



(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)



1-0051162

(51)^{2022.01} C12N 9/02; C12P 21/02; C12N 15/81

(13) B

(21) 1-2024-00081

(22) 07/06/2022

(86) PCT/KR2022/008016 07/06/2022

(87) WO 2022/260403 15/12/2022

(30) 10-2021-0075689 10/06/2021 KR

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/03/2024 432

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) IM, Yeong Eun (KR); HA, Cheol Woong (KR); YANG, Eun Bin (KR); KIM, Yeonsoo (KR).

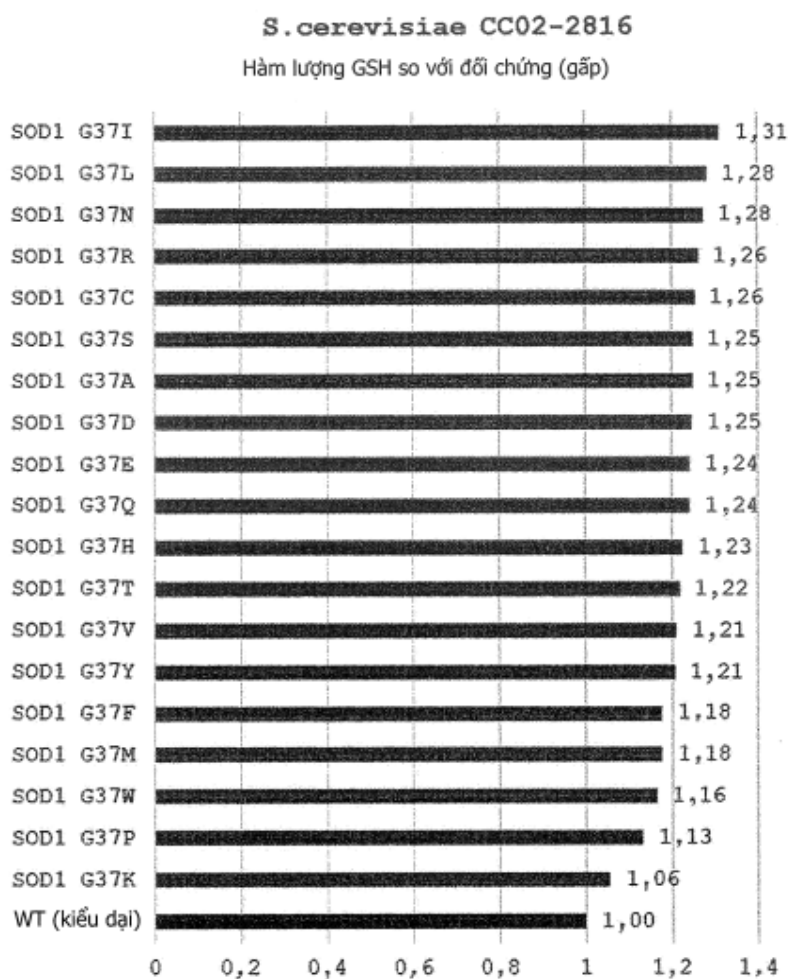
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) BIẾN THỂ PEROXIT DISMUTAZA, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION HOẶC CÁC DẪN XUẤT CỦA CHÚNG BẰNG CÁCH SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2024-00081

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể peroxit dismutaza 1, polynucleotit mã hóa biến thể peroxit dismutaza 1, vi sinh vật, và phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng bằng cách sử dụng biến thể này.

Fig.1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể peroxit dismutaza 1, polynucleotit mã hóa biến thể peroxit dismutaza 1, vi sinh vật, và phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng bằng cách sử dụng biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glutathion (GSH) là hợp chất hữu cơ lưu huỳnh được tìm thấy phổ biến nhất trong tế bào và nó tồn tại ở dạng tripeptit, trong đó ba axit amin (tức là glyxin, glutamat, và xystein) được liên hợp.

Trong cơ thể, glutathion tồn tại ở hai dạng: glutathion khử (GSH) và glutathion oxy hóa (GSSG). Glutathion khử thường xuất hiện với tỷ lệ khá cao. Nó chủ yếu phân tán trong gan và tế bào da của cơ thể người, và có vai trò quan trọng trong các chức năng chống oxy hóa, như phân hủy và loại bỏ các gốc oxy tự do, chức năng giải độc, như loại bỏ các hợp chất ngoại lai (tức là, các chất độc hại), và chức năng làm trắng để ức chế sự sản xuất melanin, v.v..

Do những chức năng đa dạng này, glutathion đã thu hút nhiều sự chú ý như là nguyên liệu trong nhiều lĩnh vực khác nhau như dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, v.v., và cũng được sử dụng trong điều chế các thành phần gia vị, thực phẩm và phụ gia thức ăn chăn nuôi. Glutathion được biết đến có tác dụng đáng kể trong việc tăng hương vị của nguyên liệu thô và duy trì hương vị đậm đà, và có thể dùng riêng làm chất tăng hương vị *kokumi* hoặc kết hợp với các chất khác. Thông thường, nguyên liệu *kokumi* có hương vị đậm đà hơn nguyên liệu *umami*, chẳng hạn như axit nucleic và MSG, và được biết đến là được tạo ra thông qua quá trình phân hủy và lão hóa protein. Hơn nữa, glutathion cũng có thể được chuyển đổi thành các peptit *gamma*-glutamyl khác (Sofyanovich, O. A. *et al.*, (2019) Multiple pathways for the formation of the γ -glutamyl peptits γ -glutamyl-valin và γ -glutamyl-valyl glycine in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 14 (5): e0216622). Peptit *gamma*-glutamyl là hợp chất có trọng lượng phân tử thấp có nhóm *gamma*-carboxyl của axit glutamic tại đầu tận cùng N của phân tử, và được

biết là được sử dụng rộng rãi như chất tăng hương vị *kokumi*.

Tuy nhiên, mặc dù nhu cầu về glutathion và các dẫn xuất của nó có thể sử dụng trong nhiều lĩnh vực như đã được mô tả ở trên ngày càng tăng, quy trình tổng hợp enzym vẫn chưa được thương mại hóa do chi phí sản xuất cao, và do đó, thị trường chưa được kích thích đáng kể do chi phí đáng kể cần thiết cho sản xuất công nghiệp glutathion và các dẫn xuất của nó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất biến thể peroxit dismutaza 1 và phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng bằng cách sử dụng biến thể này.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể peroxit dismutaza 1, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể, và vector bao gồm polynucleotit.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể và polynucleotit mã hóa biến thể.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất và phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng, bao gồm nuôi cấy vi sinh vật.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Biến thể peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể được sử dụng một cách hiệu quả trong quá trình sản xuất lượng lớn glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 và Fig.2 thể hiện kết quả xác nhận mức sản xuất glutathion bằng cách đưa biến thể peroxit dismutaza 1 vào trong chủng *Saccharomyces cerevisiae*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết sau đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng tương ứng cho các phần mô tả và các phương án khác. Nghĩa là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ ở đây đều

thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị hạn chế bởi mô tả cụ thể được mô tả dưới đây.

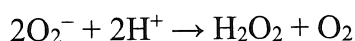
Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận diện hoặc xác nhận, chỉ bằng cách sử dụng thí nghiệm thông thường, nhiều đương lượng với các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Hơn thế, dự định rằng những đương lượng này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Hơn nữa, một số nghiên cứu và tài liệu sáng chế được tham chiếu và trích dẫn trong suốt bản mô tả của sáng chế. Nội dung của các nghiên cứu và tài liệu sáng chế đã được trích dẫn được đưa vào đây bằng cách tham chiếu toàn bộ, và mức độ lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc về cũng như nội dung của sáng chế sẽ được mô tả rõ ràng hơn.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể peroxit dismutaza 1 bao gồm sự thay thế axit amin trong protein có hoạt tính peroxit dismutaza 1 (SOD1), trong đó sự thay thế bao gồm thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác.

Biến thể có thể là biến thể protein trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

“Peroxit dismutaza 1” của sáng chế là enzym còn được gọi là “SOD1” hoặc “peroxit dismutaza [Cu-Zn]”. Peroxit dismutaza được biết đến là chất xúc tác cho sơ đồ phản ứng sau:



Như được sử dụng ở đây, trình tự axit amin của peroxit dismutaza 1 là trình tự axit amin mã hóa bởi gen *sod1*, và có thể được gọi là “protein SOD1”. Axit amin cấu thành peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể thu được từ GenBank của NCBI, cơ sở dữ liệu đã biết. Peroxit dismutaza 1 có thể là protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trong ví dụ khác, peroxit dismutaza 1 có thể có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*. Trong ví dụ khác, peroxit dismutaza 1 có thể là peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 là glyxin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và trình tự bất kỳ có hoạt tính peroxit dismutaza 1 tương tự như trình tự axit amin ở trên có

thể được bao gồm mà không bị giới hạn.

Trong ví dụ cụ thể, peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Hơn nữa, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin trong đó một phần của trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm, cũng có thể nằm trong phạm vi của protein mục tiêu để sửa đổi của sáng chế miễn là nó là trình tự axit amin có tính tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và biểu hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của protein nêu trên.

Ngoài ra, mặc dù theo sáng chế, peroxit dismutaza 1 được định nghĩa là protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 trong một ví dụ, nó không loại trừ đột biến có thể xảy ra bằng cách thêm trình tự vô nghĩa ở phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc có thể xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến câm của nó, và rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật rằng bất kỳ protein có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 có thể nằm trong peroxit dismutaza 1 theo sáng chế.

