



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

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

(11)



1-0052978

(51)^{2020.01} C12N 15/10; C12R 1/07; C12N 15/75; (13) B
A61K 35/742

(21) 1-2020-02284

(22) 01/11/2018

(86) PCT/GB2018/053178 01/11/2018

(87) WO2019/086887 09/05/2019

(30) 1718133.0 02/11/2017 GB

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/01/2021 394A

(73) SPOREGEN LIMITED (GB)

The London Bioscience Innovation Centre 2 Royal College Street, London, NW1
0NH, United Kingdom

(72) CUTTING, Simon (GB).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) BÀO TỬ VI KHUẨN ĐƯỢC CẢI BIẾN, QUY TRÌNH ĐƯA GEN KHÁC LOÀI
VÀO VI KHUẨN TẠO BÀO TỬ, VÀ VECTƠ ĐỂ SỬ DỤNG TRONG QUY
TRÌNH NÀY

(21) 1-2020-02284

(57) Sáng chế đề cập đến bào tử vi khuẩn được cải biến, và cụ thể là đề cập đến, nhưng không chỉ giới hạn ở, bào tử vi khuẩn được cải biến chứa một hoặc nhiều gen khác loài, nhưng không đưa các gen kháng kháng sinh vào. Sáng chế còn đề cập đến quy trình đưa các gen khác loài vào vi khuẩn tạo bào tử, các vector để sử dụng trong quy trình này.

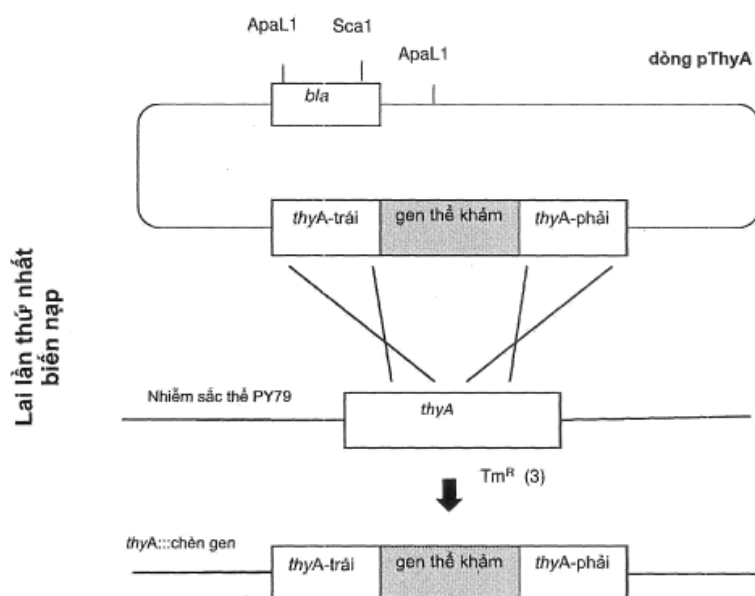


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến bào tử vi khuẩn được cải biến, và cụ thể là đề cập đến, nhưng không chỉ giới hạn ở, bào tử vi khuẩn được cải biến chứa một hoặc nhiều gen khác loài, mà không đưa các gen kháng kháng sinh vào. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra các bào tử vi khuẩn được cải biến này, các vector và kit để đưa các gen khác loài vào vi khuẩn tạo bào tử.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nòi bào tử, hoặc bào tử *Bacillus* là các thực thể ngủ có các đặc tính đề kháng đã được biết rõ bao gồm cả tính ổn định nhiệt, khi tiếp xúc với các hóa chất có hại và làm khô (tài liệu 1). Theo đó, các bào tử mang lại nhiều ứng dụng. Ứng dụng đầu tiên và quan trọng nhất là sử dụng chúng làm vacxin dùng qua đường niêm mạc trong đó các kháng nguyên có thể được biểu hiện trên bề mặt của bào tử bằng cách dung hợp với thành phần gắn của protein vỏ (tài liệu 2). Sự tạo miễn dịch của các bào tử tái tổ hợp bằng cách sử dụng qua đường niêm mạc (đường miệng, dưới lưỡi hoặc mũi) đã cho thấy nhiều kết quả hứa hẹn và trong một số trường hợp, mức độ bảo vệ có thể có hiệu quả ở người hoặc động vật (các tài liệu 3-5). Trong trường hợp sau, khả năng kết hợp vacxin vào thức ăn là đặc biệt hấp dẫn và đối với một số động vật, có thể được cho là cách duy nhất để sử dụng vacxin. Ví dụ, việc sử dụng vacxin cho tôm nuôi chống lại các tác nhân gây bệnh là virus, ví dụ, virus gây hội chứng đốm trắng (White Spot Syndrome Virus: WSSV) trong đó các bào tử tái tổ hợp biểu hiện các protein vỏ VP26 và VP28 của WSSV đã được chứng minh là tạo ra sự bảo vệ ở tôm (các tài liệu 6-9).

Nhiều loài vi khuẩn *Bacillus* được cho là ‘thuộc loại thực phẩm’, nghĩa là an toàn để sử dụng cho người và được ký hiệu là QPS (Qualified Presumption of Safety: đạt tiêu chuẩn về độ an toàn như được xác định bởi Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (European Food Safety Authority: EFSA)) (tài liệu 10). Ở Mỹ, một số chủng ở trạng thái nói chung được công nhận là an toàn ((Generally Recognized As Safe: GRAS) như được xác định bởi Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ). Trạng

thái QPS và GRAS đã chứng minh việc sử dụng nhiều chủng *Bacillus*, bao gồm cả các chủng *B. subtilis*, làm men vi sinh trong cả thức ăn cho người và động vật (tài liệu 11). Khái niệm về men vi sinh tái tổ hợp (tài liệu 12) là bước tiến logic tiếp theo về mặt khái niệm trong việc khai thác các đặc tính có lợi của *Bacillus* (tài liệu 13).

Ngoài việc dùng làm vaccin, các bào tử đã được chứng minh là tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện của enzym trên bề mặt của bào tử, ví dụ, enzym phytaza trong thức ăn cho động vật (tài liệu 14). Khả năng sử dụng các vi khuẩn làm men vi sinh để cung cấp các enzym mà không cần tinh chế enzym và có thể mang lại nhiều lợi thế đáng kể cho ngành công nghiệp. Cuối cùng, streptavidin đã được biểu hiện trên các bào tử *B. subtilis* cho phép các kháng thể đơn dòng được liên hợp với bề mặt bào tử và sự hướng đích của các bào tử được tải được chất kháng ung thư đến các tế bào ung thư (tài liệu 15).

Mặc dù các bào tử *Bacillus* có tính hữu dụng tiềm năng cho các ứng dụng trong công nghiệp, vẫn còn một số trở ngại liên quan đến sự giải phóng có chủ ý của vi khuẩn *Bacillus* đã được cải biến di truyền. Trở ngại trước tiên là việc sử dụng các gen kháng kháng sinh (Ab^R) được sử dụng trong kỹ thuật di truyền của các chủng tái tổ hợp ổn định. Liên quan đến Ab^R , phần lớn quy trình cần phải chèn ADN khác loài vào *B. subtilis* có sự chèn lệch vị trí bằng cách sử dụng gen Ab^R để chọn lọc dương tính (tài liệu 16). Các vector plasmit mang gen kháng chloramphenicol hoặc erythromycin thường được sử dụng để chèn lệch vị trí ở locus di truyền với lượng dư cho sự sinh trưởng của tế bào, điển hình là các gen alpha amylaza (*amyE*) hoặc threonin C (*thrC*) (tài liệu 17). Nguy cơ tiềm tàng của việc chuyển gen Ab^R sau khi giải phóng đã được thừa nhận và hiện nay có ít nhất hai hệ trong vi khuẩn *B. subtilis* đã được mô tả là có thể chèn các gen khác loài mà không đưa gen Ab^R vào (tài liệu 18, 19).

Trở ngại thứ hai và cũng là thách thức lớn nhất là số phận cuối cùng của các bào tử tái tổ hợp khi được giải phóng, do các bào tử đã được chứng minh là còn sống trong hàng triệu năm dưới dạng thực thể sống (tài liệu 20). Đất thường được làm giàu bằng nhiều bào tử ngủ (tài liệu 21) và sức sống nội tại của chúng làm cho khó chứng minh được rằng chúng sẽ không tồn tại sau khi giải phóng có chủ ý. Một phương pháp có thể tạo cấu trúc cho các bào tử không có khả năng nảy mầm nhưng tốt nhất là tỷ lệ nảy mầm có thể được giảm đến 0,0015% (tài liệu 22), điều này có thể không đáp ứng yêu cầu của các cơ quan quản lý.

Do đó, cần có các phương pháp cải tiến để đưa gen khác loài vào vi khuẩn tạo bào tử mà không đưa các gen kháng kháng sinh vào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã chọn phương pháp tạo ra sự đói thymin dẫn đến tình trạng còn được gọi là ‘chết vì không có thymin’ (các tài liệu 23-25). Phần lớn các sinh vật có nhân nguyên thủy đã được biết là mang một enzym thymidylat synthaza được mã hóa bởi gen *thyA* và sinh vật có nhân nguyên thủy mang gen thymidylat synthaza đột biến không thể sinh trưởng với nồng độ của thymidin hoặc thymin thấp dẫn đến sự chết tế bào. Do đó, sự đói thymin khác với các hiệu ứng kìm hãm sinh học thường được tìm thấy với sự thiếu hụt các chất dinh dưỡng khác. Tình trạng chết vì không có thymin đã được chứng minh đối với *B. subtilis* (tài liệu 26) và vi khuẩn này khác biệt ở chỗ nó mang hai enzym thymidylat synthaza được mã hóa bởi các gen *thyA* và *thyB* (tài liệu 27).

Tuy nhiên, mặc dù đã được biết từ năm 1954, khái niệm về tình trạng chết vì không có thymin vẫn chưa bao giờ được áp dụng thành công với vi khuẩn tạo bào tử nhằm mục đích đưa các gen khác loài vào mà không đưa các gen kháng kháng sinh vào.

Các tác giả sáng chế đã chọn thành công nguyên lý ‘chết vì không có thymin’ để khai thác các vi khuẩn tạo bào tử, như *Bacillus*, để đưa các gen khác loài vào mà không đưa các gen kháng kháng sinh vào. Để làm phối tử tái tổ hợp, chúng cần phải nảy mầm, chúng sẽ chết ngay lập tức và không sống sót hoặc tăng sinh (nghĩa là sinh trưởng) trong môi trường do thiếu thymin hoặc thymidin (hoặc các chất này chỉ ở nồng độ thấp). Phương pháp được phát triển này là rất mới do nó là quá trình đính gán gen gồm hai bước cho phép chọn lọc dương tính đối với nồng độ trimethoprim cao hơn liên tiếp mà không đưa các gen kháng kháng sinh bất kỳ vào.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào vi khuẩn tạo bào tử và làm cho vi khuẩn này không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen thymidylat synthaza trong vi khuẩn tạo bào tử; và
- (ii) để vi khuẩn tạo bào tử nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim.

Theo phương án được ưu tiên, và có lợi nếu quy trình được tiến hành mà không đưa gen kháng kháng sinh vào, và do đó khắc phục được các vấn đề đã bàn luận trên

đây.

Theo phương án được ưu tiên, phương pháp này còn bao gồm bước:
(iii) tạo ra bào tử vi khuẩn từ vi khuẩn tạo bào tử nêu trên.

Cần hiểu rằng bào tử vi khuẩn có thể nảy mầm hoặc có thể không nảy mầm, nhưng nếu nó nảy mầm, nó không thể sinh trưởng từ bào tử đã nảy mầm và tăng sinh.

Theo cách có lợi, tác giả sáng chế đã tìm ra cách thuận tiện để làm bất hoạt tất cả các enzym thymidylat synthaza trong vi khuẩn, ví dụ, theo các phương án, trong đó vi khuẩn mang hai hoặc nhiều gen *thy*, hoặc trong đó vi khuẩn mang gen *thyA* và gen *thyB* (ví dụ, *Bacillus spp.*), hoặc trong đó sự bất hoạt *thyA* không thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn trong các điều kiện sinh lý bình thường.

Do đó, theo phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều gen khác loài được đưa vào mỗi gen thymidylat synthaza có mặt trong vi khuẩn. Chẳng hạn, theo một phương án, vi khuẩn tạo bào tử có thể là *Bacillus Spp.* (vi khuẩn này khác biệt ở chỗ, đã được biết là có hai gen thymidylat synthaza là *thyA* và *thyB*). Tốt hơn, nếu gen khác loài được đưa vào mỗi gen trong số hai gen thymidylat synthaza, ví dụ, gen *thyA* và *thyB* của vi khuẩn *Bacillus spp.* Vi khuẩn *Bacillus spp.* có thể là loài *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaeaceans*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. licheniformis* hoặc *B. megaterium*. Tuy nhiên, tốt nhất nếu vi khuẩn *Bacillus spp.* là loài *B. subtilis*.

Cần hiểu rằng sự bất hoạt *thyA* chỉ ở vi khuẩn *Bacillus* sẽ không gây chết vì không có thymine, và sẽ không gây hư hại hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng trong các điều kiện sinh lý bình thường.

Theo phương án khác, vi khuẩn tạo bào tử có thể là *Clostridium Spp.* (vi khuẩn này đã được biết là có một gen thymidylat synthaza). Tốt hơn nếu theo phương án này, gen khác loài được đưa vào gen thymidylat synthaza. Vi khuẩn *Clostridium spp.* có thể là loài *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. acetobutylicum*, *C. cellulolyticum*, *C. novyi* hoặc *C. thermocellum*. Tốt nhất nếu vi khuẩn *Clostridium spp.* là loài *Clostridium difficile*.

Theo các phương án được ưu tiên quy trình, vi khuẩn tạo bào tử có mặt trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn.

Bước (ii) của quy trình có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bình thích hợp bất kỳ, như đĩa Petri hoặc bình nuôi cấy bằng thủy tinh, chứa môi trường sinh trưởng bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Môi trường sinh trưởng này có thể chứa trimethoprim

với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 $\mu\text{g/ml}$ đến 20 $\mu\text{g/ml}$, từ 0,01 $\mu\text{g/ml}$ đến 15 $\mu\text{g/ml}$, từ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ đến 10 $\mu\text{g/ml}$, từ 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 5 $\mu\text{g/ml}$, từ 2 $\mu\text{g/ml}$ đến 4 $\mu\text{g/ml}$, hoặc tốt hơn là khoảng 3 $\mu\text{g/ml}$.

Theo một phương án khác, trong bước (ii), vi khuẩn có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa chất chiết nấm men (yeast extract: YE) với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, hoặc nồng độ bất kỳ được bộc lộ ở đây. Theo một phương án, môi trường này không chứa YE.

Theo một phương án, trong bước (ii), vi khuẩn có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa thymin hoặc thymidin với nồng độ bất kỳ được bộc lộ ở đây, chẳng hạn khoảng 50 $\mu\text{g/ml}$.

Theo một phương án, trong bước (ii), vi khuẩn có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa trimethoprim với nồng độ bất kỳ được bộc lộ ở đây, chẳng hạn khoảng 3 $\mu\text{g/ml}$.

Theo một phương án, trong bước (ii), vi khuẩn có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa axit casamino (casaxit amin: CAA) với nồng độ bất kỳ được bộc lộ ở đây, chẳng hạn khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án, trong bước (ii), vi khuẩn có thể được sinh trưởng trong môi trường có bổ sung ít nhất một axit amin hoặc hỗn hợp axit amin bất kỳ như được bộc lộ ở đây.

Theo một phương án, các tế bào có sự chèn gen có thể được xác định theo khả năng không sinh trưởng trừ khi được bổ sung thymin hoặc thymidin. Phương pháp xác định khác hoặc thay thế là khuếch đại bằng phản ứng PCR đối với sự có mặt của các gen thể khảm từ các thể biến nạp.

Theo phương án được ưu tiên nhất, sáng chế đề xuất hệ tách dòng thích hợp để ngăn chặn về mặt sinh học đối với *Bacillus Spp.* đã được cải biến di truyền, như *B. subtilis*.

Do đó, theo phương án này, sáng chế đề xuất quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào vi khuẩn *Bacillus Spp.* và làm cho vi khuẩn này không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* và gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*; và
- (ii) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim.

Theo phương án được ưu tiên, gen khác loài được đưa vào một trong số các gen *thy*, và sau đó đưa vào gen *thy* còn lại. Do đó, tốt hơn nếu sáng chế đề xuất quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào vi khuẩn *Bacillus Spp.* và làm cho vi khuẩn này không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*;
- (ii) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim;
- (iii) đưa gen khác loài vào gen còn lại trong số gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên; và
- (iv) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim.

Theo phương án được ưu tiên, quy trình này còn bao gồm bước:

- (v) tạo ra bào tử vi khuẩn từ vi khuẩn *Bacillus Spp* nêu trên.

Cần hiểu rằng bào tử vi khuẩn có thể nảy mầm hoặc có thể không nảy mầm, nhưng nếu nó nảy mầm, nó không thể sinh trưởng từ bào tử đã nảy mầm và tăng sinh. Theo phương án được ưu tiên, quá trình này diễn ra mà không đưa gen kháng kháng sinh vào. Theo phương án được ưu tiên, bước (i) là bước đưa gen khác loài vào gen *thyA* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* và bước (iii) là bước đưa gen khác loài vào gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*

Theo phương án được ưu tiên, vi khuẩn *Bacillus Spp.* là loài *B. subtilis*. Theo các phương án được ưu tiên, vi khuẩn *Bacillus Spp.* hoặc *B. subtilis* có mặt trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn.

Theo một phương án, khung đọc mở của gen *thyA* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 1 như sau:

```
ATGACGCAATTCGATAAACAATACAATTCAATTATAAAGGATATTATCAATAATGGAATCTC
AGACGAAGAGTTTGATGTAAGAACCAAGTGGGACTCAGATGGAACACCGGCACATACTCTAA
GTGTAATCAGTAAGCAAATGAGATTCGACAACCTCAGAGGTTCCGATTTTAACGACAAAAAAG
GTTGCCTGGAAAACAGCCATTAAAGAGTTGCTCTGGATTGGCAGCTGAAATCTAATGATGT
TAATGATTTAAACATGATGGGCGTCCATATTTGGGATCAGTGGAAACAAGAAGACGGAACCA
TCGACATGCATATGGATTTTCAGCTGGGGAAGAAAAACAGAAGTCTAAATGGAGAAAAAGTG
GATCAGGTAGACTATCTTCTTCATCAATTGAAGAACAATCCATCTTCACGCAGACACATTAC
AATGCTGTGGAATCCTGATGAATTAGACGCAATGGCCTTAACGCCATGTGTATACGAGACAC
AATGGTACGTTAAACATGGGAACTCCACCTTGAGGTAAGAGCACGGAGCAATGATATGGCA
TTGGGAAATCCATTCAATGTATTCCAGTATAATGTGTTGCAGCGCATGATTGCTCAAGTGAC
TGGTTATGAGCTTGGTGAATATATCTTTAACATTGGGGATTGCCATGTGTACACACGTCATA
TAGACAATTTGAAAATTCAAATGGAAAGAGAACAGTTTGAAGCACCTGAACCTATGGATCAAT
```

CCTGAAGTGAAAGATTTTATGACTTTACCATTGATGATTCAAGTTAATCAACTATAAACA
TGGGGACAAGCTTTTATTTGAGGTAGCGGTTTAA

[SEQ ID NO: 1]

Do đó, tốt hơn nếu quy trình này bao gồm bước đưa gen khác loài vào trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 1, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* Theo một phương án khác, quy trình này có thể bao gồm bước đưa gen khác loài vào vi khuẩn *Bacillus Spp.* mà không đưa vào trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, theo cách sao cho sự biểu hiện của trình tự SEQ ID NO: 1 bị đứt quãng hoặc giảm đi.

Theo một phương án, khung đọc mở của gen *thyA* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic, trình tự này mã hóa trình tự axit amin được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 18 như sau:

MTQFDKQYNSIIKDIINNGISDEEFDVRTKWSDGTPAHTLSVISKQMRFDNSEVPILTTHK
VAWKTAIKELLWIWQLKSNDVNDLNMGVHIWDQWKQEDGTIGHAYGFQLGKKNRSLNGEKV
DQVDYLLHQLKNNPSSRRHITMLWNPDELDAMALTPCVYETQWYVKHGKHLHLEVRARSNDMA
LGNPFNVFQYNVLQRMIAQVTGYELGEYIFNIGDCHVYTRHIDNLKIQMEREQFEAPELWIN
PEVKDFYDFTIDDFKLINYPKHGDKLLFEVAV

[SEQ ID NO: 18]

Các trình tự SEQ ID NO: 1 và 18 là các trình tự làm ví dụ từ vi khuẩn *B. subtilis*, và do đó biến thể của các trình tự này bao gồm các gen *thyA* liên quan từ tất cả các vi khuẩn *Bacillus Spp.* Điều quan trọng cần lưu ý là giải pháp theo sáng chế có thể áp dụng cho gen *thyA* bất kỳ của vi khuẩn *Bacillus Spp.* và các trình tự SEQ ID NO: 1 và 18 được dự định để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Theo một phương án, khung đọc mở của gen *thyB* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 2 như sau:

ATGAAACAGTATAAGGATTTCTGCAGACATGTTTTAGAGCATGGTGAGAAAAAGGGAGACCG
GACTGGGACCGGAACAATCAGCACTTTCCGATATCAAATGAGATTTAATTTACGGGAAGGCT
TTCCGATGCTCACCCTAAAAACTCCACTTTAAATCAATTGCGCATGAAGTCTGTGGTTC
TTAAAAGGAGATACGAATGTACGCTATCTGCAGGAAAACGGAGTGCGAATCTGGAATGAGTG
GGCTGATGAAAACGGTGAACCTGGACCTGTATATGGCTCCCAATGGCGTTCTTGCGGGGAG
CTGATGGAGAAACCATTGATCAAATTTCCCGTCTTATTGAAGATATTTAAACAAATCCGAAC
TCCAGACGCTTAATCGTCAGCGCCTGGAATGTTGGTGAAATTGATAAAATGGCGTTGCCGCC
GTGCCATTGCCTGTTCCAATTCTATGTGTCTGACGGCAAGCTGTCTGTGCTGATCATCAGC
GCTCTGCCGATGTTTTCTTAGGTGTGCCGTTTAAATATTGCATCTTATGCCCTCCTAACCATG
ATCATTGCTCATGTGACTGGGCTTGAACCGGGCGAGTTCATCCATACGTTTGGTGATGTTCA
TATTTACCAAAATCATATTGAACAAGTCAATTTGCAGCTGGAAAGAGATGTTAGACCGCTTC
CGCAGCTTCGTTTCGCCAGAAAGGTTGATTCTATTTTAACTTTGCATTTGAGGACTTTATC
ATCGAGGATTATGATCCGCATCTCATATAAAAGGGGCGGTGACCGTATGA

[SEQ ID NO: 2]

Do đó, tốt hơn nếu quy trình theo sáng chế bao gồm bước đưa gen khác loài vào trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 2, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* Quy trình này có thể bao gồm bước đưa gen khác loài vào *Bacillus Spp.* mà không đưa vào trình tự SEQ ID NO: 2 hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, theo cách sao cho sự biểu hiện từ trình tự SEQ ID NO: 2 bị đứt quãng hoặc giảm đi.

Theo một phương án, khung đọc mở của gen *thyB* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic, trình tự này mã hóa trình tự axit amin được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 19 như sau:

```

MKQYKDFCRHVLEHGEKKGDRTGTGTISTFGYQMRFNLRGFPMLTTKKLHFKSIAHELLWF
LKGD TNVRYLQENG VRIWNEWADENGELGPVYGSQWR SWRGADGETIDQISR LIEDIKTNP N
SRRLIVSAWNVGEIDKMALPPCHCLFQFYVSDGKLSCQLYQRSADVFLGVFPNIASYALLTM
IIAHVTGLEPGEFIHTFGDVHIYQNHIEQVNLQLERDVRPLPQLRFARKVDSIFNF AFEDFI
IEDYDPHPHIKGA VSV

```

[SEQ ID NO: 19]

Các trình tự SEQ ID NO: 2 và 19 là các trình tự làm ví dụ từ vi khuẩn *B. subtilis*, và do đó biến thể của các trình tự này bao gồm các gen *thyB* liên quan từ tất cả các vi khuẩn *Bacillus Spp.* Điều quan trọng cần lưu ý là giải pháp theo sáng chế có thể áp dụng cho gen *thyB* bất kỳ của vi khuẩn *Bacillus Spp.* và các trình tự SEQ ID NO: 2 và 19 được dự định để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Theo một phương án, bước (i) có thể được thực hiện bằng cách biến nạp vi khuẩn *Bacillus Spp.* với plasmit, plasmit này có thể được tuyển tính hóa, có thể chứa ít nhất một phần nhánh trái của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần nhánh phải của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*. Bước (i) có thể được thực hiện với vector bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Sự biến nạp có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp gây xung điện.

