



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2021.01} C07K 14/00; C12N 9/16; C12N 9/10; (13) B
C12N 15/70; C12N 9/04



1-0051960

-
- (21) 1-2022-04110 (22) 08/06/2021
(86) PCT/KR2021/007172 08/06/2021 (87) WO 2021/251734 16/12/2021
(30) 10-2020-0069753 09/06/2020 KR
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/05/2023 422A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) PARK, Hye Min (KR); KIM, So-Yeon (KR); SIM, Hee-jin (KR); LEE, Jin Nam
(KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)
-

- (54) POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SẢN SINH O-PHOSPHOSERIN,
POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA POLYPEPTIT, VI SINH VẬT, VÀ CÁC PHƯƠNG
PHÁP SẢN XUẤT O-PHOSPHOSERIN, XYSTEIN, VÀ CÁC DẪN XUẤT
XYSTEIN SỬ DỤNG O-PHOSPHOSERIN

(21) 1-2022-04110

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin (OPS), polynucleotit mã hóa polypeptit, vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin, và các phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin, xystein, và các dẫn xuất xystein sử dụng *O*-phosphoserin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin (OPS), polynucleotit mã hóa polypeptit, vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin, và các phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin, xystein và các dẫn xuất xystein sử dụng *O*-phosphoserin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-Xystein là axit amin có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa lưu huỳnh trong tất cả các cơ thể sống, không chỉ được sử dụng trong quá trình tổng hợp các protein sinh học như keratin tóc (chất sừng tóc), glutathion, biotin, methionin, và các chất chuyển hóa chứa lưu huỳnh khác, mà còn là tiền chất để sinh tổng hợp coenzym A.

Các phương pháp sản xuất L-xystein sử dụng các vi sinh vật đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật bao gồm: 1) phương pháp chuyển đổi sinh học D,L-2-aminthiazolin-4-carboxylic axit (D,L-ATC) thành L-xystein sử dụng các vi sinh vật, 2) phương pháp sản xuất L-xystein bằng cách lên men trực tiếp sử dụng *E. coli* (US 5972663 A; Wada M và Takagi H, *Appl. Microbiol. Biochem.*, 73:48–54, 2006), và 3) phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin (sau đây được gọi là “OPS”) bằng cách lên men sử dụng các vi sinh vật, và sau đó chuyển đổi *O*-phosphoserin thành L-xystein bằng cách cho phản ứng *O*-phosphoserin với sulfua dưới sự xúc tác của *O*-phosphoserin sulfhydrylaza (sau đây được gọi là “OPSS”) (patent Hoa Kỳ số US 8557549).

Cụ thể, để sản xuất xystein bằng phương pháp 3) với sản lượng cao, OPS là tiền chất cần được sản xuất với số lượng dư thừa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả đã hoàn thiện sáng chế bằng cách xác định biến thể với hoạt tính được tăng cường của yếu tố sản sinh có khả năng sản sinh đều đặn OPS được sản sinh trong chủng sản sinh OPS từ tế bào, và xác nhận rằng sự sản sinh OPS được cải thiện nhờ biến thể này.

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin

(OPS).

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vectơ chứa polynucleotit của sáng chế.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit, polynucleotit, và vectơ của sáng chế.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin bao gồm nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin của sáng chế trong môi trường nuôi cấy.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của xystein, trong đó phương pháp này bao gồm:

a) sản xuất *O*-phosphoserin (OPS) hoặc môi trường chứa OPS bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit, polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế, và vectơ chứa polynucleotit của sáng chế; và

b) cho phản ứng *O*-phosphoserin hoặc môi trường chứa OPS được sản xuất ở bước a) với sulfua trong sự có mặt của *O*-phosphoserin sulfhydrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện OPS.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-phosphoserin được nuôi cấy sử dụng polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin của sáng chế, có thể dẫn đến sản xuất OPS năng suất cao so với việc sử dụng protein biến thể hoặc không biến đổi hiện có.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được mô tả trong sáng chế có thể được áp dụng tương ứng cho các phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả sự kết hợp của các thành phần khác nhau được mô tả trong sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các phần mô tả dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất polypeptit có

hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin (OPS) bao gồm: a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*O*-phosphoserin” (sau đây được gọi là “OPS”) đề cập đến axit phosphoric este của serin có chức năng làm thành phần cấu tạo của nhiều loại protein. Cụ thể, OPS là tiền chất của L-xystein và có thể được chuyển đổi thành xystein bằng cách cho phản ứng với sulfua dưới sự xúc tác của OPS sulfhydrylaza (sau đây được gọi là “OPSS”), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây (patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS” đề cập đến màng protein có hoạt tính sản sinh OPS ra bên ngoài của tế bào, và màng protein có thể có nguồn gốc từ *E. coli*. Trong sáng chế, polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS có thể là chất vận chuyển liên họ trợ giúp chính YhhS (major facilitator superfamily: MFS) hoặc biến thể của nó. Cụ thể, polypeptit của sáng chế có thể là biến thể của chất vận chuyển MFS YhhS biểu hiện hoạt tính được cải thiện so với hoạt tính của chất vận chuyển MFS YhhS kiểu dại, được xác định là protein có hoạt tính sản sinh OPS trong *E. coli*, trong đó sự ức chế tăng trưởng được giải phóng trong điều kiện có OPS dư thừa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến protein có ít nhất một trình tự axit amin khác với trình tự đã nêu do sự thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi sao cho các chức năng và các đặc tính của protein được giữ lại. Các biến thể khác với trình tự đã xác định nhờ sự thay thế, xóa, hoặc bổ sung một số axit amin. Các biến thể này thường có thể được xác định bằng cách sửa đổi một trong các trình tự axit amin nêu trên của protein và đánh giá các đặc tính của protein đã biến đổi. Tức là, khả năng của các biến thể có thể được tăng cường, không thay đổi, hoặc giảm đi so với protein tự nhiên. Hơn nữa, một số biến thể có thể bao gồm những biến thể trong đó một hoặc nhiều phần, chẳng hạn như trình tự dẫn đầu đầu N hoặc miền xuyên màng được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm những biến thể trong đó một phần đã được loại bỏ khỏi đầu N và/hoặc đầu C của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay

thể cho các thuật ngữ như được sửa đổi, biến đổi, protein biến đổi, polypeptit biến tính, đột biến, mutein, phân kỳ, biến thể, v.v. tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, miễn là các thuật ngữ được sử dụng để thể hiện sự biến đổi. Đối với mục đích của sáng chế, biến thể có thể là những biến thể có hoạt tính tăng cường của protein đã biến đổi so với protein kiểu đại tự nhiên hoặc protein không biến đổi, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc các tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, biến thể có thể bao gồm ít nhất một sự thay thế bảo thủ trong khi vẫn giữ được ít nhất một hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin này thường có thể xảy ra dựa trên sự giống nhau về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, trong số các axit amin mang điện tích, các axit amin mang điện tích dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin, và histidin, và các axit amin mang điện tích âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; và trong số các axit amin không tích điện, các axit amin không phân cực bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, và prolin; các axit amin phân cực hoặc ưa nước bao gồm serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; và các axit amin thơm trong số các axit amin bao gồm phenylalanin và tryptophan, và tyrosin.

Ngoài ra, các biến thể có thể còn bao gồm việc loại bỏ hoặc bổ sung các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các tính chất và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu N của protein liên quan đến chuyển dịch của các protein đồng dịch mã hoặc sau dịch mã. Ngoài ra, polypeptit còn có thể được liên hợp với trình tự hoặc liên kết khác để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit.

Cụ thể, polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể là polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin

và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K).

Polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể là polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K).

Ngoài ra, polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể bao gồm mà không giới hạn ở bất kỳ polypeptit có trình tự axit amin thể hiện tối thiểu 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và tối đa 100% sự đồng nhất với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 1 và thể hiện khả năng sản sinh OPS về cơ bản đồng nhất hoặc tương đồng với khả năng sản sinh OPS của polypeptit, trong khi là polypeptit bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong

trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K). Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ biến thể polypeptit có trình tự axit amin trong đó một phần của trình tự axit amin được xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào ở các vị trí axit amin tương ứng vị trí thứ 88, 207, 241, 246, và 330 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, đều có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế, miễn là đó là polypeptit có trình tự axit amin về cơ bản có hoạt tính sản sinh OPS như trình tự có sự đồng nhất như vậy.

Cụ thể, polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể là polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Trong sáng chế, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin về cơ bản gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Hơn nữa, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin của sáng chế không loại trừ vùng phía trước hoặc vùng phía sau bổ sung trình tự vô nghĩa của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Trong sáng chế, trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể có nghĩa là trình tự axit amin có hoạt tính sản sinh OPS. Cụ thể, trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là trình tự axit amin tạo thành biến thể của chất vận chuyển MFS YhhS, protein biểu hiện hoạt tính sản sinh OPS được mã hóa bởi gen *yhhS*.

Trình tự axit amin của chất vận chuyển MFS YhhS, protein biểu hiện hoạt tính sản sinh OPS được mã hóa bởi gen *yhhS*, có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ví dụ, trình tự axit amin của chất vận chuyển MFS YhhS có thể là trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11. Ngoài ra, trình tự axit amin của chất vận chuyển MFS YhhS có thể là trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin, bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, *O*-phosphoserin, và polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, “polynucleotit” là polyme của các nucleotit có trong các đơn phân nucleotit được liên kết trong mạch dài bằng liên kết cộng hóa trị, là sợi ADN hoặc ARN có độ dài nhất định.

Polynucleotit có thể bao gồm bất kỳ polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế mà không giới hạn ở đây. Trong sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của protein sản sinh OPS có thể là gen *yhhS*. Ngoài ra, gen có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể có hoặc bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm các sự biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa miễn là không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit do sự thoái biến codon (đơn vị mã hóa) hoặc trong sự xem xét các codon được ưu tiên bởi sinh vật trong đó polypeptit được biểu hiện. Polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm hoặc chứa, ví dụ, trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trong một phương án, polynucleotit của sáng chế có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit

có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ bất kỳ trình tự có thể lai hóa với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 mà không bị giới hạn ở đây. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các tài liệu đã biết (xem 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). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao lai với nhau, tốt hơn là ít nhất 40%, 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, và tốt nhất là ít nhất 99%, và các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên không lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa của lai Southern, tức là, rửa một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Sự lai hóa đòi hỏi hai axit nucleic chứa các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm các đoạn nucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như các trình tự axit nucleic giống nhau về cơ bản.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến mức độ kết hợp với hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, và có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và hàm

phạt khoảng trống dịch chuyển mặc định được thiết lập bởi chương trình có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể lai hóa với nhau theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Các polynucleotit chứa các codon thoái biến thay vì các codon trong lai hóa các polynucleotit cũng được xem xét.

Ví dụ, bất kỳ hai trình tự polynucleotit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng thuật toán máy tính đã biết như thuật toán “FASTA” bằng cách sử dụng các thông số mặc định (Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444). Thay vào đó, có thể xác định bằng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453) được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS) (Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc mới hơn) (gói chương trình GCG (Devereux, J. et al., Axit nucleics 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 của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: 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 như Needleman et al., (1970), J Mol Biol. 48:443 như đã đưa ra bởi Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình máy tính GAP xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau cho tổng số ký hiệu trong một đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14:6745, như được đưa ra bởi Schwartz và Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence và Structure, National Biomedical Research Foundation, các trang từ 353 đến 358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI

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

Ngoài ra, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất với nhau có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự trong thử nghiệm lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai thích hợp đã xác định thuộc cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế, và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook *et al.*).