Tức là, theo sáng chế, mặc dù nó được biểu thị là “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể” hoặc “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể”, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin mà trong đó một phần của trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm, cũng có thể được sử dụng theo sáng chế, miễn là protein có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” hoặc “polypeptit được sửa đổi” đề cập đến protein có một hoặc nhiều axit amin khác với trình tự được đề cập bằng các thay thế và/hoặc sửa đổi bảo toàn sao cho các chức năng hoặc các đặc tính của protein được giữ lại.

Các biến thể khác với các trình tự được xác định bằng thay thế, xóa hoặc bổ sung một số axit amin. Các biến thể như vậy thường có thể được xác định bằng việc biến đổi một hoặc nhiều trình tự axit amin bên trên của protein và đánh giá các đặc tính của protein sửa đổi. Tức là, khả năng của các biến thể có thể được tăng cường, không thay đổi hoặc giảm xuống so với protein tự nhiên. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các polypeptit được sửa đổi mà trong đó một hoặc nhiều vùng, chẳng hạn như trình tự

dẫn đầu đầu tận cùng N hoặc miền xuyên màng, đã được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó vùng đã được loại bỏ từ đầu tận cùng C và/hoặc N của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” hoặc “polypeptit được sửa đổi” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như biến đổi, protein được sửa đổi, đột biến, mutein, phân kỳ, biến thể, v.v., miễn là các thuật ngữ được sử dụng để chỉ sự biến đổi, nhưng các thuật ngữ không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo toàn” đề cập đến thay thế của axit amin bằng axit amin khác có có đặc tính hóa học và/hoặc cấu trúc tương tự. Biến thể có thể có, ví dụ, một hoặc nhiều thay thế bảo toàn trong khi vẫn giữ lại một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên sự giống nhau về độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc tính chất lưỡng tính của gốc.

Ví dụ, trong số các axit amin có mạch bên tích điện, các axit amin (bazo) tích điện dương bao gồm arginin, lysin, và histidin; các axit amin (tính axit) tích điện âm bao gồm axit glutamic và axit aspartic; và các axit amin có mạch bên không tích điện bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin.

Ngoài ra, biến thể cũng có thể bao gồm xóa hoặc bổ sung các axit amin có sự ảnh hưởng tối thiểu đến các đặc tính và cấu trúc thứ cấp của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể liên hợp với trình tự (hoặc dẫn đầu) tín hiệu tại đầu tận cùng N liên quan đến vận chuyển của các protein đồng dịch mã hoặc sau dịch mã. Hơn nữa, polypeptit cũng có thể liên hợp với trình tự khác hoặc liên kết để xác định, tính chế, hoặc tổng hợp polypeptit.

Theo một phương án, biến thể theo sáng chế có thể là thể peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, hoặc polypeptit được sửa đổi có hoạt tính peroxit dismutaza 1, trong số peroxit dismutaza 1 được mô tả bên trên. Biến thể theo sáng chế, tức là, “biến thể peroxit dismutaza 1” có thể được biểu hiện như “polypeptit (sửa đổi) có hoạt tính peroxit dismutaza 1” hoặc “biến thể SOD1”, hoặc có thể biến thể có thể tăng cường sản xuất glutathion so với polypeptit kiểu đại hoặc polypeptit không sửa đổi, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, biến thể có thể là thể peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Theo sáng chế, “thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn miễn là nó là axit amin khác với axit amin trước khi thay thế. Trong khi đó, theo sáng chế, khi thể hiện rằng “axit amin cụ thể được thay thế”, rõ ràng rằng axit amin được thay thế bằng axit amin khác với axit amin trước khi thay thế, ngay cả khi điều đó không quy định cụ thể rằng axit amin đã được thay thế bằng axit amin khác.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, “axit amin khác” có thể là axit amin ngoại trừ glyxin. Cụ thể là axit amin khác có thể là axit amin được lựa chọn từ alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, glutamin, axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, và histidin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “vị trí tương ứng” đề cập đến gốc axit amin tại vị trí nêu trong protein hoặc peptit, hoặc gốc axit amin là tương tự, đồng nhất hoặc tương đồng với gốc nêu trong protein hoặc peptit. Như được sử dụng ở đây, “vùng tương ứng” thường đề cập đến vị trí tương tự hoặc tương ứng trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Theo sáng chế, có thể sử dụng cách đánh số cụ thể của các vị trí gốc axit amin trong protein được sử dụng ở đây. Ví dụ, có thể đánh số lại các vị trí gốc axit amin của protein của sáng chế theo các vị trí tương ứng bằng cách căn thẳng trình tự peptit của protein của sáng chế với protein đích cần so sánh.

Biến thể peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, có thể là protein mà trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, trong số trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%.

Biến thể như vậy có thể là biến thể có tính tương đồng hoặc đồng nhất of 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc nhiều hơn với trình tự có SEQ ID NO: 1, và có tính tương đồng hoặc đồng nhất nhỏ hơn 100% với trình tự có SEQ ID

NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Biến thể peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, có thể bao gồm bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30. Cụ thể là biến thể có thể về cơ bản bao gồm bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30, và cụ thể hơn bao gồm bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30.

Thêm nữa, biến thể có thể bao gồm bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30, hoặc có thể bao gồm trình tự axit amin, trong đó axit amin ở vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin được cố định (tức là, trong trình tự axit amin của biến thể, axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30 đồng nhất với axit amin tại vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30) và có tính tương đồng hoặc đồng nhất 80% hoặc nhiều hơn, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể là biến thể theo sáng chế có thể có bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30 và có thể có tính tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các trình tự axit amin của bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin của bất kỳ một trong các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30 có thể bao gồm polypeptit, là axit amin khác ngoài glyxin. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin, trong đó một phần của trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm, có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và thể hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” có nghĩa là mức độ phù hợp giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho và có thể được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm. Thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và các hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bằng chương trình đang sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ

bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai hóa với toàn bộ hoặc ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% của toàn bộ chiều dài trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Rõ ràng rằng việc lai hóa còn bao gồm lai hóa polynucleotit với polynucleotit chứa đơn vị mã hóa (codon) thông thường hoặc codon trong sự xem xét thoái biến codon.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc protein có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, thuật toán “FASTA” (Pearson *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444) bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Thay vào đó, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453), được thực hiện trong chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) (gói chương trình GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, *J MOLEC BIOL* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI).

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP chẳng hạn như Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol.* 48:443, như được đưa ra trong, ví dụ, Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP có thể được định nghĩa là giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (cụ thể, các nucleotit hoặc các axit amin) cho tổng số các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong hai trình tự. Các tham số mặc định đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (bao gồm giá trị 1 đối với đồng nhất và giá trị 0 đối với không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745 như được mô tả bởi Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353–358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI

NUC4.4)); (2) hàm phạt bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển bằng 10, hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển bằng 0,5); và (3) không có hàm phạt đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối.

Ngoài ra, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự đồng nhất, tương tự, hoặc tương đồng hay không có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự này thông qua các thử nghiệm lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai hóa thích hợp được xác định có thể nằm trong phạm vi của công nghệ và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit”, là polyme of các nucleotit bao gồm các monome nucleotit được nối theo chuỗi dài bằng liên kết cộng hoá trị, là chuỗi ADN hoặc ARN có ít nhất độ dài nhất định.

Gen mã hóa peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể là gen *sod1*.

Gen có thể có nguồn gốc từ nấm men. Cụ thể là nó có thể có nguồn gốc từ chi *Saccharomyces*, cụ thể hơn là từ *Saccharomyces cerevisiae*. Cụ thể là bất kỳ gen có thể bao gồm mà không giới hạn miễn là nó mã hóa polypeptit có hoạt tính của peroxit dismutaza 1 có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*. Theo một phương án, nó có thể là gen mã hóa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, và theo phương án khác, nó có thể bao gồm trình tự nucleotit of SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Polynucleotit mã hóa biến thể peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ polynucleotit mã hóa biến thể peroxit dismutaza 1 hoặc polypeptit có hoạt tính tương ứng với nó mà không bị giới hạn.

Peroxit dismutaza 1 theo sáng chế hoặc polynucleotit mã hóa biến thể của nó có thể trải qua nhiều biến đổi trong vùng mã hóa trong phạm vi mà không thay đổi trình tự

axit amin của polypeptit, do thoái biến codon hoặc xem xét các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó polypeptit được biểu hiện.

Cụ thể, polynucleotit mã hóa biến thể peroxit dismutaza 1 theo sáng chế có thể bao gồm trình tự polynucleotit bất kỳ mà không giới hạn miễn là nó mã hóa biến thể protein mà trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 bằng axit amin khác.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa biến thể protein theo sáng chế có thể biến thể protein theo sáng chế, cụ thể trình tự polynucleotit mã hóa bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30 hoặc polypeptit có tính tương đồng hoặc đồng nhất với nó, và trình tự mã hóa axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong bất kỳ trình tự trong số các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30 có thể là trình tự polynucleotit mã hóa axit amin ngoại trừ glyxin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Tính tương đồng và đồng nhất như được mô tả bên trên.

Hơn nữa, polynucleotit mã hóa biến thể protein theo sáng chế có thể bao gồm đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bất kỳ mã hóa biến thể protein mà trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác, có thể lai hóa với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit dưới các điều kiện nghiêm ngặt mà không giới hạn.