Bước (ii) và/hoặc bước (iv) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bình thích hợp bất kỳ, như đĩa Petri hoặc đĩa nuôi cấy tế bào, chứa môi trường sinh trưởng bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Theo một phương án, trong bước (ii) và/hoặc bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa chất chiết nấm men (YE) với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml. Theo phương án được ưu tiên, môi trường này có YE với nồng độ nhỏ hơn 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,0001 mg/ml, hoặc 0 mg/ml. Theo một

phương án, môi trường trong đó vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng không chứa YE.

Theo một phương án, trong bước (ii) và/hoặc bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa thymin hoặc thymidin. Theo phương án được ưu tiên, thymin hoặc thymidin có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 µg/ml đến 1000 µg/ml, từ 1 µg/ml đến 500 µg/ml, nhỏ hơn hoặc bằng 300 µg/ml, từ 10 µg/ml đến 200 µg/ml, từ 20 µg/ml đến 100 µg/ml, từ 30 µg/ml đến 80 µg/ml, từ 35 µg/ml đến 65 µg/ml, từ 45 µg/ml đến 55 µg/ml, hoặc tốt hơn là khoảng 50 µg/ml.

Theo một phương án, trong bước (ii) và/hoặc bước (iv), môi trường sinh trưởng là môi trường sinh trưởng thích hợp bất kỳ, chẳng hạn môi trường tối thiểu của Spizizen (Spizizen's Minimal Medium: SMM).

Theo một phương án, lượng trimethoprim có mặt trong bước (iv) cao hơn lượng trimethoprim có mặt trong bước (ii).

Theo một phương án, trong bước (ii), môi trường này có thể chứa trimethoprim với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 µg/ml đến 20 µg/ml, từ 0,01 µg/ml đến 15 µg/ml, từ 0,1 µg/ml đến 10 µg/ml, từ 1 µg/ml đến 5 µg/ml, từ 2 µg/ml đến 4 µg/ml, hoặc tốt hơn là khoảng 3 µg/ml. Theo phương án được ưu tiên, nồng độ trimethoprim nhỏ hơn nồng độ trimethoprim trong bước (iv).

Theo một phương án, bước (ii) có thể bao gồm hoặc gồm thời gian sinh trưởng từ 12 giờ đến 168 giờ, từ 24 giờ đến 144 giờ, từ 48 giờ đến 120 giờ, từ 60 giờ đến 108 giờ, hoặc từ 72 giờ đến 96 giờ.

Theo một phương án, các tế bào có sự chèn gen ở locus *thyA* có thể được xác định bằng khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C khi có mặt hoặc không có mặt thymin hoặc thymidin nhưng không có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 46°C trừ khi được bổ sung thymin hoặc thymidin. Phương pháp xác định khác hoặc thay thế là khuếch đại bằng phản ứng PCR đối với sự có mặt của gen thể khảm từ các thể biến nạp bằng cách sử dụng các đoạn mồi gắn với trình tự *thyA*. Theo một số phương án, các khuẩn lạc có thể được sàng lọc và tách thành hai loại: i) các khuẩn lạc mờ có kích thước lớn (2-3 mm sau thời gian sinh trưởng từ 72 giờ đến 96 giờ), ii) các khuẩn lạc trong mờ, có kích thước nhỏ hơn (1 mm sau thời gian sinh trưởng từ 72 giờ đến 96 giờ). Theo một số phương án, các khuẩn lạc loại (i) có thể được chọn lọc.

Theo một phương án, bước (iii) có thể được thực hiện bằng cách biến nạp

Bacillus Spp. với plasmid, plasmid này có thể được tuyến tính hóa, có thể chứa ít nhất một phần nhánh trái của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần nhánh phải của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*. Bước (iii) có thể được thực hiện với vectơ bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Sự biến nạp có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp gây xung điện.

Theo một phương án, vi khuẩn *Bacillus Spp.* có thể được tạo ra hoặc được tạo khả biến điện bằng cách sử dụng phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus Spp.* trong môi trường chứa chất chiết xuất men (YE) với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml. Theo phương án được ưu tiên, môi trường này có YE với nồng độ nhỏ hơn 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,0001 mg/ml, hoặc 0 mg/ml. Theo một phương án, môi trường trong đó vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng không chứa YE. Theo phương án được ưu tiên nhất, vi khuẩn *Bacillus Spp.* là chủng có sự chèn gen *thyA* như được tạo ra bởi các bước (i) và (ii).

Theo một phương án, YE có mặt với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, nồng độ bất kỳ được bộc lộ ở đây, hoặc tốt hơn là không có mặt trong môi trường được sử dụng ở giai đoạn bất kỳ của quy trình này.

Theo một phương án, bước (iv) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường có thể chứa trimethoprim với nồng độ nhỏ hơn hoặc bằng 80 µg/ml, nhỏ hơn hoặc bằng 40 µg/ml, nhỏ hơn hoặc bằng 30 µg/ml, từ 0,01 µg/ml đến 30 µg/ml, từ 0,1 µg/ml đến 20 µg/ml, từ 1 µg/ml đến 15 µg/ml, từ 2 µg/ml đến 10 µg/ml, từ 5 µg/ml đến 7 µg/ml, hoặc tốt hơn là khoảng 6 µg/ml. Theo phương án được ưu tiên, nồng độ trimethoprim cao hơn nồng độ trimethoprim trong bước (ii).

Các axit casamino (CAA) được tạo ra bằng cách thủy phân casein bằng axit. Thành phần điển hình là như sau, mặc dù các giá trị bằng số này là gần đúng và các thay đổi về thành phần là chấp nhận được để sử dụng với sáng chế: Ala 2,8%, Arg 3,6%, Asp 6,3%, Xystin 0,3%, Glu 21,1%, Gly 2,2%, His 2,7%, Ile 5,6%, Leu 8,4%, Lys 7,5%, Met 2,7%, Phe 4,6%, Pro 9,9%, Ser 5,6%, Thr 4,2%, Trp 1,1%, Tyr 6,1%, Val 5,0%. Axit CAA không thể chứa tryptophan.

Theo một phương án, trong bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* có thể được sinh trưởng trong môi trường chứa axit casamino (CAA). Môi trường này có thể chứa CAA với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,0001% đến 5%, từ 0,001% đến 2%, từ 0,01% đến

1%, từ 0,05% đến 0,5%, từ 0,1% đến 0,3%, hoặc tốt hơn là khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án, trong bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* có thể được sinh trưởng trong môi trường có bổ sung ít nhất một axit amin. Theo các phương án khác, môi trường này có thể chứa một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên bất kỳ, và tùy ý tất cả các axit amin có trong tự nhiên hoặc tất cả các axit amin có trong tự nhiên ngoại trừ tryptophan. Môi trường này có thể chứa serin, glyxin, xystein, methionin, tổ hợp bất kỳ của chúng, hoặc cả bốn axit amin. Môi trường này có thể chứa axit amin riêng biệt bất kỳ với nồng độ tương đương với môi trường chứa CAA với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,0001% đến 5%, từ 0,001% đến 2%, từ 0,01% đến 1%, từ 0,05% đến 0,5%, từ 0,1% đến 0,3%, hoặc tốt hơn là bằng khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích). Do đó, theo phương án được ưu tiên, môi trường này có thể chứa serin, glyxin, xystein, và/hoặc methionin với nồng độ tương đương với môi trường chứa CAA với nồng độ khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích). Theo phương án được ưu tiên khác, môi trường này có thể chứa cùng các axit amin như môi trường chứa CAA với nồng độ khoảng 0,2% (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án, bước (iv) có thể bao gồm hoặc gồm thời gian sinh trưởng từ 6 giờ đến 144 giờ, từ 12 giờ đến 120 giờ, từ 24 giờ đến 96 giờ, từ 36 giờ đến 72 giờ, hoặc khoảng 48 giờ.

Theo một phương án, các tế bào có hai sự chèn gen có thể được xác định theo khả năng không sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C hoặc 46°C trừ khi được bổ sung thymin hoặc thymidin. Phương pháp xác định khác hoặc thay thế là khuếch đại bằng phản ứng PCR đối với sự có mặt của các gen thể khảm từ các thể biến nạp bằng cách sử dụng các đoạn mồi gắn với trình tự của *thyA* và *thyB*.

Gen khác loài bất kỳ có thể được sử dụng để chèn gen vào hoặc mỗi gen thymidylat synthaza. Theo các phương án cụ thể, các gen khác loài được dung hợp với gen mã hóa protein vỏ của bào tử, chẳng hạn CotA, CotB, CotC, CotD, CotE, CotF, hoặc CotG của *B. subtilis*. Protein của bào tử được sử dụng có thể được chọn tùy thuộc vào vi khuẩn cụ thể được cải biến và gen thích hợp được sử dụng. Các protein vỏ của bào tử thích hợp để sử dụng với *Clostridium Spp.* bao gồm CotA, CotB, CotC, CotD, CotE, CotF, CdeC, BclA1, BclA2, hoặc BclA3 (tài liệu 53, 54, 55).

Theo một số phương án, gen khác loài có thể được chèn vào gen *thyA* và chính

gen khác loài này có thể được chèn vào gen *thyB*. Theo các phương án khác, gen khác loài khác có thể được chèn vào gen *thyA* mà từ đó gen này được chèn vào gen *thyB*.

Theo một số phương án, bào tử tạo thành được tạo ra bằng quy trình này mang protein khác loài để sử dụng trong việc tiêm chủng. Bào tử tạo thành có thể mang protein khác loài được biểu hiện dưới dạng enzym có hoạt tính. Bào tử tạo thành có thể mang protein khác loài cho phép sự liên hợp của các protein với bề mặt bào tử.

Sau khi tạo ra và chọn lọc chủng chứa các gen khác loài không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, quy trình có thể bao gồm bước nuôi cấy chủng này. Quá trình nuôi cấy có thể là trên môi trường bất kỳ chứa thymin hoặc thymidin, YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml hoặc không có mặt, và ít nhất một axit amin hoặc hỗn hợp bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Các nồng độ có thể là nồng độ bất kỳ như được bộc lộ ở đây.

Do đó, theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào vi khuẩn *B. subtilis* và làm cho *B. subtilis* không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, tốt hơn là trong đó quy trình này không liên quan đến việc đưa gen kháng kháng sinh vào, bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *B. subtilis*;
- (ii) để vi khuẩn *B. subtilis* sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim và thymin hoặc thymidin, và YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, tùy ý trong đó YE không có mặt;
- (iii) đưa gen khác loài vào gen còn lại trong số gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *B. subtilis* nêu trên;
- (iv) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim và thymin hoặc thymidin, và YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, tùy ý trong đó không có mặt YE.

Theo phương án được ưu tiên, YE có mặt với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, tốt hơn là 0 mg/ml, trong tất cả các bước sau bước (i). Theo phương án được ưu tiên, thymin hoặc thymidin có mặt đối với tất cả các môi trường nuôi cấy sau bước (i). Theo phương án được ưu tiên, gen khác loài được đưa vào gen *thyA* trong bước (i) và gen khác loài được đưa vào gen *thyB* trong bước (iii).

Do đó, theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào vi khuẩn *B. subtilis* và làm cho *B. subtilis* không có khả năng tăng sinh

khi không có mặt thymin hoặc thymidin, tốt hơn là trong đó quy trình này không liên quan đến việc đưa gen kháng kháng sinh vào, bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *B. subtilis*;
- (ii) để vi khuẩn *B. subtilis* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim, và với sự có mặt của hoặc thymin hoặc thymidin;
- (iii) đưa gen khác loài vào gen còn lại trong số gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *B. subtilis* nêu trên;
- (iv) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim và thymin hoặc thymidin, và ít nhất một axit amin, tùy ý trong đó CAA có mặt.

Theo phương án được ưu tiên, thymin hoặc thymidin có mặt đối với tất cả các môi trường nuôi cấy sau bước (i). Theo phương án được ưu tiên, gen khác loài được đưa vào gen *thyA* trong bước (i) và gen khác loài được đưa vào gen *thyB* trong bước (iii).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất bào tử vi khuẩn thu được hoặc có thể thu được bằng quy trình theo khía cạnh thứ nhất.

Tốt hơn, nếu bào tử vi khuẩn là *Bacillus spp.* và chứa các gen *thyA* và *thyB* không có chức năng, tốt hơn là do việc đưa các gen khác loài vào đó.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất bào tử vi khuẩn chứa ít nhất một gen khác loài và không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, trong đó bào tử vi khuẩn được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen thymidylat synthaza trong vi khuẩn tạo bào tử;
 - (ii) để vi khuẩn tạo bào tử nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim;
- và
- (iii) tạo ra bào tử vi khuẩn từ vi khuẩn tạo bào tử nêu trên.

Theo phương án được ưu tiên, bào tử vi khuẩn không chứa gen kháng kháng sinh.

Theo phương án được ưu tiên, bào tử vi khuẩn có thể là *Bacillus Spp.* Vi khuẩn *Bacillus spp.* có thể là *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaeaceans*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. licheniformis* hoặc *B. megaterium*. Tốt nhất là vi khuẩn *Bacillus spp.* là *B. subtilis*. Theo phương án được ưu tiên khác, bào tử vi khuẩn có thể là *Clostridium Spp.* Vi khuẩn *Clostridium spp.* có thể là *C. difficile*, *C. perfringens*, *C.*

tetani, *C. botulinum*, *C. acetobutylicum*, *C. cellulolyticum*, *C. novyi* hoặc *C. thermocellum*. Tốt nhất nếu vi khuẩn *Clostridium spp.* là *Clostridium difficile*.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất bào tử vi khuẩn chứa ít nhất một gen khác loài và không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, trong đó bào tử vi khuẩn này được tạo ra bằng quy trình bất kỳ như được bộc lộ ở đây, hoặc bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy hoặc các điều kiện bất kỳ như được bộc lộ.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất bào tử *Bacillus Spp.* chứa ít nhất một gen khác loài và không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, trong đó bào tử *Bacillus Spp.* được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước:

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*;
- (ii) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim và với sự có mặt của thymin hoặc thymidin, tùy ý với sự có mặt của YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, tốt hơn là trong đó YE không có mặt;
- (iii) đưa gen khác loài vào gen còn lại trong số gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên;
- (iv) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim, tùy ý với nồng độ cao hơn so với nồng độ trong bước (ii), và với sự có mặt của thymin hoặc thymidin, tùy ý với sự có mặt của YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, tốt hơn là trong đó YE không có mặt, tùy ý với sự có mặt của ít nhất một axit amin, tùy ý trong đó CAA có mặt; và
- (v) tạo ra các bào tử vi khuẩn từ vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên.

Theo phương án được ưu tiên, gen khác loài được đưa vào gen *thyA* trong bước (i) và gen khác loài được đưa vào gen *thyB* trong bước (iii).

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất vector để sử dụng trong việc đưa gen khác loài vào gen *thyA* trong vi khuẩn tạo bào tử.

Theo một phương án, vector có thể chứa ít nhất một phần của phần đầu 5' của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần của phần đầu 3' của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*.

Theo một phương án, vector có thể chứa nhánh trái và nhánh phải của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*. Các nhánh này có thể nằm ở vùng rìa của vị trí đa tách

dòng. Chẳng hạn, vector có thể bao gồm nhánh trái (ví dụ, 900 bp) và nhánh phải (ví dụ, 950 bp) của gen *thyA* của vi khuẩn *B. subtilis*.

Chiều dài của nhánh vùng rìa có thể được điều chỉnh theo chiều dài của trình tự khác loại cần được chèn vào. Các nhánh vùng rìa dài hơn (ví dụ, ~1500bp) có thể cần thiết cho sự chèn gen lớn.

Các vector có thể chứa gen khác loài được chèn vào ở vị trí đã tách dòng. Gen khác loài có thể là gen thể khảm chứa protein vỏ của bào tử được dung hợp với gen khác loài. Chẳng hạn, protein vỏ của bào tử có thể là CotB hoặc CotC của vi khuẩn *B. subtilis*. Các vector có thể chứa: nhánh trái của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, protein vỏ của bào tử, vị trí đã tách dòng cho phép chèn gen khác loài sao cho nó được dung hợp với protein vỏ của bào tử, và nhánh phải của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*

Theo một phương án chỉ nhằm mục đích minh họa, nhánh trái của gen *thyA* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 3 như sau:

CAGATCATATAAGGAATGAACCGCTGCCAAATATCATAAAAAAGTTGTTAATGATCAAATGA
ATGAAATTAGAGAGAATTTATTTTAAAGAAAGCCCAATTGCACATGGACAAATGACAATTGA
TATTGAGGTAAAATACAATGCATTAAATCAGAAAAAGCTATTGGAGGATTTAATGTGTTTAG
ACAATTTCCAATTTGGTATACACAAACACCTGACTATTTGAATTTTTATGTACCGCAATATC
AAACCATTTCTGTATAATCCTCAACAATGTTATCAACGGTGTATGTACCAAACCTGGCGGTAAC
TATGAGCTATGTGACAGACTATGTTATGGAGAAATACAGGTGTAAAAGAGGGGGATTAACCTC
CTCTTTAAACACACAGTGAGTGAATAAGATCCTCACTTTATCTGCAAGTGCTTAGTATTTG
CGATAATATTGCATTTCGTAATAAATTATGCTTAGCAACTGAAAATGAAAGAAGGATATGAAT
AGTCATGACGCAATTCGATAAACAATACAATTCAATTATAAAGGATATTATCAATAATGGAA
TCTCAGACGAAGAGTTTGATGTAAGAACCAAGTGGGACTCAGATGGAACACCGGCACATACT
CTAAGTGTAATCAGTAAGCAAATGAGATTGACAACCTCAGAGGTTCCGATTTTAAACGACAAA
AAAGGTTGCCTGGAAAACAGCCATTAAAGAGTTGCTCTGGATTTGGCAGCTGAAATCTAATG
ATGTTAATGATTTAAACATGATGGGCGTCCATATTTGGGATCAGTGGAACAAGAAGACGGA
ACCATCGGACATGCATATGGATTTAGCTGGGGAAGAAAAACAGAAGTCTAAATGGAGAAAA
AGTGGATCAGGTAGACTATCTTCTTCATCAAT

[SEQ ID NO: 3]

Trình tự in đậm thể hiện trình tự mã hóa *thyA*, trình tự không in đậm thể hiện vùng ngược dòng. Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 3, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án chỉ nhằm mục đích minh họa, nhánh phải của gen *thyA* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 4 như sau:

TGAAGAACAATCCATCTTCACGCAGACACATTACAATGCTGTGGAATCCTGATGAATTAGAC

GCAATGGCCTTAACGCCATGTGTATACGAGACACAATGGTACGTTAAACATGGGAAACTCCA
 CCTTGAGGTAAGAGCACGGAGCAATGATATGGCATTGGGAAATCCATTCAATGTATTCCAGT
 ATAATGTGTTGCAGCGCATGATTGCTCAAGTGAAGTGGTATGAGCTTGGTGAATATATCTTT
 AACATTGGGGATTGCCATGTGTACACACGTCATATAGACAATTTGAAAATTCAAATGGAAAG
 AGAACAGTTTGAAGCACCTGAACTATGGATCAATCCTGAAGTGAAAGATTTTATGACTTTA
 CCATTGATGATTTCAAGTTAATCAACTATAAACATGGGGACAAGCTTTTATTTGAGGTAGCG
 GTTTAATGCTGCCTTTTTTATTGTGCAGTGAATAGATAGCAGGTATCCTAATTTCAATTAAGCA
 ATCTGGAAGATGAATAAAAATTGAAGGACAAACACGTATAATACATAAAAAAGATTAAGCA
 ACAGTTAATCTTTTTTATTTCAGAAGAAAATATCCTAACTTTGAAACTAAATACAAAGTAAAA
 GCAATCATTACAGTTCTAGATATTACAATTCATGAATAGCTAGATCATATCCAGCAGGTAT
 CAACGCATTTGTATTACACATAAAATATATAGATATTAGAAGTGCTACAATACTAAAATCA
 TTCCAAAAAGACTTGTTTTTTCATATTTTCATACCAATTTCCACCCTTATTAAAGTTAGGTTT
 AAACAAAAGAGCTGAAGAAACGAACTATGACCAGTATGCTCCAAGGAAAACCGCCAGACAAT
 GCTGGCGGCTTTTTTGCTGCTTCGTTTATTTATTAACAGAGATCGTAACGTTATTTCTGCAA
 CTGAAACCTTTGCGAAATCC

[SEQ ID NO: 4]

Trình tự in đậm thể hiện trình tự mã hóa *thyA*, trình tự không in đậm thể hiện vùng xuôi dòng. Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 4 hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Vị trí đa tách dòng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong vector theo sáng chế. Chẳng hạn, theo một phương án, vị trí đa tách dòng có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 5 như sau:

AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGGGTACCGAGCTCGAATTC

[SEQ ID NO: 5]

Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 5 hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án chỉ nhằm mục đích minh họa, vector *thyA* có thể chứa trình tự axit nucleic, trình tự này có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 6 như sau:

CAGATCATATAAGGAATGAACCGCTGCCAAATATCATAAAAAAGTTGTTAATGATCAAATGA
 ATGAAATTAGAGAGAATTTATTTTAAAGAAAGCCCAATTGCACATGGACAAATGACAATTGA
 TATTGAGGTAAAATACAATGCATTAAATCAGAAAAAGCTATTGGAGGATTTAATGTGTTTAG
 ACAATTTCCAATTTGGTATACACAAACACCTGACTATTTGAATTTTTATGTACCGCAATATC
 AAACCATTTTCGTATAATCCTCAACAATGTTATCAACGGTGTATGTACCAAACTGGCGGTAAC
 TATGAGCTATGTGACAGACTATGTTATGGAGAAATACAGGTGTAAAAGAGGGGGATTAAGTC
 CTCTTTAAACACACAGTGAGTGGAATAAGATCCTCACTTTATCTGCAAGTGCTTAGTATTTG
 CGATAATATTGCATTTCGATAAACAATAAATTATGCTTAGCAACTGAAAATGAAAGAAGGATATGAAT
 AGTCATGACGCAATTTCGATAAACAATAAATTCAATTATAAAGGATATTATCAATAATGGAA
 TCTCAGACGAAGAGTTTGATGTAAGAACCAAGTGGGACTCAGATGGAACACCGGCACATACT
 CTAAGTGTAATCAGTAAGCAAATGAGATTGCAAACTCAGAGGTTCCGATTTTAACGACAAA
 AAAGGTTGCCTGGAAAACAGCCATTAAAGAGTTGCTCTGGATTTGGCAGCTGAAATCTAATG
 ATGTTAATGATTTAAACATGATGGGCGTCCATATTTGGGATCAGTGGAACAAGAAGACGGA
 ACCATCGGACATGCATATGGATTTGAGCTGGGGAAGAAAAACAGAA**GTCTAAATGGAGAAA**
AGTGGATCAGGTAGACTATCTTCTTCATCAATAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGA
 GGATCCCCCGGGGTACCGAGCTCGAATTCTGAAGAACAATCCATCTTCACGCAGACACATT

ACAATGCTGTGGAATCCTGATGAATTAGACGCAATGGCCTTAACGCCATGTGTATACGAGAC
 ACAATGGTACGTTAAACATGGGAACTCCACCTTGAGGTAAGAGCACGGAGCAATGATATGG
 CATTGGGAAATCCATTCAATGTATTCAGTATAATGTGTTGCAGCGCATGATTGCTCAAGTG
 ACTGGTTATGAGCTTGGTGAATATATCTTTAACATTGGGGATTGCCATGTGTACACACGTCA
 TATAGACAATTTGAAAATTCAAATGGAAAGAGAACAGTTTGAAGCACCTGAACTATGGATCA
 ATCCTGAAGTGAAAGATTTTTATGACTTTACCATTGATGATTTCAAGTTAATCAACTATAAA
 CATGGGGACAAGCTTTTATTTGAGGTAGCGGTTTAATGCTGCCTTTTTATTGTGCAGTGAAT
 AGATAGCAGGTATCCTAATTTTATTAAGCAATCTGGAAGATGAATAAAAATTGAAGGACAAA
 CACGTATAATACATAAAAAAGATTAAGTCTACAGTTAATCTTTTTTATTTCAGAAGAAAATAT
 CCTAACTTTGAACTAAATACAAAGTAAAAGCAATCATTACAGTTCTAGATATTACAATTCC
 ATGAATAGCTAGATCATATCCAGCAGGTATCAACGCATTTGTATTACACATAAAATATATAG
 ATATTAGAAGTGCTACAATAACTAAAATCATTTCCAAAAGAGCTGTTTTTTTCATATTTTCATA
 CCAATTTCCACCCTTATTAAAGTTAGGTTTAAACAAAAGAGCTGAAGAAACGAACTATGACC
 AGTATGCTCCAAGGAAAACCGCCAGACAATGCTGGCGGCTTTTTGCTGCTTCGTTTATTTAT
 TAACAGAGATCGTAACGTTATTTCTGCAACTGAAACCTTTGCGAAATCC

[SEQ ID NO: 6]

Do đó, tốt hơn là vectơ chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 6, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Các vị trí gắn đoạn mỗi làm ví dụ có thể được sử dụng để xác định sự chèn gen khác loài, được thể hiện ở vị trí in đậm và gạch chân.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất vectơ để sử dụng trong việc đưa gen khác loài vào gen *thyB* trong vi khuẩn tạo bào tử.