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

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

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh O-phosphoserin, bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính sản sinh O-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, O-phosphoserin, polypeptit có hoạt tính sản sinh O-phosphoserin, và polynucleotit đã được

mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit đích và protein được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp để có thể biểu hiện polypeptit hoặc protein đích trong tế bào vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để 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. Khi tế bào vật chủ thích hợp được biến nạp với vector, vector có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chúng.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể sao chép trong tế bào vật chủ, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmit, cosmit, virut và thể thực khuẩn tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A có thể được sử dụng như vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit; pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pSK, pSKH, và pET có thể được sử dụng như vector plasmit. Cụ thể, có thể sử dụng các vector pCL, pSK, pSKH130, pDZ, pACYC177, pACYC184, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, và pCC1BAC.

Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên phương pháp không bị giới hạn ở đây.

Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để xác nhận sự chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc là 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 vào hay chưa, và các chỉ dấu cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc, chẳng hạn như kháng thuốc, dinh dưỡng thụ động, kháng các chất gây độc tế bào, hoặc biểu hiện của các protein được biến đổi bề mặt có thể được sử dụng. Chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, và do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vector chứa polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein đích vào tế bào vật chủ sao cho polypeptit

hoặc protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit đã biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, polynucleotit đã biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm trong đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, và cả hai trường hợp có thể được bao gồm. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa polypeptit hoặc protein đích.

Polynucleotit có thể được đưa vào ở bất kỳ dạng nào miễn là polynucleotit được đưa vào tế bào vật chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng catxet biểu hiện là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để biểu hiện độc lập của nó. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng gen khởi động được liên kết chức năng với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, hoặc tín hiệu 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 tế bào vật chủ ở dạng ban đầu và được liên kết chức năng đến các trình tự yêu cầu đối với sự biểu hiện trong tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” có nghĩa là trình tự gen được liên kết chức năng với trình tự vùng gen khởi động, cho phép bắt đầu và trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein đích của sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin (OPS) bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế, và vector chứa polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, *O*-phosphoserin, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin, polynucleotit, và vector

đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh OPS” đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản sinh OPS yếu sẵn có hoặc vi sinh vật được đưa vào khả năng sản sinh OPS bằng sự biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo của chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh OPS. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật biểu hiện polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trong sáng chế, “vi sinh vật sản sinh OPS” có thể được sử dụng thay thế cho nhau với “vi sinh vật có khả năng sản sinh OPS”, “chủng sản sinh OPS”, và “dòng chủng sản sinh OPS”.

Để đạt mục đích của sáng chế, trong trường hợp vi sinh vật sản sinh OPS, vi sinh vật có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin của sáng chế, polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế, và vectơ chứa polynucleotit của sáng chế, nhờ đó cải thiện hoạt tính của polypeptit được biểu hiện ở đó, và do đó, lượng sản sinh OPS có thể được tăng lên so với lượng sản sinh của vi sinh vật kiểu dại hoặc trước khi biến đổi. Điều này quan trọng khi việc sản xuất OPS có thể được tăng cường bằng cách đưa vào polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế và tăng cường hoạt tính của nó, trong khi các vi sinh vật kiểu dại không thể sản sinh OPS hoặc chỉ có thể sản sinh lượng nhỏ ngay cả khi chúng có thể sản sinh OPS. Tức là, vi sinh vật sản sinh OPS của sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của polypeptit có hoạt tính sản sinh OPS của sáng chế được tăng cường so với hoạt động nội sinh của nó, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường so với hoạt động nội sinh của nó” đề cập đến hoạt tính được tăng cường của protein khi so sánh với hoạt tính của protein có sẵn bởi vi sinh vật trong trạng thái tự nhiên của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được biểu hiện/được biểu hiện” đề cập đến trạng thái trong đó polypeptit hoặc protein đích được đưa vào vi sinh vật hoặc trong đó polypeptit hoặc protein đích được biến đổi để được biểu hiện trong vi sinh vật. Khi polypeptit hoặc protein đích là polypeptit hoặc protein có mặt trong vi sinh vật, có nghĩa là trạng thái trong đó hoạt tính của nó được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi biến đổi.

Như được sử dụng ở đây, “tăng cường hoạt tính” của polypeptit hoặc protein có

nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit hoặc protein có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi, khi đặc điểm của vi sinh vật được thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. “Sự tăng cường” hoặc “tăng lên” của hoạt tính của polypeptit hoặc protein so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa là hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit hoặc protein cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi.

“Sự tăng lên hoạt tính” có thể đạt được bằng cách đưa vào polypeptit hoặc protein ngoại lai, hoặc bằng cách tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein nội sinh, cụ thể, có thể đạt được bằng cách tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein nội sinh. Hoạt tính của polypeptit hoặc protein có được tăng cường hay không có thể được xác định từ sự tăng lên của mức hoạt tính, mức độ biểu hiện của polypeptit hoặc protein đích, hoặc lượng sản phẩm được sản sinh từ protein đích.

Trong sáng chế, polypeptit hoặc protein đích cho sự tăng cường hoạt tính, tức là, polypeptit hoặc protein đích, có thể là biến thể của chất vận chuyển MFS YhhS, và cụ thể, có thể là biến thể của chất vận chuyển MFS YhhS có hoạt tính sản sinh OPS được tăng cường so với hoạt tính sản sinh OPS của chất vận chuyển MFS YhhS kiểu dại, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, trong sáng chế, sản phẩm được sản sinh từ polypeptit hoặc protein đích có thể là *O*-phosphoserin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Sự tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể đạt được bằng nhiều phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và có thể không bị giới hạn miễn là hoạt tính của polypeptit hoặc protein đích có thể được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit hoặc protein đích của vi sinh vật trước khi biến đổi. Phương pháp có thể bao gồm kỹ thuật gen hoặc kỹ thuật protein, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein sử dụng kỹ thuật gen có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng:

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

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

3) phương pháp biến đổi trình tự nucleotit của codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của polypeptit hoặc protein;

4) phương pháp biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể sao cho hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng cường;

5) phương pháp đưa vào polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của polypeptit hoặc protein hoặc polynucleotit được biến đổi tối ưu hóa của polynucleotit; hoặc

6) sự kết hợp của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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

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

2) Phương pháp thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa polypeptit hoặc protein trên nhiễm sắc thể với trình tự có hoạt tính mạnh có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách đưa vào sự biến đổi trên trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự axit nucleic, sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính mạnh hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở vùng gen 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. Cụ thể, phương pháp có thể bao gồm liên kết

vùng gen khởi động dị hợp mạnh, thay vì vùng gen khởi động ban đầu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ của vùng gen khởi động mạnh có thể bao gồm vùng gen khởi động CJ7 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2), vùng gen khởi động CJ1 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2), vùng gen khởi động lac, vùng gen khởi động trp, vùng gen khởi động trc, vùng gen khởi động tac, vùng gen khởi động lambda phage PR, vùng gen khởi động PL, và vùng gen khởi động tet, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

3) Phương pháp biến đổi trình tự nucleotit của codon ban đầu hoặc 5'-UTR của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách thay thế codon ban đầu nội sinh của polypeptit hoặc protein bằng codon ban đầu khác có mức biểu hiện cao hơn của polypeptit hoặc protein so với codon ban đầu nội sinh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

4) Phương pháp biến đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể sao cho hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng cường có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự điều hòa biểu hiện thông qua xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự nucleotit, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit được biến đổi để có hoạt tính mạnh hơn. Cụ thể, sự thay thế có thể đạt được bằng cách chèn gen vào nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vector được sử dụng ở đây có thể còn bao gồm chỉ dấu lựa chọn để xác nhận sự chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn đã được mô tả ở trên.

5) Phương pháp đưa polynucleotit ngoại lai có hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách đưa vào tế bào vật chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit hoặc protein biểu hiện hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất với polypeptit hoặc protein hoặc polynucleotit biến đổi tối ưu hóa codon. Polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn bất kể nguồn gốc hoặc trình tự của nó miễn là polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất với polypeptit hoặc protein. Ngoài ra, đối với sự phiên mã và dịch mã tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai vào tế bào vật chủ,

codon của nó có thể được tối ưu hóa và đưa vào tế bào vật chủ. Việc đưa vào có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật bằng cách chọn phương pháp biến đổi thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và sự biểu hiện của polynucleotit được đưa vào tế bào vật chủ có khả năng sản sinh polypeptit hoặc protein, nhờ đó tăng cường hoạt tính của nó.

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

Sự tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể tăng lên trong hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein đích dựa trên hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein được biểu hiện trong chủng vi sinh kiểu đại hoặc trước khi biến đổi, hoặc có thể là lượng tăng lên của sản phẩm được sản sinh từ polypeptit hoặc protein đích, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chủng trước khi biến đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi biến đổi” không loại trừ các chủng chứa các đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong các vi sinh vật, và có thể đề cập đến chủng tự nhiên của nó hoặc chủng trước khi biến đổi trong đó tính trạng bị thay đổi do đột biến 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 biến đổi”, “vi sinh vật không đột biến”, “vi sinh vật không biến đổi”, hoặc “vi sinh vật nền”.

Trong sáng chế, vi sinh vật nền có thể là CA07-0012 là vi sinh vật đã biết sản sinh OPS, CA07-0022/pCL_Prmf-*serA**(G336V)-*serC* (KCCM11103P (patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2), chủng trong đó các hoạt tính của SerA (D-3-phosphoglyxerat dehydrogenaza) và SerC (3-phosphoserin amintransferaza) nội sinh được tăng cường, và CA07-0012 (KCCM11121P, patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2), hoặc chủng trong đó hoạt tính của phosphoserin phosphataza (SerB) nội sinh được làm suy yếu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật của sáng chế có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được sản xuất bằng cách biến nạp với vectơ chứa polynucleotit mã hóa polypeptit, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật của sáng chế không bị giới hạn bởi loại của nó miễn là vi sinh vật có thể sản sinh OPS, và có thể là bất kỳ sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn nào, cụ

thể là vi sinh vật nhân sơ. Vi sinh vật nhân sơ có thể bao gồm các chủng vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Brevibacterium*, tốt hơn là vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, và tốt hơn nữa là *Escherichia coli*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể, trong trường hợp vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, OPS và L-serin có thể được sản xuất thông qua SerA, SerC, và SerB là các enzym của con đường sinh tổng hợp của L-serin (Ahmed Zahoor, *Computational và structural biotechnology journal*, tập 3, tháng 10 năm 2012; Wendisch V. F. *et al.*, *Curr Opin Microbiol.* tháng 6 năm 2006;9(3):268–74; Peters-Wendisch P. *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* tháng 11 năm 2005;71(11):7139–44.).

Vi sinh vật sản sinh OPS của sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của phosphoserin phosphatase (SerB) có thể được làm suy yếu thêm so với hoạt tính nội sinh của nó.