“Các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook *et al.*). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có tính tương đồng hoặc đồng nhất cao từ 40% hoặc nhiều hơn, cụ thể 90% hoặc nhiều hơn, cụ thể hơn 95% hoặc nhiều hơn, 96% hoặc nhiều hơn, 97% hoặc nhiều hơn, 98% hoặc nhiều hơn, hoặc cụ thể hơn nữa 99% hoặc nhiều hơn, được lai hóa với nhau và các gen có tính tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn các tương đồng hoặc đồng nhất bên trên không được lai hóa với nhau, hoặc các điều kiện rửa của lai Southern, tức là, rửa một lần, cụ thể là hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và cụ thể hơn 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Lai hóa yêu cầu hai axit nucleic chứa các trình tự bổ sung, mặc dù sự không khớp

giữa các bazơ có thể phụ thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenin bổ sung cho thymine và xytosin bổ sung cho guanin. Do đó, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các đoạn axit nucleic đã phân lập bổ sung cho toàn bộ trình tự cũng như các trình tự axit nucleic về cơ bản tương tự với chúng.

Cụ thể là các polynucleotit có tính tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai ở giá trị T_m là 55°C dưới các điều kiện được mô tả bên trên. Hơn nữa, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C, hoặc 65°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích của nó.

Mức độ nghiêm ngặt để lai hóa các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài của các polynucleotit và mức độ bổ sung, và các biến số này đã được biến đổi trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế có thể đề xuất vector bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc AND chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein đích liên kết chức năng với vùng điều hòa biểu hiện phù hợp (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) để cho phép biểu hiện polypeptit đích trong tế bào chủ thích hợp. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm các vùng khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự vận hành để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự để điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Một khi được biến nạp vào trong tế bào chủ thích hợp, vector sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của nó.

Theo một ví dụ, polynucleotit mã hóa protein đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế với polynucleotit được sửa đổi thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể nội bào. Chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã được biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để xác nhận chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc để lựa chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận xem phân tử axit nucleic đích đã được chèn, và các chỉ

dầu cung cấp các kiểu hình có thể lựa chọn, chẳng hạn như kháng thuốc, tăng dưỡng, kháng lại các tác nhân gây độc tế bào, hoặc biểu hiện có thể sử dụng các protein bề mặt có thể được sử dụng. Chỉ các tế bào biểu thị chỉ dấu chọn lọc mới có thể tồn tại hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng tác nhân chọn lọc và do đó các tế bào đã biến đổi có thể được chọn.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Vector biểu hiện nấm men có thể bao gồm cả plasmid tích hợp nấm men (YIp) và vector plasmid ngoại bào. Vector plasmid ngoại bào có thể bao gồm plasmid episomal nấm men (Yep), plasmid sao chép nấm men (YRp), và plasmid đoạn trung tâm nấm men (YCp). Ngoài ra, các nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YACs) cũng có thể được sử dụng như vector của sáng chế. Các ví dụ cụ thể của vector có thể được sử dụng có thể bao gồm pESCHIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, vector hiển thị nấm men pYD1, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, vi nấm men dạng A, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405, và pYJ406, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào trong tế bào chủ sao cho protein mã hóa bởi polynucleotit có thể biểu hiện trong tế bào chủ. Miễn là được biến nạp polynucleotit có thể biểu hiện trong tế bào chủ, không quan trọng xem polynucleotit được biến nạp có được tích hợp vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm trong đó hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể hay không, và cả hai trường hợp được bao gồm. Hơn nữa, polynucleotit có thể bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ, miễn là nó có thể được đưa vào trong tế bào chủ và biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ ở dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố yêu cầu cho biểu hiện tự động của nó. Catxet biểu

hiện có thể thường bao gồm các vùng khởi động liên kết chức năng với polynucleotit, trình kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, hoặc trình kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ như vốn có và liên kết chức năng với trình tự được yêu cầu cho biểu hiện trong tế bào chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Hơn nữa, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết chức năng” có nghĩa rằng trình tự gen được liên kết chức năng với trình tự các vùng khởi động để khởi đầu và trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa polypeptit đích của sáng chế.

Phương pháp biến nạp vector của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ phương pháp có thể đưa axit nucleic vào trong tế bào, và biến nạp có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp như đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm điện di, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE–dextrans, phương pháp liposom cation, và phương pháp lithi axetat–DMSO, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Sáng chế có thể đề xuất vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều peroxit dismutaza 1 và polynucleotit mã hóa biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật” bao gồm tất cả vi sinh vật kiểu dại, hoặc các vi sinh vật sửa đổi bằng phương pháp tự nhiên hoặc nhân tạo, và là khái niệm toàn diện bao gồm tất cả các vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc được tăng cường do chèn gen ngoại lai, hoặc tăng cường hoặc suy yếu hoạt tính của gen nội sinh.

Theo một phương án, vi sinh vật có thể vi sinh vật sản xuất glutathion. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật để sản xuất glutathion” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như “vi sinh vật sản xuất glutathion”, “vi sinh vật có khả năng sản xuất glutathion”, “chủng sản xuất glutathion”, “chủng có khả năng sản xuất glutathion”, v.v..

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, vi sinh vật có thể vi sinh vật sản xuất các dẫn xuất glutathion.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, vi sinh vật

của sáng chế có thể bao gồm vector bao gồm polynucleotit mã hóa peroxit dismutaza 1.

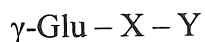
“Glutathion” của sáng chế có thể được sử dụng thay thế cho “glutathion” hoặc “GSH”, và đề cập đến tripeptit bao gồm ba axit amin (tức là, glutamat, xystein, glyxin). Glutathion có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô cho dược phẩm, thực phẩm chức năng sức khỏe, hương liệu, thực phẩm, phụ gia thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

“Dẫn xuất glutathion” của sáng chế có thể bao gồm chất bất kỳ có thể được chuyển đổi bằng cách sử dụng glutathion làm nguyên liệu ban đầu mà không giới hạn.

Theo sáng chế, glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng có thể được gọi chung là “peptit *gamma*-glutamyl”. Peptit *gamma*-glutamyl đề cập đến hợp chất r trọng lượng phân tử thấp có nhóm *gamma*-carboxyl của axit glutamic tại đầu tận cùng N của phân tử.

Cụ thể là peptit *gamma*-glutamyl có thể hợp chất được biểu diễn bằng Công thức chung 1 bên dưới:

[Công thức chung 1]



Trong công thức chung bên trên, X là xystein, axit glutamic, tyrosin, methionin, valin, tryptophan, axit aspartic, isoleuxin, leuxin, asparagin, glutamin, histidin, lysin, ornithin, arginin, *S*-metylxystein, hoặc *S*-etylxystein;

Y là glyxin, alanin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin, methionin, xystein, axit aspartic, asparagin, glutamin, lysin, ornithin, arginin, phenylalanin, tyrosin, prolin, hydroxyprolin, *alpha*-aminobutyric acid, hoặc absent.

Theo một phương án, peptit *gamma*-glutamyl có thể được lựa chọn từ γ -Glu-Cys-Gly (Glutathion), γ -Glu-Glu (γ -EF), γ -Glu-Tyr (γ -EY), γ -Glu-Met (γ -EM), γ -Glu-Val (γ -EV), γ -Glu-Trp (γ -EW), γ -Glu-Asp (γ -ED), γ -Glu-Ile (γ -EI), γ -Glu-Leu (γ -EL), γ -Glu-Cys-Gly (γ -ECG), γ -Glu-Val-Gly (γ -EVG), γ -glutamyl-*S*-metyl-xystein (γ -E-*S*-metyl-C), γ -glutamyl-*S*-ethenyl-xystein (γ -E-*S*-ethenyl-C), và γ -glutamyl-cysteinyl- β -alanin (γ -E-C- β -A).

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, peptit *gamma*-glutamyl có thể glutathion, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản xuất vượt mức glutathion mong muốn, bao gồm peroxit dismutaza 1, so với vi sinh vật không sửa đổi hoặc kiểu dại. Vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể bởi loại của nó miễn là nó có thể sản xuất glutathion, nhưng có thể vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể *Saccharomyces cerevisiae*. Tuy nhiên, vi sinh vật không bị giới hạn ở đó.

Chủng bố mẹ của vi sinh vật sản xuất glutathion bao gồm biến thể không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có khả năng sản xuất glutathion. Vi sinh vật có thể còn bao gồm các đột biến chẳng hạn như tăng cường các con đường sinh tổng để tăng khả năng sản xuất glutathion, giải phóng ức chế phản hồi, hoặc bất hoạt gen để làm suy yếu các con đường thoái biến hoặc các con đường sinh tổng hợp, và các đột biến này không loại trừ các đột biến xảy ra tự nhiên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường” hoạt tính polypeptit có nghĩa rằng hoạt tính của polypeptit được tăng lên so với hoạt tính nội sinh của nó. Tăng cường có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như kích hoạt, điều chỉnh tăng, biểu hiện quá mức, tăng, v.v.. Cụ thể, kích hoạt, tăng cường, điều chỉnh tăng, biểu hiện quá mức và tăng có thể bao gồm cả hai trường hợp mà trong đó hoạt tính không được sở hữu ban đầu được biểu hiện, hoặc hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi biến đổi. “Hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit cụ thể được sở hữu ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không sửa đổi, khi đặc điểm bị thay đổi thông qua biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. “Tăng cường”, “điều chỉnh tăng”, “biểu hiện quá mức”, hoặc “tăng” hoạt tính của polypeptit so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa rằng hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) polypeptit được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit cụ thể được sở hữu ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không sửa đổi.

Tăng cường có thể đạt được bằng cách đưa polypeptit ngoại lai, hoặc bằng cách tăng cường hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit nội sinh. Tăng cường hoạt tính của polypeptit có thể được xác nhận bằng cách tăng mức hoạt tính của polypeptit, mức độ biểu hiện, hoặc lượng sản phẩm được bài tiết từ polypeptit.