Theo một phương án, vectơ có thể chứa ít nhất một phần của phần đầu 5' của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần của phần đầu 3' của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*.

Theo một phương án, vectơ có thể chứa nhánh trái và nhánh phải của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*. Các nhánh này có thể nằm ở vùng rìa của vị trí đa tách dòng. Chẳng hạn, vectơ có thể bao gồm nhánh trái (900bp) và nhánh phải (1,1 kb) của gen *thyB* của vi khuẩn *B. subtilis*.

Chiều dài của nhánh vùng rìa có thể được điều chỉnh theo chiều dài của trình tự khác loài cần được chèn vào. Các nhánh vùng rìa dài hơn (ví dụ. ~1500bp) có thể cần thiết cho sự chèn gen lớn.

Các vectơ có thể bao gồm gen khác loài được chèn ở vị trí đa tách dòng. Gen khác loài này có thể là gen thể khảm chứa protein vỏ của bào tử được dung hợp với gen khác loài. Chẳng hạn, protein vỏ của bào tử có thể là CotB hoặc CotC của vi khuẩn *B. subtilis*. Các vectơ có thể chứa: nhánh trái của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, protein vỏ của bào tử, vị trí đa tách dòng cho phép chèn gen khác loài sao cho nó được dung hợp với protein vỏ của bào tử, và nhánh phải của gen *thyB* của

vi khuẩn *Bacillus Spp.*.

Theo một phương án chỉ nhằm mục đích minh họa, nhánh trái của *thyB* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID

NO: 7 như sau:

CCAAATCTGCCGCTCAGTGTTTGCATGGAGAATGTAGAAAAAGTCCTGAACAAACGTGAAAT
TATTCATGCTGTTTTGACAGGCCTTGCACTCGATCAGCTTGCAAGAACAGAACTTCTCCCCG
AACCGCTGCAGCACCTTGTTGAAACGGATGAACCGCTTTACGGCATAGATGAAATTATCCCCG
CTTTCAATCGTTAATGTGTACGGGTCGATCGGTTTGACCAATTTTCGGTTATTTGGATAAAGA
GAAGATTGGAATTATTAAGGAACCTTGATGAAAGTCCAGACGGTATTCACACCTTTTTGGATG
ATATTGTGGCAGCTCTTGCTGCAGCAGCGGCGAGCAGAATTGCACATACGCATCAGGATCTG
CAAGATGAAGAAAAAGAACAGGATGAAAAGCCTGTCGTCAGCTGACTATAAAAAAATCATTT
CTGGGTTCAGAAATGATTTTTTATTGTGTACACTACTAGAAGACTACTTTTAAAGGATGAA
AAAAATGAACAGTATAAGGATTTCTGCAGACATGTTTTAGAGCATGGTGAGAAAAAGGGAG
ACCGGACTGGGACCGGAACAATCAGCACTTTCCGATATCAAATGAGATTTAATTTACGGGAA
GGCTTTCCGATGCTCACCCTAAAAAATCCACTTTAAATCAATTGCGCATGAACTGCTGTG
GTTCTTAAAGGAGATACGAATGTACGCTATCTGCAGGAAAACGGAGTGCGAATCTGGAATG
AGTGGGCTGATGAAAACGGTGAACCTTGACCTGTATATGGCTCCCAATGGCGTTCTTGCGCG
GGAGCTGATGGAGAAACCATGATCAAATTTCCCGTCTTATTGAAGATATTAAACAAATCC
GAACTCCAGACGCTTAATCGTCAGCGCCTGGA

[SEQ ID NO: 7]

Trình tự in đậm thể hiện trình tự mã hóa *thyB*, trình tự không in đậm thể hiện vùng ngược dòng. Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 7, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án chỉ nhằm mục đích minh họa, nhánh phải của *thyB* có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID

NO: 8 như sau:

ATGTTGGTGAAATTGATAAAATGGCGTTGCCGCGTGCCATTGCCTGTTCCAATTCTATGTG
TCTGACGGCAAGCTGTCTGTGCTGATCAGCGCTCTGCCGATGTTTTCTTAGGTGTGCC
GTTTAATATTGCATCTTATGCCCTCCTAACCATGATCATTGCTCATGTGACTGGGCTTGAAC
CGGGCGAGTTTCATCCATACGTTTGGTGATGTTTCATATTTACCAAAATCATATTGAACAAGTC
AATTTGCAGCTGGAAAGAGATGTTAGACCGCTTCCGCAGCTTCGTTTCGCCAGAAAGGTTGA
TTCTATTTTTTAACCTTTGCATTTGAGGACTTTATCATCGAGGATTATGATCCGCATCCTCATA
TAAAGGGGCGGTGAGCGTATGATTTTCATTCATTTTTGCGATGGATGCCAACAGGCTTATCG
GCAAAGACAATGATTTGCCGTGGCATTGCCCCAATGATCTTGCACTTTAAGAAAATAACA
TCGGGCCATTCAATCATTATGGGCCGGAACATTTGAATCGATCGGACGTCGGCTTCCAAA
TCGGAAAAATATTGTGTTACCTCAGCGCCGATTGAGAATTTAGGGATGCACGGTTGTCA
GTTTCATTAAAGGATGTACTGGACATTTGTTGAGGCCCTGAAGAATGCTTTGTGATCGGAGGG
GCTCAGCTCTATACGGACCTGTTCCCTTATGCGGACAGACTGTATATGACGAAAATTCATCA
CGAGTTTGAGGGTGACCGTCACTTTCTGAATTTGATGAATCCAATTGGAAGCTGGTTTCTT
CTGAGCAGGGGACCAAAGACGAAAAAACCCGTATGATTACGAATTTCTAATGTATGAAAAA
AAGAAATCTTCTAAAGCGGGAGGATTTTAATTGGTTTCGCTACAGCCTTCTAGTGGTTTATAT
TGTGTATATGCTGTTAAAAAATATGAAACAATTATTTAATCAAACAATGCTCGATCCCCGTC
TGTCATACAAAAACAGATGGCTCTTGTGTACGAACAGCCAAAGGCGTTTTTAGAAGGCTGT
ATCGGCATCTCCGGTTCAGTTGTGACGATCCATCAGCCAGA

[SEQ ID NO: 8]

Trình tự in đậm thể hiện trình tự mã hóa *thyB*, trình tự không in đậm thể hiện vùng ngược dòng. Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 8, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Các phương án minh họa trên đây của cả trình tự *thyA* và *thyB* được dự định làm ví dụ. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, các trình tự này có thể thay đổi giữa các loài, cụ thể là có sự thay đổi lớn giữa trình tự ngược dòng và trình tự xuôi dòng.

Vị trí đa tách dòng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong vector của sáng chế. Chẳng hạn, theo một phương án, vị trí đa tách dòng có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 9 như sau:

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGGGTACCGAGCTCGAATTCTG
[SEQ ID NO: 9]

Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 9, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án, vector *thyB* có thể chứa trình tự axit nucleic, trình tự này có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic được đưa ra ở đây dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 10 như sau:

CCAAATCTGCCGCTCAGTGTTTGCATGGAGAATGTAGAAAAAGTCCTGAACAAACGTGAAAT
TATTCATGCTGTTTTGACAGGCCTTGCACTCGATCAGCTTGCAGAACAGAACTTCTCCCCG
AACCGCTGCAGCACCTTGTTGAAACGGATGAACCGCTTTACGGCATAGATGAAATTATCCCCG
CTTTCAATCGTTAATGTGTACGGGTCGATCGGTTTGACCAATTTTCGGTTATTTGGATAAAGA
GAAGATTGGAATTATTAAGGAACCTTGATGAAAGTCCAGACGGTATTCACACCTTTTTGGATG
ATATTGTGGCAGCTCTTGCTGCAGCAGCGGCGAGCAGAATTGCACATACGCATCAGGATCTG
CAAGATGAAGAAAAAGAACAGGATGAAAAGCCTGTCGTGCTGACTATAAAAAAATCATTT
CTGGGTTTCAGAAATGATTTTTTTATTGTGTACTACTAGAAAGTACTTTTTAAAGGATGAA
AAAAATGAAACAGTATAAGGATTTCTGCAGACATGTTTTAGAGCATGGTGAGAAAAAGGGAG
ACCGGACTGGGACCGGAACAATCAGCACTTTTCGGATATCAAATGAGATTTAATTTACGGGAA
GGCTTTCCGATGCTCACCCTAAAAAATCCACTTTAAATCAATTGCGCATGAACTGCTGTG
GTTCTTAAAAGGAGATACGAATGTACGCTATCTGCAGGAAAACGGAGTGCGAATCTGGAATG
AGTGGGCTGATGAAAACGGTGAACCTGGACCTGTATATGGCTCCCAATGGCGTTCTTGCGG
GGAGCTGATGGAGAAACCATTTGATCAAATTTCCCGTCTTATTGAAGATATTAAACAAATCC
GAACTCCCAGACGCTTAATCGTCAGCGCCTGGAAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAGA
GGATCCCCCGGGGTACCGAGCTCGAATTCTGATGTTGGTGAAATTGATAAAATGGCGTTGC
CGCCGTGCCATTGCCTGTTCC**CAATTCTATGTGCTGAC**GGCAAGCTGTCCTGTCAGCTGTAT
CAGCGCTCTGCCGATGTTTTCTTAGGTGTGCCGTTTTAAATATTGCATCTTATGCCCTCCTAAC
CATGATCATTGCTCATGTGACTGGGCTTGAACCGGGCGAGTTCATCCATACGTTTGGTGATG
TTCATATTTACCAAATCATATTGAACAAGTCAATTTGCAGCTGGAAAGAGATGTTAGACCG
CTTCCGCAGCTTCGTTTCGCCAGAAAGGTTGATTCTATTTTTAACTTTGCATTTGAGGACTT
TATCATCGAGGATTATGATCCGCATCCTCATATAAAAGGGCGGTGAGCGTATGATTTTCATT
CATTTTTGCGATGGATGCCAACAGGCTTATCGGCAAAGACAATGATTTGCCGTGGCATTTC
CCAATGATCTTGCATACTTTAAGAAAATAACATCGGGCCATTCAATCATTATGGGCCGGAAA

ACATTTGAATCGATCGGACGTCCGCTTCCAAATCGGAAAAATATTGTCGTTACCTCAGCGCC
 GGATTGAGAAATTCAGGGATGCACGGTTGTCAGTTCATTAAAGGATGTACTGGACATTTGTT
 CAGGCCCTGAAGAATGCTTTGTGATCGGAGGGGCTCAGCTCTATACGGACCTGTTCCCTTAT
 GCGGACAGACTGTATATGACGAAAATTCATCACGAGTTTGAGGGTGACCGTCACTTTCTCTGA
 ATTTGATGAATCCAATTGGAAGCTGGTTTCTTCTGAGCAGGGGACCAAAGACGAAAAAACCC
 CGTATGATTACGAATTTCTAATGTATGAAAAAAGAAATCTTCTAAAGCGGGAGGATTTTAA
 TTGGTTTCGCTACAGCCTTCTAGTGGTTTATATTGTGTATATGCTGTTAAAAAATATGAAACA
 ATTATTTAATCAAACAATGCTCGATCCCCGTCTGTCATACAAAAACAGATGGCTCTTGTGT
 ACGAACAGCCAAAGGCGTTTTTAGAAGGCTGTATCGGCATCTCCGGTTCAGTTGTGACGATC
 CATCAGCCAGA

[SEQ ID NO: 10]

Do đó, tốt hơn là vector chứa trình tự axit nucleic về cơ bản như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 10, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Ví dụ các vị trí gắn đoạn môi, có thể được sử dụng để xác định sự chèn gen khác loài, được thể hiện trong phần in đậm và gạch chân.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất kit chứa các chất phản ứng để sử dụng với quy trình của sáng chế.

Theo một phương án, kit có thể chứa môi trường bất kỳ như được bộc lộ ở đây, chẳng hạn môi trường chứa YE với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, hoặc không chứa YE. Kit có thể chứa trimethoprim. Kit có thể chứa môi trường có chứa trimethoprim, tùy ý hai môi trường, một môi trường có nồng độ trimethoprim cao hơn môi trường còn lại. Kit có thể chứa CAA. Kit có thể chứa một hoặc nhiều axit amin, hoặc tổ hợp hoặc nồng độ bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Kit có thể có các hướng dẫn mô tả việc sử dụng kit này hoặc mô tả quy trình bất kỳ như được bộc lộ ở đây. Kit có thể chứa ít nhất một đồ chứa để thực hiện quy trình như được bộc lộ ở đây, chẳng hạn đĩa Petri.

Theo một phương án, kit có thể chứa một hoặc nhiều vector của sáng chế. Kit có thể chứa vector để sử dụng trong việc đưa gen khác loài vào gen *thyA* trong vi khuẩn tạo bào tử và/hoặc vector để sử dụng trong việc đưa gen khác loài vào gen *thyB* trong vi khuẩn tạo bào tử. Kit có thể chứa trình tự axit nucleic bao gồm gen khác loài, như gen dùng cho vacxin, để liên hợp protein, hoặc enzym. Kit có thể chứa trình tự axit nucleic bao gồm cả protein vỏ của bào tử. Protein vỏ của bào tử có thể được tạo cấu hình để có thể gắn dễ dàng với gen khác loài, chẳng hạn gắn với vị trí đa tách dòng.

Cần hiểu rằng sáng chế mở rộng đến axit nucleic hoặc peptit bất kỳ hoặc biến thể, dẫn xuất hoặc chất tương tự của chúng, bao gồm chủ yếu là trình tự axit amin hoặc axit nucleic của trình tự bất kỳ trong số các trình tự được đề cập ở đây, bao gồm cả các biến thể chức năng hoặc các mảnh chức năng của chúng. Các thuật ngữ “chủ yếu là

trình tự axit amin/nucleotit/peptit”, “biến thể chức năng” và “mảnh chức năng”, có thể là trình tự có tính đồng nhất trình tự ít nhất 40% với trình tự axit amin/nucleotit/peptit của trình tự bất kỳ trong số các trình tự được đề cập ở đây, ví dụ, có tính đồng nhất 40% với trình tự được xác định dưới dạng các trình tự SEQ ID No: 1 – 19.

Các trình tự axit amin/polynucleotit/polypeptit có tính đồng nhất trình tự lớn hơn 50%, tốt hơn nữa là lớn hơn 65%, 70%, 75%, và vẫn tốt hơn nữa là có tính đồng nhất trình tự lớn hơn 80% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được đề cập ở đây cũng được dự định. Tốt hơn là trình tự axit amin/polynucleotit/polypeptit có tính đồng nhất ít nhất 85% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được đề cập ở đây, tốt hơn nữa là có tính đồng nhất ít nhất 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, và tốt nhất là có tính đồng nhất ít nhất 99% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được đề cập ở đây.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách tính tỷ lệ % tính đồng nhất giữa hai trình tự axit amin/polynucleotit/polypeptit. Để tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất giữa hai trình tự axit amin/polynucleotit/polypeptit, trước tiên, sự đóng thẳng hàng của hai trình tự phải được chuẩn bị, sau đó tính toán giá trị của tính đồng nhất trình tự. Tỷ lệ % tính đồng nhất của hai trình tự có thể có giá trị khác nhau, tùy thuộc vào:- (i) phương pháp được sử dụng để đóng thẳng hàng các trình tự, ví dụ, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (được thực hiện trong các chương trình khác nhau), hoặc đóng thẳng hàng cấu trúc từ sự so sánh 3D; và (ii) các thông số được sử dụng bởi phương pháp đóng thẳng hàng, ví dụ, sự đóng thẳng hàng cục bộ so với tổng thể, phương pháp ma trận điểm số theo cặp được sử dụng (ví dụ, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, v.v.), và điểm phạt-khoảng trống, ví dụ, dạng chức năng và hằng số.

Sau khi tiến hành đóng thẳng hàng, có nhiều cách khác nhau để tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất giữa hai trình tự. Ví dụ, có thể chia số lượng gốc có tính đồng nhất cho: (i) chiều dài của trình tự ngắn nhất; (ii) chiều dài đóng thẳng hàng; (iii) chiều dài trung bình của trình tự; (iv) số lượng vị trí không có khoảng trống; hoặc (iv) số lượng vị trí tương đương loại trừ phần nhô ra. Ngoài ra, cần hiểu rằng tỷ lệ % tính đồng nhất cũng phụ thuộc đáng kể vào chiều dài. Do đó, chiều dài của trình tự càng ngắn, tính đồng nhất trình tự càng cao, điều này có thể xảy ra tình cờ.

Do đó, cần hiểu rằng sự đóng thẳng hàng chính xác trình tự của protein hoặc ADN là quá trình phức tạp. Chương trình đóng thẳng hàng nhiều trình tự phổ biến ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson

et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) là cách được ưu tiên để tạo ra sự dóng thẳng hàng nhiều trình tự của proteins hoặc ADN theo sáng chế. Các thông số thích hợp của chương trình ClustalW có thể là như sau: đối với sự dóng thẳng hàng ADN: Điểm phạt mở khoảng trống = 15,0, Điểm phạt mở rộng khoảng trống = 6,66, và Ma trận = Tính đồng nhất. Đối với sự dóng thẳng hàng protein: Điểm phạt mở khoảng trống = 10,0, Điểm phạt mở rộng khoảng trống = 0,2, và Ma trận = Gonnet. Đối với sự dóng thẳng hàng ADN và protein: ENDGAP = -1, và GAPDIST = 4. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể cần thay đổi các thông số này và các thông số khác để dóng thẳng hàng trình tự tối ưu.

Tốt hơn là sau đó việc tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất giữa hai trình tự axit amin/polynucleotit/polypeptit có thể được thực hiện từ sự dóng thẳng hàng theo công thức $(N/T) \times 100$, trong đó N là số lượng vị trí mà ở đó các trình tự có chung một gốc giống nhau, và T là tổng số vị trí được so sánh bao gồm cả các khoảng trống và bao gồm hoặc không bao gồm các phần nhô ra. Tốt hơn là các phần nhô ra được bao gồm trong việc tính toán này. Do đó, phương pháp được ưu tiên nhất để tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất giữa hai trình tự bao gồm các bước (i) chuẩn bị dóng thẳng hàng trình tự bằng cách sử dụng chương trình ClustalW sử dụng tập hợp các thông số thích hợp, ví dụ, như được nêu trên đây; và (ii) chèn các giá trị của N và T vào công thức sau: -
 Tính đồng nhất trình tự = $(N/T) \times 100$.

Các phương pháp khác để xác định các trình tự tương tự sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Ví dụ, trình tự nucleotit gần như tương tự sẽ được mã hóa bằng trình tự lai với các trình tự được thể hiện hoặc các phần bổ trợ của chúng, trong các điều kiện nghiêm ngặt. Cụm từ các điều kiện nghiêm ngặt của các tác giả sáng chế có nghĩa là nucleotit lai với ADN hoặc ARN được gắn với bộ lọc trong 3x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C, sau đó rửa ít nhất một lần trong 0,2x SSC/0,1% SDS ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 65°C. Theo cách khác, polypeptit gần như tương tự có thể khác biệt bởi ít nhất 1, nhưng ít hơn 5, 10, 20, 50 hoặc 100 axit amin so với các trình tự được thể hiện.

Do sự suy biến của mã di truyền, rõ ràng là trình tự axit nucleic bất kỳ được mô tả ở đây có thể được biến đổi hoặc thay đổi mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến trình tự của protein được mã hóa, nhờ đó tạo ra biến thể chức năng của nó. Các biến thể nucleotit thích hợp là các biến thể có trình tự được thay đổi bằng cách thay thế các

codon khác nhau mã hóa cùng axit amin trong trình tự, do đó tạo ra sự thay đổi âm. Các biến thể thích hợp khác là các biến thể có trình tự nucleotit tương đồng nhưng chứa tất cả, hoặc các phần, của trình tự, được thay đổi bằng cách thay thế các codon khác nhau mã hóa axit amin có mạch bên có đặc tính lý-sinh học tương tự với axit amin mà nó thay thế, để tạo ra sự thay đổi bảo toàn. Ví dụ, các axit amin kỵ nước, không phân cực, kích thước nhỏ bao gồm glyxin, alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, và methionin. Các axit amin kỵ nước, không phân cực, kích thước lớn, bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin. Các axit amin trung tính phân cực bao gồm serin, threonin, xystein, asparagin và glutamin. Các axit amin (có tính bazơ) mang điện tích dương bao gồm lysin, arginin và histidin. Các axit amin (có tính axit) mang điện tích âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Do đó, cần hiểu rằng các axit amin có thể được thay thế bằng axit amin có các đặc tính lý-sinh học tương tự, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết các trình tự nucleotit mã hóa các axit amin này.

Tất cả các dấu hiệu được mô tả ở đây (bao gồm cả phần yêu cầu bảo hộ, tóm tắt và các hình vẽ kèm theo), và/hoặc tất cả các bước của phương pháp hoặc quy trình bất kỳ đã được bộc lộ, có thể được kết hợp với khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây theo cách kết hợp bất kỳ, ngoại trừ sự kết hợp trong đó ít nhất một số dấu hiệu và/hoặc bước trong số các dấu hiệu và/hoặc bước này là loại trừ lẫn nhau.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Để hiểu rõ hơn sáng chế, và để chứng minh các phương án của sáng chế có thể được tiến hành có hiệu quả, phần sau đây sẽ đề cập đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện sơ đồ cấu trúc của chủng vi khuẩn. Để tạo cấu trúc chèn lệch vị trí ở locus *thyA* và *thyB* của vi khuẩn *B. subtilis*, cần thực hiện hai bước. Trong bước 1, plasmit pThyA mang gen thể khảm được tuyến tính hóa (phân giải bằng enzym ApaII) và được đưa vào các tế bào của chủng *B. subtilis* kiểu đại (trong trường hợp này là chủng PY79) bằng cách biến nạp qua trung gian ADN. Các thể biến nạp Tm^R được chọn lọc trên thạch SMM chứa trimethoprim (3 µg/ml) và thymin (50 µg/ml) và có sự chèn gen ADN *thyA* tương đồng cùng với gen thể khảm, bằng cách thay thế gen đánh dấu, như được thể hiện. Trong bước thứ hai, ADN plasmit đã tuyến tính hóa của vector pThyB mang gen thể khảm giống hoặc khác nhau được đưa vào các tế bào của chủng

có sự chèn gen *thyA* được tạo ra trong bước thứ nhất. Việc chọn lọc đối với Tm^R được thực hiện trên thạch SMM + CAA chứa trimethoprim (> 6 µg/ml) và thymin (50 µg/ml);

Fig.2 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng của chủng trong môi trường tối thiểu. PY79 kiểu dại (*hình A*), SH13 *thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉* (*hình B*) và SH14 *thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉* (*hình C*) được sinh trưởng trong môi trường SMM ở nhiệt độ 37°C có bổ sung (ký hiệu bằng hình màu đen) hoặc không bổ sung (ký hiệu bằng hình màu trắng) thymin (50 µg/ml);

Fig.3 thể hiện mức độ biểu hiện protein vỏ của bào tử. Các chủng *B. subtilis* có sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB* được thử nghiệm bằng phương pháp thấm tách Western đối với protein vỏ của bào tử được chiết từ hỗn hợp bào tử tinh khiết. Mỗi hình thể hiện các dải thu được trong chất chiết của các bào tử kiểu dại (PY79) hoặc bào tử có sự chèn gen *thyA* và *thyB* (*hình AB*) hoặc, ngoài ra trên *hình D*, các bào tử chỉ có sự chèn gen *thyA* (*hình A*). Các *hình A* và *B* thể hiện kết quả phân tích của SH12 *thyA::cotB-vp26 thyB::cotC-vp28* với kháng thể kháng VP28 (*hình A*) và kháng thể kháng VP26 (*hình B*). *Hình C* thể hiện kết quả phân tích của SH14 *thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*. *Hình D* thể hiện kết quả phân tích của SH16 *thyA::cotB-SA thyB::cotB-SA*. Các dải tương ứng với các protein thể khảm được đánh dấu (*) với thành phần gắn protein vỏ liên quan (CotB hoặc CotC). Protein này được tải vào mỗi lỗ tương ứng với chất chiết từ 2 X 10⁸ bào tử (xem phần phương pháp);

Fig.4 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện bề mặt được xác định bằng “thử nghiệm ELISA bào tử nguyên”. *Hình A*; Các đĩa vi chuẩn được phủ các bào tử (2 X 10⁸/lỗ) PY79 (*spo*⁺), PP108 (*amyE::cotC-tcdA₂₆₋₃₉ thrC::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*), SH13 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*) và SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) và sau đó được dò bằng PAb của thổ kháng bào tử (theo tỷ lệ 1:1000) hoặc kháng TcdA₂₆₋₃₉ (theo tỷ lệ 1:500). PAb thứ cấp theo tỷ lệ 1:5000 và huyết thanh nguyên thể được sử dụng để so sánh, và mức nền được trừ đi.