SerB của sáng chế có hoạt tính chuyển đổi OPS thành L-serin, và do đó vi sinh vật được biến đổi để làm suy giảm hoạt tính của SerB có đặc tính tích lũy OPS trong đó, và do đó có lợi cho việc sản xuất OPS. SerB của sáng chế có thể là protein có hoặc bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3, hoặc có thể là protein gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, SerB có thể có hoặc bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự với trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3, miễn là nó thể hiện hoạt tính của SerB. Ngoài ra, SerB của sáng chế có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa SerB có thể có hoặc chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa SerB có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Polynucleotit mã hóa SerB của sáng chế có thể thực hiện các biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa trong phạm vi không làm thay đổi trình tự axit amin của protein SerB, do sự thoái biến codon hoặc xem xét các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó protein SerB được biểu hiện. Polynucleotit mã hóa SerB của sáng chế có thể có hoặc chứa trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều

nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa SerB của sáng chế có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm suy yếu hoạt tính so với hoạt tính nội sinh của nó” có nghĩa là chủng kiểu dại tự nhiên, chủng bố mẹ, hoặc protein đích không có biểu hiện của enzym hoặc protein, hoặc không có hoạt tính hoặc hoạt tính suy giảm ngay cả khi được biểu hiện so với chủng không biến đổi. Cụ thể, giảm có nghĩa là bao gồm cả trường hợp trong đó hoạt tính protein giảm so với hoạt tính của protein có sẵn ban đầu bởi vì sinh vật do sự đột biến của gen mã hóa protein, sự biến đổi của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc sự xóa một phần hoặc toàn bộ gen, v.v.; trường hợp trong đó mức tổng thể của hoạt tính protein nội bào giảm so với mức tổng thể của chủng tự nhiên hoặc chủng trước khi biến đổi do sự ức chế của biểu hiện gen mã hóa protein hoặc ức chế của dịch mã; và sự kết hợp của chúng.

Việc làm suy yếu hoạt tính của protein có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm: phương pháp biến đổi trình tự gen mã hóa protein sao cho hoạt tính của protein được loại bỏ hoặc làm suy yếu; phương pháp biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện sao cho sự biểu hiện của gen được tăng lên; phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein; phương pháp đưa antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN), ức chế dịch mã từ mRNA vào protein thông qua liên kết bổ sung với bản phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp làm cho việc gắn vào ribosom không thể thực hiện được bằng cách tạo ra cấu trúc thứ cấp bằng cách thêm trình tự bổ sung vào trình tự Shine–Dalgarno (SD) trên phía sau của trình tự SD của gen mã hóa protein; và phương pháp kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm vùng gen khởi động đối với phiên mã ngược đến đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự polynucleotit của gen mã hóa protein, và sự kết hợp của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, phương pháp biến đổi trình tự gen trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của protein;

hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự gen được biến đổi để có hoạt tính yếu hơn hoặc trình tự gen được biến đổi để không có hoạt tính nào.

Phương pháp biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự điều hòa biểu hiện thông qua xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện; hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính yếu hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen 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.

Phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể bằng polynucleotit hoặc gen chỉ dấu có trình tự axit nucleic đã xóa một phần sử dụng vector để chèn nhiễm sắc thể vào vi khuẩn. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp xóa gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “một phần”, mặc dù có thể khác nhau tùy thuộc vào loại polynucleotit, tốt hơn là có thể đề cập đến từ 1 đến 300 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 1 đến 100 nucleotit, và tốt nhất là từ 1 đến 50 nucleotit, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự điều hòa biểu hiện thông qua xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện; hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự axit nucleic có hoạt tính yếu hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen 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.

Ngoài ra, phương pháp biến đổi trình tự gen trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sự biến đổi trong trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy yếu thêm hoạt tính của protein; hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự gen được biến đổi để có hoạt tính yếu hơn hoặc trình tự gen được biến đổi để không có hoạt tính.

Ngoài ra, vi sinh vật sản sinh OPS của sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của phosphoglycerat dehydrogenaza (SerA) hoặc phosphoserin amintransferaza

(SerC) được tăng cường thêm so với hoạt tính nội sinh của nó.

SerA là protein có khả năng chuyển đổi 3-phosphoglyxerat thành 3-phospho-hydroxypyruvat. SerC là protein có khả năng chuyển đổi 3-phospho-hydroxypyruvat thành OPS. Theo đó, bất kỳ vi sinh vật với các hoạt tính SerA và/hoặc SerC được tăng cường có thể được sử dụng hiệu quả như vi sinh vật sản sinh OPS.

SerA có thể là protein có hoặc chứa trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, hoặc protein gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 5 là trình tự của SerA kiểu đại, và trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 6 là trình tự của biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng. Ngoài ra, SerA của sáng chế có thể có hoặc chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, miễn là nó thể hiện hoạt tính của SerA kiểu đại hoặc hoạt tính của biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, SerA của sáng chế có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, miễn là nó thể hiện hoạt tính của SerA kiểu đại hoặc hoạt tính của biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng. Các biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng đề cập đến các protein trong đó sự biến đổi được đưa vào trên gen mã hóa SerA bằng cách chèn nucleotit của gen mã hóa SerA hoặc thay thế gen mã hóa kiểu đại SerA, v.v., nhờ đó duy trì hoạt tính từ sự ức chế phản hồi bởi serin hoặc glyxin, hoặc có các hoạt tính được tăng cường của nó, và các biến thể trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng là đã biết (Grant G. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 39:5357–5361, 1999; Grant G. A. *et al.*, *Biochem.*, 39:7316–7319, 2000; Grant G. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:17844–17850, 2001; Peters-Wendisch P. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:37–441, 2002; patent Hoa Kỳ số US 6258573 B1).

Ngoài ra, trình tự polynucleotit mã hóa biến thể SerA hoặc biến thể SerA kiểu đại trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng có thể có hoặc chứa trình tự

nucleotit mã hóa bất kỳ một trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6. Ngoài ra, trình tự polynucleotit mã hóa SerA kiểu đại hoặc biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit mã hóa bất kỳ một trình tự axit amin được thể hiện bởi các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trình tự polynucleotit mã hóa SerA kiểu đại hoặc biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng có thể thực hiện các biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa trong phạm vi không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit mã hóa SerA kiểu đại hoặc biến thể SerA trong đó sự ức chế phản hồi trên serin được giải phóng, do sự thoái biến codon hoặc trong sự xem xét của các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó polypeptit được biểu hiện. Ví dụ, trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 5 có thể là trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 7. Ngoài ra, trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 6 có thể là trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 8, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

SerC có thể là, ví dụ, protein có hoặc bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 9, hoặc protein gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 9, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, SerC có thể có hoặc chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 9, miễn là nó thể hiện hoạt tính của SerC. Ngoài ra, SerC có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99%, và nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 9, miễn là nó thể hiện hoạt tính của SerC.

Ngoài ra, polynucleotit mã hóa SerC có thể có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi mã nhận biết SEQ ID NO: 9. Polynucleotit có thể thực hiện các biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa trong phạm vi không làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit, do sự thoái biến codon hoặc trong sự xem xét của các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó polypeptit được biểu hiện. Polynucleotit mã hóa

SerC có thể có hoặc chứa, ví dụ, trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 10, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa SerC có thể gồm có hoặc về cơ bản gồm có trình tự nucleotit có ít nhất 80%, 90%, 95%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 10, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó” và phương pháp tăng cường đã được mô tả ở trên.

Ngoài ra, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó khả năng đưa OPS vào tế bào hoặc phân tách OPS được làm suy yếu hơn nữa.

Đối với các hàm lượng của vi sinh vật sản sinh OPS, có thể sử dụng patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2 để tham chiếu cho sáng chế, ngoài những tài liệu đã mô tả ở trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin bao gồm nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin, bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế, và vectơ chứa polynucleotit của sáng chế.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, *O*-phosphoserin, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin, polynucleotit, vectơ, và vi sinh vật đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” có nghĩa là vi sinh vật được nuôi cấy trong các điều kiện môi trường được kiểm soát thích hợp. Quá trình nuôi cấy của sáng chế có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Quá trình nuôi cấy này có thể được điều

chỉnh dễ dàng để sử dụng bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo chủng cần chọn. Cụ thể, việc nuôi cấy có thể theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong việc nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp có hoạt tính SerB suy giảm so với hoạt tính nội sinh của nó, môi trường nuôi cấy có thể còn chứa glyxin hoặc serin, khi yêu cầu serin của vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra. Glyxin có thể được cung cấp dưới dạng glyxin tinh khiết, dịch chiết nấm men chứa glyxin, hoặc trypton. Nồng độ của glyxin có trong môi trường nuôi cấy thông thường là từ 0,1 g/L đến 10 g/L, và cụ thể từ 0,5 g/L đến 3 g/L. Ngoài ra, serin có thể được cung cấp dưới dạng serin tinh khiết, dịch chiết nấm men chứa serin, hoặc trypton. Nồng độ của serin có trong môi trường nuôi cấy thông thường là từ 0,1 g/L đến 5 g/L, và cụ thể từ 0,1 g/L đến 1 g/L.

Các ví dụ về nguồn carbon có trong môi trường có thể bao gồm các saccharit và các cacbohyđrat chẳng hạn như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; các axit béo chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu như glyxerol và etanol; và các axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn carbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ về nguồn nitơ có trong môi trường có thể bao gồm các nguồn nitơ hữu cơ chẳng hạn như pepton, dịch chiết nấm men, cao thịt, cao mạch nha, dịch chiết ngô, và bột đậu; và các nguồn nitơ vô cơ chẳng hạn như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni photphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ về nguồn phospho có trong môi trường có thể bao gồm kali dihydro phosphat, kali hydro phosphat và muối chứa natri tương ứng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm muối kim loại, chẳng hạn như magie sulfat hoặc sắt sulfat, và có thể còn bao gồm các axit amin, vitamin, và tiền chất thích hợp. Các môi trường nuôi cấy hoặc tiền chất có thể được bổ sung vào dịch nuôi cấy dưới dạng nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Độ pH của dịch nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách thêm hợp chất như

amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric trong quá trình nuôi cấy theo cách thích hợp. Ngoài ra, sự hình thành bong bóng có thể được ngăn chặn trong quá trình nuôi cấy bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như este polyglycol axit béo. Ngoài ra, khí oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì các điều kiện hiếu khí của quá trình nuôi cấy; hoặc khí nitơ, khí hydro, hoặc carbon đioxit có thể được bơm vào để duy trì các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí mà không cần bơm khí. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 25°C đến 50°C, tốt hơn là 30°C đến 37°C. Việc nuôi cấy có thể tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản phẩm mong muốn, tốt hơn là từ 10 giờ đến 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ minh họa.

Sáng chế có thể còn bao gồm bước điều chế môi trường trước bước nuôi cấy trong phương pháp của sáng chế, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi OPS được sản xuất trong bước nuôi cấy trong phương pháp của sáng chế sau bước nuôi cấy. OPS mong muốn có thể được thu hồi từ quá trình nuôi cấy bằng cách tách và tinh chế sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, theo phương pháp nuôi cấy, ví dụ, theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của xystein, trong đó phương pháp này bao gồm:

a) sản xuất *O*-phosphoserin (OPS) hoặc môi trường chứa OPS bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa polypeptit của sáng chế, và vectơ chứa polynucleotit của