Tăng cường hoạt tính của polypeptit có thể được áp dụng bằng các phương pháp khác nhau đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và không bị giới hạn miễn là nó có

thể tăng cường hoạt tính của polypeptit đích so với hoạt tính của vi sinh vật trước khi biến đổi. Cụ thể là kỹ thuật gen và/hoặc kỹ thuật protein đã được biến đổi đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, là phương pháp thông thường trong sinh học phân tử có thể được sử dụng, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây (ví dụ, Sitnicka *et al.* Functional Analysis of Genes. *Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1–16, Sambrook *et al.* *Molecular Nhân dòng* 2012, v.v.).

Cụ thể là tăng cường polypeptit của sáng chế có thể đạt được bằng cách:

- 1) tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit;
- 2) thay thế vùng điều hòa biểu hiện của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể with trình tự có hoạt tính mạnh;
- 3) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của bản phiên mã gen mã hóa polypeptit;
- 4) biến đổi trình tự axit amin của polypeptit sao cho hoạt tính của polypeptit được tăng cường;
- 5) biến đổi trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit sao cho hoạt tính của polypeptit được tăng cường (ví dụ, việc biến đổi trình tự polynucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit đã được sửa đổi để tăng cường hoạt tính của polypeptit);
- 6) đưa polypeptit ngoại lai biểu hiện hoạt tính polypeptit hoặc polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit;
- 7) tối ưu hóa codon của polynucleotit mã hóa polypeptit;
- 8) phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và nhờ đó lựa chọn và việc biến đổi vị trí tiếp xúc, hoặc biến đổi hóa học polypeptit; hoặc
- 9) kết hợp của hai hoặc nhiều hơn được lựa chọn từ phương pháp 1 đến 8 nêu trên, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Cụ thể hơn là

Phương pháp 1 để tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit có thể đạt được bằng cách đưa vector, được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa polypeptit và có khả năng để sao chép và hoạt động bất kể tế bào chủ, vào trong tế bào chủ. Ngoài ra, phương pháp có thể đạt được bằng cách đưa một

bản sao hoặc hai bản sao của các polynucleotit mã hóa polypeptit vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Đưa vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách đưa vector, có khả năng để chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, vào trong tế bào chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vector như được mô tả bên trên.

Phương pháp 2 để thay thế vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng trình tự có hoạt tính mạnh có thể đạt được bằng cách gây ra biến đổi trên trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện, hoặc by thay thế trình tự bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, các vùng khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v.. Theo một ví dụ, phương pháp có thể bao gồm thay thế các vùng khởi động ban đầu với các vùng khởi động mạnh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ của các vùng khởi động đã biết đến ở sinh vật nhân chuẩn bao gồm các vùng khởi động cho yếu tố kéo dài dịch mã 1 (TEF1), glycerol-3-phosphat dehydrogenaza 1 (GPD1), 3-phosphoglyxerat kinaza, hoặc các enzym glycolytic khác, ví dụ, enolaza, glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvate kinaza, trioza phosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza; các ví dụ của các vùng khởi động nấm men khác, là các vùng khởi động cảm ứng với các ưu điểm bổ sung của phiên mã được điều khiển bởi các điều kiện sinh trưởng bao gồm các vùng khởi động cho alcohol dehydrogenaza 2, isocytocrom C, axit phosphataza, các enzym thoái biến liên quan đến chuyển hóa nitơ, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenaza, và các enzym chịu trách nhiệm sử dụng maltoza và galactozơ; các vùng khởi động có thể được sử dụng khi tế bào chủ là nấm men có thể bao gồm TEF1 các vùng khởi động, TEF2 các vùng khởi động, GAL10 các vùng khởi động, GAL1 các vùng khởi động, ADH1 các vùng khởi động, ADH2 các vùng khởi động, PHO5 các vùng khởi động, GAL1-10 các vùng khởi động, TDH3 các vùng khởi động (GPD các vùng khởi động), TDH2 các vùng khởi động, TDH1 các vùng khởi động, PGK1 các vùng khởi động, PYK2 các vùng khởi động,

ENO1 các vùng khởi động, ENO2 các vùng khởi động, và TPI1 các vùng khởi động; và các vectơ thích hợp và các vùng khởi động để sử dụng trong biểu hiện nấm men còn được mô tả trong patent châu Âu số 073657, nhưng các vùng khởi động không bị giới hạn ở đó. Hơn nữa, các chất tăng cường nấm men cũng có thể được sử dụng thuận lợi theo cách kết hợp với các vùng khởi động nấm men, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp 3 để biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR of bản phiên mã gen mã hóa polypeptit có thể đạt được, ví dụ, bằng cách thay thế thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu khác có tốc độ biểu hiện cao của polypeptit so với codon khởi đầu nội sinh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các phương pháp 4 và 5 để biến đổi trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit có thể đạt được bằng cách gây ra biến đổi trên trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn của trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc kết hợp của chúng để tăng cường hoạt tính của polypeptit, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit sửa đổi để có hoạt tính mạnh hơn, hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit sửa đổi để tăng cường hoạt tính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Việc thay thế có thể được thực hiện cụ thể bằng cách chèn polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vectơ được sử dụng ở đây có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để xác nhận chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc như được mô tả bên trên.

Phương pháp 6 để đưa polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit có thể đạt được bằng cách đưa vào trong tế bào chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit để biểu hiện hoạt tính giống/tương tự với hoạt tính của polypeptit. Polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn bất kể nguồn gốc hoặc trình tự của nó miễn là nó biểu hiện hoạt tính giống/tương tự với hoạt tính của polypeptit. Việc đưa vào có thể được thực hiện bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật bằng cách lựa chọn phù hợp phương pháp biến nạp đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và biểu hiện của polynucleotit được đưa vào trong tế bào chủ cho phép sản sinh polypeptit, nhờ đó tăng hoạt tính của nó.

Phương pháp 7 để tối ưu hóa codon của polynucleotit mã hóa polypeptit có thể đạt được bằng cách tối ưu hóa codon của polynucleotit nội sinh để tăng phiên mã hoặc dịch mã trong tế bào chủ, hoặc bằng cách tối ưu hóa các codon của nó sao cho phiên mã và dịch mã được tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai có thể đạt được trong tế bào chủ.

Phương pháp 8 để phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và nhờ đó lựa chọn và việc biến đổi vị trí tiếp xúc, hoặc biến đổi hóa học polypeptit có thể đạt được, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự của polypeptit cần phân tích với cơ sở dữ liệu trong đó thông tin trình tự của các protein đã biết được lưu trữ, để xác định các ứng viên protein mẫu theo mức độ tương tự trình tự, và do đó xác nhận cấu trúc dựa trên thông tin, nhờ đó lựa chọn và biến nạp hoặc việc biến đổi vị trí tiếp xúc cần sửa đổi hoặc biến đổi hóa học.

Sự tăng cường như vậy của hoạt tính polypeptit có nghĩa rằng hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit tương ứng được tăng lên so với hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit được biểu hiện trong vi sinh vật trước khi biến đổi hoặc kiểu dại, hoặc lượng sản phẩm được sản xuất từ polypeptit được tăng lên, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Biến đổi một phần hoặc toàn bộ của polynucleotit trong vi sinh vật của sáng chế có thể đạt được bằng cách (a) tái tổ hợp tương đồng sử dụng vector cho chèn nhiễm sắc thể trong vi sinh vật hoặc sửa đổi gen sử dụng thao tác di truyền (ví dụ, CRISPR-Cas9) và/hoặc (b) có thể gây ra bởi ánh sáng, chẳng hạn như tia cực tím và hồng ngoại, v.v., và/hoặc các xử lý hóa học, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Phương pháp biến đổi một phần hoặc toàn bộ gen có thể bao gồm phương pháp bằng công nghệ tái tổ hợp ADN. Ví dụ, một phần hoặc toàn bộ của gen có thể xóa bằng cách tiêm trình tự nucleotit hoặc vector chứa trình tự nucleotit tương đồng với gen đích vào trong vi sinh vật để gây ra tái tổ hợp tương đồng. Trình tự nucleotit được tiêm hoặc vector có thể bao gồm chỉ dấu chọn lọc trội, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “suy yếu” của polypeptit là khái niệm toàn diện bao gồm cả giảm xuống hoặc không có hoạt tính so với hoạt tính nội sinh của nó. Sự suy yếu có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như bất hoạt, thiếu hụt, điều chỉnh xuống, giảm, giảm xuống, suy giảm, v.v..

Sự suy yếu cũng có thể bao gồm trường hợp trong đó hoạt tính polypeptit bị giảm hoặc bị loại bỏ so với hoạt tính của polypeptit được sở hữu ban đầu bởi vi sinh vật do

đột biến của polynucleotit mã hóa polypeptit; trường hợp trong đó mức độ tổng thể của hoạt tính polypeptit nội bào và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) bị giảm so với chủng tự nhiên do ức chế biểu hiện của gen của polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc sự ức chế của dịch mã vào trong polypeptit, v.v.; trường hợp trong đó polynucleotit hoàn toàn không được biểu hiện; và/hoặc trường hợp trong đó không có hoạt tính polypeptit được quan sát ngay cả khi polynucleotit được biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit cụ thể được sở hữu ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp, vì sinh vật không sửa đổi hoặc kiểu dại, khi tính trạng bị biến đổi thông qua biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. Biểu hiện hoạt tính polypeptit là “bị bất hoạt, thiếu hụt, bị giảm, bị điều chỉnh xuống, giảm xuống hoặc bị suy giảm” so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa rằng hoạt tính polypeptit bị giảm so với hoạt tính của polypeptit cụ thể được sở hữu ban đầu bởi chủng bố mẹ before biến nạp hoặc vì sinh vật không sửa đổi.