Hình B; giống như *hình A* nhưng sử dụng các bào tử PY79, AC01 (*thyA::cotB-vp28*) và AC02 (*thyA::cotB-vp28 thyB::cotB-vp28*) được tạo môi bằng PAb của thổ kháng bào tử (theo tỷ lệ 1:1000) hoặc kháng VP28 (theo tỷ lệ 1:300);

Fig.5 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng của các chủng trong môi trường giàu. Sự sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C của PY79 (■), SH13 (●) và SH14 (▲) được thực hiện

trong: *hình A*, LB + thymin (50 $\mu\text{g/ml}$); *hình B*, LB; *hình C*, DSM + thymin (50 $\mu\text{g/ml}$) và *hình D*, DSM;

Fig.6 là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống trong đường dạ dày ruột (GI) của chuột. Các con chuột ($n=5$ con/nhóm) được cho sử dụng một liều duy nhất qua đường miệng của các bào tử (2×10^9) SH14 có sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB* hoặc SH250, chủng kiểu dại về cơ bản được hướng đích bằng gen đánh dấu kháng chloramphenicol. Số lượng bào tử chịu nhiệt trong phân được xác định trong khoảng thời gian 12 giờ sau khi dùng liều. Số lượng bào tử SH14 được xác định trên aga có bổ sung trimethoprim và thymin (■). Khi không có mặt thymin, không phát hiện được CFU (▲). Số lượng CFU của SH250 được xác định trên aga có bổ sung chloramphenicol (●);

Fig.7 là biểu đồ thể hiện tính sinh miễn dịch của các bào tử SH14 biểu hiện kháng nguyên *C. difficile* TcdA₂₆₋₃₉. Các bào tử (5×10^{10}) gồm SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉* *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*), PP108 (*amyE::cotC-tcdA₂₆₋₃₉* *thrC::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*) và PY79 (*spo*⁺) được sử dụng cho chuột ($n=4$) bằng ống xông qua đường miệng vào các ngày 1, 14, 35 và 57. Nồng độ IgG trong huyết thanh (*hình A*) và IgA trong phân (*hình B*) đặc hiệu với TcdA₂₆₋₃₉ được xác định bằng thử nghiệm ELISA và chuẩn độ điểm cuối được thể hiện. **, $p < 0,005$; *** $p < 0,0002$;

Fig.8 là ảnh chụp minh họa sự liên hợp của các kháng thể với streptavidin và enzym được biểu hiện trên bào tử. **Hình A** thể hiện hình ảnh quan sát được về sự liên hợp các kháng thể kháng TcdA₂₆₋₃₉ với các bào tử SH16 bằng cách sử dụng phương pháp huỳnh quang miễn dịch. Để làm đối chứng, các bào tử PY79 không có SA không liên hợp. Hình ảnh tương phản pha khẳng định sự có mặt của các bào tử PY79. **Hình B** thể hiện hoạt tính của subtilisin E được biểu hiện trên bề mặt của bào tử. Thạch casein được sử dụng để quan sát hoạt tính của proteaza. Các đĩa được tạo vết bằng 20 μl hỗn dịch chứa các bào tử SH20 (*thyA::aprE* *thyB::MCS*) hoặc PY79. Trong mỗi trường hợp, nguyên liệu cấy mang 5×10^8 bào tử. Để làm đối chứng dương, 0,02 đơn vị *Streptomyces griseus* proteaza (Sigma P5147) được sử dụng. Sau khi ủ 24 giờ ở nhiệt độ 37°C, các đĩa được nhuộm bằng thuốc nhuộm Bromocresol green và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng để làm hiện màu các vùng thoái biến. **Hình C** thể hiện các đĩa tinh bột được nhuộm bằng dung dịch Lugol. Hỗn dịch chứa các bào tử tinh khiết của SH18 (10^9 và 10^{10} cfu) hoặc PY79 (10^{10} cfu) được tạo vết trên đĩa và được ủ trong 48 giờ. Các đĩa mang ba chất kháng sinh để ngăn ngừa sự sinh trưởng

của vi khuẩn. Các bào tử biểu hiện amylaza có hoạt tính tạo ra vùng trong suốt;

Fig.9 là hình vẽ sơ đồ thể hiện sự chèn gen *thy* trong bào tử SH12 (*thyA::cotC-
vp26 thyB::cotB-vp28*). Các đoạn ở đầu gần (^P) và ở đầu xa (^D) của *thyA* và *thyB* nằm ở vùng rìa của vị trí chèn gen thể khảm được thể hiện. Các khung đọc mở (ORF) được thể hiện bao gồm: *hypo*, ORF mã hóa theo giả định, *dhfr*, dihydrofolat reductaza, *ltrC* (protein C cần nhiệt độ thấp);

Fig.10 là hình vẽ sơ đồ thể hiện sự chèn gen *thy* trong bào tử SH14 (*thyA::cotB-
tcdA₂₆₋₃₉ thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*). Các đoạn ở đầu gần (^P) và ở đầu xa (^D) của *thyA* và *thyB* nằm ở vùng rìa của vị trí chèn gen thể khảm được thể hiện. Khung ORF được thể hiện bao gồm: *hypo*, ORF mã hóa theo giả định, *dhfr*, dihydrofolat reductaza, *ltrC* (protein C cần nhiệt độ thấp);

Fig.11 là hình vẽ sơ đồ thể hiện sự chèn gen *thy* vào bào tử SH16 (*thyA::cotB-
SA thyB::cotB-SA*). Các đoạn ở đầu xa (^P) và đầu gần (^D) của *thyA* và *thyB* nằm ở vùng rìa của vị trí chèn gen thể khảm được thể hiện. Khung ORF được thể hiện bao gồm: *hypo*, ORF mã hóa theo giả định, *dhfr*, dihydrofolat reductaza, *ltrC* (protein C cần nhiệt độ thấp);

Fig.12 là hình vẽ sơ đồ thể hiện sự chèn gen *thy* vào bào tử SH20 (*thyA::cotB-
aprE thyB::MCS*). Các đoạn ở đầu gần (^P) và đầu xa (^D) của *thyA* và *thyB* nằm ở vùng rìa của vị trí chèn gen thể khảm được thể hiện. Khung ORF được thể hiện bao gồm: *hypo*, ORF mã hóa theo giả định, *dhfr*, dihydrofolat reductaza, *ltrC* (protein C cần nhiệt độ thấp);

Fig.13 là hình vẽ sơ đồ thể hiện sự chèn gen *thy* vào bào tử SH18 (*thyA::cotB-
amyE thyB::MCS*). Các đoạn ở đầu gần (^P) và đầu xa (^D) của *thyA* và *thyB* nằm ở vùng rìa của vị trí chèn gen thể khảm được thể hiện. Khung ORF được thể hiện bao gồm: *hypo*, ORF mã hóa theo giả định, *dhfr*, dihydrofolat reductaza, *ltrC* (protein C cần nhiệt độ thấp);

Fig.14 là sơ đồ thể hiện tác dụng của trimethoprim đối với con đường folat hóa. Trimethoprim ức chế enzym là axit dihydrofolic (DHFR), chất cần thiết cho sự tạo ra dihydrofolat (DHF) từ dihydropterat (DHP) cũng như cần thiết cho sự tổng hợp axit tetrahydrofolic (THF). Chất này ngăn ngừa sự tổng hợp axit metylenterahydrofolic (MTHF) và sự tổng hợp cả purin và pyrimidin. Trong vi khuẩn *B. subtilis*, hai enzym thymidylat synthetaza (TS), TSaza A và TSaza B sử dụng MTHF để tạo ra pyrimidin

thymidin và thymin. Sự làm bất hoạt cả hai enzym TS đều gây chết trừ khi bổ sung thymin (hoặc thymidin) ngoại sinh. Axit *para*-aminobenzoic (PABA) cũng được thể hiện là một thành phần của axit folic và SHMT (serin hydroxymetyltransferaza);

Fig.15 là biểu đồ thể hiện sự sinh trưởng của bào tử SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*; *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) trong môi trường chứa thymin hoặc thymidin. SH14 được sinh trưởng trong môi trường SMM chứa CAA 0,2% với nồng độ của thymin hoặc thymidin khác nhau. Các môi trường nuôi cấy được ủ trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó mật độ quang OD được xác định;

Fig.16 là đồ thị thể hiện sự mất khả năng sống sau khi loại bỏ thymin. SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉* *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) được sinh trưởng (ở nhiệt độ 37°C) trong môi trường SOC chứa trimethoprim (6 µg/ml) và thymin (50 µg/ml) qua đêm và sau đó được cấy chuyển vào môi trường SOC mới được bổ sung thymin (50 µg/ml). Ở mật độ OD₆₀₀ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,6, các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm, rửa 3 lần bằng PBS và được tạo hỗn dịch trong 20ml môi trường SOC ấm. 10ml hỗn dịch tế bào này được cho vào mỗi bình trong số hai bình mà thymin được thêm vào để tạo ra nồng độ cuối bằng 50 µg/ml. Các môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C kèm theo lắc trong bể nước và số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu) còn sống/ml được xác định ở các thời điểm bằng cách pha loãng theo bậc và đàn mỏng;

Fig.17 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng của chủng trong môi trường giàu. Sự sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C của PY79 (hình A), và SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉* *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) (hình B) được thực hiện trong môi trường LB + thymin với nồng độ của chất chiết nấm men khác nhau (mg/ml);

Fig.18 thể hiện các loại khuẩn lạc sau khi lai di truyền lần thứ nhất. Sau khi biến nạp, quan sát được hai loại khuẩn lạc: loại mờ-có kích thước lớn (Typ 1) và loại trong mờ-kích thước nhỏ (Typ 2). Chỉ các khuẩn lạc loại mờ có thể được sử dụng để gây xung điện để tạo cấu trúc của chủng được chèn hai gen; và

Fig.19 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng của chủng được chèn gen *thyA thyB* trong môi trường SMM. Sự sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C của bào tử SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉* *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) trong môi trường SMM bằng cách sử dụng các chất bổ sung khác nhau được thể hiện (thymin 50µg/ml, CAA (0,2% trọng lượng/thể tích) Adenin (20µg/ml). Các môi trường được bổ sung trimethoprim (3µg/ml) trên hình A và không bổ sung trimethoprim trên hình B. Để làm đối chứng, chủng *B. subtilis* PY79

cũng được đánh giá về sự sinh trưởng trong môi trường SMM mà không có các chất bổ sung.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thao tác di truyền đối với bào tử vi khuẩn của giống *Bacillus* đã chứng minh khả năng dùng để tiêm chủng và cung cấp dược chất hoặc enzym. Đáng chú ý là các protein được biểu hiện trên bề mặt của bào tử vẫn duy trì được hoạt tính và thường là không bị thoái biến. Tính ổn định nhiệt của các bào tử được kết hợp với tính chịu được quá trình làm khô của chúng làm cho chúng thích hợp để cung cấp cho người hoặc động vật qua đường miệng. Mặc dù có các đặc tính này, vẫn có một trở ngại cần giải quyết liên quan đến số phận của các bào tử tái tổ hợp được chuyển vào môi trường dưới dạng các bào tử còn sống. Các tác giả sáng chế đã khắc phục sự ngăn chặn về mặt sinh học đối với bào tử GMO bằng cách sử dụng khái niệm ‘chết vì không có thymin’, hiện tượng đã được thông báo lần đầu tiên vào sáu thập kỷ trước nhưng chưa từng được thực hiện thành công trên thực tế để đưa các gen khác loài vào vi khuẩn tạo bào tử. Bằng cách sử dụng *B. subtilis*, các tác giả sáng chế đã chèn gen thể khảm vào hai gen thymidylat synthaza, là *thyA* và *thyB* sử dụng quy trình hai bước. Trước tiên là chèn ở *thyA*, sau đó là chèn ở *thyB* mà ở đó sự chèn này tạo ra tính kháng với trimethoprim để cho phép chọn lọc các thể tái tổ hợp. Điều quan trọng là phương pháp này yêu cầu không đưa các gen kháng kháng sinh mới vào. Các vi khuẩn tái tổ hợp hoặc tế bào sinh dưỡng có sự phụ thuộc đáng kể vào thymin hoặc thymidin và khi trong không có mặt chúng, các tế bào bị làm tan và chết. Các vị trí chèn gen có tính ổn định và không có bằng chứng rõ ràng về sự ức chế hoặc sự hồi biến. Bằng cách sử dụng hệ thống này, các tác giả sáng chế đã tạo ra thành công một số vacxin bào tử cũng như các bào tử biểu hiện enzym có hoạt tính.

Nguyên liệu và phương pháp

Các chủng, môi trường và phương pháp chung

PY79 là chủng nguyên dưỡng của vi khuẩn *B. subtilis* có nguồn gốc từ chủng chuẩn 168 (tài liệu 28). PP108 (*amyE::cotC-tcdA₂₆₋₃₉ thrC::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*) đã được mô tả trong phần khác của bản mô tả này (tài liệu 4). Bào tử SH250 là dẫn xuất nguyên dưỡng của PY79 mang gen *cat* (mã hóa tính kháng với chloramphenicol) được chèn ở locus *amyE*. Các phương pháp chung để tiến hành với vi khuẩn *B. subtilis* bao gồm ‘phương pháp biến nạp theo hai bước’ được thực hiện như đã mô tả trước đây (tài liệu

29). Môi trường hình thành bào tử Difco (Difco Sporulation Medium: DSM) là môi trường tiêu chuẩn cho sự sinh trưởng và hình thành bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* (tài liệu 30). Để thẩm tách Western, các bào tử đã tinh chế được chuẩn bị và 2×10^8 bào tử được tạo hỗn dịch trong 40 μ l chất đệm Bolt LDS (Life Tech.) và được ủ ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút. Hỗn dịch bào tử được ly tâm (10 phút, 18000g) và 20 μ l dịch nổi bề mặt được điện di trên gel SDS-PAGE 12%.

Các vectơ *pThy*

pThyA (4274 bp) mang đoạn có chiều dài 1910 bp chứa nhánh trái (900 bp) và nhánh phải (950 bp) của gen *thyA* của vi khuẩn *B. subtilis* xung quanh vị trí đã tách dòng (multiple cloning site: MCS) được tách dòng vào pMA-RQ (2556 bp; Genscript, Mỹ). Cả hai nhánh mang trình tự ADN bổ sung ở đầu gần và đầu xa liền kề với *thyA*. Tương tự, pThyB1 (4973 bp) mang đoạn có chiều dài 2057 bp chứa nhánh trái (900bp) và nhánh phải (1,1 kb) của gen *thyB* của vi khuẩn *B. subtilis* bao quanh MCS được tách dòng vào pBluescript SK(+) (2958 bp). Các plasmit mang gen *bla* và các trình tự nucleotit của các đoạn *thyA* và *thyB* được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 10 (tương ứng) và được thể hiện dưới dạng sơ đồ trên **Fig.1**. Các plasmit pThyA và pThyB được tạo cấu trúc và mang các gen thể khảm được chèn vào ở vị trí MCS của mỗi vectơ. Các gen thể khảm (không được tối ưu hóa để sử dụng codon) chứa sự dung hợp trong khung giữa đoạn ở đầu 5' của *cotB* hoặc *cotC* của vi khuẩn *B. subtilis* với các khung ORF mã hóa *vp26*, *vp28*, *tcdA₂₆₋₃₉* hoặc *SA* được tổng hợp trước tiên với các đầu 5' và 3' thích hợp để tách dòng phụ ở vị trí MCS của các vectơ pThyA và pThyB. Đối với hai gen *aprE* và *amyE*, các tác giả sáng chế khuếch đại từ khuôn ADN của nhiễm sắc thể và sau đó dung hợp với *cotB*. Gen *aprE* (mã hóa subtilisin E) được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ chủng *B. subtilis* (SG115) trong bộ sưu tập của tác giả sáng chế và đoạn mã hóa được khuếch đại không có các vùng ở đầu tận cùng N liên quan đến sự tiết ra protein (pre) và hoạt hóa protein (pro) (tài liệu 31). Gen *amyE* (mã hóa alpha amylaza) được khuếch đại từ chủng trong phòng thí nghiệm *Bacillus amyloliquefaciens* và được tách dòng không có trình tự tín hiệu. Sự dung hợp gen được sử dụng cho quá trình này được thể hiện trên các hình vẽ từ **Fig.9** đến **Fig.13**.

Tạo cấu trúc của các chủng *B. subtilis* mang sự chèn gen *thyA* và *thyB*

Quy trình được phát triển ở đây gồm hai bước. Trong giai đoạn thứ nhất, các tế

bào của chủng thể nhận kiểu đại (trong quá trình được mô tả ở đây, chủng nguyên dưỡng PY79 được sử dụng) được tạo tính khả biến bằng cách sử dụng quy trình ‘biến nạp hai bước’ được mô tả bởi Dubnau và Davidoff-Abelson (tài liệu 33) và sử dụng phổ biến trong các phòng thí nghiệm *Bacillus* (tài liệu 33, 34). Các plasmid pThyA mang gen thể khảm được tuyến tính hóa bằng cách phân giải bằng ApaI hoặc ScaI và các tế bào được đàn mỏng trên thạch SMM (môi trường tối thiểu của Spizizen) (tài liệu 29) được bổ sung thymin (50 µg/ml) và trimethoprim (3 µg/ml). Sau thời gian sinh trưởng từ 72 giờ đến 96 giờ, các khuẩn lạc đơn là khuẩn lạc được tinh chế và đánh giá về sự sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C và 46°C trên thạch SMM ± thymin (50 µg/ml) + trimethoprim (3 µg/ml). Các tế bào có sự chèn gen ở locus *thyA* sẽ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C khi có mặt hoặc không có mặt thymin nhưng không thể sinh trưởng ở nhiệt độ 46°C trừ khi được bổ sung thymin. Phương pháp xác định khác là khuếch đại bằng phản ứng PCR đối với sự có mặt của gen thể khảm từ các thể biến nạp bằng cách sử dụng các đoạn mồi gắn với các trình tự *thyA*. Tần suất biến nạp thông thường là khoảng $2 \times 10^3/\mu\text{g}$ tế bào khả biến với khoảng từ 15 đến 20% khuẩn lạc có sự chèn gen đúng (xem phần giải thích sau đây). Trong giai đoạn thứ hai, plasmid pThyB đã tuyến tính hóa (ApaI hoặc ScaI) mang gen thể khảm được đưa vào các tế bào của chủng có sự chèn gen *thyA* bằng cách gây xung điện. Các tế bào đã gây xung điện được đàn mỏng trên SMM+CAA (SMM chứa các axit casamino (CAA) 0,2% (trọng lượng/thể tích)) chứa thymin (50 µg/ml) và trimethoprim (6 µg/ml) và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Để khẳng định sự có mặt của cả hai khuẩn lạc có sự chèn gen *thyA* và *thyB* được cấy thành vạch trên thạch SMM+CAA ± thymin (50 µg/ml) và sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào có sự chèn hai gen không thể sinh trưởng ở cả nhiệt độ 37°C và 46°C trừ khi được bổ sung thymin. Phương pháp xác định cuối được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR được khuếch đại hai vị trí chèn gen. Bằng cách sử dụng phương pháp gây xung điện, tần suất dính gắn bằng khoảng $1 \times 10^3/\mu\text{g}$ ADN mạch thẳng với ~20% khuẩn lạc kháng trimethoprim có sự chèn hai gen (*thyA* và *thyB*).

Gây xung điện

Quy trình được sử dụng ở đây được cải biến từ phương pháp được thiết lập (tài

liệu 35) để gây xung điện trong *Bacillus* chủ yếu bằng việc sử dụng môi trường SOC2 không chứa chất chiết nấm men. Môi trường SOC2 gồm trypton (2% trọng lượng/thể tích), NaCl (10mM), KCl (2,5mM), MgCl₂ (5mM), MgSO₄.7H₂O (5mM) và glucoza (20 mM). Môi trường nuôi cấy qua đêm của chủng có sự chèn gen *thyA* được cấy chuyển trong 25ml môi trường SOC2 (được bổ sung sorbitol 0,5M) để tạo ra mật độ OD₆₀₀ ban đầu bằng 0,2. Môi trường nuôi cấy được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C đến mật độ OD₆₀₀ bằng 1,4, được làm lạnh trên nước đá trong 10 phút và sau đó được thu hoạch bằng cách ly tâm ở nhiệt độ 4°C (5000 x g, 5 phút). Các tế bào được rửa 4 lần trong dung dịch gây xung điện được làm lạnh bằng nước đá (sorbitol 0,5M, manitol 0,5M, glyxerol 10% (theo thể tích)) và được tạo hỗn dịch trong 1,6ml của chính dung dịch được làm lạnh bằng nước đá này. Các tế bào được tạo khả biến điện và sử dụng được ngay. Các tế bào được duy trì trên nước đá và được sử dụng trong vòng 30 phút mặc dù các phân phân ước có thể được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. 1μl (~50ng) ADN plasmid đã tuyến tính hóa được cho thêm vào 60μl tế bào khả biến điện và hỗn hợp này được chuyển vào chậu thủy tinh đã được làm lạnh từ trước (chiều rộng khe hở 1mm) và được ủ trong thời gian 1,5 phút trên nước đá. Sau đó, chậu thủy tinh này được cho vào bên trong dụng cụ tạo xung điện (BioRad GenePulser Xcell) và các thông số sau đây được sử dụng để gây xung điện: điện áp 2100V, điện trở 200W, thời gian 5 mili giây và số lần xung 1. Sau khi gây xung điện, 1ml môi trường phục hồi (môi trường SOC2 chứa sorbitol 0,5M và manitol 0,38M) được cho thêm vào chậu thủy tinh và hỗn hợp được chuyển vào 2ml Eppendorf và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó các tế bào được pha loãng theo bậc và đàn mỏng trên môi trường chọn lọc thích hợp.

Thử nghiệm ELISA bào tử nguyên

Phương pháp ELISA được sử dụng để phát hiện các protein biểu hiện trên bề mặt như đã mô tả trước đây (tài liệu 36). Các lỗ của vi đĩa được phủ 50μl hỗn dịch chứa các bào tử nguyên chất (2×10^8 bào tử/lỗ), được để qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Các đĩa được phong bế bằng BSA 2% (trọng lượng/thể tích) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các kháng thể đa dòng của thỏ nhận biết kháng nguyên khác loài được biểu hiện trên bề mặt của bào tử hoặc bào tử *B. subtilis* nguyên được sử dụng làm kháng thể sơ cấp kèm theo ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thể liên hợp IgG-peroxidaza của cây củ cải cay (horseradish peroxidase: HRP) kháng thỏ (theo tỷ lệ 1:5000 trong PBS cùng với Tween-20 0,05%) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp kèm theo ủ trong 1 giờ ở

nhiệt độ trong phòng. TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) được sử dụng làm cơ chất.

Các kháng thể

Các kháng thể đa dòng với VP28 và TcdA₂₆₋₃₉ được tạo ra ở thỏ bằng cách sử dụng bốn lần tiêm dưới da (1mg/liều, 14 ngày một lần). Các protein tái tổ hợp được tạo phức với tá được Freund và huyết thanh được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký protein A. Kháng thể đa dòng VP26 được tạo ra ở chuột bằng cách sử dụng protein rVP26 đã tinh chế (4 liều dùng qua đường trong màng bụng, mỗi liều cách nhau 14 ngày, 10µg/liều, cùng với tá được Freund).

Các nghiên cứu trên động vật

Đối với các nghiên cứu về tính sinh miễn dịch, chuột (C57 Black 6, chuột cái, 7 tuần tuổi) được cho sử dụng liều với hỗn hợp chứa các bào tử tinh khiết của PY79 hoặc SH14. Các đáp ứng miễn dịch với TcdA₂₆₋₃₉ trong các mẫu huyết thanh và phân được thực hiện như đã mô tả trước đây (tài liệu 4). Đối với các nghiên cứu về tuổi thọ, chuột Balb/c (chuột cái, 7-8 tuần tuổi) được sử dụng. Chuột (n=5) được cho sử dụng liều đơn của các bào tử tinh khiết (2×10^9) SH14 hoặc SH250 bằng ống xông qua đường miệng. Ở các thời điểm sau đó, phân mới bài tiết được thu gom (3-4 viên), được làm đồng nhất và đối với bào tử SH14, hệ pha loãng theo bậc của phân được đàn mỏng trên các đĩa thạch (i) DSM và (iii) DSM + trimethoprim (6 µg/ml) + thymin (50 µg/ml). Các hệ pha loãng phân khi sử dụng SH250 được đàn mỏng trên các đĩa DSM chứa chloramphenicol (5 µg/ml). Các khuẩn lạc SH14 riêng biệt được kiểm tra ngẫu nhiên về sự có mặt của sự chèn gen *thy* bằng cách sử dụng phản ứng PCR.