sáng chế trong môi trường nuôi cấy; và

b) cho phản ứng *O*-phosphoserin hoặc môi trường chứa *O*-phosphoserin được sản xuất ở bước a) với sulfua trong sự có mặt của *O*-phosphoserin sulfhydrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện *O*-phosphoserin.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, *O*-phosphoserin, polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin, polynucleotit, vectơ, và vi sinh vật đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dẫn xuất” đề cập đến các hợp chất tương tự thu được bằng cách biến đổi hóa học một phần của bất kỳ hợp chất nào. Thuật ngữ này thường đề cập đến các hợp chất trong đó nguyên tử hydro hoặc nhóm nguyên tử cụ thể được thay thế bằng nguyên tử hoặc nhóm nguyên tử khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dẫn xuất xystein” đề cập đến các hợp chất trong đó nguyên tử hydro hoặc nhóm nguyên tử cụ thể trong xystein được thay thế bằng nguyên tử hoặc nhóm nguyên tử khác. Ví dụ, các dẫn xuất xystein có thể dưới dạng trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amin ($-NH_2$) hoặc nguyên tử lưu huỳnh/lưu huỳnh của nhóm thiol ($-SH$) trong xystein có nguyên tử hoặc nhóm nguyên tử khác được gắn vào đó, và các ví dụ về các dẫn xuất xystein có thể bao gồm NAC (*N*-axetyl xystein), SCMC (*S*-carboxymetyl xystein), Boc-Cys(Me)-OH, (*R*)-*S*-(2-amin-2-carboxyetyl)-L-homoxystein, (*R*)-2-amin-3-sulfopropionic axit, D-2-amin-4-(etylthio)butyric axit, 3-sulfino-L-alanin, Fmoc-Cys(Boc-metyl)-OH, seleno-L-xystin, *S*-(2-thiazolyl)-L-xystein, *S*-(2-thienyl)-L-xystein, *S*-(4-tolyl)-L-xystein, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Miễn là xystein được sản xuất theo phương pháp của sáng chế, sự chuyển đổi đối với các dẫn xuất xystein có thể được chuyển đổi dễ dàng thành các dẫn xuất xystein khác nhau bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Cụ thể, phương pháp sản xuất các dẫn xuất xystein có thể còn bao gồm chuyển đổi xystein được sản xuất ở bước b) thành dẫn xuất xystein. Ví dụ, xystein có thể được tổng hợp thành *N*-axetyl xystein (NAC) bằng phản ứng với chất axetyl hóa, hoặc có thể được tổng hợp thành *S*-carboxymetyl xystein (SCMC) bằng phản ứng với haloaxetic axit trong các điều kiện cơ bản, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các dẫn xuất xystein được sử dụng chủ yếu làm dược liệu cho thuốc chống ho, thuốc giảm ho, và thuốc điều trị viêm phế quản, hen phế quản, viêm thanh quản, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*O*-phosphoserin sulfhydrylaza (OPSS)” đề cập đến enzym xúc tác phản ứng mà OPS từ nhóm thiol được chuyển đổi thành xystein. Enzym có thể đã được tìm thấy trước tiên ở *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, và *Trichomonas vaginalis* (Mino K. và Ishikawa K., *FEBS Letters*, 551:133–138, 2003; Burns K. E. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127:11602–11603, 2005). Ngoài ra, OPSS có thể bao gồm không chỉ các protein OPSS kiểu đại, mà còn các protein biến thể bao gồm xóa, thay thế, hoặc thêm vào một phần của trình tự polynucleotit mã hóa OPSS thể hiện hoạt tính ngang bằng hoặc cao hơn hoạt tính sinh học của các protein OPSS kiểu đại, và còn có thể bao gồm tất cả protein OPSS đã được bộc lộ trong các patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2 và US 9127324 B2 và các biến thể của nó.

Sulfua được sử dụng trong sáng chế có thể là bất kỳ sulfua nào được cung cấp không chỉ ở dạng rắn thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, mà còn ở dạng lỏng hoặc khí do sự khác biệt về độ pH, áp suất, và độ hòa tan, và do đó có thể được chuyển đổi thành nhóm thiol (SH) dưới dạng của, ví dụ, sulfua (S^{2-}) hoặc thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$). Cụ thể, sulfua có thể bao gồm Na_2S , $NaSH$, H_2S , $(NH_4)_2S$, và $Na_2S_2O_3$, có thể cung cấp nhóm thiol cho OPS, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Trong phản ứng, nhóm thiol riêng lẻ được cung cấp cho nhóm OPS phản ứng riêng lẻ để tạo ra xystein riêng lẻ hoặc dẫn xuất của chúng. Cụ thể, trong phản ứng này, sulfua được bổ sung vào với lượng từ 0,1 đến 3 đương lượng mol, và cụ thể là từ 1 đến 2 đương lượng mol dựa trên nồng độ mol của OPS, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp của sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi xystein được sản xuất ở bước phản ứng nêu trên. Cụ thể, xystein mong muốn có thể được thu hồi bằng cách tách và tinh chế từ dung dịch phản ứng sử dụng phản ứng thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng để sản xuất *O*-phosphoserin bằng polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID

NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, xystein hoặc các dẫn xuất xystein.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng để sản xuất *O*-phosphoserin bằng polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin từ các vi sinh vật chứa a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K), hoặc polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, mã nhận biết SEQ ID NO: 1, *O*-phosphoserin, xystein, dẫn xuất xystein, và vi sinh vật đã được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ chỉ là các ví dụ ưu tiên được mô tả nhằm mục đích minh họa, và do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở bởi các ví dụ này. Trong khi đó, các dấu hiệu kỹ thuật không được mô tả ở đây có thể được hiểu đầy đủ và thực hiện dễ dàng bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế hoặc lĩnh vực kỹ thuật tương tự.

Ví dụ 1: Điều chế các biến thể của chất vận chuyển liên họ trợ giúp chính (major facilitator superfamily: MFS) YhhS

Để tăng cường hoạt tính của chất sản sinh *O*-phosphoserin (sau đây được gọi là, “OPS”) cho sự tăng cường hoạt tính sản sinh OPS trong chủng sản sinh OPS, các biến thể được điều chế cho chất vận chuyển liên họ trợ giúp chính (MFS) YhhS (mã nhận

biết SEQ ID NO: 11) là protein của chất sản sinh OPS, và *yhhS* (mã nhận biết SEQ ID NO: 12) là gen mã hóa OPS. Quá trình chi tiết được mô tả dưới đây.

Trước tiên, thư viện của các biến thể của gen *yhhS* được tạo cấu trúc. Đối với vấn đề này, PCR đột biến ngẫu nhiên (PCR dễ bị lỗi JENA) được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen (các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14) dựa trên bộ gen ADN của *Escherichia coli* K12_W3110 (ATCC27325) làm mạch khuôn. Phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction: PCR) được thực hiện với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và 20 chu kỳ kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Để chèn các đoạn gen đột biến đã điều chế vào vector pCL1920 với vùng gen khởi động *rhtB*, vector pCL_PrhtB được tạo điều chế trước tiên. PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen (các mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17) để đảm bảo vùng gen khởi động *rhtB* (mã nhận biết SEQ ID NO: 15). PCR được thực hiện với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Đoạn vùng gen khởi động *rhtB* được chèn vào vector pCL1920 (ngân hàng gen số AB236930) cắt với *SacI* và *SmaI* để thu được pCL_PrhtB. Vector pCL_PrhtB được cắt với *SmaI* và *PstI*, và sau đó các đoạn gen đột biến được nhân dòng vào đó sử dụng bộ kit nhân dòng In-fusion (Clontech Laboratories, Inc.). Việc nhân dòng được thực hiện ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút để sau đó điều chế các thư viện plasmid của các biến thể gen pCL_PrhtB *yhhS*. Các trình tự đoạn mồi đã sử dụng ở đây được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Vector
13	CACCGGGAGCCCGGGatCCCGAACCCGTAGCCGA	thư viện pCL_PrhtB- <i>yhhS</i>
14	CTTGCATGCCTGCAGttaAGATGATGAGGCGGCCT	
16	CGGGGATCCTCTAGACGCTTGCTGCAACTCTCTC A	pCL_PrhtB
17	TACGGGTTCGGGcatGATATCTTTCCTGTGTGAAA	

Các thư viện plasmid tái tổ hợp đã điều chế được sàng lọc thông qua sàng lọc thông lượng cao (high-throughput screening: HTS). Cụ thể, chúng nên được sử dụng để sàng

lọc là CA07-0012 (KCCM11121P, patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2), là chủng trong đó hoạt tính của phosphoserin phosphatase nội sinh (SerB) được làm suy yếu dựa trên chủng *E. coli* W3110 kiểu dại.

Tiếp theo, để thu được các biến thể với hoạt tính sản sinh OPS được tăng cường, các thư viện plasmid biến thể gen pCL_PrhtB-*yhhS* đã điều chế được biến nạp thành chủng nền CA07-0012 thông qua điện biến nạp, và sau đó được nuôi cấy trong môi trường chứa lượng OPS dư thừa, và chọn ba khuẩn lạc tại đó sự ức chế sinh trưởng được giải phóng. Sau đó, các plasmid thu được từ ba khuẩn lạc đã chọn và được phân tích thông qua công nghệ giải trình tự.

Do đó, chọn ba biến thể gen *yhhS* có liên quan đến việc giải phóng ức chế tăng trưởng trong điều kiện bổ sung OPS dư thừa, và thu được biến thể vượt trội hơn *yhhS* M45 (công bố đơn patent Hoa Kỳ số US 2019-0233859 A1), là biến thể gen *yhhS* hiện có với hoạt tính sản sinh OPS được tăng cường, và được gọi là *yhhS453*.

Sau khi phân tích trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa bởi *yhhS453*, xác nhận rằng YhhS453 có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Ví dụ 2: Xác nhận hoạt tính sản sinh OPS của biến thể gen *yhhS yhhS453*

Ví dụ 2-1. Điều chế chủng được đưa vào với *yhhS453* sử dụng chủng sản sinh OPS và sự đánh giá khả năng sản sinh OPS

Một loại của plasmid, plasmid biến thể pCL_PrhtB-*yhhS453* được xác định trong ví dụ 1 được biến nạp vào CA07-0012 là chủng sản sinh OPS bằng điện biến nạp thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Như vậy, CA07-0012/pCL_PrhtB-*yhhS453*, chủng sản sinh OPS được đưa vào với các biến thể gen *yhhS yhhS453* được tạo cấu trúc, và khả năng sản sinh OPS được đánh giá.

Cụ thể, mỗi chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường LB rắn và được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C qua đêm. Các chủng được nuôi cấy trong môi trường LB rắn qua đêm được cấy vào môi trường hiệu giá 25 mL được thể hiện trong bảng 2 dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 2

Thành phần môi trường	Lượng
-----------------------	-------

Glucosa	40 g
KH ₂ PO ₄ (KP1)	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	17 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
L-Glyxin	2,5 g/L
Dịch chiết nấm men	3 g/L
CaCO ₃	30 g/L
Độ pH	6,8

Bảng 3

Tên các chủng	OD _{562 nm}	Tiêu thụ glucosa (g/L)	O-Phosphoserin (g/L)
CA07-0012/pCL1920	45	40	1,4
CA07-0012/pCL_PrhtB-yhhS	42,7	40	1,7
CA07-0012/pCL_PrhtB-yhhS M45	32	40	2,3
CA07-0012/pCL_PrhtB-yhhS453	30	40	3,1

Như được thể hiện ở bảng 3, trong trường hợp chủng được đưa vào với biến thể gen *yhhS* của sáng chế, xác nhận rằng lượng sản sinh OPS tăng lên so với chủng được đưa vào với gen *yhhS* kiểu dại. Ngoài ra, xác nhận rằng lượng sản sinh OPS tăng lên so với *yhhS* M45, là biến thể gen *yhhS* nền. Cụ thể, *yhhS*453 thể hiện rằng nồng độ OPS tăng lên 82% so với *yhhS* kiểu dại và 35% so với *yhhS* M45, biến thể gen *yhhS* nền.

CA07-0012/pCL_PrhtB-yhhS453 được đặt tên là *Escherichia coli* CA07-0352, và chủng CA07-0352 được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 5 năm 2020, với số lưu chủng KCCM12720P.