Sự suy yếu của hoạt tính polypeptit có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây, và có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Nakashima N. *et al.*, Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2773–2793, Sambrook *et al.* *Molecular Nhân dòng* 2012, v.v.).

Cụ thể là sự suy yếu của hoạt tính polypeptit của sáng chế có thể đạt được bằng cách:

- 1) xóa một phần hoặc toàn bộ của gen mã hóa polypeptit;
- 2) biến đổi vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) sao cho biểu hiện của gen mã hóa polypeptit bị giảm;
- 3) biến đổi trình tự axit amin cấu thành polypeptit sao cho hoạt tính polypeptit bị loại bỏ hoặc bị suy yếu (ví dụ, xóa/thay thế/bổ sung của một hoặc nhiều axit amin trên trình tự axit amin);
- 4) biến đổi trình tự gen mã hóa polypeptit sao cho hoạt tính polypeptit bị loại bỏ hoặc bị suy yếu (ví dụ, xóa/thay thế/bổ sung của một hoặc nhiều các nucleotit trên trình tự nucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit đã sửa đổi để loại bỏ hoặc suy yếu

hoạt tính của polypeptit);

5) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của bản phiên mã gen mã hóa polypeptit;

6) đưa antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN), liên kết bổ sung với bản phiên mã gen mã hóa polypeptit;

7) thêm trình tự bổ sung vào trình tự Shine–Dalgarno (SD) ở đầu trước của trình tự SD của gen mã hóa polypeptit để tạo thành cấu trúc bậc hai, nhờ đó ức chế gắn kết ribosom;

8) kỹ thuật phiên mã ngược (RTE), bổ sung các vùng khởi động, được phiên mã ngược, trên đầu tận cùng đầu tận cùng 3' của khung đọc mở (ORF) của trình tự gen mã hóa polypeptit; or

9) kết hợp của hai hoặc nhiều hơn được lựa chọn từ các phương pháp 1 đến 8 bên trên, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Ví dụ,

Phương pháp 1 để xóa một phần hoặc toàn bộ của gen mã hóa polypeptit có thể đạt được bằng cách xóa toàn bộ polynucleotit mã hóa polypeptit đích nội sinh trong nhiễm sắc thể, hoặc bằng cách thay thế polynucleotit bằng polynucleotit có nucleotit xóa một phần, hoặc có gen chỉ dấu.

Phương pháp 2 để biến đổi vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) có thể đạt được bằng cách gây ra biến đổi trên vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) thông qua xóa, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không thay thế bảo toàn, hoặc kết hợp của chúng; hoặc bằng thay thế trình tự bằng trình tự có hoạt tính yếu. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm các vùng khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, và trình tự để điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp 5 để biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của bản phiên mã gen mã hóa polypeptit có thể đạt được, ví dụ, bằng cách thay thế thay thế trình tự nucleotit with trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu khác có tốc độ biểu hiện polypeptit thấp hơn codon khởi đầu nội sinh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các phương pháp 3 và 4 để biến đổi trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit có thể đạt được bằng cách gây ra biến đổi trên trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn của trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc kết hợp của chúng để làm suy yếu hoạt tính của polypeptit, hoặc bằng thay thế trình tự bằng trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit sửa đổi để có hoạt tính yếu, hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit sửa đổi để có không có hoạt tính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, biểu hiện của gen có thể bị ức chế hoặc bị suy yếu bằng cách đưa đột biến vào trong trình tự polynucleotit để tạo thành codon kết thúc, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp 6 để đưa antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN), liên kết bổ sung với bản phiên mã gen mã hóa polypeptit có thể tìm thấy trong tài liệu (Weintraub, H. *et al.*, Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986).

Phương pháp 7 để thêm trình tự bổ sung vào trình tự Shine–Dalgarno (SD) ở đầu trước của trình tự SD của gen mã hóa polypeptit để tạo thành cấu trúc bậc hai, nhờ đó ức chế gắn kết ribosom có thể đạt được bằng cách ức chế mARN dịch mã hoặc giảm tốc độ của nó.

Phương pháp 8 là kỹ thuật phiên mã ngược (RTE), bổ sung các vùng khởi động, được phiên mã ngược, trên đầu tận cùng 3' of khung đọc mở (ORF) của trình tự gen mã hóa polypeptit có thể đạt được bằng cách tạo thành antisense nucleotit bổ sung vào bản phiên mã gen mã hóa polypeptit để làm suy yếu hoạt tính.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, vi sinh vật của sáng chế có thể bao gồm đột biến trong vùng điều hòa biểu hiện của glutamat–xystein ligaza (GSH1) để tăng khả năng sản xuất glutathion. Đột biến có thể bất kỳ một hoặc nhiều các đột biến được lựa chọn từ –250(C→T), –252(G→A), –398(A→T), –399(A→C), –407(T→C), và –409(T→C) phía trước của GSH1 ORF.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, vi sinh vật có thể bao gồm đột biến mà trong đó axit amin thứ 86 và/hoặc axit amin thứ 653 của glutamat–xystein ligaza (GSH1) được thay thế bằng các axit amin khác. Cụ thể là vi sinh vật có thể bao gồm đột biến mà trong đó axit amin thứ 86 được thay thế bằng arginin và axit amin thứ 653 acid được thay thế bằng methionin, nhưng đột biến không bị giới

hạn ở đó.

Theo một phương án bất kỳ trong các phương án đã được mô tả ở trên, vi sinh vật có thể bao gồm đột biến mà trong đó hoạt tính của glutamat–xystein ligaza (GSH1) được tăng cường, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể peroxit dismutaza 1 theo sáng chế và polynucleotit mã hóa biến thể có thể “vi sinh vật biểu hiện peroxit dismutaza 1 trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác”, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Peroxit dismutaza 1 và các biến thể của nó như được mô tả bên trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cần biểu hiện/ biểu hiện” đối với protein đề cập đến trạng thái trong đó protein đích được đưa vào vào trong vi sinh vật hoặc protein đích được sửa đổi cần biểu hiện in vi sinh vật.

Vi sinh vật biểu hiện biến thể protein theo sáng chế có thể vi sinh vật đã sửa đổi để biểu hiện biến thể protein theo sáng chế, và theo đó, khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất vi sinh vật biểu hiện biến thể protein theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chủng trước khi biến đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi biến đổi” không loại trừ chủng chứa đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong vi sinh vật, và có thể đề cập đến chủng đại hoặc bản thân chủng tự nhiên, hoặc chủng trước khi tính trạng được thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. “Chủng trước khi biến đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi biến đổi” có thể được sử dụng thay thế cho “chủng không đột biến”, “chủng không sửa đổi”, “vi sinh vật không đột biến”, “vi sinh vật không sửa đổi”, hoặc “vi sinh vật tham chiếu”.

Theo sáng chế, vi sinh vật bao gồm biến thể peroxit dismutaza 1 theo sáng chế, polynucleotit mã hóa biến thể, hoặc vector bao gồm polynucleotit có thể vi sinh vật tái tổ hợp, và tái tổ hợp có thể đạt được bằng cách biến đổi gen chẳng hạn như biến nạp.

Ví dụ, vi sinh vật có thể vi sinh vật tái tổ hợp được điều chế bằng cách biến nạp với vector bao gồm polynucleotit, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vi sinh vật tái tổ hợp có thể nấm men, ví dụ, vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể *Saccharomyces cerevisiae*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất và phương pháp sản xuất glutathion hoặc

các dẫn xuất của chúng, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật. Vi sinh vật, glutathion, hoặc các dẫn xuất của chúng như được mô tả bên trên.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy chủng của sáng chế có thể bất kỳ môi trường được sử dụng cho nuôi cấy thông thường của các vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces* mà không có bất kỳ giới hạn cụ thể. Cụ thể là chủng của sáng chế có thể được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin, và/hoặc vitamin, trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các cacbohyđrat, chẳng hạn như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; các rượu đường, chẳng hạn như mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ, chẳng hạn như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin, chẳng hạn như glutamat, methionin, lysin, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên chẳng hạn như tinh bột thủy phân, mật đường, mật mía, cám gạo, sắn, mật mía và dịch chiết ngô, v.v., và các cacbohyđrat chẳng hạn như glucoza và mật đường đã được xử lý trước đã khử trùng (tức là, mật đường). chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng. Ngoài ra, nhiều nguồn cacbon khác với số lượng thích hợp có thể được sử dụng không giới hạn. Những nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp từ hai loại trở lên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nguồn nitơ có thể bao gồm các nguồn nitơ vô cơ, chẳng hạn như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, v.v.; và các nguồn nitơ hữu cơ chẳng hạn như các axit amin, peptone, NZ-amin, chiết xuất thịt, chiết xuất men, chiết xuất mạch nha, dịch chiết ngâm ngô, dịch thủy phân casein, cá hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, bánh đậu nành đã khử chất béo hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, v.v.. Những nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp từ hai loại trở lên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, v.v.. Các ví dụ của hợp chất vô cơ có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, iron clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, v.v..