Sự liên hợp với streptavidin

Các kháng thể đa dòng (của thỏ; 100µg) được tạo ra với protein rTcdA₂₆₋₃₉ được biotinyl hóa bằng cách sử dụng kit liên hợp biotin Lightning-Link Lipid typ A (Innova Biosciences). Các bào tử đã tinh chế (1×10^9) của chủng PY79 hoặc các bào tử biểu hiện CotB-SA (SH16) trong 200µl PBS được trộn lẫn với 1µg kháng thể được biotinyl hóa và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các bào tử được rửa bốn lần bằng PBS và được tạo hỗn dịch trong 1ml PBS. $\sim 3 \times 10^8$ bào tử đã liên hợp được sử dụng để phủ các lỗ của vi đĩa, sau đó đĩa này được dò bằng thể liên hợp IgG-củ cải cay kháng thỏ (theo tỷ lệ 1:5000 trong PBS cùng với Tween-20 0,05%) kèm theo ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó rửa ba lần trước khi làm hiện màu bằng TMB

(3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Để làm đối chứng, các bào tử PY79 được sử dụng theo quy trình tương tự. Để thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, 5×10^6 bào tử đã xử lý của SH16 hoặc PY79 được cho vào các tiêu bản hiển vi và được để khô trong không khí. Sau khi rửa ba lần bằng PBS, các tiêu bản được phong bế bằng PBS chứa BSA 2% (trọng lượng/thể tích) cùng với Tween-20 0,05% (theo thể tích) trong 45 phút ở nhiệt độ 37°C. Các kháng thể kháng TcdA₂₆₋₃₉ đã biotinyl hóa (tỷ lệ pha loãng 1:300; 200µl) được cho thêm vào các tiêu bản, được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được rửa 3 lần bằng PBS + Tween-20 0,05% (theo thể tích). Huyết thanh FITC của thỏ (Sigma F0382 với tỷ lệ pha loãng 1:200) được thêm vào và các tiêu bản được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiến hành phân tích hình ảnh bằng kính hiển vi EVOS fl LED.

Thử nghiệm loại trừ độc tố

Chủng *C. difficile* RT176 (*tcdA*⁺ *tcdB*⁺) được sinh trưởng trong môi trường canh thang TY (tryptone 3% (trọng lượng/thể tích), chất chiết nấm men 2% (trọng lượng/thể tích) và natri thiodycolat 0,1% (trọng lượng/thể tích)) trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Dịch nổi bề mặt không chứa tế bào được lọc vô khuẩn và duy trì ở nhiệt độ 4°C cho đến khi thử nghiệm. Nồng độ gây chết tối thiểu (minimum lethal concentration: MLC) của dịch nổi bề mặt cần thiết để gây độc 100% cho các tế bào HT29 được xác định bằng cách sử dụng hệ pha loãng 2 lần và cho thêm dịch tan đã pha loãng vào các tế bào HT29, sau đó đánh giá độc tính bằng cách sử dụng thử nghiệm làm tròn tế bào (tài liệu 4). Để thử nghiệm, 10^9 bào tử tinh khiết các bào tử SH16 được liên hợp với các kháng thể đa dòng TcdA₂₆₋₃₉ (xem phần trên đây) được cho vào 200µl môi trường McCoy 2% chứa nồng độ MLC của độc tố (thường là với tỷ lệ pha loãng 1/4000). Hỗn hợp này được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó, tính gây độc tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào HT29 và ủ trong 24 giờ. Để làm đối chứng, các bào tử PY79 đã trộn lẫn với các kháng thể TcdA₂₆₋₃₉ (xem phần trên đây) được sử dụng song song.

Hoạt tính enzym

Hoạt tính của proteaza được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính proteaza chung được mô tả bởi Sigma Aldrich trên trang web của họ bằng cách sử dụng casein làm cơ chất. Thạch casein gồm casein 1% (trọng lượng/thể tích), sữa đã tách kem 1% (trọng lượng/thể tích), thạch loại kỹ thuật số 2, Oxoid 1% (trọng

lượng/thể tích) và 1,2% (trọng lượng/thể tích)). Hoạt tính của amylaza trong chất lỏng được xác định như được mô tả (tài liệu 37). Sự tạo ra amylaza có hoạt tính được thử nghiệm bằng cách sử dụng hỗn dịch của các bào tử (thể tích 20 μ l) với các đĩa thạch chỉ mang tinh bột hòa tan (1% trọng lượng/thể tích) và chất chiết từ thịt bò (0,3% trọng lượng/thể tích) và ba kháng sinh (trimethoprim 10 μ g/ml, chloramphenicol 30 μ g/ml và erythromycin 30 μ g/ml). Các kháng sinh được sử dụng để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi khuẩn bất kỳ trên các đĩa để đảm bảo hoạt tính chỉ được tạo ra từ các bào tử ngủ. Các đĩa được ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó đĩa này được làm ngập bằng dung dịch Lugol (Sigma) trong 2 phút để làm hiện màu các vùng có sự thoái biến của tinh bột.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Cơ sở lý luận

Yêu cầu bắt buộc đối với thymin trong *B. subtilis* cần có hai enzym thymidylat synthaza (TSaza) được mã hóa bằng các gen *thyA* (TSazaA) và *thyB* (TSazaB) không liên kết (tài liệu 27). Các gen này được liên kết với con đường folat hóa và tạo ra pyrimidin dùng cho sự sinh trưởng của tế bào (**Fig.14**). TSazaB là enzym nhạy nhiệt và chỉ duy trì được ~5-8% hoạt tính ở nhiệt độ giới hạn bằng 46°C. Do đó, sự bất hoạt ở locus *thyA* cần phải bổ sung thymin (hoặc thymidin) đối với sự sinh trưởng ở nhiệt độ 46°C. TSaseA là enzym không nhạy nhiệt và vì thế sự bất hoạt *thyB* cho phép các tế bào sinh trưởng ở nhiệt độ cao. Tuy nhiên, sự bất hoạt cả *thyA* và *thyB*, tạo ra yêu cầu bắt buộc đối với thymin về sự sinh trưởng ở cả nhiệt độ 37°C và 46°C. Như được chứng minh bởi Neuhard và các đồng tác giả (tài liệu 27), sự bất hoạt các gen *thy* tạo ra tính kháng với được chất chống folat hóa là trimethoprim (hoặc aminopterin) do yêu cầu về dihydrofolat reductaza (DHFR), đích của trimethoprim, được bỏ qua. Tuy nhiên, mức độ kháng thuốc là khác nhau, với sự chèn gen ở *thyA* tạo ra mức độ kháng thuốc thấp hơn so với mức độ kháng thuốc phát hiện được ở thể đột biến *thyA thyB* (tài liệu 27). Thuộc tính về mức độ kháng với trimethoprim khác nhau này cho phép hệ tách dòng lệch vị trí mới, có hai bước, được thiết kế (**Fig.1**). Trong bước thứ nhất, gen được đưa vào ở locus *thyA*, sau đó, trong bước thứ hai, bằng cách chèn gen ở *thyB* sử dụng sự kháng với nồng độ tăng của trimethoprim để chọn lọc dương tính.

Để chứng minh bằng chứng về khái niệm đối với sự tách dòng lệch vị trí ở

locus *thy*, các tác giả sáng chế đã chọn một số gen khác loài có các sản phẩm đã được biểu hiện trước đó trên bề mặt của bào tử. Trong mỗi trường hợp, sự biểu hiện đạt được bằng cách dung hợp với gen *B. subtilis* mã hóa protein vỏ của bào tử đã biểu hiện trên bề mặt (CotB hoặc CotC). Các protein được chọn là VP26 và VP28, cả hai protein vỏ của virus WSSV (virus gây hội chứng đốm trắng) ở tôm. Khi được biểu hiện trên các bào tử *B. subtilis* và được đưa vào thức ăn, các bào tử tái tổ hợp này đã được chứng minh là tạo ra sự bảo vệ cho tôm được thử nghiệm bằng virus WSSV (tài liệu 7, 8, 9). (ii) TcdA₂₆₋₃₉ mã hóa miền ở đầu tận cùng C của độc tố A của *Clostridium difficile* (TcdA) được biểu hiện trên bề mặt của bào tử đã được chứng minh là tạo ra sự bảo vệ đối với bệnh nhiễm *C. difficile* infection (*C. difficile* infection: CDI) ở chuột (tài liệu 4, 38) được cho sử dụng liều của các bào tử tái tổ hợp này qua đường miệng. (iii) Streptavidin (SA), khi được biểu hiện trên các bào tử, có thể được liên hợp với kháng thể đơn dòng Cetuximab cho phép hướng đích các dòng tế bào ung thư ruột kết (tài liệu 15). (iv) cuối cùng, cả hai enzym, subtilisin E (*AprE*), proteaza kiềm và alpha amylaza (*AmyE*) là enzym quan trọng trong công nghiệp và thường được đưa vào thức ăn dùng cho động vật (tài liệu 32, 39).

Phương pháp hai bước để chèn gen lệch vị trí

Hai plasmit, pThyA và pThyB, được thiết kế và tổng hợp mang các gen *thyA* hoặc *thyB* hoàn chỉnh bị làm gián đoạn ở điểm giữa bằng vị trí đa tách dòng (MCS) để chèn ADN khác loài vào (**Fig.1**, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 10). Để đảm bảo đủ mức độ tương đồng ADN để có thể tiến hành sự kiện tái tổ hợp chéo kép, mỗi nhánh trái và nhánh phải mang các đoạn *thy* liên quan cũng như nằm ở vùng rìa ADN ngược dòng hoặc xuôi dòng (tổng cộng ~900 bp ở đầu gần và đầu xa). Sự dung hợp trong khung của các gen *cotB* và *cotC* (mã hóa các thành phần gắn kết vỏ của bào tử cần thiết để biểu hiện các protein khác loài) với các khung ORF *vp26*, *vp28*, *tcdA₂₆₋₃₉*, *SA*, *aprE* hoặc *amyE* (các hình vẽ từ **Fig.9** đến **Fig.13**) được tách dòng sau đó thành các vector pThyA hoặc pThyB thích hợp. Tiếp theo, các plasmit pThyA được tuyến tính hóa và sử dụng để biến nạp tế bào khả biến của chủng PY79 kiểu dại có sự chọn lọc đối với tính kháng trimethoprim trên các đĩa được bổ sung trimethoprim (3 µg/ml) và thymin ở nhiệt độ 37°C. Các thể biến nạp có sự chèn gen *thyA* có thể được nhận biết bởi sự không sinh trưởng của chúng ở nhiệt độ 46°C nếu không có mặt thymin. Trong bước thứ hai, để đưa sự chèn gen vào locus *thyB*, sự biến nạp qua trung gian ADN cổ

điển của các tế bào khả biến với plasmid pThyB đã chứng minh là không hiệu quả với tần suất đính gán thấp. Thay vào đó, các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp gây xung điện là phương pháp tin cậy và có thể lặp lại cho phép đưa các plasmid pThyB ở locus *thyB* vào các chủng *thyA*⁻ (xem phần phương pháp) bằng cách sử dụng sự chọn lọc với nồng độ trimethoprim cao hơn (6 µg/ml). Các chủng có sự chèn gen ở *thyA* và *thyB* được xác định theo khả năng không sinh trưởng của chúng ở cả nhiệt độ 37°C và 46°C khi không có mặt thymin. Bằng cách sử dụng quy trình hai bước này, các tác giả sáng chế đã tạo cấu trúc thành công nhiều chủng có sự chèn gen (*vp26*, *vp28*, *tcdA₂₆₋₃₉* và *SA*) ở locus *thyA* và *thyB* (**Bảng 1**). Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng tạo ra các chủng có một sự chèn gen của gen *aprE* và *amyE* ở locus *thyA*. Để tạo ra tính phụ thuộc thymin tuyệt đối, các tác giả sáng chế chỉ tuyến tính hóa plasmid pThyB ‘rỗng’ và đưa ADN này vào thể đột biến *thyA* chọn lọc đối với trimethoprim ở nồng độ 6 µg/ml. Các chủng mà tác giả sáng chế đã tạo cấu trúc thành công bao gồm sự biểu hiện hóa trị một (VP28, TcdA₂₆₋₃₉, streptavidin, subtilisin E và amylaza) cũng như sự biểu hiện hóa trị hai (sự biểu hiện của VP26 và VP28 trên một bào tử) bằng cách dung hợp với một hoặc hai thành phần gắn vỏ của bào tử khác nhau (CotB và CotC). Đối với mỗi chủng được tạo cấu trúc trong **Bảng 1**, các tác giả sáng chế đã khẳng định bằng cách phân tích trình tự nucleotit, tính toàn vẹn của sự chèn gen *thyA* hoặc *thyB*.

Các tác giả sáng chế đã đánh giá sự sinh trưởng của chủng có sự chèn gen trong môi trường SMM tối thiểu ở nhiệt độ 37°C và **Fig.2** thể hiện các ví dụ của chủng (SH14) có sự chèn gen *cotB-tcdA₂₆₋₃₉* và *cotC-tcdA₂₆₋₃₉* ở locus *thyA* và *thyB*. Như dự đoán, chủng có sự chèn gen *thyA* sinh trưởng bình thường khi có mặt hoặc không có mặt thymin (**Fig.2B**) và không khác biệt với chủng PY79 kiểu dại (**Fig.2A**). Trái lại, chủng có sự chèn gen *thyA thyB* phụ thuộc thymin nhưng với sự có mặt của thymin đã bị giảm tính thích ứng như được thể hiện từ các mật độ OD tối đa thấp hơn (**Fig.2C**).

Ngoài ra, bằng cách sử dụng phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen, các tác giả sáng chế đã khẳng định được chủng SH12 (*thyA::cotC-vp26 thyB::cotB-vp28*) và SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyA::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) có sự chèn gen đặc hiệu ở locus *thy* mà không có sự bất thường nhiễm sắc thể bất kỳ (không được thể hiện). Sự biểu hiện của các protein thể khảm được khẳng định bằng phương pháp thâm tách Western đối với các protein được chiết từ các bào tử đã tinh chế (**Fig.3** thể hiện các vết phát hiện

thể khám VP26, VP28, TcdA₂₆₋₃₉ và SA trong SH12, SH14 và SH16) chứng minh các dải trọng lượng phân tử chính xác. Phương pháp thứ hai là phương pháp phát hiện bằng thử nghiệm ELISA đối với các bào tử nguyên bằng cách sử dụng các kháng thể đa dòng với kháng nguyên khác loài tương ứng và **Fig.4** thể hiện sự phát hiện các kháng nguyên trên bề mặt của TcdA₂₆₋₃₉ (**Fig.4A**) và VP28 (**Fig.4B**) bằng thử nghiệm ELISA đối với bào tử nguyên. Như dự đoán, nồng độ protein TcdA₂₆₋₃₉ mang cả hai locus *thyA* và *thyB* (SH14 trên **Fig.4A**) có mức độ biểu hiện cao hơn ở một locus (nghĩa là *thyA*, SH13). Đồng thời, các tác giả sáng chế cũng xác định độ phong phú của TcdA₂₆₋₃₉ trong các bào tử của PP108 mang cùng kháng nguyên được dung hợp với CotB và CotC nhưng được chèn vào ở locus *thrC* và *amyE* tương ứng (tài liệu 4). Mức độ biểu hiện thấp hơn một chút nhưng cần hiểu rằng việc sử dụng PAb kháng bào tử để xác định mức độ biểu hiện của protein vỏ của bào tử được giảm đi tương ứng.

Cả thymine và thymidine đều có thể được sử dụng cho sự sinh trưởng các chủng mang sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB*. Bằng cách sử dụng SH14, các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng để sự sinh trưởng tối ưu hóa, thymine 15 µg/ml hoặc thymidine 20 µg/ml là đủ (**Fig.15**). Giá trị này thấp hơn đáng kể so với giá trị 50 µg/ml đã thông báo trước đây (tài liệu 27) và gần như có thể phản ánh sự khác biệt về mức nền của chủng được sử dụng. Tuy nhiên, tế bào mang sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB* có thể sinh trưởng trong môi trường được bổ sung thymine bị mất đáng kể khả năng sống của tế bào (~5 log trong 5 giờ) khi thymine được loại bỏ, dấu hiệu phân biệt của ‘sự chết vì không có thymine’ (**Fig.16**).

Bảng 1: kiểu hình của các chủng tái tổ hợp *B. subtilis*

Chủng	Kiểu gen	37°C ¹		46°C ¹		T _m MIC ²	Sự hình thành bào tử ³	
		- thy	+ thy	- thy	+ thy		TC	Bào tử %
PY79	<i>thyA⁺ thyB⁺</i>	+	+	+	+	0,25	2,8 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸ 85,7
SH11	<i>thyA::cotC-<i>vp26</i></i>	+	+	-	+	16	1,9 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸ 82
SH12	<i>thyA::cotC-<i>vp26 thyB::cotB-<i>vp28</i></i></i>	-	+	-	+	>64	2 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸ 75
AC01	<i>thyA::cotB-<i>vp28</i></i>	+	+	-	+	16	2,6 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸ 85
AC02	<i>thyA::cotB-<i>vp28 thyB::cotB-<i>vp28</i></i></i>	-	+	-	+	>64	1,9 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸ 78,6
SH13	<i>thyA::cotB-<i>tcdA₂₆₋₃₉</i></i>	+	+	-	+	16	2,2 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸ 85
SH14	<i>thyA::cotB-<i>tcdA_{26-39 thyB::cotC-<i>tcdA₂₆₋₃₉</i>}</i></i>	-	+	-	+	>64	2,5 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁸ 77,2
SH15	<i>thyA::cotB-SA</i>	+	+	-	+	16	2,8 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁸ 82
SH16	<i>thyA::cotB-SA thyB::cotB-SA</i>	-	+	-	+	>64	3,1 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸ 77,4
SH17	<i>thyA::cotB-<i>amyE</i></i>	+	+	-	+			
SH18	<i>thyA::cotB-<i>amyE thyB::MCS</i></i>	-	+	-	+			
SH19	<i>thyA::cotB-<i>aprE</i></i>	+	+	-	+	16	8,7 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸ 90
SH20	<i>thyA::cotB-<i>aprE thyB::MCS</i></i>	-	+	-	+	>64	8,1 x 10 ⁷	6,8 x 10 ⁷ 83,9

¹ sự sinh trưởng (+) hoặc không sinh trưởng (-) trên thạch SMM khi có mặt hoặc không có mặt thymine (50 µg/ml)
² nồng độ ức chế tối thiểu (MIC; µg/ml) của trimethoprim (Tm) được xác định bằng cách sử dụng phương pháp vi pha loãng (tài liệu 52).

³ tỷ lệ % bào tử chịu nhiệt trong môi trường nuôi cấy được sinh trưởng qua đêm trong môi trường DSM (+ thymine) ở nhiệt độ 37°C.
TC, tổng số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu)/ml; Bào tử, số lượng bào tử chịu nhiệt cfu/ml.

Cuối cùng, bằng cách sử dụng hệ tách dòng này, các tác giả sáng chế có thể đưa sự chèn gen vào, sự chèn gen này có tính phân cực phiên mã cùng chiều hoặc ngược chiều với gen *thy* tương ứng (các hình vẽ từ **Fig.9** đến **Fig.13**) cho thấy không có bằng chứng về việc đọc hết từ đầu đến cuối các trình tự mã hóa *thy* ở đầu gần.

Ví dụ 2

*Xem xét thử nghiệm về việc sử dụng sự chèn gen lệch vị trí ở locus *thy**

a) Sự sinh trưởng trong môi trường giàu

Trong môi trường giàu như LB và DSM, chủng có một sự chèn gen *thyA* có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C mà không cần bổ sung thymin, tuy nhiên chủng có hai sự chèn gen *thyA thyB* không có sự sinh trưởng (**Fig.5B** và **Fig.5D**). Bất ngờ là sự bổ sung LB hoặc DSM cùng với thymin không khôi phục được mức độ sinh trưởng bình thường. Trong LB, chủng có hai sự chèn gen không sinh trưởng (**Fig.5A**) trong khi trong môi trường DSM có bổ sung thymin, quan sát được sự sinh trưởng bị giới hạn (**Fig.5C**). Tuy nhiên, sau 24 giờ sinh trưởng trong DSM, sự hình thành bào tử đã được chứng minh là có xảy ra và số lượng bào tử chịu nhiệt là gần như tương đương với PY79 (**Bảng 1**).

Do chủng có sự chèn gen *thyA thyB* có thể sinh trưởng, mặc dù có sự giảm tính thích ứng, trong môi trường tối thiểu được bổ sung thymin (xem **Fig.2C**), các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng một hoặc nhiều thành phần của môi trường giàu có thể ức chế sự sinh trưởng có thể là bằng cách can thiệp con đường folat hóa. Chất thử nghiệm là chất chiết nấm men (YE) có mặt trong môi trường LB và DSM với nồng độ tương ứng là 5 mg/ml và 2 mg/ml và không có mặt trong môi trường SMM. YE đã được chứng minh là ức chế thể đột biến thymin của các chủng *E. coli* mà ở đó thành phần vi khuẩn có hoạt tính đã được xác định là adenosin (tài liệu 40). Khả năng thứ hai là axit *p*-aminobenzoic (tài liệu 41), thành phần của YE và tham gia trực tiếp vào con đường folat hóa (**Fig.14**) nhưng cũng là chất diệt khuẩn đối với *E. coli* (tài liệu 42).

Các tác giả sáng chế đã để các chủng (*thy*⁺ và *thyA thyB*) phát triển trong môi trường LB + thymin với nồng độ YE thay đổi và đã phát hiện được rằng nồng độ YE ≥ 2 mg/ml ức chế sự sinh trưởng của các chủng có hai sự chèn gen (*thyA + thyB*) (**Fig.17**). Do đó, hoạt tính ức chế của YE có thể giải thích việc chủng mang hai sự chèn gen *thyA thyB* không sinh trưởng trong môi trường LB với sự có mặt của thymin (**Fig.5A**). Tương tự, trong môi trường DSM với sự có mặt của YE ở nồng độ thấp hơn,

quan sát được sự sinh trưởng giảm đi (Fig.5C). Cuối cùng, tác dụng ức chế của YE là cần thiết cho môi trường sinh trưởng được cải biến (SOC2) không chứa YE để tạo ra các tế bào dùng cho bước gây xung điện được sử dụng trong khi tạo cấu trúc của chủng (xem phần phương pháp). Bất ngờ là mặc dù YE có tác dụng ức chế rõ ràng, các tác giả sáng chế không thể cho rằng điều này rõ ràng là do adenosin hoặc axit *p*-amnobenzoic (số liệu không được thể hiện).

b) Chuyển gen

Như đã nêu trên đây, phương pháp biến nạp tế bào khả biến qua trung gian ADN có thể được sử dụng để đưa ADN plasmit vào các tế bào *B. subtilis*. Tuy nhiên, để đưa ADN vào các tế bào *thyA* trong bước thứ hai, phương pháp gây xung điện sử dụng môi trường được cải biến không có mặt YE tạo ra tần suất dính gần cao hơn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng sau khi lai di truyền lần thứ nhất, hai typ khuẩn lạc, với tỷ lệ bằng nhau, xuất hiện trên thạch SMM được bổ sung thymine và trimethoprim (3 µg/ml) (Fig.18). Typ 1 là các khuẩn lạc mờ, có kích thước lớn (2-3mm) và các khuẩn lạc typ 2 là loại trong mờ, có kích thước nhỏ hơn (1mm) và sinh trưởng chậm. Tất cả các khuẩn lạc có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 46°C với sự có mặt của thymine cho thấy rõ ràng sự chèn gen *thyA*. Tuy nhiên, chỉ phát hiện được khoảng một phần ba khuẩn lạc typ 1 bằng cách sử dụng phản ứng PCR là mang sự chèn gen *thyA* ổn định trong khi không có khuẩn lạc typ 2 nào có sự chèn gen. Các tác giả sáng chế cho rằng các khuẩn lạc có khả năng sinh trưởng trên các đĩa trimethoprim này phải mang một số dạng đột biến bổ sung, vẫn không ổn định để cho phép sinh trưởng với sự có mặt của chất kháng sinh.