Ví dụ 2-2. Điều chế chủng được đưa vào với *yhhS*453 sử dụng các chủng với SerA và SerC được tăng cường và sự đánh giá khả năng sản sinh OPS

Để xác nhận lại hoạt tính của *yhhS*453, sử dụng CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC (KCCM11103P, patent Hoa Kỳ số US 8557549 B2) làm chủng sản sinh OPS với khả năng sản sinh OPS, có hoạt tính tăng cường của D-3-phosphoglyxerat dehydrogenaza (SerA) và 3-phosphoserin amintransferaza (SerC) như các con đường sinh tổng hợp OPS.

yhhS453 được nhân dòng vào vị trí enzym giới hạn HindIII của vector pCL_Prmf-*serA**(G336V)-*serC*. Trước tiên, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 dựa trên pCL_PrhtB-*yhhS453* làm mạch khuôn để thu được đoạn gen *yhhS453*. PCR được thực hiện với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Đoạn gen *yhhS453* thu được thông qua PCR được nhân dòng sử dụng bộ kit nhân dòng In-fusion. Việc nhân dòng được thực hiện ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút để nhờ đó điều chế plasmit biến thể pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC*_PrhtB-*yhhS453*. Như đối chứng, CA07-0022/pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC*_PrhtB-*yhhS* M25 và CA07-0022/pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC*_PrhtB-*yhhS* M45 được sử dụng (công bố đơn patent số US 2019-0233859 A1). Các trình tự đoạn mồi đã sử dụng ở đây được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Vector
18	CACGGTTAAAAGCTTCGATGGTTCGATG ATTAAGAC	pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)- (RBS) <i>serC</i> _PrhtB- <i>yhhS453</i>
19	GATTACGCCAAGCTTttaAGATGATGAGG CGGCCT	

Mỗi plasmit được điều chế được biến nạp vào CA07-0012 là chủng sản sinh OPS bằng điện biến nạp thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, CA07-0022/pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC*_PrhtB-*yhhS453* là chủng sản sinh OPS được đưa vào với biến thể gen *yhhS yhhS453* được tạo cấu trúc, và khả năng sản sinh OPS của chủng này được đánh giá.

Cụ thể, mỗi chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường LB rắn và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C qua đêm. Các chủng được nuôi cấy trong môi trường LB rắn qua đêm được cấy vào môi trường hiệu giá 25 mL được thể hiện trong bảng 1 nêu trên và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Tên chủng	OD _{562 nm}	Tiêu thụ glucoza (g/L)	O-Phosphoserin (g/L)
CA07-0022/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i> _PrhtB- <i>yhhS</i> (wt)	30	40	4,01
CA07-0022/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i> _PrhtB- <i>yhhS</i> M25	26,3	40	6,01
CA07-0022/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i> _PrhtB- <i>yhhS</i> M45	25,4	40	4,8
CA07-0022/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i> _PrhtB- <i>yhhS</i> 453	25,1	40	7,5

Như được thể hiện ở bảng 5, khi *yhhS*453 của sáng chế được đưa vào chủng sản sinh OPS trong đó gen của con đường sinh tổng hợp OPS được cải thiện, xác nhận rằng lượng sản sinh OPS có thể được cải thiện. Kết quả này cho thấy rằng *yhhS*453 của sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả trong sản xuất OPS.

CA07-0022/pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC*_PrhtB-*yhhS*453 được đặt tên là *Escherichia coli* CA07-0353, và chủng CA07-0353 được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 5 năm 2020, với số lưu chủng KCCM12721P.

Ví dụ 2-3. Điều chế chủng được đưa vào với *yhhS*453 theo cường độ của vùng gen khởi động trên nhiễm sắc thể và sự đánh giá khả năng sản sinh OPS

Để xác nhận xem hoạt tính sản sinh OPS có được tăng cường hay không khi *yhhS*453 được đưa vào nhiễm sắc thể, vùng gen khởi động tự thân của vi sinh vật được thay thế bằng vùng gen khởi động trc, và chủng được đưa vào với *yhhS*453 của sáng chế được điều chế và khả năng sản sinh OPS của chủng được đánh giá. Cụ thể, vector pSKH130 (mã nhận biết SEQ ID NO: 30) được sử dụng để chèn vùng gen khởi động trc vào nhiễm sắc thể của *E. coli*. Vector chứa protein PI (gen *pir*)-phụ thuộc R6K replicon, gen SacB (Levansucrase), và gen kháng kanamycin. Sau khi thu được chủng mong muốn sử dụng R6K và kanamycin ở lần bắt chéo thứ nhất sử dụng vector, các thuốc kháng sinh được loại bỏ khỏi môi trường chứa sucroza để điều chế chủng. Cụ thể, vector pSKH130_*yhhS*453 được tạo cấu trúc để thay thế *yhhS* tự thân trong chủng CA07-0022 bằng *yhhS*453. Để tạo cấu trúc pSKH130-*yhhS*453, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21 dựa trên pCL_PrhtB-*yhhS*453 thu được trong ví dụ 1 làm mạch khuôn để thu được đoạn gen *yhhS*453. PCR

được thực hiện với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Đoạn gen được khuếch đại được nhân dòng sử dụng vector tpSKH130 được tạo ra bằng enzym giới hạn EcoRV và bộ kit nhân dòng In-fusion (Clontech Laboratories, Inc.) để thu được pSK-*yhhS453*. Plasmid thu được được biến nạp vào chủng CA7-0022 bằng điện biến nạp. Trong chủng được biến nạp, chủng được đưa vào nhiễm sắc thể trong môi trường rắn LB chứa kanamycin được chọn bằng sự tái tổ hợp (bắt chéo), và sau đó vị trí plasmid được cắt từ nhiễm sắc thể thông qua tái tổ hợp thứ cấp (thay thế) trong môi trường chứa sucroza. Sau khi hoàn thành tái tổ hợp thứ cấp, chủng được thực hiện với PCR sử dụng cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 và phân tích trình tự để tạo cấu trúc chủng CA07-0022::*yhhS453*.

PSKH130-P_{trc}-*yhhS453*' được tạo cấu trúc để tăng cường vùng gen khởi động của *yhhS453* trong chủng CA07-0022::*yhhS453* đã được điều chế. Cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25 dựa trên chủng W3110 *E. coli* kiểu dại làm mạch khuôn để thu được đoạn *yhhSUP* ADN. PCR được thực hiện bởi biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Tiếp theo, PCR được thực hiện sử dụng cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27 dựa trên pCL_P_{trc}-gfp (công bố đơn patent Hoa Kỳ số US 2017-0247727 A1) làm mạch khuôn để thu được đoạn ADN của P_{trc}. PCR được thực hiện bởi biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Hơn nữa, PCR được thực hiện sử dụng cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29 dựa trên pCL_PrhtB-*yhhS453* làm mạch khuôn để thu được đoạn *yhhS453*. PCR được thực hiện với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Các đoạn gen được khuếch đại được nhân dòng sử dụng vector pSKH130 được xử lý với enzym giới hạn EcoRV và IST để thu được pSKH_*yhhSUP*_P_{trc}-*yhhS453*. Plasmid thu được được biến nạp vào chủng

CA7-0022::*yhhS453* bằng điện biến nạp. Trong chủng được biến nạp, chủng được đưa vào nhiễm sắc thể trong môi trường rắn LB chứa kanamycin được chọn bởi sự tái hợp (bắt chéo), và sau đó vị trí plasmit được cắt từ nhiễm sắc thể thông qua tái tổ hợp thứ cấp (thay thế) trong môi trường chứa sucroza. Sau khi hoàn thành tái tổ hợp thứ cấp, chủng được xác nhận sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23. Chủng đã điều chế được đặt tên là CA07-0022::Ptrc-*yhhS453*. Các trình tự đoạn mồi đã sử dụng ở đây được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Vector
20	CAGGAATTCGATATCATGCCCCGAACCCGTAGCCGA	pSK- <i>yhhS453</i>
21	GACTAGCGTGATATCTTAAGATGATGAGGCGGCCT	
22	ATGTGAATCTGTGGATTATT	<i>yhhS</i> -out
23	GTTATGGCCGTTTATCGAAA	
24	CAGGAATTCGATATCTCGCTCCGGCGACATATGCA	pSKH130-Ptrc- <i>yhhS453</i> '
25	CAGCAAGCGGGTACCGAGGATCACCACATTTTAC	
26	AATGTGGTGATCCTCGGTACCCGCTTGCTGCAACT	
27	TACGGGTTCGGGCATGATATCTTTCCTGTGTGAAA	
28	CACAGGAAAGATATCATGCCCCGAACCCGTAGCCGA	
29	GACTAGCGTGATATCGCACCCATCGCCATCGCCCC	

Như nhóm đối chứng, sử dụng CA07-0022::Ptrc-*yhhS*, CA07-0022::Ptrc-*yhhS* M25, và CA07-0022::Ptrc-*yhhS* M45 được điều chế theo cách tương tự nêu trên. Các trình tự nucleotit của các đoạn mồi được sử dụng cho PCR tương tự nêu trên. Chủng được điều chế được biến nạp bằng cách đưa vector pCL_Prmf-*serA**(G336V)-(RBS)*serC* được tăng cường với *serA* và *serC* bởi điện biến nạp thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật để xác nhận khả năng sản sinh OPS.

Mỗi chủng được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường LB rắn và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C qua đêm. Các chủng được nuôi cấy trong môi trường LB rắn qua đêm được cấy vào môi trường hiệu giá 25 mL được thể hiện trong bảng 1 nêu trên và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Tên chủng	OD _{562 nm}	Tiêu thụ glucoza	O-Phosphoserin
-----------	----------------------	------------------	----------------

		(g/L)	(g/L)
CA07-0022/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i>	32	40	1,7
CA07-0022::Ptrc- <i>yhhS</i> /pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i>	33	40	2,0
CA07-0022::Ptrc- <i>yhhS</i> M25/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i>	35	40	3,2
CA07-0022::Ptrc- <i>yhhS</i> M45/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i>	25,4	40	2,7
CA07-0022::Ptrc- <i>yhhS</i> 453/pCL_Prmf- <i>serA</i> *(G336V)-(RBS) <i>serC</i>	25,1	40	5,0

Như được thể hiện ở bảng 7 nêu trên, khi hoạt tính của *yhhS*453 tăng lên bằng cách tăng cường vùng gen khởi động trên nhiễm sắc thể, xác nhận rằng lượng sản sinh OPS tăng lên nhiều hơn hai lần so với chủng được đưa vào *yhhS* kiểu dại, và cũng xác nhận rằng nồng độ OPS tăng đáng kể so với các biến thể gen *yhhS* M45 và M25.