Ngoài ra, các axit amin, vitamins, và/hoặc các tiền chất thích hợp có thể bao gồm

trong môi trường. Cụ thể là các L axit amin, v.v., có thể thêm vào môi trường nuôi cấy của chúng. Cụ thể là glyxin, glutamat, và/hoặc xystein có thể thêm, và Các L axit amin, chẳng hạn như lysin, có thể còn thêm khi cần, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Môi trường hoặc tiền chất có thể thêm vào sản phẩm nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, độ pH của sản phẩm nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy chúng bằng cách thêm hợp chất chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, axit sulfuric, v.v. vào sản phẩm nuôi cấy theo cách thích hợp. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt chẳng hạn như este polyglycol axit béo để ngăn chặn sự tạo bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào sản phẩm nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của sản phẩm nuôi cấy; hoặc có thể bơm khí nitơ, hydro hoặc cacbon đioxit hoặc không thể bơm khí để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc vi hiếu khí của môi trường.

Nhiệt độ của sản phẩm nuôi cấy có thể trong phạm vi từ 25°C đến 40°C, và cụ thể là từ 28°C đến 37°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Việc nuôi cấy có thể có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng vật liệu hữu ích mong muốn, cụ thể là từ 1 đến 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp sản xuất có thể còn bao gồm quy trình bổ sung sau bước nuôi cấy. Quy trình bổ sung có thể được lựa chọn thích hợp tùy thuộc vào việc sử dụng glutathion hoặc các dẫn xuất của nó.

Cụ thể là phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng có thể bao gồm bước thu hồi glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng tích lũy trong các tế bào bằng bước nuôi cấy, ví dụ, phương pháp có thể bao gồm bước thu hồi glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng từ ít nhất một vật liệu được lựa chọn từ các chủng, sản phẩm khô của nó, dịch chiết của nó, sản phẩm nuôi cấy của nó, và dịch ly giải của nó after bước nuôi cấy. Trong ví dụ khác, phương pháp sản xuất các dẫn xuất glutathion có thể bao gồm bước chuyển hóa glutathion thành dẫn xuất.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước ly giải chủng trước bước thu hồi hoặc đồng thời. Ly giải của chủng có thể được thực hiện bằng phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế, ví dụ, bằng dung dịch đệm ly giải, máy siêu âm, xử lý nhiệt và máy ép kiểu Pháp, v.v.. Ngoài ra, bước ly giải có thể bao gồm, nhưng

không giới hạn ở, các phản ứng enzym như các enzym ly giải thành tế bào, các enzym ly giải axit nucleic, các enzym chuyển axit nucleic, và các proteaza, v.v..

Nấm men khô, chiết xuất nấm men, bột hỗn hợp chiết xuất nấm men, glutathion nguyên chất hoặc các dẫn xuất của chúng chứa hàm lượng glutathion cao hoặc các dẫn xuất của chúng có thể được điều chế thông qua phương pháp sản xuất theo sáng chế, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó, và có thể được điều chế thích hợp theo sản phẩm mong muốn.

Theo sáng chế, nấm men khô có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ chẳng hạn như “sản phẩm sấy khô của chúng”. Nấm men khô có thể được điều chế bằng cách sấy khô các tế bào nấm men trong đó glutathion được tích lũy, và có thể cụ thể bao gồm chế phẩm dùng cho thức ăn chăn nuôi, chế phẩm dùng cho thực phẩm, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, chiết xuất nấm men có thể được sử dụng thay thế cho term chẳng hạn như “chiết xuất chúng”. Dẫn xuất của chúng có nghĩa là vật liệu còn lại sau khi tách thành tế bào ra khỏi các tế bào của chúng. Cụ thể, nó có thể có nghĩa là các thành phần còn lại không bao gồm thành tế bào khỏi các thành phần thu được từ quá trình ly giải tế bào. Dẫn xuất của chúng bao gồm bao gồm glutathion hoặc các dẫn xuất của nó, và các thành phần khác có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần protein, cacbohyđrat, axit nucleic và chất xơ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong bước thu hồi, nguyên liệu đích, tức là glutathion hoặc dẫn xuất của nó, có thể được thu hồi bằng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Bước thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh chế. Quy trình tinh chế có thể có thể là tinh chế thuần túy bằng cách chỉ tách glutathion hoặc các dẫn xuất của nó khỏi chúng. Glutathion tinh khiết có thể được điều chế từ quy trình tinh chế.

Nếu cần, phương pháp sản xuất glutathion có thể còn bao gồm bước trộn vật liệu được lựa chọn từ trong số các chủng thu được sau bước nuôi cấy, sản phẩm khô của nó, dịch chiết của nó, sản phẩm nuôi cấy của nó, dịch ly giải của nó, và glutathion được thu hồi từ đó với tá dược. Qua bước trộn, bột trộn chiết xuất nấm men có thể được điều chế. Quy trình tương tự có thể được áp dụng cho các dẫn xuất của glutathion.

Tá dược có thể được lựa chọn và sử dụng thích hợp theo mục đích sử dụng hoặc

dạng thức, ví dụ, nó có thể được chọn từ tinh bột, glucoza, xenlulo, lactoza, glycogen, D-mannitol, sorbitol, lactitol, maltodextrin, canxi cacbonat, nhôm silicat tổng hợp, canxi phosphat đibazơ, canxi sunfat, natri clorua, natri hydro cacbonat, lanolin tinh khiết, dextrin, natri alginat, metyl xenluloza, keo silica gel, tinh bột hydroxypropyl, hydroxypropyl metylxenluloza, propylen glycol, casein, canxi lactat, Primojel® và kẹo cao su Ả Rập, cụ thể một hoặc nhiều thành phần được chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, dextrin, glycogen, D-mannitol, và maltodextrin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Tá được có thể bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất làm ướt, chất phân tán, chất tạo hỗn dịch, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất đẳng trương, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ của sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các Ví dụ và Ví dụ thử nghiệm. Tuy nhiên, các Ví dụ và Ví dụ thử nghiệm này chỉ được cung cấp nhằm mục đích minh họa và phạm vi bảo hộ của sáng chế không nhằm mục đích giới hạn trong hoặc bởi các Ví dụ và Ví dụ thử nghiệm này.

Ví dụ 1: Cải thiện chủng sản xuất glutathion

Để cải thiện thêm khả năng sản xuất glutathion của chủng CJ-5 (patent Hàn quốc số KR 10-2222210 B1), là chủng sản xuất glutathion được ký gửi với số truy cập KCCM12568P, các đột biến được gây ra theo phương pháp sau.

Chủng CJ-5 được nuôi cấy trên môi trường rắn và sau đó được cấy chuyển vào trong canh trường để thu được dung dịch nuôi cấy, và UV được chiếu vào các tế bào sử dụng đèn UV. Sau đó, chỉ các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc bằng cách trải dung dịch nuôi cấy đã chiếu UV trên môi trường đĩa thu được bằng cách phân lập, và chủng có sự cải thiện lớn nhất về khả năng sản xuất glutathion được phân lập.

Kết quả xác nhận bộ gen của chủng được phân lập, các đột biến ở -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C), và -409(T→C) xảy ra ở phía trước của GSH1 ORF, và điều này xác nhận rằng xystein, axit amin ở vị trí thứ 86 của protein GSH1 mã hóa bởi gen *gsh1*, được thay thế bằng arginin, và axit amin ở vị trí thứ 653 (glyxin) được thay thế bằng methionin.

Chủng nêu trên được đặt tên CC02-2816 và được ký gửi tại và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 08 tháng 12 năm 2020, và được cấp số lưu chủng KCCM12891P.

Ví dụ 2: Thử nghiệm cải thiện bổ sung của chủng

Để cải thiện thêm khả năng sản xuất glutathion của chủng CC02-2816 của ví dụ 1, đột biến được gây ra theo cách sau.

Chủng CC02-2816 được nuôi cấy trên môi trường rắn và sau đó được cấy chuyển vào trong canh trường để thu được dung dịch nuôi cấy, và các tế bào được chiếu xạ với ánh sáng UV bằng cách sử dụng đèn UV. Sau đó, chỉ các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc bằng cách trải dung dịch nuôi cấy đã chiếu UV trên môi trường đĩa thu được bằng cách phân lập, và các trình tự nucleotit được phân tích.

Các kết quả thử nghiệm, xác nhận rằng axit amin tại vị trí thứ 37 (glyxin) có SOD1 (SEQ ID NO: 1), là protein mã hóa bởi *sod1* mã hóa peroxit dismutaza 1 của chủng có hàm lượng glutathion được cải thiện bằng 26%, được thay thế bằng arginin.

Ví dụ 3: Thử nghiệm đột biến dư vị trí thứ 37 của protein SOD1

Từ các kết quả của ví dụ 2, xác nhận rằng vị trí thứ 37 của protein SOD1 sẽ rất quan trọng đối với việc sản xuất glutathion, và chủng *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D hương đại và CC02-2816 của ví dụ 1 được điều chế để biểu hiện protein đột biến trong đó axit amin thứ 37 của protein SOD1 được thay thế bằng axit amin khác, nhờ đó xác định xem sản xuất glutathion được tăng lên hay không.

Để điều chế chủng mà trong đó axit amin thứ 37 của protein SOD1 từ nấm men *S. cerevisiae* được thay thế bằng arginin, các plasmit pWAL100 và pWBR100 được sử dụng có tham chiếu đến các nội dung được bộc lộ trong tài liệu Lee T. H. *et al.* (*J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16(6), 979–982).