Phát hiện quan trọng thứ hai là phát hiện đối với các thể tái tổ hợp vận chuyển di truyền lần thứ hai chỉ có thể được chọn lọc trên môi trường tối thiểu SMM được bổ sung thymine, trimethoprim (6 µg/ml) và CAA. Nếu được đàn mỏng trực tiếp lên thạch mà không có mặt một lượng nhỏ CAA (<1mm), các khuẩn lạc sinh trưởng chậm sẽ được tạo ra nhưng sau khi nuôi cấy lại, các khuẩn lạc này được phát hiện là bị mất sự chèn gen *thyB* khi được xác định bằng phương pháp PCR đối với khuẩn lạc. Ngay cả khi có mặt CAA, tất cả các khuẩn lạc đều có kích thước nhỏ và chỉ khoảng 20% trong số chúng sinh trưởng trên trimethoprim (6 µg/ml) có sự chèn gen *thyB* ổn định. Tiến hành thử nghiệm với *E. coli* cũng như *B. subtilis* đã cho thấy rằng sự gián đoạn của con đường folat hóa có thể dẫn đến sự cạn kiệt các axit amin quan trọng cũng như các

purin và pyrimidin (tài liệu 43, 44). Sự bất hoạt DHFR qua trung gian trimethoprim sẽ làm cạn kiệt nồng độ THF, MTHF cũng như DHF trong tế bào. Điều này sẽ lại ảnh hưởng đến sự biến đổi qua lại thuận nghịch của serin và glyxin với axit tetrahydrofolic (THF), phản ứng quan trọng trong quá trình tổng hợp purin và được xúc tác bởi serin hydroxymethyltransferaza (SHMT hoặc GlyA (tài liệu 45, 46)). MTHF cũng được sử dụng trong bước cuối cùng của các con đường sinh tổng hợp xystein và methionin (tài liệu 47) và sự gián đoạn của con đường này bởi các alen *thyA thyB* có thể đưa ra yêu cầu về methionin.

Các tác giả sáng chế đã xác định mức độ sinh trưởng của chủng SH14 có sự chèn gen *thyA thyB* trong môi trường SMM được bổ sung CAA, adenin và thymine (Fig.19). Với sự có mặt của trimethoprim (6 µg/ml), sự sinh trưởng đạt mức tối ưu hóa với OD₆₀₀ tối đa bằng ~2 chỉ trong môi trường SMM chứa CAA trong khi trong các môi trường không chứa CAA hoặc chỉ chứa adenin và/hoặc thymine, mức độ sinh trưởng bị giảm đáng kể. Khi không có mặt trimethoprim, sự sinh trưởng của SH14 vẫn yếu so với chủng PY79 kiểu dại nhưng i) cao hơn so với sự sinh trưởng khi có mặt chất kháng sinh, ii) sự sinh trưởng được khôi phục đến tính thích ứng bình thường chỉ khi có mặt CAA. Do đó, trimethoprim làm gián đoạn con đường folat hóa làm giảm đáng kể tính thích ứng của chủng và điều này không thể khôi phục được bằng cách bổ sung purin hoặc pyrimidin mà chỉ với CAA.

Do đó, đối với bước vận chuyển di truyền thứ hai (nghĩa là để tạo cấu trúc của sự chèn gen kép *thyA thyB*), tốt hơn là môi trường chọn lọc có thể cung cấp tất cả các axit amin. Tuy nhiên, khi được tạo cấu trúc, không cần phải sử dụng trimethoprim nữa và các chủng có thể được nuôi cấy trên môi trường bất kỳ miễn là ba tiêu chí được đáp ứng, tiêu chí thứ nhất là môi trường này chứa thymine hoặc thymidine, tiêu chí thứ hai là YE không có mặt hoặc có mặt với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, và tiêu chí thứ ba là các axit amin được cung cấp trong môi trường sinh trưởng.

c) Lựa chọn một thành phần gắn protein vỏ

Để biểu hiện các protein khác loài trên bề mặt của bào tử, các protein vỏ CotB và CotC có thể được sử dụng cho cả sự biểu hiện hóa trị một hoặc hóa trị hai. Như dự đoán, khi sử dụng hai thành phần gắn vỏ bào tử khác nhau, sự biểu hiện của protein là cao hơn so với khi sử dụng sự biểu hiện từ chỉ một thành phần này. Vì thế, như được thể hiện trên Fig.4A, nồng độ TcdA₂₆₋₃₉ cao hơn trong các bào tử SH14 có sự chèn gen

thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ và *thyB::cotC-tcdA₂₆₋₃₉* so với trong các bào tử SH13 chỉ có một sự chèn gen *thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉*. Bất ngờ là việc sử dụng sự dung hợp của VP28 với CotB và sự chèn gen của thể khảm này ở locus *thyA* một mình (chủng AC01) hoặc ở cả hai locus *thyA* và *thyB* (chủng AC02) dẫn đến mức độ biểu hiện cao hơn trong trường hợp có sự chèn gen ở cả hai locus. Phát hiện này cần phải xem xét ở mức độ nhất định do phải giả định rằng mỗi bào tử sẽ mang số lượng monome CotB xác định để có thể lắp ráp trên bề mặt của bào tử và việc chỉ làm tăng số lượng sẽ không dẫn đến mức độ đưa vào cao hơn trong lớp vỏ. Tuy nhiên, các chủng này mang gen *cotB* nguyên vẹn (cư trú ở locus nhiễm sắc thể bình thường của nó), vì thế trong các tế bào có sự chèn gen *thyA::cotB-VP28* (nghĩa là AC01) 50% protein CotB được biểu hiện sẽ có mặt CotB kiểu dại và 50% CotB-VP28. Trong các chủng có sự chèn gen kép *thyA thyB* (AC02), các tác giả sáng chế sẽ dự đoán ~ 66% protein CotB được biểu hiện sẽ có mặt VP28 và ~33% CotB kiểu dại. Tỷ lệ theo hệ số tỷ lệ này của CotB-VP28 và CotB sẽ phù hợp với kết quả phát hiện VP28 bằng thử nghiệm ELISA như được thể hiện trên **Fig.4B**.

Ví dụ 3

Sự hồi biến

Sự chèn gen được tạo ra bằng sự kiện tái tổ hợp chéo-kép cần có sự ổn định vốn có nhưng vẫn có khả năng thu được gen ức chế bổ sung hoặc sự đột biến phụ. Để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế đã tiến hành thử nghiệm để xác định xem khi nuôi cấy lặp lại mà không có áp lực chọn lọc bất kỳ, sự phụ thuộc thymin có thể mất đi hay không. Như được thể hiện trong **Bảng 2**, môi trường nuôi cấy lặp lại và sự nuôi cấy lại của chủng SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyA::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) không làm mất đi sự phụ thuộc thymin, điều này cho thấy sự chèn gen có tính ổn định và gợi ý rằng sự thu được đột biến bổ sung, nếu chúng xuất hiện, phải là sự kiện rất hiếm.

Bảng 2: Sự hồi biến¹

Môi trường nuôi cấy	CFU trong môi trường nuôi cấy 1		CFU trong môi trường nuôi cấy 2	
	DSM + thymin	DSM	DSM + thymin	DSM
Lần thứ 1	$2,8 \times 10^8$	0	$2,1 \times 10^8$	0
Lần thứ 2	$1,8 \times 10^8$	0	$3,4 \times 10^8$	0
Lần thứ 3	$1,85 \times 10^8$	0	$1,73 \times 10^8$	0
Lần thứ 4	$1,82 \times 10^8$	0	$1,6 \times 10^8$	0
Lần thứ 5	$1,54 \times 10^8$	0	$2,4 \times 10^8$	0

¹ Hai môi trường nuôi cấy 25ml SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyA::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) được tạo ra trong DSM + thymin (50 µg/ml). Môi trường nuôi cấy này được sinh trưởng trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và mẫu được phân tích về CFU trên aga DSM khi có mặt hoặc không có mặt thymin (50 µg/ml). Mẫu cũng được dùng để cấy chuyển vào môi trường mới (25ml) và quá trình này được lặp lại bốn lần. Số lượng CFU/ml đối với mỗi lần nuôi cấy lại được thể hiện.

Ví dụ 4

Số phận của các bào tử *thyA⁻ thyB⁻* trong đường dạ dày ruột (GI) *in vivo*

Đã chứng minh được rằng vi khuẩn *E. coli* tạo khuẩn lạc ở đường GI của chuột, sự tổng hợp purin và pyrimidin là cần thiết (tài liệu 48). Điều này có nghĩa là nồng độ purin và pyrimidin thấp có thể là do thức ăn được tiêu hóa hoặc do sự phân giải giả của khu hệ vi sinh vật cư trú ở ruột sẽ không đủ để cho phép thể đột biến *thyA thyB* của *B. subtilis* sinh trưởng. Ở người, nồng độ thymidin trong ruột ước tính được bằng 0,075µM và ở lợn bằng ~1,0µM (tài liệu 49). Các tác giả sáng chế cho chuột sử dụng qua đường miệng liều đơn 2×10^9 bào tử SH250 (*thyA⁺ thyB⁺ Cm^R*) hoặc các bào tử SH14 (*thyA::cotB-tcdA₂₆₋₃₉ thyA::cotC-tcdA₂₆₋₃₉*) bằng ống xông vào dạ dày. Sau đó, các bào tử chịu nhiệt trong phân mới được bài tiết tách được được xác định. Đối với SH250, chủng mang sự chèn câm của gen *cat* (chloramphenicol axetyltransferaza) nên sau khi pha loãng theo bậc, CFU chịu nhiệt được xác định trên các đĩa chloramphenicol. Các bào tử SH14 tách được trong phân và chỉ có thể được phát hiện trên các đĩa thạch được bổ sung thymin nhưng khi được đàn mỏng trên các đĩa không

chứa thymin, không thể phát hiện được CFU (Fig.6). Sau 10 ngày, số lượng bào tử SH14 tách được trong phân ở mức ngưỡng phát hiện ($<10^3$ /g phân). Số liệu *in vivo* này cho thấy rằng đặc tính động học của các bào tử *thyA⁻ thyB⁻* tách được bào tử không khác biệt so với khi tách các bào tử của chủng kiểu dại. Các tác giả sáng chế đã khẳng định được rằng các bào tử SH14 nảy mầm hữu hiệu và tương đương với các bào tử kiểu dại (số liệu không được thể hiện). Mặc dù không thể xác định rõ ràng việc các bào tử SH14 có thể tăng sinh trong đường GI hay không, có thể chứng minh được rằng các bào tử *thyA thyB* đi qua đường GI không thể còn sống khi không có mặt thymin. Ngoài ra, không có bằng chứng về sự hồi biến hoặc thu được các dấu hiệu cho thấy các bào tử đã nảy mầm có thể còn sống.

Ví dụ 5

Tính hữu dụng của sự biểu hiện bào tử

Các tác giả sáng chế đã sử dụng ba ví dụ để chứng minh rằng các bào tử có sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB* là thích hợp cho các mục đích sử dụng, làm chất dẫn thuốc giải phóng vacxin, dùng để liên hợp các protein với bề mặt bào tử và cuối cùng để biểu hiện các enzym có hoạt tính. Để làm vacxin, các tác giả sáng chế sử dụng các bào tử SH14 để biểu hiện kháng nguyên TcdA₂₆₋₃₉ của *C. difficile* được dung hợp với hai thành phần gắn protein vỏ của bào tử là CotB và CotC. SH14 tương đương với chủng PP108 đã được chứng minh là tạo ra sự bảo vệ cho bệnh nhiễm *C. difficile* (CDI) trong mô hình nhiễm khuẩn ở chuột và chuột đồng (tài liệu 4, 38). Các tác giả sáng chế đã gây miễn dịch cho chuột bằng các bào tử SH14 và PP108 bằng cách sử dụng qua đường miệng và sau tổng cộng bốn liều, xác định nồng độ tương ứng của IgG đặc hiệu TcdA₂₆₋₃₉ (Fig.7A) và IgA (Fig.7B) trong huyết thanh và phân. So với các nhóm đối chứng (động vật chưa quen thí nghiệm và chuột nhắt được cho sử dụng liều với các bào tử PY79 trần) không có đáp ứng, cả bào tử PP108 và SH14 đều tạo ra IgG và IgA với chuẩn độ cao và dựa trên kết quả thu được trước đó, các tác giả sáng chế sẽ dự đoán các nồng độ này của kháng thể sẽ có tác dụng bảo vệ.

Để liên hợp các protein với streptavidin được biểu hiện trên bề mặt bào tử, trước tiên, các tác giả sáng chế biotinyl hóa kháng thể đa dòng đặc hiệu TcdA₂₆₋₃₉ của thỏ và đã chứng minh được rằng kháng thể này được liên hợp với các bào tử SH16 bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện huỳnh quang miễn dịch (Fig.8A) và cũng khẳng định được bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đối với bào tử nguyên (không

được thể hiện). Bằng cách sử dụng các bào tử đã liên hợp này, các tác giả sáng chế đã đánh giá xem các bào tử SH16 biểu hiện IgG TcdA₂₆₋₃₉ có thể loại trừ độc tố *C. difficile* ra khỏi dịch tan không chứa tế bào dạng thô hay không. Như được thể hiện trong **Bảng 3**, việc ủ các bào tử đã liên hợp với dịch tan chứa độc tố chỉ trong 5 phút làm giảm độc tính 90%. Bất ngờ là các bào tử PY79 cũng có khả năng nhất định trong việc gắn kết các kháng thể TcdA₂₆₋₃₉ và có thể làm giảm hoạt tính của độc tố ở mức vừa phải (10-20%). Thử nghiệm này được sử dụng làm ví dụ để chứng minh rằng các bào tử có thể có tiềm năng cho mục đích điều trị, ví dụ, trong việc sử dụng các kháng thể qua đường miệng.

Bảng 3: loại trừ độc tố của *C. difficile*¹

Hỗn hợp	Tính gây độc tế bào (%)
Chỉ có môi trường	0
Chỉ có độc tố	100
Các bào tử được xử lý bằng PY79 + độc tố	80-90
Các bào tử liên hợp với SH16 + độc tố	10

¹Độc tính tế bào ở các tế bào HT29 được xác định bằng cách sử dụng độc tố dạng thô thu được từ *C. difficile* hoặc từ cùng độc tố này đã được xử lý sơ bộ bằng các bào tử SH16 được liên hợp với kháng thể đa dòng với các bào tử được xử lý bằng TcdA₂₆₋₃₉ hoặc PY79.

Các enzym thường được đưa vào thức ăn cho động vật mà ở đó chúng cải thiện sự tiêu hóa và dinh dưỡng. Các enzym proteaza và amylaza là các ví dụ thích hợp được sử dụng ở đây để chứng minh rằng có thể biểu hiện enzym trong khi vẫn duy trì hoạt tính trên bề mặt của bào tử. Các bào tử SH18 biểu hiện amylaza được phát hiện là có thể biểu hiện amylaza có hoạt tính trên bề mặt của chúng (**Fig.8B**). Bằng cách sử dụng thạch casein này, các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng các bào tử SH20 biểu hiện proteaza kiềm, subtilisin E, mang hoạt tính của enzym (**Fig.8B**). Trong hỗn dịch lỏng, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng 10¹⁰ bào tử SH20 có ~0,127 đơn vị hoạt tính của proteaza.

Tóm tắt các ví dụ từ 1 đến 5

Các tác giả sáng chế đã mô tả phương pháp đơn giản để thu được các bào tử vi khuẩn được cải biến di truyền. Phương pháp theo sáng chế phát triển các vi khuẩn

nhưng khác với các phương pháp được mô tả đối với vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* (tài liệu 51) và *Lactococcus lactis* (Steidler *et al.*, 2003) dựa vào sự tự sát tại chỗ do ‘chết vì không có thymine’. Trong phương pháp thứ nhất được mô tả vào năm 1954 (tài liệu 23), sự phụ thuộc thymine khác với các sinh vật tự dưỡng khác ở chỗ không có mặt của thymine là chất diệt khuẩn và vì thế các vi khuẩn mang khiếm khuyết về gen thymidylat synthase không thể tích tụ trong môi trường này. Các loài *Bacillus* mang hai gen thymidylat synthase (*thyA* và *thyB*) cần có sự bất hoạt của cả hai locus để đạt được sự phụ thuộc hoàn toàn vào thymine. Các tác giả sáng chế đã chứng minh ở đây rằng điều này có thể thực hiện và đã xác định được quy trình tách dòng gồm hai bước cần có sự bất hoạt chèn gen ở locus *thyA* và sau đó là locus *thyB*. Phương pháp nêu trên không cần đưa các gen đánh dấu kháng kháng sinh vào để chọn lọc mà đúng hơn là phát triển mức độ kháng với trimethoprim tăng lên do sự gián đoạn liên tục của con đường folat hóa. Kết hợp với kiểu hình nhạy nhiệt của sự chèn gen ở locus *thyA* và *thyB*, điều này tạo ra phương pháp hữu ích cho cả việc chọn lọc và sàng lọc sự chèn gen, mặc dù về mặt kỹ thuật, có nhiều hạn chế cần được xem xét. Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng sự không có mặt của thymine là chất diệt khuẩn và không quan sát thấy bằng chứng về sự hồi biến hoặc ức chế mặc dù cấy chuyển nhiều lần các chủng này. Tất nhiên là mục đích của hệ tách dòng là để tạo cấu trúc các chủng để có thể biểu hiện các protein dùng cho các mục đích ứng dụng, ví dụ, để biểu hiện các kháng nguyên khác loài hoặc enzym. Các tác giả sáng chế đã sử dụng các ví dụ ở đây để chứng minh rằng các protein thể khảm gồm protein ngoại lai được dung hợp với protein vỏ của bào tử có thể được biểu hiện trên bề mặt của bào tử. Điều này cũng bao gồm việc cung cấp hai enzym (subtilisin E và α -amylase), các kháng nguyên bảo vệ vắc xin giả định cũng như streptavidin được sử dụng để liên hợp với kháng thể đơn dòng. Tuy nhiên, rõ ràng là hệ thống này cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các protein trong tế bào sinh dưỡng hoặc sự tiết ra từ tế bào này.

Tài liệu tham khảo

1. Nicholson WJ, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:548-572.
2. Pan JG, Kim EJ, Yun CH. 2012. *Bacillus* spore display. *Trends Biotechnol* 30:610-612.
3. Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. 2003. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infection and Immunity* 71:2810-2818.
4. Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang JM, Cook J, Fairweather NF, Cutting SM. 2011. Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infection and immunity* 79:2295-2302.
5. Lee S, Belitsky BR, Brinker JP, Kerstein KO, Brown DW, Clements JD, Keusch GT, Tzipori S, Sonenshein AL, Herrmann JE. 2010. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17:1647-1655.
6. Fu LL, Li WF, Du HH, Dai W, Xu ZR. 2008. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. *Lett Appl Microbiol* 46:581-586.
7. Nguyen AT, Pham CK, Pham HT, Pham HL, Nguyen AH, Dang LT, Huynh HA, Cutting SM, Phan TN. 2014. *Bacillus subtilis* spores expressing the VP28 antigen: a potential oral treatment to protect *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome. *FEMS Microbiol Lett* 358:202-208.
8. Ning D, Leng X, Li Q, Xu W. 2011. Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *Journal of applied microbiology* 111:1327-1336.
9. Valdez A, Yepiz-Plascencia G, Ricca E, Olmos J. 2014. First *Litopenaeus vannamei* WSSV 100% oral vaccination protection using CotC::Vp26 fusion protein displayed on *Bacillus subtilis* spores surface. *J Appl Microbiol* doi:10.1111/jam.12550.
10. EFSA. 2008. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA Journal* 923:1-48.
11. Hong HA, Duc le H, Cutting SM. 2005. The use of bacterial spore formers as

probiotics. FEMS Microbiol Rev 29:813-835.

12. Amalaradjou MA, Bhunia AK. 2013. Bioengineered probiotics, a strategic approach to control enteric infections. Bioengineered 4:379-387.
13. Sorokulova IB, Beliavskaia VA, Masycheva VA, Smirnov VV. 1997. Recombinant probiotics: problems and prospects of their use for medicine and veterinary practice. Vestn Ross Akad Med Nauk:46-49.
14. Potot S, Serra CR, Henriques AO, Schyns G. 2010. Display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores, using a coat-associated enzyme as the carrier. Appl Environ Microbiol 76:5926-5933.
15. Nguyen VA, Huynh HA, Hoang TV, Ninh NT, Pham AT, Nguyen HA, Phan TN, Cutting SM. 2013. Killed *Bacillus subtilis* spores expressing streptavidin: a novel carrier of drugs to target cancer cells. J Drug Target 21:528-541.
16. Shimotsu H, Henner DJ. 1986. Construction of a single copy integration vector and its use in analysis of regulation of the trp operon of *Bacillus subtilis*. Gene 43:85-94.
17. Guerout-Fleury AM, Frandsen N, Stragier P. 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. Gene 180:57-61.
18. Bloor AE, Cranenburgh RM. 2006. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. Appl Environ Microbiol 72:2520-2525.
19. Iwanicki A, Piatek I, Stasilojc M, Grela A, Lega T, Obuchowski M, Hinc K. 2014. A system of vectors for *Bacillus subtilis* spore surface display. Microb Cell Fact 13:30.
20. Cano RJ, Borucki M. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. Science 268:1060-1064.
21. Nicholson WL. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Sciences 59:410-416.
22. Mauriello EM, Cangiano G, Maurano F, Saggese V, De Felice M, Rossi M, Ricca E. 2007. Germination-independent induction of cellular immune response by *Bacillus subtilis* spores displaying the C fragment of the tetanus toxin. Vaccine 25:788-793.
23. Cohen SS, Barner HD. 1954. Studies on Unbalanced Growth in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 40:885-893.
24. Goulian M, Bleile BM, Dickey LM, Grafstrom RH, Ingraham HA, Neynaber SA, Peterson MS, Tseng BY. 1986. Mechanism of thymineless death. Adv Exp Med Biol

195 Pt B:89-95.

25. Ahmad SI, Kirk SH, Eisenstark A. 1998. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* 52:591-625.
26. Rolfe R. 1967. On the mechanism of thymineless death in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:114-121.
27. Neuhaud J, Price AR, Schack L, Thomassen E. 1978. Two thymidylate synthetases in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1194-1198.
28. Zeigler DR, Pragai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins JB. 2008. The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. *Journal of Bacteriology* 190:6983-6995.
29. Harwood CR, Cutting SM. 1990. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
30. Nicholson WL, Setlow P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth., p 391-450. In Harwood. CR, Cutting. SM (ed), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
31. Ikemura H, Takagi H, Inouye M. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262:7859-7864.
32. Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. 2010. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:279-287.
33. Dubnau D, Davidoff-Abelson R. 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *Journal of Molecular Biology* 56:209-221.
34. Cutting SM, Vander-Horn PB. 1990. Genetic Analysis, p 27-74. In Harwood CR, Cutting SM (ed), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
35. Sun QY, Ding LW, He LL, Sun YB, Shao JL, Luo M, Xu ZF. 2009. Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. *Anal Biochem* 394:144-146.
36. Permpoonpattana P, Phetcharaburanin J, Mikelson A, Dembek M, Tan S, Brisson MC, La Ragione R, Brisson AR, Fairweather N, Hong HA, Cutting SM. 2013. Functional Characterization of *Clostridium difficile* Spore Coat Proteins. *J Bacteriol*

195:1492-1503.

37. Harwood CR, Coxon RD, Hancock IC. 1990. The *Bacillus* cell envelope and secretion, p 327-390. In Harwood CR, Cutting SM (ed), Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester.
38. Hong HA, Hitri K, Hosseini S, Kotowicz N, Bryan D, Mawas F, Wilkinson AJ, van Broekhoven A, Kearsley J, Cutting SM. 2017. Mucosal Antibodies to the C-terminus of Toxin A Prevent Colonization of *Clostridium difficile* Infection and Immunity 85.
39. Walsh GA, Power RF, Headon DR. 1993. Enzymes in the animal-feed industry. Trends Biotechnol 11:424-430.
40. Kinoshita N, Akiyoshi H, Endo H. 1969. Isolation and characterization of substance in yeast extract which inhibits growth of thymine-less strains of *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 59:393-400.
41. Blanchard KC. 1941. The isolation of p-aminobenzoic acid from yeast. The Journal of Biological Chemistry 140:919-926.
42. Davis BD. 1951. Inhibition of *Escherichia coli* by p-aminobenzoic acid and its reversal by p-hydroxybenzoic acid. J Exp Med 94:243-254.
43. Amyes SG, Smith JT. 1974. Trimethoprim action and its analogy with thymine starvation. Antimicrob Agents Chemother 5:169-178.
44. Stepanek JJ, Schakermann S, Wenzel M, Prochnow P, Bandow JE. 2016. Purine biosynthesis is the bottleneck in trimethoprim-treated *Bacillus subtilis*. Proteomics Clin Appl 10:1036-1048.
45. Schirch L. 1982. Serine hydroxymethyltransferase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 53:83-112.
46. Ponce-de-Leon MM, Pizer LI. 1972. Serine biosynthesis and its regulation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 110:895-904.
47. Ferla MP, Patrick WM. 2014. Bacterial methionine biosynthesis. Microbiology 160:1571-1584.
48. Vogel-Scheel J, Alpert C, Engst W, Loh G, Blaut M. 2010. Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 76:5181-5187.
49. Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox

- E, Remon JP, Remaut E. 2003. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21:785-789.
50. Yan S, Wu G. 2017. Bottleneck in secretion of alpha-amylase in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 16:124.
51. Fu X, Xu JG. 2000. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker. *Microbiol Immunol* 44:551-556.
52. CLSI. 2010. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline – Second Ed M45-A2. Institute CaLS, USA.
53. Barra-Carrasco, J., V. Olguin-Araneda, A. Plaza-Garrido, C. Miranda-Cardenas, G. Cofre-Araneda, M. Pizarro-Guajardo, M.R. Sarker & D. Paredes-Sabja, (2013) The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J Bacteriol* 195: 3863-3875.
54. Permpoonpattana, P., E.H. Tolls, R. Nadem, S. Tan, A. Brisson & S.M. Cutting, (2011b) Surface layers of *Clostridium difficile* endospores. *J Bacteriol* 193: 6461-6470.
55. Phetcharaburanin, J., H.A. Hong, C. Colenutt, I. Bianconi, L. Sempere, P. Permpoonpattana, K. Smith, M. Dembek, S. Tan, M.C. Brisson, A.R. Brisson, N.F. Fairweather & S.M. Cutting, (2014) The spore-associated protein BclA1 affects the susceptibility of animals to colonization and infection by *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 92: 1025-1038.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình đưa ít nhất một gen khác loài vào **Bacillus Spp** và làm cho *Bacillus Spp.* này không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymin hoặc thymidin, quy trình này bao gồm các bước:

(a)

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* và gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*; và
- (ii) để *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim; hoặc

(b)

- (i) đưa gen khác loài vào gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*;
- (ii) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim;

(iii) đưa gen khác loài vào gen còn lại trong số gen *thyA* hoặc gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên; và

(iv) để vi khuẩn *Bacillus Spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim, trong đó quy trình này được tiến hành mà không đưa gen kháng kháng sinh vào.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó *Bacillus Spp.* là *B. subtilis*.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong bước b:

bước (i) là bước đưa gen khác loài vào gen *thyA* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*; và

bước (iii) là bước đưa gen khác loài vào gen *thyB* trong vi khuẩn *Bacillus Spp.*

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó:

trong suốt bước (ii), *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường chứa chất chiết nấm men (yeast extract: YE) với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,0001 mg/ml, hoặc 0 mg/ml, tốt hơn là môi trường trong đó *Bacillus Spp.* được sinh trưởng không chứa YE.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1, 2 hoặc 3, trong đó trong bước (b):

trong suốt bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường chứa chất chiết nấm men (YE) với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,0001 mg/ml, hoặc 0 mg/ml, tốt hơn là môi trường trong đó vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng không chứa YE.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

trong suốt bước (ii), *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường chứa thymine hoặc thymidine.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3 hoặc 5, trong đó trong bước b:

trong suốt bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường chứa thymine hoặc thymidine.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3, 5 hoặc 7, trong đó:

lượng trimethoprim có mặt trong bước (iv) cao hơn lượng trimethoprim có mặt trong bước (ii).