Những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện trong các hình thức cụ thể khác mà không vượt quá nguyên lý hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Các phương án được mô tả được xem xét ở mọi khía cạnh chỉ mang tính minh họa và không giới hạn ở đó. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế được thể hiện bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo ngoài phần mô tả ở trên. Tất cả các biến thể trong phạm vi bảo hộ và tương đương của yêu cầu bảo hộ đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SẢN SINH O-PHOSPHOSERIN, POLYNUCLEOTIT MÃ
 HÓA POLYPEPTIT, VI SINH VẬT, VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-
 PHOSPHOSERIN, XYSTEIN, VÀ CÁC DẪN XUẤT XYSTEIN SỬ DỤNG O-PHOSPHOSERIN
 <130> OPA21198
 <150> KR 10-2020-0069753
 <151> 2020-06-09
 <160> 30
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> yhhS453
 <400> 1
 Met Pro Glu Pro Val Ala Glu Pro Ala Leu Asn Gly Leu Arg Leu Asn
 1 5 10 15
 Leu Arg Ile Val Ser Ile Val Met Phe Asn Phe Ala Ser Tyr Leu Thr
 20 25 30
 Ile Gly Leu Pro Leu Ala Val Leu Pro Gly Tyr Val His Asp Val Met
 35 40 45
 Gly Phe Ser Ala Phe Trp Ala Gly Leu Val Ile Ser Leu Gln Tyr Phe
 50 55 60
 Ala Thr Leu Leu Ser Arg Pro His Ala Gly Arg Tyr Ala Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Pro Lys Lys Ile Val Val Phe Gly Leu Cys Gly Cys Phe Leu Ser
 85 90 95
 Gly Leu Gly Tyr Leu Thr Ala Gly Leu Thr Ala Ser Leu Pro Val Ile
 100 105 110
 Ser Leu Leu Leu Leu Cys Leu Gly Arg Val Ile Leu Gly Ile Gly Gln
 115 120 125
 Ser Phe Ala Gly Thr Gly Ser Thr Leu Trp Gly Val Gly Val Val Gly
 130 135 140
 Ser Leu His Ile Gly Arg Val Ile Ser Trp Asn Gly Ile Val Thr Tyr
 145 150 155 160
 Gly Ala Met Ala Met Gly Ala Pro Leu Gly Val Val Phe Tyr His Trp
 165 170 175
 Gly Gly Leu Gln Ala Leu Ala Leu Ile Ile Met Gly Val Ala Leu Val
 180 185 190
 Ala Ile Leu Leu Ala Ile Pro Arg Pro Thr Val Lys Ala Ser Lys Gly

195	200	205
Lys Pro Leu Pro Phe Arg Ala Val Leu Gly Arg Val Trp Leu Tyr Gly		
210	215	220
Met Ala Leu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe		
225	230	235 240
Thr Thr Leu Phe Tyr Val Ala Lys Gly Trp Asp Gly Ala Ala Phe Ala		
	245	250 255
Leu Thr Leu Phe Ser Cys Ala Phe Val Gly Thr Arg Leu Leu Phe Pro		
	260	265 270
Asn Gly Ile Asn Arg Ile Gly Gly Leu Asn Val Ala Met Ile Cys Phe		
	275	280 285
Ser Val Glu Ile Ile Gly Leu Leu Leu Val Gly Val Ala Thr Met Pro		
	290	295 300
Trp Met Ala Lys Ile Gly Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Phe Ser Leu		
305	310	315 320
Val Phe Pro Ala Leu Gly Val Val Ala Ile Lys Ala Val Pro Gln Gln		
	325	330 335
Asn Gln Gly Ala Ala Leu Ala Thr Tyr Thr Val Phe Met Asp Leu Ser		
	340	345 350
Leu Gly Val Thr Gly Pro Leu Ala Gly Leu Val Met Ser Trp Ala Gly		
	355	360 365
Val Pro Val Ile Tyr Leu Ala Ala Ala Gly Leu Val Ala Ile Ala Leu		
	370	375 380
Leu Leu Thr Trp Arg Leu Lys Lys Arg Pro Pro Glu His Val Pro Glu		
385	390	395 400
Ala Ala Ser Ser Ser		
	405	

<210> 2
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yhhS453

<400> 2	
atgccccaac ccgtagccga acccgcgcta aacggattgc gcctgaattt gcgcattgtc	60
tctatagtca tgttttaactt cgccagctac ctcaccatcg gggtgccgct cgctgtatta	120
ccgggctatg tccatgatgt gatgggcttt agcgccttct gggcaggatt gggtatcagc	180
ctgcaatatt tcgccacctt gctgagccgc cctcatgccg gacgttacgc cgattcgctg	240
ggacccaaaa agattgtcgt ctctcggttta tgcggctgct ttttgagcgg tctgggggat	300
ctgacggcag gattaaccgc cagtctgcct gtcacagcc tggtattact ttgcctgggg	360

cgcgatcatcc ttgggattgg gcaaagtttt gccggaacgg gatcgaccct atggggcggt 420
 ggcgtgggttg gctcgctgca tatcgggagg gtgatttcgt ggaacggcat tgtcacttac 480
 ggggagatgg cgatgggtgc gccgttaggc gtcgtgtttt atcactgggg cggcttgacag 540
 gcgttagcgt taatcattat gggcgtggcg ctggtggcca ttttgttggc gatcccgcg 600
 ccgacggtaa aagccagtaa aggcaaaccg ctgccgtttc gcgcgggtgct tgggcgcgctc 660
 tggctgtacg gtatggcgct ggcactggct tccgcgggat ttggcgatcat cggcaccttt 720
 accacgctgt tttatgtcgc taaagggttg gacgggtgagg ctttcgcgct gacgctgttt 780
 agctgtgcgt ttgtcgggtac gcgtttgtta ttccctaacc gcattaaccg tatcgggtggc 840
 ttaaaccgtag cgatgatttg ctttagcggt gagataatcg gcctgctact ggttggcggtg 900
 gcgactatgc cgtggatggc gaaaatcggc gtcttactgg cggggggccgg gttttcgcgtg 960
 gtgttcccg ctttgggtgt agtggcgata aaagcgggtc cgcagcaaaa tcagggggcg 1020
 gcgctggcaa cttacaccgt atttatggat ttatcgcttg gcgtgactgg accactggct 1080
 gggctgggtga tgagctgggc gggcgtagcg gtgatttatc tggcgggcg gcgactggctc 1140
 gcaatcgctg tattactgac gtggcgatta aaaaaacggc ctccggaaca cgtccctgag 1200
 gccgcctcat catcttaa 1218

<210> 3
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> serB

<400> 3
 Met Pro Asn Ile Thr Trp Cys Asp Leu Pro Glu Asp Val Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Gly Leu Pro Leu Ser Leu Ser Gly Asp Glu Val Met Pro Leu Asp
 20 25 30
 Tyr His Ala Gly Arg Ser Gly Trp Leu Leu Tyr Gly Arg Gly Leu Asp
 35 40 45
 Lys Gln Arg Leu Thr Gln Tyr Gln Ser Lys Leu Gly Ala Ala Met Val
 50 55 60
 Ile Val Ala Ala Trp Cys Val Glu Asp Tyr Gln Val Ile Arg Leu Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Leu Thr Ala Arg Ala Thr Arg Leu Ala His Glu Ala Gln Leu
 85 90 95
 Asp Val Ala Pro Leu Gly Lys Ile Pro His Leu Arg Thr Pro Gly Leu
 100 105 110
 Leu Val Met Asp Met Asp Ser Thr Ala Ile Gln Ile Glu Cys Ile Asp
 115 120 125

Glu Ile Ala Lys Leu Ala Gly Thr Gly Glu Met Val Ala Glu Val Thr
 130 135 140
 Glu Arg Ala Met Arg Gly Glu Leu Asp Phe Thr Ala Ser Leu Arg Ser
 145 150 155 160
 Arg Val Ala Thr Leu Lys Gly Ala Asp Ala Asn Ile Leu Gln Gln Val
 165 170 175
 Arg Glu Asn Leu Pro Leu Met Pro Gly Leu Thr Gln Leu Val Leu Lys
 180 185 190
 Leu Glu Thr Leu Gly Trp Lys Val Ala Ile Ala Ser Gly Gly Phe Thr
 195 200 205
 Phe Phe Ala Glu Tyr Leu Arg Asp Lys Leu Arg Leu Thr Ala Val Val
 210 215 220
 Ala Asn Glu Leu Glu Ile Met Asp Gly Lys Phe Thr Gly Asn Val Ile
 225 230 235 240
 Gly Asp Ile Val Asp Ala Gln Tyr Lys Ala Lys Thr Leu Thr Arg Leu
 245 250 255
 Ala Gln Glu Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Gln Thr Val Ala Ile Gly Asp
 260 265 270
 Gly Ala Asn Asp Leu Pro Met Ile Lys Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ala
 275 280 285
 Tyr His Ala Lys Pro Lys Val Asn Glu Lys Ala Glu Val Thr Ile Arg
 290 295 300
 His Ala Asp Leu Met Gly Val Phe Cys Ile Leu Ser Gly Ser Leu Asn
 305 310 315 320
 Gln Lys

<210> 4
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> serB

<400> 4
 atgcctaaca ttacctggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc gggctctgcct 60
 ctttcattaa gtggtgatga agtgatgcc aaggattacc acgcaggtcg tagcggctgg 120
 ctgctgtatg gtcgtgggct ggataaaca cgtctgaccc aataccagag caaactgggt 180
 gcggcgatgg tgattgttgc cgctgggtgc gtggaagatt atcaggtgat tcgtctggca 240
 ggttcactca ccgcacgggc tacacgcctg gccacgaag cgcagctgga tgcgccccg 300
 ctggggaaaa tcccgcacct gcgcacgcg ggtttgctgg tgatggatat ggactccacc 360
 gccatccaga ttgaatgtat tgatgaaatt gccaaactgg ccggaacggg cgagatgggtg 420

gcggaagtaa ccgaacgggc gatgcgcggc gaactcgatt ttaccgccag cctgcgcagc 480
 cgtgtggcga cgctgaaagg cgctgacgcc aatattctgc aacaggtgcg tgaaaatctg 540
 ccgctgatgc caggettaac gcaactgggtg ctcaagctgg aaacgctggg ctggaaagtg 600
 gcgattgcct cgggcggctt tactttcttt gctgaatacc tgcgcgacaa gctgcgcctg 660
 accgccgtgg tagccaatga actggagatc atggacggta aatttaccgg caatgtgatc 720
 ggcgacatcg tagacgcgca gtacaaagcg aaaactctga ctgcctcgc gcaggagtat 780
 gaaatccgcg tggcgcagac cgtggcgatt ggcgatggag ccaatgacct gccgatgatc 840
 aaagcggcag ggctggggat tgcctaccat gccaaagcaa aagtgaatga aaaggcggaa 900
 gtcaccatcc gtcacgctga cctgatgggg gtattctgca tcctctcagg cagcctgaat 960
 cagaagtaa 969

<210> 5
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SerA kiểu đại

<400> 5
 Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys
 35 40 45
 Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
 50 55 60
 Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
 65 70 75 80
 Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
 85 90 95
 Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
 100 105 110
 Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
 115 120 125
 Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
 130 135 140
 Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
 145 150 155 160
 His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
 165 170 175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
 180 185 190
 Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
 195 200 205
 Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
 210 215 220
 Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
 245 250 255
 His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
 260 265 270
 Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
 275 280 285
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
 290 295 300
 Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Gly
 325 330 335
 Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
 340 345 350
 Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
 355 360 365
 Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
 370 375 380
 Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile
 385 390 395 400
 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
 405 410

<210> 6
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SerA kiểu đột biến

<400> 6
 Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys

```

      35              40              45
Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His
  50              55              60

Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly
  65              70              75              80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys
      85              90              95

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
      100              105              110

Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro
      115              120              125

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala
      130              135              140

Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
      145              150              155              160

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr
      165              170              175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr
      180              185              190

Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
      195              200              205

Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys
      210              215              220

Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
      225              230              235              240

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys
      245              250              255

His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr
      260              265              270

Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu
      275              280              285

Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile
      290              295              300

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
      305              310              315              320

Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val
      325              330              335

Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr
      340              345              350

Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln
      355              360              365

Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu
      370              375              380

```

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

Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
 405 410

<210> 7
 <211> 1233
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SerA kiểu dại

<400> 7
 atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60
 caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120
 gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180
 tcccgtaacc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggc cgctattggc 240
 tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg 300
 gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgccg agctggatgat tggcgaactg 360
 ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420
 aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480
 catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540
 gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600
 ctgaatatga gcgatgtggg gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660
 atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc 720
 ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgtgg cgagcaaaca tctggcgggg 780
 gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840
 ctgtgtgaat tcgacaacgt ctttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900
 caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960
 acgtctctct cggatgaact cccggaagtc tcgctgccac tgcacggtgg gcgtcgtctg 1020
 atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat ctctgccgag 1080
 cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtgggt 1140
 attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200
 ccgggtacca ttccgccccg tctgctgtac taa 1233

<210> 8
 <211> 1233
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SerA kiểu đột biến