Cụ thể là PCR được thực hiện như sau sử dụng ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6 để thu được một phần trình tự của đầu tận cùng N SOD1 bao gồm chuỗi bên BamHI ở đầu tận cùng N, codon khởi đầu của SOD1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến G37R, và để thu được một phần trình tự của đầu tận cùng C SOD1 bao gồm chuỗi bên

XhoI ở đầu tận cùng C, codon kết thúc SOD1 ORF và trình tự mã hóa đột biến G37R bằng cách sử dụng cặp mồi có SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 7. Sau đó, các sản phẩm thu được được thực hiện PCR chồng lắp sử dụng SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7 sử dụng hai trình tự này làm mạch khuôn, các phân đoạn SOD1 ORF bao gồm trình tự mã hóa protein đột biến SOD1 trong đó axit amin thứ 37 được thay thế bằng arginin, đầu tận cùng N BamHI, và các enzym giới hạn XhoI ở đầu tận cùng C. Các phân đoạn ORF được tách dòng vào trong vector pWAL100 được xử lý với cùng enzym sau khi xử lý với BamHI và XhoI, và vector pWAL100-SOD1(G37R)) được điều chế.

Ngoài ra, PCR được thực hiện sử dụng SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 dựa trên ADN bộ gen của chủng CJ-5 làm mạch khuôn để thu được phân đoạn 500 bp phía sau của codon kết thúc SOD1 ORF bao gồm đầu tận cùng N SpeI và các trình tự enzym giới hạn NcoI tại đầu tận cùng C, và phân đoạn được xử lý với SpeI và các enzym giới hạn NcoI. Sau khi nhân dòng phân đoạn trong pWBR100 được xử lý với cùng enzym giới hạn, vector pWBR100-SOD1 được điều chế.

Để điều chế phân đoạn ADN cuối cùng được đưa vào vào trong nấm men, sản phẩm PCR chứa trình tự mã hóa đột biến arginin và một phần của KIURA3 thu được dựa trên vector pWAL100-SOD1 (G37R) được điều chế trước đó làm mạch khuôn bằng cách sử dụng cặp mồi có SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 10, và sản phẩm PCR chứa một phần KIURA3 và phân đoạn 500 bp phía sau của codon kết thúc SOD1 thu được dựa trên vector pWBR100-SOD1 làm mạch khuôn bằng cách sử dụng cặp mồi có SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 9. Mỗi sản phẩm PCR được biến nạp vào trong *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CC02-2816 ở cùng tỷ lệ mol. PCR được thực hiện dưới các điều kiện biến tính ở 95°C trong 5 phút, ủ để gắn mồi ở 53°C trong 1 phút, và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút trên 1 kb. Để biến nạp nấm men, phương pháp lithi axetat sửa đổi từ tài liệu Geitzs (*Nucleic Acid Research*, 20(6), 1425) được sử dụng. Cụ thể là sau khi rửa các tế bào nấm men với O.D. từ 0,7 đến 1,2 lần với dung dịch đệm lithi axetat/TE, các sản phẩm PCR và AND sợi đơn (Sigma D-7656) được trộn với nhau và được nuôi cấy cố định trong dung dịch đệm lithi axetat/TE/40% PEG ở 30°C trong 30 phút và ở 42°C trong 15 phút. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trên đĩa thạch SC (2% glucoza) không chứa uracil cho đến khi các khuẩn lạc được quan sát thấy để thu được chủng trong đó trình tự mã hóa đột biến SOD1 G37R và gen KIURA3 được đưa vào. Tiếp theo, để loại bỏ KIURA3, mỗi chủng được nuôi cấy qua đêm trong 2 mL of YPD, pha loãng theo

tỷ lệ 1/100, và cấy trải trên đĩa thạch SC (2% glucoza) chứa 0,1% 5-FOA để tạo ra chủng đột biến *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D SOD1 G37R và chủng đột biến *S. cerevisiae* CC02-2816 SOD G37R có chỉ dấu đã được loại bỏ khỏi đó. Các chủng có khả năng biểu hiện protein đột biến SOD1 thay thế bằng axit amin khác arginin cũng được điều chế theo cách tương tự ngoại trừ cặp mỗi trong đó trình tự mã hóa arginin thứ 37 trên các trình tự đoạn mỗi có SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng trình tự mã hóa axit amin khác, được sử dụng.

Bảng 1

Các đoạn mỗi	Trình tự 5' -> 3'
F_BamHI_SOD1 (SEQ ID NO: 4)	GGTAGGATCC ATGGTTCAAGCAGTCGCAGTGTTAA
F_SOD1_G37R (SEQ ID NO: 5)	TTACGAGATCGCTCGCAACAGTCCT
R_SOD1_G37R (SEQ ID NO: 6)	AGGACTGTTGCGAGCGATCTCGTAA
R_XhoI_SOD1 (SEQ ID NO: 7)	ATGACTCGAG TTAGTTGGTTAGACCAATGACACCA
F_SpeI_SOD1_DW (SEQ ID NO: 8)	TAGAACTAGT TGTTAATGATAATATACTTGAATA
R_NcoI_SOD1_DW (SEQ ID NO: 9)	GCTGCCATGG ACACTACTAGCTCCTGAAGACCAAG
R_AL killer (SEQ ID NO: 10)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR killer (SEQ ID NO: 11)	CTTGACGTTTCGTTGACTGATGAG

Các kết quả đo nồng độ và hàm lượng glutathion (GSH) được sản xuất bằng cách nuôi cấy từng chủng được điều chế bên trên trong 26 giờ được thể hiện trong các bảng 2 và 3, và Fig.1 và Fig.2 bên dưới.

Bảng 2

<i>S. cerevisiae</i> CC02-2816		
	Hàm lượng (gấp)	Nồng độ (gấp)
WT (kiểu đại)	1,00	1,00
SOD1 G37A	1,25	1,16
SOD1 G37C	1,26	1,14

SOD1 G37D	1,25	1,11
SOD1 G37E	1,24	1,14
SOD1 G37F	1,18	0,90
SOD1 G37H	1,23	1,12
SOD1 G37I	1,31	1,16
SOD1 G37K	1,06	1,14
SOD1 G37L	1,28	1,17
SOD1 G37M	1,18	0,95
SOD1 G37N	1,28	1,14
SOD1 G37P	1,13	0,73
SOD1 G37Q	1,24	1,18
SOD1 G37R	1,26	1,18
SOD1 G37S	1,25	1,24
SOD1 G37T	1,22	1,22
SOD1 G37V	1,21	1,24
SOD1 G37W	1,16	0,69
SOD1 G37Y	1,21	1,21

Bảng 3

<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D		
	Nồng độ (gấp)	Hàm lượng (gấp)
CEN.PK	1,00	1,00
SOD1 G37A	1,06	1,10
SOD1 G37C	1,05	1,08
SOD1 G37D	1,08	1,11
SOD1 G37E	1,07	1,12
SOD1 G37F	1,34	1,26
SOD1 G37H	1,24	1,11
SOD1 G37I	1,32	1,19
SOD1 G37K	1,19	1,13
SOD1 G37L	1,31	1,25
SOD1 G37M	1,18	1,07
SOD1 G37N	1,27	1,17
SOD1 G37P	1,12	1,12
SOD1 G37Q	1,26	1,17

SOD1 G37R	1,10	1,06
SOD1 G37S	1,26	1,21
SOD1 G37T	1,22	1,18
SOD1 G37V	1,18	1,12
SOD1 G37W	1,26	1,23
SOD1 G37Y	1,23	1,14

Dựa trên các kết quả, xác nhận rằng khả năng sản xuất glutathion có thể tăng lên bằng cách thay thế thay thế axit amin tại vị trí thứ 37 bằng các axit amin khác, và theo đó, ít có thể hiểu rằng biến thể protein SOD1 được đề xuất theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để sản xuất các peptit *gamma*-glutamyl.

Từ phần mô tả bên trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không cần sửa đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Các phương án ví dụ được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bằng các yêu cầu bảo hộ kèm theo thay vì mô tả ở trên. Tất cả những thay đổi về ý nghĩa và phạm vi tương đương của yêu cầu bảo hộ sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể peroxid dismutaza 1 (SOD1), trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 37 từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.
2. Biến thể theo điểm 1, trong đó axit amin khác được chọn từ alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, glutamin, axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, và histidin.
3. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể bao gồm bất kỳ một trình tự trong số các trình tự có SEQ ID NO: 12 đến SEQ ID NO: 30.
4. Polynucleotit mã hóa biến thể peroxid dismutaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3.
5. Vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể peroxid dismutaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3; và polynucleotit mã hóa biến thể.
6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó vi sinh vật sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng.
7. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là *Saccharomyces cerevisiae*.
9. Phương pháp sản xuất glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể peroxid dismutaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3; và polynucleotit mã hóa biến thể trong môi trường.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp còn bao gồm thu hồi glutathion hoặc các dẫn xuất của chúng từ ít nhất một chất được lựa chọn từ vi sinh vật nuôi cấy, sản phẩm khô của nó, dịch chiết của nó, sản phẩm nuôi cấy của nó, và dịch ly giải của nó.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> BIẾN THỂ PEROXIT DISMUTAZA, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION HOẶC CÁC DẪN XUẤT CỦA CHÚNG BẰNG CÁCH SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

<130> OPA22037

<150> KR 10-2021-0075689

<151> 2021-06-10

<160> 30

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 154

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
20 25 30

Tyr Glu Ile Ala Gly Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
50 55 60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
65 70 75 80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
85 90 95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
100 105 110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145 150

<210> 2

<211> 465

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

atggttcaag cagtcgcagt gttaaagggt gatgccggtg tctctggtgt tgtcaagttc 60

gaacaggctt ccgaatccga gccaaaccact gtctcttacg agatcgctgg taacagtcct 120
 aacgcagaac gtgggttcca cattcatgag tttggagatg ccaccaatgg ttgtgtctct 180
 gctggtcctc acttcaatcc tttcaagaag acacatgggtg ctccaactga cgaagtcaga 240
 catgtcgggtg acatgggtaa cgtaaagacg gacgaaaatg gtgtggccaa gggctccttc 300
 aaggactctt tgatcaagct tatcggtcct acctccgttg taggcagaag cgtcgttata 360
 cacgccggcc aagatgactt aggtaagggt gacactgaag aatctttgaa gactggtaat 420
 gccgggtccaa gaccagcctg tgggtgtcatt ggtctaacca actaa 465