9. Quy trình theo điểm 3, trong đó các tế bào có sự chèn gen ở locus *thyA* được xác định theo khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C khi có mặt hoặc không có mặt thymine hoặc thymidine nhưng không có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 46°C trừ khi được bổ sung thymine hoặc thymidine.

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

YE có mặt với nồng độ nhỏ hơn 2 mg/ml, hoặc tốt hơn là không có mặt, trong môi trường được sử dụng ở giai đoạn bất kỳ của quy trình này.

11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 3, 5, 7 hoặc 8 trong đó:

trong bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường có bổ sung ít nhất một axit amin.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó:

trong bước (iv), vi khuẩn *Bacillus Spp.* được sinh trưởng trong môi trường chứa axit casamino (casamino acid: CAA).

13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

các tế bào có hai sự chèn gen được xác định theo khả năng không sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C hoặc 46°C trừ khi được bổ sung thymine hoặc thymidine.

14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quy trình này được tiến hành mà không đưa gen kháng kháng sinh vào.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quy trình còn bao gồm bước:

tạo ra bào tử vi khuẩn từ vi khuẩn tạo bào tử nêu trên.

16. Bào tử vi khuẩn thu được hoặc có thể thu được bằng quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

17. Bào tử vi khuẩn theo điểm 16, trong đó bào tử vi khuẩn là *Bacillus spp.* và chứa các gen *thyA* và *thyB* không chức năng, tốt hơn là do việc đưa các gen khác loài vào.

18. Bào tử vi khuẩn chứa ít nhất một gen khác loài và không có khả năng tăng sinh khi không có mặt thymine hoặc thymidine, trong đó bào tử vi khuẩn này được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước:

(i) đưa gen khác loài vào các gen *thyA* và *thyB* trong *Bacillus spp.*;

(ii) để *Bacillus spp.* nêu trên sinh trưởng với sự có mặt của trimethoprim; và

(iii) tạo ra bào tử vi khuẩn từ *Bacillus spp.* nêu trên,

trong đó bào tử vi khuẩn không bao gồm gen kháng kháng sinh.

19. Bào tử vi khuẩn theo điểm 18, trong đó bào tử vi khuẩn này được tạo ra bằng quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

20. Vector để sử dụng trong quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó vector này chứa ít nhất một phần của phần đầu 5' của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần của phần đầu 3' của gen *thyA* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, và còn chứa ít nhất một phần của phần đầu 5' của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*, gen khác loài, và ít nhất một phần của phần đầu 3' của gen *thyB* của vi khuẩn *Bacillus Spp.*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Sporegen Limited

<120> Bào tử vi khuẩn được cải biến

<130> 78188PCT1

<160> 19

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 840

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

atgacgcaat tcgataaaca atacaattca attataaagg atattatcaa taatggaatc	60
tcagacgaag agtttgatgt aagaaccaag tgggactcag atggaacacc ggcacatact	120
ctaagtgtaa tcagtaagca aatgagattc gacaactcag aggttccgat tttaacgaca	180
aaaaaggttg cctggaaaac agccattaaa gagttgctct ggatttggca gctgaaatct	240
aatgatgtta atgatttaaa catgatgggc gtccatattt gggatcagtg gaaacaagaa	300
gacggaacca tcggacatgc atatggattt cagctgggga agaaaaacag aagtctaaat	360
ggagaaaaag tggatcaggt agactatctt cttcatcaat tgaagaacaa tccatcttca	420
cgcagacaca ttacaatgct gtggaatcct gatgaattag acgcaatggc cttaacgcca	480
tgtgtatacg agacacaatg gtacgttaaa catgggaaac tccaccttga ggtaagagca	540
cggagcaatg atatggcatt gggaaatcca ttcaatgtat tccagtataa tgtgttgcag	600
cgcattgattg ctcaagtgc tggttatgag cttggtgaat atatctttaa cattggggat	660
tgccatgtgt acacacgtca tatagacaat ttgaaaattc aaatggaaag agaacagttt	720
gaagcacctg aactatggat caatcctgaa gtgaaagatt tttatgactt taccattgat	780
gatttcaagt taatcaacta taaacatggg gacaagcttt tatttgaggt agcgggttaa	840

<210> 2

<211> 795

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

atgaaacagt ataaggattt ctgcagacat gttttagagc atggtgagaa aaagggagac	60
---	----

cggactggga ccggaacaat cagcactttc ggatatcaaa tgagatttaa tttacgggaa 120
 ggctttccga tgctcaccac taaaaaactc cactttaaat caattgcgca tgaactgctg 180
 tggttcttaa aaggagatac gaatgtacgc tatctgcagg aaaacggagt gcgaatctgg 240
 aatgagtggg ctgatgaaaa cgggtgaactt ggacctgtat atggctccca atggcggttct 300
 tggcgggggag ctgatggaga aaccattgat caaatttccc gtcttattga agatattaaa 360
 acaaatccga actccagacg cttaatcgtc agcgccctgga atgttggtga aattgataaa 420
 atggcggttgc cgccgtgcca ttgcctgttc caattctatg tgtctgacgg caagctgtcc 480
 tgtcagctgt atcagcgctc tgccgatgtt ttcttaggtg tgccgtttaa tattgcatct 540
 tatgccctcc taaccatgat cattgctcat gtgactgggc ttgaaccggg cgagttcatc 600
 catacgtttg gtgatgttca tatttaccaa aatcatattg aacaagtcaa tttgcagctg 660
 gaaagagatg ttagaccgct tccgcagctt cgtttcgcca gaaagggtga ttctatTTTT 720
 aactttgcat ttgaggactt tatcatcgag gattatgatc cgcaccccca tataaaaggg 780
 gcggtcagcg tatga 795

<210> 3
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> nhánh trái của thyA

<400> 3
 cagatcatat aaggaatgaa ccgctgccaa atatcataaa aaagttgtta atgatcaaat 60
 gaatgaaatt agagagaatt tatttttaaag aaagcccaat tgcacatgga caaatgacaa 120
 ttgatattga ggtaaaatac aatgcattaa atcagaaaaa gctattggag gattttaatgt 180
 gtttagacaa tttccaattt ggtatacaca aacacctgac tatttgaatt tttatgtacc 240
 gcaatatcaa accatttcgt ataatcctca acaatgttat caacggtgta tgtaccaaac 300
 tggcggtaac tatgagctat gtgacagact atgttatgga gaaatacagg tgtaaaagag 360
 ggggattaac tcctctttaa acacacagtg agtgggaataa gatcctcact ttatctgcaa 420
 gtgcttagta tttgcgataa tattgcattc gtaataaatt atgcttagca actgaaaatg 480
 aaagaaggat atgaatagtc atgacgcaat tcgataaaca atacaattca attataaagg 540
 atattatcaa taatggaatc tcagacgaag agtttgatgt aagaaccaag tgggactcag 600

atggaacacc ggcacatact ctaagtgtaa tcagtaagca aatgagattc gacaactcag 660
 aggttccgat tttaacgaca aaaaagggtg cctggaaaac agccattaaa gagttgctct 720
 ggatttggca gctgaaatct aatgatgtta atgatttaaa catgatgggc gtccatattt 780
 gggatcagtg gaaacaagaa gacggaacca tcggacatgc atatggattt cagctgggga 840
 agaaaaacag aagtctaaat ggagaaaaag tggatcaggt agactatctt cttcatcaat 900

<210> 4
 <211> 950
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> nhánh phải của thyA

<400> 4
 tgaagaacaa tccatcttca cgcagacaca ttacaatgct gtggaatcct gatgaattag 60
 acgcaatggc cttaacgcca tgtgtatacg agacacaatg gtacgttaaa catgggaaac 120
 tccaccttga ggtaagagca cggagcaatg atatggcatt gggaaatcca ttcaatgtat 180
 tccagtataa tgtgttgcag cgcattgattg ctcaagtgc tggttatgag cttggtgaat 240
 atatctttaa cattggggat tgccatgtgt acacacgtca tatagacaat ttgaaaattc 300
 aaatggaaag agaacagttt gaagcacctg aactatggat caatcctgaa gtgaaagatt 360
 tttatgactt taccattgat gatttcaagt taatcaacta taaacatggg gacaagcttt 420
 tatttgaggt agcggtttaa tgctgccttt ttattgtgca gtgaatagat agcaggtatc 480
 ctaatttcat taagcaatct ggaagatgaa taaaaattga aggacaaaca cgtataatac 540
 ataaaaaga ttaactctac agttaatctt ttttattcag aagaaaatat cctaactttg 600
 aaactaaata caaagtaaaa gcaatcatta cagttctaga tattacaatt ccatgaatag 660
 ctagatcata tccagcaggt atcaacgcat ttgtattaca cataaaatat atagatatta 720
 gaagtgtac aataactaaa atcattccaa aaagacttgt tttttcatat ttcataccaa 780
 tttccaccct tattaaggtt aggttttaaac aaaagagctg aagaaacgaa ctatgaccag 840
 tatgctccaa ggaaaaccgc cagacaatgc tggcggcttt ttgctgcttc gtttatttat 900
 taacagagat cgtaacgtta tttcctgcaa ctgaaacctt tgcgaaatcc 950

<210> 5

<211> 59
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vị trí đã tách dòng

<400> 5
 agcttgcatg cctgcaggtc gactctagag gatcccccg ggtaccgag ctggaattc 59

<210> 6
 <211> 1910
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vector thyA

<400> 6
 cagatcatat aaggaatgaa ccgctgccaa atatcataaa aaagttgtta atgatcaaatt 60
 gaatgaaatt agagagaatt tatttttaaag aaagcccaat tgcacatgga caaatgacaa 120
 ttgatattga ggtaaaatac aatgcattaa atcagaaaaa gctattggag gatttaattgt 180
 gtttagacaa tttccaattt ggtatacaca aacacctgac tatttgaatt tttatgtacc 240
 gcaatatcaa accatttcgt ataatcctca acaatgttat caacggtgta tgtaccaaac 300
 tggcggtaac tatgagctat gtgacagact atgttatgga gaaatacagg tgtaaaagag 360
 ggggattaac tcctctttta acacacagtg agtggataa gatcctcact ttatctgcaa 420
 gtgcttagta tttgcgataa tattgcattc gtaataaatt atgcttagca actgaaaatg 480
 aaagaaggat atgaatagtc atgacgcaat tcgataaaca atacaattca attataaagg 540
 atattatcaa taatggaatc tcagacgaag agtttgatgt aagaaccaag tgggactcag 600
 atggaacacc ggcacatact ctaagtgtta tcagtaagca aatgagattc gacaactcag 660
 aggttccgat ttttaacgaca aaaaagggtg cctggaaaac agccattaaa gagttgctct 720
 ggatttggca gctgaaatct aatgatgtta atgatttaaa catgatgggc gtccatattt 780
 gggatcagtg gaaacaagaa gacggaacca tcggacatgc atatggattt cagctgggga 840
 agaaaaacag aagtctaaat ggagaaaaag tggatcaggt agactatctt cttcatcaat 900
 aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatccccg ggggtaccga gctcgaattc 960
 tgaagaacaa tccatcttca cgcagacaca ttacaatgct gtggaatcct gatgaattag 1020
 acgcaatggc cttaacgcca tgtgtatagc agacacaatg gtacgttaaa catgggaaac 1080

tccaccttga ggtaagagca cggagcaatg atatggcatt gggaaatcca ttcaatgtat 1140
 tccagtataa tgtgttgacag cgcatgattg ctcaagtgac tggttatgag cttggtgaat 1200
 atatctttta cattggggat tgccatgtgt acacacgtca tatagacaat ttgaaaattc 1260
 aaatggaaag agaacagttt gaagcacctg aactatggat caatcctgaa gtgaaagatt 1320
 tttatgactt taccattgat gatttcaagt taatcaacta taaacatggg gacaagcttt 1380
 tatttgaggt agcggtttaa tgctgccttt ttattgtgca gtgaatagat agcaggtatc 1440
 ctaatttcat taagcaatct ggaagatgaa taaaaattga aggacaaaca cgtataatac 1500
 ataaaaaaga ttaactctac agttaatctt ttttattcag aagaaaatat cctaactttg 1560
 aaactaaata caaagtaaaa gcaatcatta cagttctaga tattacaatt ccatgaatag 1620
 ctagatcata tccagcaggt atcaacgcat ttgtattaca cataaaatat atagatatta 1680
 gaagtgtac aataactaaa atcattccaa aaagacttgt tttttcatat ttcataccaa 1740
 tttccaccct tattaaagtt aggtttaaac aaaagagctg aagaaacgaa ctatgaccag 1800
 tatgtccaa ggaaaaccgc cagacaatgc tggcggcttt ttgctgcttc gtttatttat 1860
 taacagagat cgtaacgtta tttcctgcaa ctgaaacctt tgcgaaatcc 1910

<210> 7
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> nhánh trái của thyB

<400> 7
 ccaaactctgc cgctcagtggt ttgcatggag aatgtagaaa aagtcctgaa caaacgtgaa 60
 attattcatg ctgttttgac aggccttgca ctcgatcagc ttgcagaaca gaaacttctc 120
 cccgaaccgc tgcagcacct tgttgaaacg gatgaaccgc tttacggcat agatgaaatt 180
 atcccgtttt caatcgttaa tgtgtacggg tcgatcgggt tgaccaattt cggttatttg 240
 gataaagaga agattggaat tattaaggaa cttgatgaaa gtccagacgg tattcacacc 300
 tttttggatg atattgtggc agctcttgct gcagcagcgg cgagcagaat tgcacatacg 360
 catcaggatc tgcaagatga agaaaaagaa caggatgaaa agcctgtcgt cagctgacta 420
 taaaaaaatc atttctgggt tcagaaatga ttttttattg tgttacacta ctagaagact 480

acttttaaaag gatgaaaaaa atgaaacagt ataaggattt ctgcagacat gtttttagagc 540
 atggtgagaa aaaggagac cggactggga ccggaacaat cagcactttc ggatatcaaa 600
 tgagatttaa tttacgggaa ggctttccga tgctcaccac taaaaaactc cactttaaat 660
 caattgcgca tgaactgctg tggttcttaa aaggagatac gaatgtacgc tatctgcagg 720
 aaaacggagt gcgaatctgg aatgagtggg ctgatgaaaa cggatgaactt ggacctgtat 780
 atggctccca atggcgttct tggcggggag ctgatggaga aaccattgat caaatctccc 840
 gtcttattga agatattaaa acaaattccga actccagacg cttaatcgtc agcgcctgga 900

<210> 8

<211> 1095

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> nhánh phải của thyB

<400> 8

atgttggtga aattgataaa atggcgttgc cgccgtgcca ttgcctgttc caattctatg 60
 tgtctgacgg caagctgtcc tgtcagctgt atcagcgtc tgccgatgtt ttcttaggtg 120
 tgccgtttaa tattgcatct tatgccctcc taaccatgat cattgctcat gtgactgggc 180
 ttgaaccggg cgagttcatc catacgtttg gtgatgttca tatttaccaa aatcatattg 240
 aacaagtcaa tttgcagctg gaaagagatg ttagaccgct tccgcagctt cgtttcgcca 300
 gaaagggtga ttctatTTTT aactttgcat ttgaggactt tatcatcgag gattatgatc 360
 cgcacctca tataaaaggg gcggtcagcg tatgatttca ttcatTTTT cgatggatgc 420
 caacaggctt atcggcaaag acaatgattt gccgtggcat ttgccaatg atcttgcata 480
 cttaagaaa ataacatcgg gccattcaat cattatgggc cggaaaacat ttgaatcgat 540
 cggacgtccg cttccaaatc ggaaaaatat tgtcgttacc tcagcgccgg attcagaatt 600
 tcagggatgc acggttgtca gttcattaaa ggatgtactg gacatttggt caggccctga 660
 agaatgcttt gtgatcggag gggctcagct ctatacggac ctgttccctt atgcggacag 720
 actgtatatg acgaaaattc atcacgagtt tgaggggtgac cgtcactttc ctgaatttga 780
 tgaatccaat tggaagctgg tttcttctga gcaggggacc aaagacgaaa aaaaccgta 840
 tgattacgaa tttctaattg atgaaaaaaa gaaatcttct aaagcgggag gattttaatt 900
 ggttcgctac agccttctag tggtttatat tgtgtatatg ctgttaaaaa atatgaaaca 960

attattttaat caaacaatgc tcgatccccc tctgtcatac aaaaaacaga tggctcttgt 1020
 gtacgaacag ccaaaggcgt ttttagaagg ctgtatcggc atctccggtt cagttgtgac 1080
 gatccatcag ccaga 1095

<210> 9
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vị trí đa tách dòng

<400> 9
 aagcttgcac gcctgcaggt cgactctaga ggatcccccg ggggtaccga gctcgaattc 60
 tg 62

<210> 10
 <211> 2057
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vector thyB

<400> 10
 ccaaactctgc cgctcagtgt ttgcatggag aatgtagaaa aagtcctgaa caaacgtgaa 60
 attattcatg ctgttttgac aggccttgca ctcgatcagc ttgcagaaca gaaacttctc 120
 cccgaaccgc tgcagcacct tgttgaaacg gatgaaccgc tttacggcat agatgaaatt 180
 atcccgccttt caatcggtta tgtgtacggg tcgatcgggt tgaccaattt cggttatttg 240
 gataaagaga agattggaat tattaaggaa cttgatgaaa gtccagacgg tattcacacc 300
 tttttggatg atattgtggc agctcttgct gcagcagcgg cgagcagaat tgcacatacg 360
 catcaggatc tgcaagatga agaaaaagaa caggatgaaa agcctgtcgt cagctgacta 420
 taaaaaaatc atttctgggt tcagaaatga ttttttattg tgttacacta ctagaagact 480
 actttttaag gatgaaaaaa atgaaacagt ataaggattt ctgcagacat gtttttagagc 540
 atggtgagaa aaaggagac cggactggga ccggaacaat cagcactttc ggatatcaaa 600
 tgagatttaa tttacgggaa ggctttccga tgctcaccac taaaaaactc cacttttaaat 660
 caattgcgca tgaactgctg tggttcttaa aaggagatac gaatgtacgc tatctgcagg 720

```

aaaacggagt gcgaatctgg aatgagtggg ctgatgaaaa cggatgaactt ggacctgtat 780
atggctccca atggcgttct tggcggggag ctgatggaga aaccattgat caaatctccc 840
gtcttattga agatattaaa acaaatccga actccagacg cttaatcgtc agcgccctgga 900
aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatcccccg ggggtaccga gctcgaattc 960
tgatgttggt gaaattgata aaatggcggt gccgccgtgc cattgcctgt tccaattcta 1020
tgtgtctgac ggcaagctgt cctgtcagct gtatcagcgc tctgccgatg ttttcttagg 1080
tgtgcccgtt aatattgcat cttatgccct cctaaccatg atcattgctc atgtgactgg 1140
gcttgaaccg ggcgagttca tccatacggt tggatgatgt catatttacc aaaatcatat 1200
tgaacaagtc aatttgcagc tggaaagaga tgtagaccg cttccgcagc ttcgtttcgc 1260
cagaaagggt gattctatct ttaactttgc atttgaggac tttatcatcg aggattatga 1320
tccgcacct catataaaag gggcggtcag cgtatgattt cattcatttt tgcgatggat 1380
gccaacaggc ttatcggaag agacaatgat ttgccgtggc atttgcccga tgatcttgca 1440
tactttaaga aaataacatc gggccattca atcattatgg gccggaaaac atttgaatcg 1500
atcggacgtc cgcttccaaa tcggaaaaat attgtcgta cctcagcgcc ggattcagaa 1560
tttcagggat gcacggttgt cagttcatta aaggatgtac tggacatttg ttcaggccct 1620
gaagaatgct ttgtgatcgg aggggctcag ctctatacgg acctgttccc ttatgcggac 1680
agactgtata tgacgaaaat tcatcacgag tttgaggggt accgtcaact tctgaattt 1740
gatgaatcca attggaagct ggtttcttct gagcagggga ccaaagacga aaaaaacccg 1800
tatgattacg aatttctaata gtatgaaaaa aagaaatctt ctaaagcggg aggattttaa 1860
ttggttcgct acagccttct agtgggttat attgtgtata tgctgttaaa aaatatgaaa 1920
caattattta atcaaacaat gctcgatccc cgtctgtcat acaaaaaaca gatggctctt 1980
gtgtacgaac agccaaaggc gtttttagaa ggctgtatcg gcactccgg ttcagttgtg 2040
acgatccatc agccaga 2057

```

<210> 11
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CotC-VP26

<400> 11

Met Gly Tyr Tyr Lys Lys Tyr Lys Glu Glu Tyr Tyr Thr Val Lys Lys
 1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Lys Lys Tyr Tyr Glu Tyr Asp Lys Lys Asp Tyr Asp Cys
 20 25 30

Asp Tyr Asp Lys Lys Tyr Asp Asp Tyr Asp Lys Lys Tyr Tyr Asp His
 35 40 45

Asp Lys Lys Asp Tyr Asp Tyr Val Val Glu Tyr Lys Lys His Lys Lys
 50 55 60

His Tyr Lys Leu Met Glu Phe Gly Asn Leu Thr Asn Leu Asp Val Ala
 65 70 75 80

Ile Ile Ala Ile Leu Ser Ile Ala Ile Ile Ala Leu Ile Val Ile Met
 85 90 95

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

Asn Tyr Asp Gln Met Met Arg Val Pro Ile Gln Arg Arg Ala Lys Val
 115 120 125

Met Ser Ile Arg Gly Glu Arg Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Gly Lys Val
 130 135 140

Ala Met Lys Asn Gly Leu Ser Asp Lys Asp Met Lys Asp Val Ser Ala
 145 150 155 160

Asp Leu Val Ile Ser Thr Val Thr Ala Pro Arg Thr Asp Pro Ala Gly
 165 170 175

Thr Gly Ala Glu Asn Ser Asn Met Thr Leu Lys Ile Leu Asn Asn Thr
 180 185 190

Gly Val Asp Leu Leu Ile Asn Asp Ile Thr Val Arg Pro Thr Val Ile
 195 200 205

Ala Gly Asn Ile Lys Gly Asn Thr Met Ser Asn Thr Tyr Phe Ser Ser

210 215 220
 Lys Asp Ile Lys Ser Ser Ser Ser Lys Ile Thr Leu Ile Asp Val Cys
 225 230 235 240
 Ser Lys Phe Glu Asp Gly Ala Ala Phe Glu Ala Thr Met Asn Ile Gly
 245 250 255
 Phe Thr Ser Lys Asn Val Ile Asp Ile Lys Asp Glu Ile Lys Lys Lys
 260 265 270