<400> 8

```

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac      60
caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc      120
gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga      180
tcccgtaccc atctgactga agacgtgata aacgccgcag aaaaactggc cgctattggc      240
tgttttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccc      300
gtattttaacg caccgttctc aaatacgcg cctgttgctg agctggatgat tggcgaactg      360
ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac      420
aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcg ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt      480
catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat      540
gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg      600
ctgaatatga gcgatgtggg gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg      660
atgggcgcgga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc      720
gggtactgtgg tggatatccc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg      780
gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg      840
ctgtgtgaat tcgacaacgt cttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg      900
caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca      960
acgctctctg cggatgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gcgtcgtctg     1020
atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag     1080
cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtgggt     1140
attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt     1200
ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa                                     1233

```

<210> 9

<211> 362

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SerC

<400> 9

```

Met Ala Gln Ile Phe Asn Phe Ser Ser Gly Pro Ala Met Leu Pro Ala
  1             5             10             15

```

```

Glu Val Leu Lys Gln Ala Gln Gln Glu Leu Arg Asp Trp Asn Gly Leu

```

20	25	30
Gly Thr Ser Val Met Glu Val Ser His Arg Gly Lys Glu Phe Ile Gln		
35	40	45
Val Ala Glu Glu Ala Glu Lys Asp Phe Arg Asp Leu Leu Asn Val Pro		
50	55	60
Ser Asn Tyr Lys Val Leu Phe Cys His Gly Gly Gly Arg Gly Gln Phe		
65	70	75
Ala Ala Val Pro Leu Asn Ile Leu Gly Asp Lys Thr Thr Ala Asp Tyr		
85	90	95
Val Asp Ala Gly Tyr Trp Ala Ala Ser Ala Ile Lys Glu Ala Lys Lys		
100	105	110
Tyr Cys Thr Pro Asn Val Phe Asp Ala Lys Val Thr Val Asp Gly Leu		
115	120	125
Arg Ala Val Lys Pro Met Arg Glu Trp Gln Leu Ser Asp Asn Ala Ala		
130	135	140
Tyr Met His Tyr Cys Pro Asn Glu Thr Ile Asp Gly Ile Ala Ile Asp		
145	150	155
Glu Thr Pro Asp Phe Gly Ala Asp Val Val Val Ala Ala Asp Phe Ser		
165	170	175
Ser Thr Ile Leu Ser Arg Pro Ile Asp Val Ser Arg Tyr Gly Val Ile		
180	185	190
Tyr Ala Gly Ala Gln Lys Asn Ile Gly Pro Ala Gly Leu Thr Ile Val		
195	200	205
Ile Val Arg Glu Asp Leu Leu Gly Lys Ala Asn Ile Ala Cys Pro Ser		
210	215	220
Ile Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Asn Asp Asn Gly Ser Met Phe Asn Thr		
225	230	235
Pro Pro Thr Phe Ala Trp Tyr Leu Ser Gly Leu Val Phe Lys Trp Leu		
245	250	255
Lys Ala Asn Gly Gly Val Ala Glu Met Asp Lys Ile Asn Gln Gln Lys		
260	265	270
Ala Glu Leu Leu Tyr Gly Val Ile Asp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg Asn		
275	280	285
Asp Val Ala Lys Ala Asn Arg Ser Arg Met Asn Val Pro Phe Gln Leu		
290	295	300
Ala Asp Ser Ala Leu Asp Lys Leu Phe Leu Glu Glu Ser Phe Ala Ala		
305	310	315
Gly Leu His Ala Leu Lys Gly His Arg Val Val Gly Gly Met Arg Ala		
325	330	335
Ser Ile Tyr Asn Ala Met Pro Leu Glu Gly Val Lys Ala Leu Thr Asp		
340	345	350
Phe Met Val Glu Phe Glu Arg Arg His Gly		
355	360	

<210> 10
 <211> 1089
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SerC

<400> 10
 atggctcaaa tcttcaattt tagttctggg cgggcaatgc taccggcaga ggtgcttaaa 60
 caggctcaac aggaactgcg cgactggaac ggtcttggtg cgctcggatg ggaagtgagt 120
 caccgtggca aagagttcat tcagggtgca gaggaagccg agaaggattt tcgcatctt 180
 cttaatgtcc cctccaacta caaggtatta ttctgccatg gcggtggctg cggtcagttt 240
 gctgcggtac cgctgaatat tctcggatg aaaaccaccg cagattatgt tgatgccggt 300
 tactgggagg caagtgccat taaagaagcg aaaaaatact gcacgcctaa tgtctttgac 360
 gccaaagtga ctgttgatgg tctgcgcgcg gttaagccaa tgcgtgaatg gcaactctct 420
 gataatgctg cttatatgca ttattgcccg aatgaaacca tcgatggatg cgccatcgac 480
 gaaacgccag acttcggcgc agatgtgggt gtcgccgctg acttctcttc aaccattctt 540
 tcccgctccga ttgacgtcag ccgttatggg gtaatttacg ctggcgcgca gaaaaatata 600
 ggcccggctg gcctgacaat cgtcatcggt cgtgaagatt tgctgggcaa agcgaatata 660
 gcgtgtccgt cgattctgga ttattccatc ctcaacgata acggctccat gtttaacacg 720
 ccgccgacat ttgcctggta tctatctggg ctgggtcttta aatggctgaa agcgaacggc 780
 ggtgtagctg aaatggataa aatcaatcag caaaaagcag aactgctata tgggggtgatt 840
 gataacagcg atttctaccg caatgacgtg gcgaaagcta accgttcgcg gatgaacgtg 900
 ccgttccagt tggcggacag tgcgcttgac aaattgttcc ttgaagagtc ttttgctgct 960
 ggccttcatt cactgaaagg tcaccgtgtg gtgcggcgaa tgcgcgcttc tatttataac 1020
 gccatgccgc tggaaggcgt taaagcgtg acagacttca tgggttgagtt cgaacgccgt 1080
 cacggttaa 1089

<210> 11
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yhhS MFS

<400> 11
 Met Pro Glu Pro Val Ala Glu Pro Ala Leu Asn Gly Leu Arg Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Arg Ile Val Ser Ile Val Met Phe Asn Phe Ala Ser Tyr Leu Thr
 20 25 30
 Ile Gly Leu Pro Leu Ala Val Leu Pro Gly Tyr Val His Asp Val Met
 35 40 45
 Gly Phe Ser Ala Phe Trp Ala Gly Leu Val Ile Ser Leu Gln Tyr Phe
 50 55 60
 Ala Thr Leu Leu Ser Arg Pro His Ala Gly Arg Tyr Ala Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Pro Lys Lys Ile Val Val Phe Gly Leu Cys Gly Cys Phe Leu Ser
 85 90 95
 Gly Leu Gly Tyr Leu Thr Ala Gly Leu Thr Ala Ser Leu Pro Val Ile
 100 105 110
 Ser Leu Leu Leu Leu Cys Leu Gly Arg Val Ile Leu Gly Ile Gly Gln
 115 120 125
 Ser Phe Ala Gly Thr Gly Ser Thr Leu Trp Gly Val Gly Val Val Gly
 130 135 140
 Ser Leu His Ile Gly Arg Val Ile Ser Trp Asn Gly Ile Val Thr Tyr
 145 150 155 160
 Gly Ala Met Ala Met Gly Ala Pro Leu Gly Val Val Phe Tyr His Trp
 165 170 175
 Gly Gly Leu Gln Ala Leu Ala Leu Ile Ile Met Gly Val Ala Leu Val
 180 185 190
 Ala Ile Leu Leu Ala Ile Pro Arg Pro Thr Val Lys Ala Ser Lys Gly
 195 200 205
 Lys Pro Leu Pro Phe Arg Ala Val Leu Gly Arg Val Trp Leu Tyr Gly
 210 215 220
 Met Ala Leu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Phe Tyr Asp Ala Lys Gly Trp Asp Gly Ala Ala Phe Ala
 245 250 255
 Leu Thr Leu Phe Ser Cys Ala Phe Val Gly Thr Arg Leu Leu Phe Pro
 260 265 270
 Asn Gly Ile Asn Arg Ile Gly Gly Leu Asn Val Ala Met Ile Cys Phe
 275 280 285
 Ser Val Glu Ile Ile Gly Leu Leu Leu Val Gly Val Ala Thr Met Pro
 290 295 300
 Trp Met Ala Lys Ile Gly Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Phe Ser Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Pro Ala Leu Gly Val Val Ala Val Lys Ala Val Pro Gln Gln
 325 330 335
 Asn Gln Gly Ala Ala Leu Ala Thr Tyr Thr Val Phe Met Asp Leu Ser
 340 345 350
 Leu Gly Val Thr Gly Pro Leu Ala Gly Leu Val Met Ser Trp Ala Gly

355 360 365
 Val Pro Val Ile Tyr Leu Ala Ala Ala Gly Leu Val Ala Ile Ala Leu
 370 375 380
 Leu Leu Thr Trp Arg Leu Lys Lys Arg Pro Pro Glu His Val Pro Glu
 385 390 395 400
 Ala Ala Ser Ser Ser
 405

<210> 12
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yhhS

<400> 12
 atgcccgaac ccgtagccga acccgcgcta aacggattgc gcctgaattt gcgcattgtc 60
 tctatagtc tgtttaactt cgccagctac ctcaccatcg gggtgccgct cgctgtatta 120
 ccgggctatg tccatgatgt gatgggcttt agcgccttct gggcaggatt ggttatcagc 180
 ctgcaatatt tcgccacctt gctgagccgc cctcatgccg gacgttacgc cgattcgctg 240
 ggacccaaaa agattgtcgt cttcggttta tgccgctgct ttttgagcgg tctggggtat 300
 ctgacggcag gattaaccgc cagtctgcct gtcacagcc tgttattact ttgcctgggg 360
 cgcgatcatc ttgggattgg gcaaagtgtt gccggaacgg gatcgaccct atggggcggt 420
 ggcggtggtg gtcgctgca tatcgggagg gtgatttcgt ggaacggcat tgtaacttac 480
 ggggcgatgg cgatgggtgc gccgttaggc gtcgtgtttt atcactgggg cggcttgcag 540
 gcgttagcgt taatcattat gggcggtggc ctggtggcca ttttggtggc gatcccgcg 600
 ccgacggtaa aagccagtaa aggcaaaccg ctgccgtttc gcgcggtgct tgggcgcgct 660
 tggctgtacg gtatggcgct ggcactggct tccgcgggat ttggcgatc cgccaccttt 720
 atcacgctgt tttatgacgc taaagggttg gacggtgcgg ctttcgcgct gacgctgttt 780
 agctgtgcgt ttgtcggtag gcgtttgtta ttccctaacc gcattaaccg tatcgggtggc 840
 ttaaaccgtag cgatgatttg ctttagcggt gagataatcg gcctgctact ggttggcgtg 900
 gcgactatgc cgtggatggc gaaaatcggc gtcttactgg cggggggccg gttttcgctg 960
 gtgttcccgg cattgggtgt agtggcggtg aaagcggttc cgcagcaaaa tcagggggcg 1020
 gcgctggcaa cttacaccgt atttatggat ttatcgcttg gcgtgactgg accactggct 1080
 gggctggtga tgagctgggc gggcgtagcg gtgatttatc tggcggcggc gggactggtc 1140
 gcaatcgctg tattactgac gtggcgatta aaaaaacggc ctccggaaca cgtccctgag 1200
 gccgcctcat catcttaa 1218

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

<220>
 <223> pCL_PrhtB-yhhS library_F

<400> 13
 caccgggagc ccgggatgcc cgaacccgta gccga 35

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

<220>
 <223> pCL_PrhtB-yhhS library_R

<400> 14
 cttgcatgcc tgcagttaag atgatgaggc ggcct 35

<210> 15
 <211> 341
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rhtB promoter