<210> 3
 <211> 465
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Saccharomyces cerevisiae_CC02-2816_sod1

<400> 3
 atggttcaag cagtcgcagt gttaaagggt gatgccgggtg tctctgggtg tgtcaagttc 60
 gaacaggctt ccgaatccga gccaaaccact gtctcttacg agatcgctgg taacagtcct 120
 aacgcagaac gtgggttcca tattcatgag tttggagatg ccaccaatgg ttgtgtctct 180
 gctggtcctc acttcaatcc tttcaagaag acacacgggtg ctccaactga cgaagtcaga 240
 catgtcgggtg acatgggtaa cgtaaagacg gacgaaaatg gtgtggccaa gggctccttc 300
 aaggactctt tgatcaagct tatcggtcct acctccgttg taggcagaag cgtcgttata 360
 cacgccggcc aagatgactt aggtaagggt gacactgaag aatctttgaa gactggtaat 420
 gccgggtccaa gaccagcctg tgggtgtcatt ggtctaacca actaa 465

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

<220>
 <223> F_BamHI_SOD1

<400> 4
 ggtaggatcc atggttcaag cagtcgcagt gttaa

35

<210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_SOD1_G37R

<400> 5
 ttacgagatc gctcgcaaca gtcct 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R_SOD1_G37R

<400> 6
 aggactgttg cgagcgatct cgtaa 25

<210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> R_XhoI_SOD1

<400> 7
 atgactcgag ttagttggtt agaccaatga cacca 35

<210> 8
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_SpeI_SOD1_DW

<400> 8
 tagaactagt tgttaatgat aatatacttg aata 34

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

<220>
 <223> R_NcoI_SOD1_DW

<400> 9
 gctgccatgg acactactag ctcctgaaga ccaag 35

<210> 10

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

<220>
 <223> R_AL killer

<400> 10
 gagcaatgaa cccaataacg aaatctt 27

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F_BR killer

<400> 11
 cttgacgttc gttcgactga tgag 24

<210> 12
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37A

<400> 12
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Ala Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145 150

<210> 13
<211> 154
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SOD1 G37C

<400> 13
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
1 5 10 15
Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
20 25 30
Tyr Glu Ile Ala Cys Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
35 40 45
His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
50 55 60
Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
65 70 75 80
His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
85 90 95
Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
100 105 110
Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
115 120 125
Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
130 135 140
Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145 150

<210> 14
<211> 154
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SOD1 G37D

<400> 14
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
1 5 10 15
Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
20 25 30

Tyr Glu Ile Ala Asp Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 15
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37E

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

130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 16
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37F

<400> 16
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Phe Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 17
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37H

<400> 17
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser

```

                20                25                30
Tyr Glu Ile Ala His Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
   35                40                45
His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
   50                55                60
Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
   65                70                75                80
His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
                85                90                95
Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
                100                105                110
Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
                115                120                125
Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
                130                135                140
Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145                150

```

```

<210>    18
<211>    154
<212>    PRT
<213>    Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>    SOD1 G37I

```

```

<400>    18
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
   1                5                10                15
Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
                20                25                30
Tyr Glu Ile Ala Ile Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
   35                40                45
His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
   50                55                60
Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
   65                70                75                80
His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
                85                90                95
Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
                100                105                110
Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
                115                120                125

```

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 19
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37K

<400> 19
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30

Tyr Glu Ile Ala Lys Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 20
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37L

<400> 20
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Leu Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 21
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37M

<400> 21
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Met Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 22
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37N

<400> 22
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30

Tyr Glu Ile Ala Asn Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 23
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37P

<400> 23
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Pro Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 24
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37Q

<400> 24
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Gln Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly

```

115              120              125
Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130              135              140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145              150

<210>      25
<211>      154
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      SOD1 G37R

<400>      25
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1              5              10              15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
      20              25              30

Tyr Glu Ile Ala Arg Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
      35              40              45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
      50              55              60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
      65              70              75              80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
      85              90              95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
      100              105              110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
      115              120              125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
      130              135              140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145              150

<210>      26
<211>      154
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      SOD1 G37S

<400>      26
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly

```



```

      1             5             10             15
Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
      20             25             30

Tyr Glu Ile Ala Ser Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
      35             40             45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
      50             55             60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
      65             70             75             80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
      85             90             95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
      100            105            110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
      115            120            125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
      130            135            140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
      145            150

```

```

<210>    27
<211>    154
<212>    PRT
<213>    Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>    SOD1 G37T

```

```

<400>    27
Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
      1             5             10             15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
      20             25             30

Tyr Glu Ile Ala Thr Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
      35             40             45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
      50             55             60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
      65             70             75             80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
      85             90             95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
      100            105            110

```

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 28
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37V

<400> 28
 Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15

Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30

Tyr Glu Ile Ala Val Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60

Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80

His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95

Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 29
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37W

<400> 29

Met Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Val Lys Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Ala Trp Asn Ser Pro Asn Ala Glu Arg Gly Phe His Ile
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Ala Thr Asn Gly Cys Val Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Phe Lys Lys Thr His Gly Ala Pro Thr Asp Glu Val Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Met Gly Asn Val Lys Thr Asp Glu Asn Gly Val Ala
 85 90 95
 Lys Gly Ser Phe Lys Asp Ser Leu Ile Lys Leu Ile Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125
 Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
 145 150

<210> 30
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SOD1 G37Y

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

Val Val Gly Arg Ser Val Val Ile His Ala Gly Gln Asp Asp Leu Gly
115 120 125

Lys Gly Asp Thr Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gly Asn Ala Gly Pro Arg
130 135 140

Pro Ala Cys Gly Val Ile Gly Leu Thr Asn
145 150

Fig.1

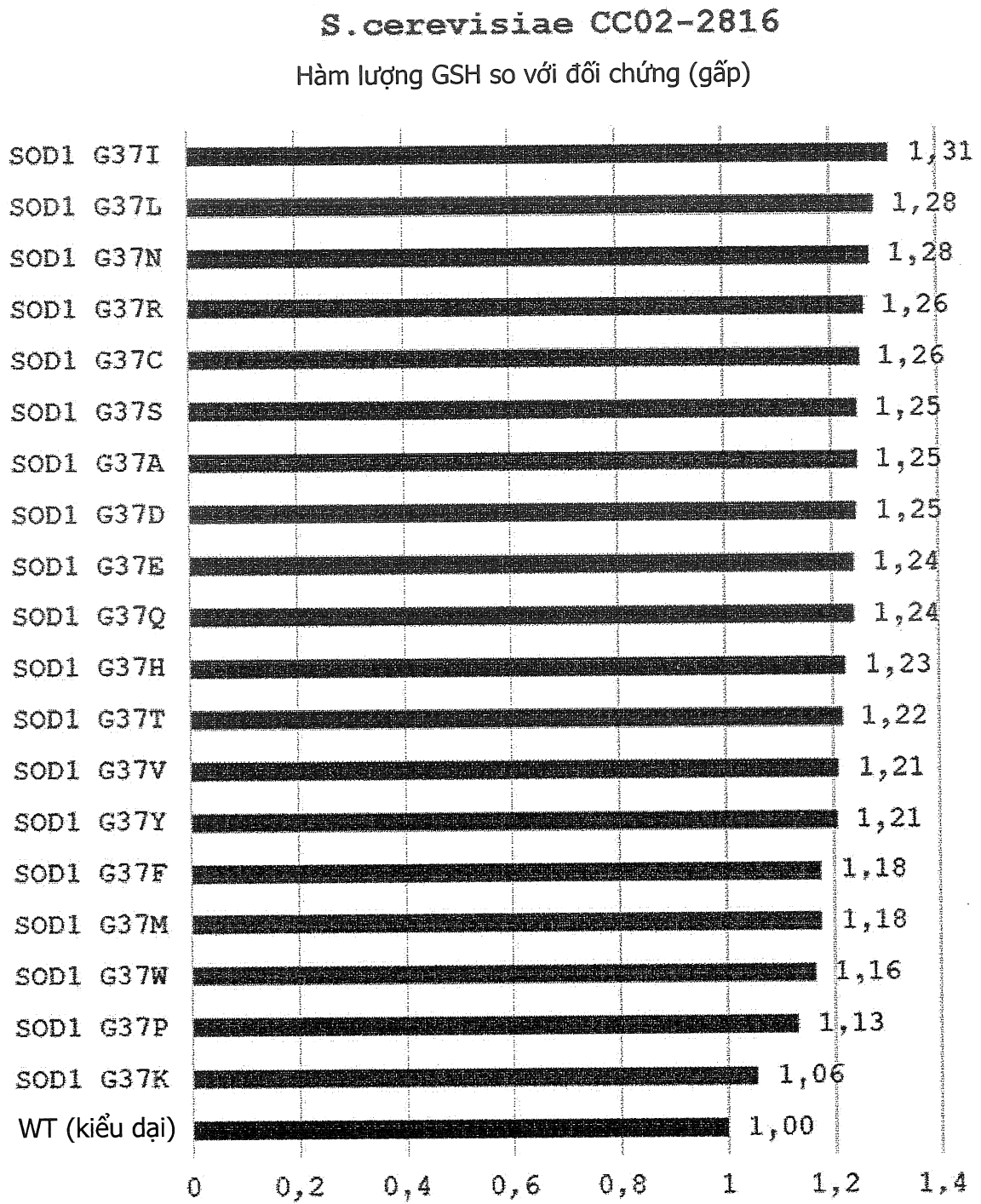


Fig.2

