctggacatca 660
cctcccacaa cgaagactac accatcgttg aacagtacga acgtgctgaa ggtcgtcact 720
ccaccggtgc ttaactgcag gcatgcaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt 780
tcagcctgat acagattaaa tcagaacgca gaagcggtct gataaaacag aatttgcctg 840
gcggcagtag cgcggtggtc ccacctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg aaacgccgta 900
gcgccgatgg tagtgtgggg tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata 960
aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggcc tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac 1020
gctctcctga gtaggacaaa tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc 1080
ggagggtggc gggcaggacg cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc 1140
atcctgacgg atggcctttt tgcgtttcta caaactcttt ttgtttattt ttctaaatac 1200
attcaaatat gtatccgctc atgaattaat tccgctagat gacgtgcggc ttcgacctcc 1260
tgggcgtggc gcttgttggc gcgctcgcgg ctggctgcgg cacgacacgc gtctgagcag 1320
tattttgcgc gccgtcctcg tgggtcaggc cggggtggga tcaggccacc gcagtaggcg 1380
cagctgatgc gatcctccac tactgcgcgt cctcctggcg ctgccgagca cgcagctcgt 1440
cggccagctc ttcaaggtcg gccacaagcg tttctaggtc gctcgcggca cttgcccagt 1500
cgcgtgatgc tggcgcgtct gtcgtatcga gggcgcggaa aaatccgatc accgttttta 1560
aatcgacggc ggcatcgagt gcgtcggact ccagcgcgac atcggagaga tccaccgctg 1620
atgcttcagg ccagttttgg tacttcgtcg tgaaggtcat gacaccatta taacgaacgt 1680
tcgttaaaaa ttctagcccc aattctgata atttcttccg gcactcctgc gaaaacctgc 1740
gagacttctt gcccagaaaa aacgccaagc gcagcggtta ccgcactttt tttccaggtg 1800

atttcaccct gaccagcgaa gcggcacttt agtgcatgag gtgtgcccct ggtttcccct 1860
ctttggaggg ttcaacccaa aaaagcacac aagcaaaaat gaaaatcatc atgagcaagt 1920
tggtgcgaag cagcaacgcg ctagctccaa aaaggtctcc aggatctcga ggagattttt 1980
gaggggggagg gagtcgagga agagccagag cagaaggcgg ggaaccgttc tctgccgaca 2040
gcgtgagccc cccttaaaaa tcaggccggg gaggaaccgg ggagggatca gagctaggag 2100
cgagacaccc taaagggggg gaaccgtttt ctgctgacgg tgtttcgttt attagttttc 2160
agcccgtgga tagcggaggg tgagggcaag tgagagccag agcaaggacg ggacccctaa 2220
aggggggaac cgttttctgc tgacggtgtt tcgtttatta gttttcagcc cgtggacggc 2280
cgcgtttagc ttccattcca agtgcctttc tgacttgttg gatgcgcctt tcactgacac 2340
ctagttcgcc tgcaagctca cgagtcgagg gatcagcaac cgattgagaa cgggcatcca 2400
ggatcgcagt tttgacgcga agttcgagca actcgcctgt catttctcgg cgtttgtttg 2460
cttccgctaa tcgctgtcgc gtctcctgcg catacttact ttctgggtca gcccatctgc 2520
gtgcattcga tgtagctgcg ccccgtcgcc ccatcgtcgc tagagctttc cgccctcggc 2580
tgctctgcgt ttccacccga cgagcaggga cgactggctg gcctttagcc acgtagccgc 2640
gcacacgacg cgccatcgtc aggcgatcac gcatggcggg aagatccggc tcccggccgt 2700
ctgcaccgac cgcctgggca acgttgtacg ccacttcata cgcgtcgatg atcttggcat 2760
cttttaggcg ctcaccagca gctttgagct ggtatcccac ggtcaacgcg tggcgaaacg 2820
cggtctcgtc gcgcgctcgc tctggatttg tccagagcac tcgcacgccg tcgatcaggt 2880
cgccggacgc gtccagggcg ctcggcaggc tcgcgtccaa aatcgctagc gccttggctt 2940
ctgcggtggc gcgttgtgcc gcttcaatgc gggcgcgtcc gctggaaaag tcctgctcaa 3000
tgtacttttt cggcttctgt gatccggtca tcgttcgagc aatctccatt aggtcggcca 3060
gccgatccac acgatcatgc tggcagtgcc atttataggc tgtcggatcg tctgagacgt 3120
gcagcggcca ccggctcagc ctatgcgaaa aagcctggtc agcgccgaaa acacgagtca 3180
tttcttccgt cgttgcagcc agcaggcgca tatttgggct ggttttacct gctgcggcat 3240
acaccgggtc aatgagccag atgagctggc atttcccgct cagcggattc acgccgatcc 3300
aagccggcgc tttttctagg cgtgcccatt tctctaaaat cgcgtagacc tgcgggttta 3360
cgtgctcaat cttcccgccg gcctggtggc tgggcacatc gatgtcaagc acgatcaccg 3420
cggcatgttg cgcgtgcgtc agcgcaacgt actggcaccg cgtcagcgct tttgagccag 3480
cccggtagag ctttggttgg gtttcgccgg tatccgggtt tttaatccag gcgctcgcga 3540
aatctcttgt cttgctgccc tggaagcttt cgcgtcccag gtgagcgagc agttcgcggc 3600
gatcttctgc cgtccagccg cgtgagccgc agcgcatagc ttcggggtgg gtgtcgaaca 3660
gatcggcgga caatttccac gcgctagctg tgactgtgtc ctgcggatcg gctagagtca 3720
tgtcttgagt gctttctccc agctgatgac tgggggttag ccgacgccct gtgagttccc 3780
gctcacgggg cgttcaactt tttcaggtat ttgtgcagct tatcgtgttt tcttcgtaaa 3840
tgaacgctta actaccttgt taaacgtggc aaataggcag gattgatggg gatctagctt 3900
cacgctgccg caagcactca gggcgcaagg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag 3960
ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa 4020
gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc 4080
tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg 4140
gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat 4200
ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac 4260
aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact 4320
gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc 4380
gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactc caagacgagg 4440
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg 4500
tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt 4560
catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc 4620
atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag 4680
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg 4740
ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg gatgcccgac ggcgaggatc 4800
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt 4860
ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg 4920
ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt 4980
acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct 5040

tctgagcggg actctggggt tcgcggaatc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg 5100
ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt 5160
ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg 5220
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 5280
ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 5340
ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 5400
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 5460
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 5520
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg 5580
tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 5640
gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 5700
tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 5760
ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct 5820
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgcag ccgaacgacc 5880
gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc tgatgcggta ttttctcc 6134

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 36
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 37
<211> 39
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 37
ggcggtggct ctggaggtgg tgggtccggc ggtggctct 39

<210> 38
<211> 351
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 38
gtgcgtggcg agttttacaa agaaccccac atcatcaatg cctaaatggc gggtattttc 60
atccaaaccc aaccgcgcat cattccaatg ctgatccacc ccatccggat aaaccaccat 120
gaacggcaac ggatcaaaag tcctgttggt gaagctgcgc cccacagatc ctgactgctg 180
ggagccatga aaatagatca gcgcatccgt ggtggaacca aaaggctcaa caatacgaaa 240
cgttcgcttt cggtcctgat gaaagagatg tccctgaatc atcatctaag tatgcattgt 300
ggtaagctcg accaggacag tgccaccaca attttggagg attacaagaa c 351