<400> 15
 cgatgggtcga tgattaagac atcaaaccac aaatggaaca ggatcataggc cagttccgca 60
 tatttttacgt agctctcaat acgccccggg cagatgacta ccaccgggtc atgggtgctgt 120
 ggcgcgaaaac ggacaaagcg caccggaatg tcattccacac cagtaaaactc tgcttcatca 180
 cgctgacgcc agaaatcagt cagcgggtccc atggtaaaag cagcaaacgc gttttctctt 240
 gtttcccagt ctttttgctg ctgaaacatc gggtaatctg cctcttaaac cactgaaaat 300
 cgtttttttt agcgtgcctg acacaacgct ggcacagtag c 341

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

<220>
 <223> pCL_PrhtB_F

<400> 16
 cggggatcct ctagacgctt gctgcaactc tctca 35

<210> 17

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

 <220>
 <223> pCL_PrhtB_R

 <400> 17 35
 tacgggttcg ggcattgatat ctttcctgtg tgaaa

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

 <220>
 <223> pCL_Prmf-serA* (G336V) - (RBS) serC_PrhtB-yhhS453_F

 <400> 18 35
 cacgggttaa agcttcgatg gtcgatgatt aagac

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

 <220>
 <223> pCL_Prmf-serA* (G336V) - (RBS) serC_PrhtB-yhhS453_R

 <400> 19 35
 gattacgcc aagcttttaag atgatgagggc ggcct

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

 <220>
 <223> pSK-yhhS453_F

 <400> 20 35
 caggaattcg atatcatgcc cgaacccgta gccga

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

 <220>
 <223> pSK-yhhS453_R

 <400> 21 35
 gactagcgtg atatcttaag atgatgagggc ggcct

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yhhS-out-F

<400> 22
 atgtgaatct gtggattatt 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yhhS-out-R

<400> 23
 gttatggccg tttatcgaaa 20

<210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> W3110 yhhSUP_F

<400> 24
 caggaattcg atatctcgct ccggcgacat atgca 35

<210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> W3110 yhhSUP_R

<400> 25
 cagcaagcgg gtaccgagga tcaccacatt ttac 35

<210> 26
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pCL_Ptrc-gfp_F

<400> 26
 aatgtggtga tcctcggtag ccgcttgctg caact 35

<210> 27
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pCL_Ptrc-gfp_R

<400> 27
 tacgggttcg ggcatgatat ctttcctgtg tgaaa 35

<210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pCL_PrhtB-yhhS453_F

<400> 28
 cacaggaaag atatcatgcc cgaaccgta gccga 35

<210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pCL_PrhtB-yhhS453_R

<400> 29
 gactagcgtg atatcgcacc catcgccatc gcccc 35

<210> 30
 <211> 4695
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pSKH130

<400> 30
 tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc 60
 gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca 120
 gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc 180
 agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact 240
 cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggga aaacagcatt ccaggtatta 300
 gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg 360
 ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct 420

caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt	480
aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg	540
gattcagtcg tcaactcatgg tgattttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa	600
ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatgcag accgatacca ggatcttgcc	660
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa	720
tatggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt	780
ttctaatacag aattggttaa ttggttgtaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg	840
gacggcggct ttgttgaata aatcgaactt ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcac	900
ttcccgacaa cgcagaccgt tccgtggcaa agcaaaagtt caaaatcacc aactggtcca	960
cctacaacaa agctctcatc aaccgtggct ccctcacttt ctggctggat gatggggcga	1020
ttcaggcctg gtatgagtca gcaacacctt cttcacgagg cagacctcag cgctcaaaga	1080
tgcaggggta aaagctaacc gcatctttac cgacaaggca tccggcagtt caacagatcg	1140
ggaagggctg gatattgctga ggatgaagggt ggaggaagggt gatgtcattc tggatgaagaa	1200
gctcgaccgt cttggccgcg acaccgccga catgatccaa ctgataaaaag agtttgatgc	1260
tcagggtgta gcggttcggt ttattgacga cgggatcagt accgacggtg atatggggca	1320
aatggtggtc accgcgcgta atacgactca ctatagggcg aattggagct ccaccgcggt	1380
ggcggccgct ctagacttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat	1440
cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgctagagga tcgatccttt	1500
ttaacccatc acatatacct gccgttcact attatttagt gaaatgagat attatgatat	1560
tttctgaatt gtgattaaaa aggcaacttt atgcccatgc aacagaaact ataaaaaata	1620
cagagaatga aaagaaacag atagattttt tagttcttta ggcccgtagt ctgcaaatcc	1680
ttttatgatt ttctatcaaa caaaagagga aaatagacca gttgcaatcc aaacgagagt	1740
ctaatagaat gaggtcgaaa agtaaatcgc gcgggtttgt tactgataaa gcaggcaaga	1800
cctaaaatgt gtaaagggca aagtgtatac tttggcgtca ccccttacat atttttaggtc	1860
tttttttatt gtgcgtaact aacttgccat cttcaaacag gagggctgga agaagcagac	1920
cgctaacaca gtacataaaa aaggagacat gaacgatgaa catcaaaaag tttgcaaaac	1980
aagcaacagt attaaccttt actaccgcac tgctggcagg aggcgcaact caagcgtttg	2040
cgaaagaaac gaacccaaaag ccatataagg aaacatacgg catttcccat attacacgcc	2100
atgatatgct gcaaatccct gaacagcaaa aaaatgaaaa atatcaagtt cctgaattcg	2160
attcgtccac aattaaaaat atctctttctg caaaaggcct ggacgttttg gacagctggc	2220
cattacaaaa cgctgacggc actgtcgcaa actatcacgg ctaccacatc gtctttgcat	2280
tagccggaga tcctaaaaat gcggatgaca catcgattta catgttctat caaaaagtcg	2340

gcgaaacttc tattgacagc tggaaaaacg ctggccgcgt ctttaaagac agcgacaaat	2400
tcgatgcaaa tgattctatc ctaaaagacc aacacaaga atggtcaggt tcagccacat	2460
ttacatctga cggaaaaatc cgtttattct acactgattt ctccggtaaa cattacggca	2520
aacaaacact gacaactgca caagttaacg tatcagcatc agacagctct ttgaacatca	2580
acggtgtaga ggattataaa tcaatctttg acggtgacgg aaaaacgtat caaaatgtac	2640
agcagttcat cgatgaaggc aactacagct caggcgacaa ccatacgctg agagatcctc	2700
actacgtaga agataaaggc cacaaatact tagtatttga agcaaacact ggaactgaag	2760
atggctacca aggcgaagaa tctttattta acaaagcata ctatggcaaa agcacatcat	2820
tcttccgtca agaaagtcaa aaacttctgc aaagcgataa aaaacgcacg gctgagttag	2880
caaacggcgc tctcggtatg attgagctaa acgatgatta cacactgaaa aaagtgatga	2940
aaccgctgat tgcattctaac acagtaacag atgaaattga acgcgcgaac gtctttaaaa	3000
tgaacggcaa atggtacctg ttcactgact cccgcggatc aaaaatgacg attgacggca	3060
ttacgtctaa cgatatttac atgcttggtt atgtttctaa ttctttaact ggcccataca	3120
agccgctgaa caaaactggc cttgtgttaa aaatggatct tgatcctaac gatgtaacct	3180
ttacttactc acacttcgct gtacctcaag cgaaaggaaa caatgtcgtg attacaagct	3240
atatgacaaa cagaggattc tacgcagaca aacaatcaac gtttgcgcca agcttctctg	3300
tgaacatcaa aggcaagaaa acatctgttg tcaaagacag catccttgaa caaggacaat	3360
taacagttaa caaataaaaa cgcaaaagaa aatgccgatg ggtaccgagc gaaatgaccg	3420
accaagcgac gcccaacctg ccacgcatc ccccgggctg caggaattcg atatcacgct	3480
agtcgacctc gctagcatat ggggagatct actagtaaag catgccaat ggtattctat	3540
agtgtcacct aaatcgtatg tgtatgatac ataaggttat gtattaattg tagccgcgtt	3600
ctaacgacaa tatgtacaag cctaattgtg tagcatctgg ctactgaag cagaccctat	3660
catctctctc gtaaaactgcc gtcagagtcg gtttggttgg acgaaccttc tgagtttctg	3720
gtaacgccgt cccgcacccg gaaatggtca gcgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc	3780
catggctaata tcccatgtca gccgttaagt gttcctgtgt cactcaaaat tgctttgaga	3840
ggctctaagg gcttctcagt gcgttacatc cctggcttgt tgtccacaac cgttaaacct	3900
taaaagcttt aaaagcctta tatattcttt tttttcttat aaaacttaaa accttagagg	3960
ctattttaagt tgctgattta tattaatttt attgttcaaa catgagagct tagtacgtga	4020
aacatgagag cttagtagct tagccatgag agcttagtac gttagccatg agggtttagt	4080
tcgttaaaca tgagagctta gtacgttaaa catgagagct tagtacgtga aacatgagag	4140
cttagtagct actatcaaca ggttgaaactg ctgatcttca gatcctctac gccggacgca	4200
tcgtggccgg atcttgccgc cgcaaaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta	4260

tatatgagta aacttgggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca ccaataactg	4320
ccttaaaaaa actagcgctg aggtctgcct cgtgaagaag gtgttgctga ctcataccag	4380
gcctgaatcg ccccatcatc cagccagaaa gtgagggagc cacggttgat gagagctttg	4440
ttgtaggtgg accagttggt gatTTTgaac ttttgctttg ccacggaacg gtctgcgttg	4500
tcgggaagat gcgtgatctg atccttcaac tcagcaaaag ttcgatttat tcaacaaagc	4560
cacgttggtg ctcaaaatct ctgatgttac attgcacaag ataaaaatat atcatcatga	4620
acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa	4680
cgggaaacgt cttgc	4695

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit có hoạt tính sản sinh *O*-phosphoserin (OPS) bao gồm a) sự thay thế isoleuxin (I) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 241 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng threonin (T), sự thay thế aspartic axit (D) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 246 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng valin (V), và sự thay thế valin (V) ở vị trí tương ứng vị trí thứ 330 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 11 bằng isoleuxin (I), và có trình tự axit amin, trong đó b) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 88 là phenylalanin và c) axit amin ở vị trí tương ứng vị trí thứ 207 là lysin (K).
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và ít nhất 90% sự đồng nhất với trình tự này.
3. Polynucleotit mã hóa polypeptit theo điểm 1.
4. Vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit theo điểm 1, polynucleotit mã hóa polypeptit, và vectơ chứa polynucleotit.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính của phosphoserin phosphataza (SerB) được làm suy yếu thêm so với hoạt tính nội sinh của nó.
6. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính của phosphoglyxerat dehydrogenaza (SerA) hoặc phosphoserin amintransferaza (SerC) được tăng cường thêm so với hoạt tính nội sinh của nó.
7. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật là *Escherichia coli*.
8. Phương pháp sản xuất *O*-phosphoserin bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật chứa bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit theo điểm 1, polynucleotit mã hóa polypeptit, và vectơ chứa polynucleotit.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp còn bao gồm thu hồi *O*-phosphoserin trong môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.
10. Phương pháp sản xuất xystein hoặc dẫn xuất của xystein, trong đó phương pháp này bao gồm:

a) sản xuất *O*-phosphoserin (OPS) hoặc môi trường chứa OPS bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản sinh *O*-phosphoserin trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật chứa

bất kỳ một hoặc nhiều polypeptit theo điểm 1, polynucleotit mã hóa polypeptit, và vector chứa polynucleotit; và

b) cho phản ứng *O*-phosphoserin hoặc môi trường chứa *O*-phosphoserin được sản xuất ở bước a) với sulfua, trong sự có mặt của *O*-phosphoserin sulfhydrylaza (OPSS) hoặc vi sinh vật biểu hiện *O*-phosphoserin.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm chuyển đổi xystein được sản xuất ở bước b) thành dẫn xuất xystein.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó sulfua là ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có Na_2S , NaSH , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, H_2S , và $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.