 <210> 12
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CotB-VP28

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

Thr Asn Glu Asp Gly Val Val Tyr Phe Asn Ile His His Ile Lys Ser
 130 135 140

Ile Ser Lys His Glu Pro Asp Leu Lys Ile Glu Glu Gln Thr Pro Val
 145 150 155 160

Gly Val Leu Glu Ala Asp Asp Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser Leu Thr
 165 170 175

His Lys Trp Val Ser Ile Asn Arg Gly Gly Pro Glu Ala Ile Glu Gly
 180 185 190

Ile Leu Val Asp Asn Ala Asp Gly His Tyr Thr Ile Val Lys Asn Gln
 195 200 205

Glu Val Leu Arg Ile Tyr Pro Phe His Ile Lys Ser Ile Ser Leu Gly
 210 215 220

Pro Lys Gly Ser Tyr Lys Lys Glu Asp Gln Lys Asn Glu Gln Asn Gln
 225 230 235 240

Glu Asp Asn Asn Asp Lys Asp Ser Asn Ser Phe Ile Ser Ser Lys Ser
 245 250 255

Tyr Ser Ser Ser Lys Ser Ser Lys Arg Ser Leu Lys Ser Ser Asp Asp
 260 265 270

Gln Ser Ser Lys Leu Met Asp Leu Ser Phe Thr Leu Ser Val Val Ser
 275 280 285

Ala Ile Leu Ala Ile Thr Ala Val Ile Ala Val Phe Ile Val Ile Phe
 290 295 300

Arg Tyr His Asn Thr Val Thr Lys Thr Ile Glu Thr His Thr Gly Asn
 305 310 315 320

Ile Glu Thr Asn Met Asp Glu Asn Leu Arg Ile Pro Val Thr Ala Glu
 325 330 335

Val Gly Ser Gly Tyr Phe Lys Met Thr Asp Val Ser Phe Asp Ser Asp

340 345 350
 Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Asp Ala Gln Met
 355 360 365
 Lys Glu Glu Asp Ala Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Glu Gly Arg Ala
 370 375 380
 Leu Glu Val Thr Val Gly Gln Asn Leu Thr Phe Glu Gly Thr Phe Lys
 385 390 395 400
 Val Trp Asn Asn Thr Ser Arg Lys Ile Asn Ile Thr Gly Met Gln Met
 405 410 415
 Val Pro Lys Ile Asn Pro Ser Lys Ala Phe Val Gly Ser Ser Asn Thr
 420 425 430
 Ser Ser Phe Thr Pro Val Ser Ile Asp Glu Asp Glu Val Gly Thr Phe
 435 440 445
 Val Cys Gly Thr Thr Phe Gly Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ala Gly Gly
 450 455 460
 Asn Leu Phe Asp Met Tyr Val His Val Thr Tyr Ser Gly Thr Glu Thr
 465 470 475 480

Glu

<210> 13
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CotB-TcdA26-39

<400> 13

Met Ser Lys Arg Arg Met Lys Tyr His Ser Asn Asn Glu Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Tyr Asn Phe Leu His Ser Met Lys Asp Lys Ile Val Thr Val Tyr Arg
 20 25 30

Gly Gly Pro Glu Ser Lys Lys Gly Lys Leu Thr Ala Val Lys Ser Asp
 35 40 45

Tyr Ile Ala Leu Gln Ala Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Tyr Gln Leu Glu
 50 55 60

His Val Lys Ser Ile Thr Glu Asp Thr Asn Asn Ser Thr Thr Thr Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Glu Met Leu Asp Ala Asp Asp Phe His Ser Leu Ile Gly
 85 90 95

His Leu Ile Asn Gln Ser Val Gln Phe Asn Gln Gly Gly Pro Glu Ser
 100 105 110

Lys Lys Gly Arg Leu Val Trp Leu Gly Asp Asp Tyr Ala Ala Leu Asn
 115 120 125

Thr Asn Glu Asp Gly Val Val Tyr Phe Asn Ile His His Ile Lys Ser
 130 135 140

Ile Ser Lys His Glu Pro Asp Leu Lys Ile Glu Glu Gln Thr Pro Val
 145 150 155 160

Gly Val Leu Glu Ala Asp Asp Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser Leu Thr
 165 170 175

His Lys Trp Val Ser Ile Asn Arg Gly Gly Pro Glu Ala Ile Glu Gly
 180 185 190

Ile Leu Val Asp Asn Ala Asp Gly His Tyr Thr Ile Val Lys Asn Gln
 195 200 205

Glu Val Leu Arg Ile Tyr Pro Phe His Ile Lys Ser Ile Ser Leu Gly
 210 215 220

Pro Lys Gly Ser Tyr Lys Lys Glu Asp Gln Lys Asn Glu Gln Asn Gln
 225 230 235 240

Glu Asp Asn Asn Asp Lys Asp Ser Asn Ser Phe Ile Ser Ser Lys Ser

					245					250						255
Tyr	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Ser	Asp	Asp	
			260					265					270			
Gln	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ile	Asn	Gly	Lys	
		275					280					285				
His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Ile	Gly	Val	Phe	Lys	
	290					295					300					
Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	His	Asn	Asn	
305					310					315					320	
Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gln	Asn	Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	
				325					330						335	
Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Asp	Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	
			340					345					350			
Leu	Arg	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asn	Thr	Ala	
		355					360					365				
Val	Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	
	370					375					380					
Asn	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ile	Ser	Gly	
385					390					395					400	
Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Ile	Gly	Val	Phe	
				405					410					415		
Lys	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	Asp	Ala	
			420					425					430			
Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Arg	Tyr	Gln	Asn	Arg	Phe	Leu	Tyr	
		435					440					445				
Leu	His	Asp	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Asn	Asn	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	
	450					455					460					

Gly Trp Val Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr
465 470 475 480

Ala Met Gly Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr
485 490 495

Phe Arg Asn Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly
500 505 510

Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly
515 520 525

Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile
530 535 540

Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile
545 550 555 560

Asn Gly Lys Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala
565 570 575

Gly Gly Leu Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp
580 585 590

Gly Val Lys Ala Pro
595

<210> 14

<211> 388

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CotC-TcdA26-39

<400> 14

Met Gly Tyr Tyr Lys Lys Tyr Lys Glu Glu Tyr Tyr Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Lys Lys Tyr Tyr Glu Tyr Asp Lys Lys Asp Tyr Asp Cys
20 25 30

Asp Tyr Asp Lys Lys Tyr Asp Asp Tyr Asp Lys Lys Tyr Tyr Asp His
15

35	40	45
Asp Lys Lys Asp Tyr Asp Tyr Val Val Glu Tyr Lys Lys His Lys Lys		
50	55	60
His Tyr Lys Leu Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His		
65	70	75
Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly		
	85	90
Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn		
	100	105
Ile Glu Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn		
	115	120
Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu		
	130	135
Arg Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val		
145	150	155
Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn		
	165	170
Thr Asn Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys		
	180	185
His Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys		
	195	200
Gly Pro Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn		
	210	215
Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu		
225	230	235
His Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly		
	245	250
		255

Trp Val Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala
 260 265 270

Met Gly Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe
 275 280 285

Arg Asn Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe
 290 295 300

Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln
 305 310 315 320

Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr
 325 330 335

Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn
 340 345 350

Gly Lys Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly
 355 360 365

Gly Leu Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly
 370 375 380

Val Lys Ala Pro
 385

<210> 15
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CotB-SA

<400> 15

Met Ser Lys Arg Arg Met Lys Tyr His Ser Asn Asn Glu Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Tyr Asn Phe Leu His Ser Met Lys Asp Lys Ile Val Thr Val Tyr Arg
 20 25 30

Gly Gly Pro Glu Ser Lys Lys Gly Lys Leu Thr Ala Val Lys Ser Asp

35	40	45
Tyr Ile Ala Leu Gln Ala Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Tyr Gln Leu Glu		
50	55	60
His Val Lys Ser Ile Thr Glu Asp Thr Asn Asn Ser Thr Thr Thr Ile		
65	70	75 80
Glu Thr Glu Glu Met Leu Asp Ala Asp Asp Phe His Ser Leu Ile Gly		
	85	90 95
His Leu Ile Asn Gln Ser Val Gln Phe Asn Gln Gly Gly Pro Glu Ser		
	100	105 110
Lys Lys Gly Arg Leu Val Trp Leu Gly Asp Asp Tyr Ala Ala Leu Asn		
	115	120 125
Thr Asn Glu Asp Gly Val Val Tyr Phe Asn Ile His His Ile Lys Ser		
	130	135 140
Ile Ser Lys His Glu Pro Asp Leu Lys Ile Glu Glu Gln Thr Pro Val		
145	150	155 160
Gly Val Leu Glu Ala Asp Asp Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser Leu Thr		
	165	170 175
His Lys Trp Val Ser Ile Asn Arg Gly Gly Pro Glu Ala Ile Glu Gly		
	180	185 190
Ile Leu Val Asp Asn Ala Asp Gly His Tyr Thr Ile Val Lys Asn Gln		
	195	200 205
Glu Val Leu Arg Ile Tyr Pro Phe His Ile Lys Ser Ile Ser Leu Gly		
	210	215 220
Pro Lys Gly Ser Tyr Lys Lys Glu Asp Gln Lys Asn Glu Gln Asn Gln		
225	230	235 240
Glu Asp Asn Asn Asp Lys Asp Ser Asn Ser Phe Ile Ser Ser Lys Ser		
	245	250 255

Tyr Ser Ser Ser Lys Ser Ser Lys Arg Ser Leu Lys Ser Ser Asp Asp
260 265 270

Gln Ser Ser Ile Gln Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser
275 280 285

Ala Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser
290 295 300

Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg
325 330 335

Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp
340 345 350

Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr
355 360 365

Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln
370 375 380

Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr
385 390 395 400

Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
405 410 415

Ile Asp Ala Ala Lys Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp
420 425 430

Ala Val Gln Gln
435

<210> 16
<211> 552
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CotB-AprE

<400> 16

Met Ser Lys Arg Arg Met Lys Tyr His Ser Asn Asn Glu Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Tyr Asn Phe Leu His Ser Met Lys Asp Lys Ile Val Thr Val Tyr Arg
 20 25 30

Gly Gly Pro Glu Ser Lys Lys Gly Lys Leu Thr Ala Val Lys Ser Asp
 35 40 45

Tyr Ile Ala Leu Gln Ala Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Tyr Gln Leu Glu
 50 55 60

His Val Lys Ser Ile Thr Glu Asp Thr Asn Asn Ser Thr Thr Thr Ile
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Glu Met Leu Asp Ala Asp Asp Phe His Ser Leu Ile Gly
 85 90 95

His Leu Ile Asn Gln Ser Val Gln Phe Asn Gln Gly Gly Pro Glu Ser
 100 105 110

Lys Lys Gly Arg Leu Val Trp Leu Gly Asp Asp Tyr Ala Ala Leu Asn
 115 120 125

Thr Asn Glu Asp Gly Val Val Tyr Phe Asn Ile His His Ile Lys Ser
 130 135 140

Ile Ser Lys His Glu Pro Asp Leu Lys Ile Glu Glu Gln Thr Pro Val
 145 150 155 160

Gly Val Leu Glu Ala Asp Asp Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser Leu Thr
 165 170 175

His Lys Trp Val Ser Ile Asn Arg Gly Gly Pro Glu Ala Ile Glu Gly
 180 185 190

Ile Leu Val Asp Asn Ala Asp Gly His Tyr Thr Ile Val Lys Asn Gln
 195 200 205

Glu Val Leu Arg Ile Tyr Pro Phe His Ile Lys Ser Ile Ser Leu Gly
 210 215 220

Pro Lys Gly Ser Tyr Lys Lys Glu Asp Gln Lys Asn Glu Gln Asn Gln
 225 230 235 240

Glu Asp Asn Asn Asp Lys Asp Ser Asn Ser Phe Ile Ser Ser Lys Ser
 245 250 255

Tyr Ser Ser Ser Lys Ser Ser Lys Arg Ser Leu Lys Ser Ser Asp Asp
 260 265 270

Gln Ser Ser Lys Leu Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile
 275 280 285

Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys
 290 295 300

Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn
 305 310 315 320

Val Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln
 325 330 335

Asp Gly Ser Ser His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu
 340 345 350

Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr
 355 360 365

Ala Val Lys Val Leu Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile
 370 375 380

Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn
 385 390 395 400

Met Ser Leu Gly Gly Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val
 405 410 415

Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn
 420 425 430

Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr
 435 440 445

Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala
 450 455 460

Ser Phe Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val
 465 470 475 480

Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 485 490 495

Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu
 500 505 510

Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu
 515 520 525

Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu
 530 535 540

Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
 545 550

<210> 17
 <211> 903
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CotB-AmyE

<400> 17

Met Ser Lys Arg Arg Met Lys Tyr His Ser Asn Asn Glu Ile Ser Tyr
 1 5 10 15

Tyr Asn Phe Leu His Ser Met Lys Asp Lys Ile Val Thr Val Tyr Arg
 20 25 30

Gly Gly Pro Glu Ser Lys Lys Gly Lys Leu Thr Ala Val Lys Ser Asp
 35 40 45

Tyr Ile Ala Leu Gln Ala Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Tyr Gln Leu Glu
50 55 60

His Val Lys Ser Ile Thr Glu Asp Thr Asn Asn Ser Thr Thr Thr Ile
65 70 75 80

Glu Thr Glu Glu Met Leu Asp Ala Asp Asp Phe His Ser Leu Ile Gly
85 90 95

His Leu Ile Asn Gln Ser Val Gln Phe Asn Gln Gly Gly Pro Glu Ser
100 105 110

Lys Lys Gly Arg Leu Val Trp Leu Gly Asp Asp Tyr Ala Ala Leu Asn
115 120 125

Thr Asn Glu Asp Gly Val Val Tyr Phe Asn Ile His His Ile Lys Ser
130 135 140

Ile Ser Lys His Glu Pro Asp Leu Lys Ile Glu Glu Gln Thr Pro Val
145 150 155 160

Gly Val Leu Glu Ala Asp Asp Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser Leu Thr
165 170 175

His Lys Trp Val Ser Ile Asn Arg Gly Gly Pro Glu Ala Ile Glu Gly
180 185 190

Ile Leu Val Asp Asn Ala Asp Gly His Tyr Thr Ile Val Lys Asn Gln
195 200 205

Glu Val Leu Arg Ile Tyr Pro Phe His Ile Lys Ser Ile Ser Leu Gly
210 215 220

Pro Lys Gly Ser Tyr Lys Lys Glu Asp Gln Lys Asn Glu Gln Asn Gln
225 230 235 240

Glu Asp Asn Asn Asp Lys Asp Ser Asn Ser Phe Ile Ser Ser Lys Ser
245 250 255

Tyr Ser Ser Ser Lys Ser Ser Lys Arg Ser Leu Lys Ser Ser Asp Asp
260 265 270

Gln Ser Ser Lys Leu Glu Thr Ala Asn Lys Ser Asn Glu Val Ala Ala
 275 280 285

Ser Ser Val Lys Asn Gly Thr Ile Leu His Ala Trp Asn Trp Ser Phe
 290 295 300

Asn Thr Leu Thr Gln Asn Met Lys Glu Ile Arg Asp Ala Gly Tyr Ala
 305 310 315 320

Ala Ile Gln Thr Ser Pro Ile Asn Gln Val Lys Glu Gly Asn Gln Gly
 325 330 335

Asp Lys Ser Met Arg Asn Trp Tyr Trp Leu Tyr Gln Pro Thr Ser Tyr
 340 345 350

Gln Ile Gly Asn Arg Tyr Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe Lys Asp Met
 355 360 365

Cys Ala Ala Ala Glu Lys Tyr Gly Leu Lys Val Ile Val Asp Ala Val
 370 375 380

Ile Asn His Thr Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Ile Ser Asp Glu Ile Lys
 385 390 395 400

Arg Ile Pro Asn Trp Thr His Gly Asn Thr Gln Ile Lys Asn Trp Ser
 405 410 415

Asp Arg Trp Asp Val Thr Gln Asn Ser Leu Leu Gly Leu Tyr Asp Trp
 420 425 430

Asn Thr Gln Asn Thr Glu Val Gln Thr Tyr Leu Lys Gly Phe Leu Glu
 435 440 445

Arg Ala Leu Asn Asp Gly Ala Asp Gly Phe Arg Tyr Asp Ala Ala Lys
 450 455 460

His Ile Glu Leu Pro Asp Asp Gly Asn Tyr Gly Ser Arg Phe Trp Pro
 465 470 475 480

Asn Ile Thr Asn Thr Ser Ala Glu Phe Gln Tyr Gly Glu Ile Leu Gln
 485 490 495

Asp Ser Ala Ser Arg Asp Thr Ala Tyr Ala Asn Tyr Met Asn Val Thr
 500 505 510

Ala Ser Asn Tyr Gly His Ser Ile Arg Ser Ala Leu Lys Asn Arg Asn
 515 520 525

Leu Ser Val Ser Asn Ile Ser His Tyr Ala Ser Asp Val Ser Ala Asp
 530 535 540

Lys Leu Val Thr Trp Val Glu Ser His Asp Thr Tyr Ala Asn Asp Glu
 545 550 555 560

Glu Glu Ser Thr Trp Met Ser Asp Asp Asp Ile Arg Leu Gly Trp Ala
 565 570 575

Val Ile Gly Ser Arg Ser Gly Ser Thr Pro Leu Phe Phe Ser Arg Pro
 580 585 590

Glu Gly Gly Gly Asn Gly Val Arg Phe Pro Gly Lys Ser Gln Ile Gly
 595 600 605

Asp Arg Gly Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gln Ala Ile Thr Ala Val Asn
 610 615 620

Gln Phe His Asn Val Met Ala Gly Gln Pro Glu Glu Leu Ser Asn Pro
 625 630 635 640

Asn Gly Asn Asn Gln Ile Phe Met Asn Gln Arg Gly Ser Lys Gly Val
 645 650 655

Val Leu Ala Asn Ala Gly Ser Ser Ser Val Thr Val Asn Thr Ser Thr
 660 665 670

Lys Leu Pro Asp Gly Arg Tyr Asp Asn Arg Ala Gly Ala Gly Ser Phe
 675 680 685

Gln Val Ala Asn Gly Lys Leu Thr Gly Thr Ile Asn Ala Arg Ser Ala
 690 695 700

Ala Val Leu Tyr Ser Asp Asp Ile Gly Asn Ala Pro Gln Val Phe Leu

<210>	18
<211>	279
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>

<223> khung đọc mở của thyA

<400> 18

Met Thr Gln Phe Asp Lys Gln Tyr Asn Ser Ile Ile Lys Asp Ile Ile
 1 5 10 15

Asn Asn Gly Ile Ser Asp Glu Glu Phe Asp Val Arg Thr Lys Trp Asp
 20 25 30

Ser Asp Gly Thr Pro Ala His Thr Leu Ser Val Ile Ser Lys Gln Met
 35 40 45

Arg Phe Asp Asn Ser Glu Val Pro Ile Leu Thr Thr Lys Lys Val Ala
 50 55 60

Trp Lys Thr Ala Ile Lys Glu Leu Leu Trp Ile Trp Gln Leu Lys Ser
 65 70 75 80

Asn Asp Val Asn Asp Leu Asn Met Met Gly Val His Ile Trp Asp Gln
 85 90 95

Trp Lys Gln Glu Asp Gly Thr Ile Gly His Ala Tyr Gly Phe Gln Leu
 100 105 110

Gly Lys Lys Asn Arg Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Asp Gln Val Asp
 115 120 125

Tyr Leu Leu His Gln Leu Lys Asn Asn Pro Ser Ser Arg Arg His Ile
 130 135 140

Thr Met Leu Trp Asn Pro Asp Glu Leu Asp Ala Met Ala Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Cys Val Tyr Glu Thr Gln Trp Tyr Val Lys His Gly Lys Leu His Leu
 165 170 175

Glu Val Arg Ala Arg Ser Asn Asp Met Ala Leu Gly Asn Pro Phe Asn
 180 185 190

Val Phe Gln Tyr Asn Val Leu Gln Arg Met Ile Ala Gln Val Thr Gly

195 200 205
 Tyr Glu Leu Gly Glu Tyr Ile Phe Asn Ile Gly Asp Cys His Val Tyr
 210 215 220
 Thr Arg His Ile Asp Asn Leu Lys Ile Gln Met Glu Arg Glu Gln Phe
 225 230 235 240
 Glu Ala Pro Glu Leu Trp Ile Asn Pro Glu Val Lys Asp Phe Tyr Asp
 245 250 255
 Phe Thr Ile Asp Asp Phe Lys Leu Ile Asn Tyr Lys His Gly Asp Lys
 260 265 270
 Leu Leu Phe Glu Val Ala Val
 275
 <210> 19
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> khung đọc mở của thyB
 <400> 19
 Met Lys Gln Tyr Lys Asp Phe Cys Arg His Val Leu Glu His Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Lys Gly Asp Arg Thr Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Phe Gly Tyr
 20 25 30
 Gln Met Arg Phe Asn Leu Arg Glu Gly Phe Pro Met Leu Thr Thr Lys
 35 40 45
 Lys Leu His Phe Lys Ser Ile Ala His Glu Leu Leu Trp Phe Leu Lys
 50 55 60
 Gly Asp Thr Asn Val Arg Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Val Arg Ile Trp
 65 70 75 80
 Asn Glu Trp Ala Asp Glu Asn Gly Glu Leu Gly Pro Val Tyr Gly Ser
 85 90 95

Gln Trp Arg Ser Trp Arg Gly Ala Asp Gly Glu Thr Ile Asp Gln Ile
 100 105 110

Ser Arg Leu Ile Glu Asp Ile Lys Thr Asn Pro Asn Ser Arg Arg Leu
 115 120 125

Ile Val Ser Ala Trp Asn Val Gly Glu Ile Asp Lys Met Ala Leu Pro
 130 135 140

Pro Cys His Cys Leu Phe Gln Phe Tyr Val Ser Asp Gly Lys Leu Ser
 145 150 155 160

Cys Gln Leu Tyr Gln Arg Ser Ala Asp Val Phe Leu Gly Val Pro Phe
 165 170 175

Asn Ile Ala Ser Tyr Ala Leu Leu Thr Met Ile Ile Ala His Val Thr
 180 185 190

Gly Leu Glu Pro Gly Glu Phe Ile His Thr Phe Gly Asp Val His Ile
 195 200 205

Tyr Gln Asn His Ile Glu Gln Val Asn Leu Gln Leu Glu Arg Asp Val
 210 215 220

Arg Pro Leu Pro Gln Leu Arg Phe Ala Arg Lys Val Asp Ser Ile Phe
 225 230 235 240

Asn Phe Ala Phe Glu Asp Phe Ile Ile Glu Asp Tyr Asp Pro His Pro
 245 250 255

His Ile Lys Gly Ala Val Ser Val
 260

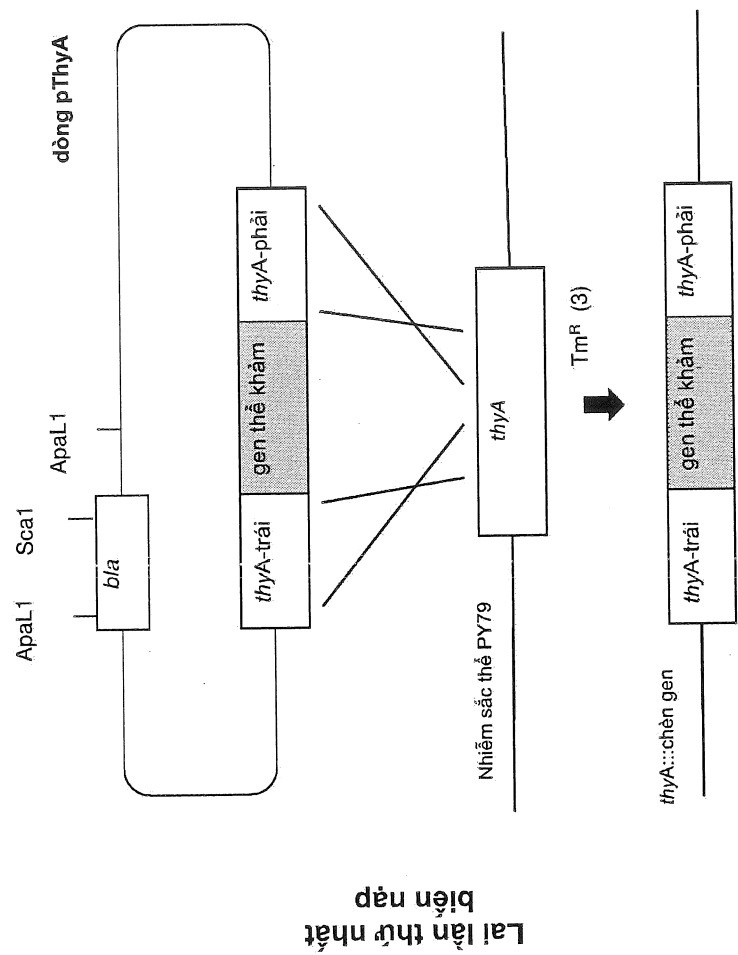


Fig. 1

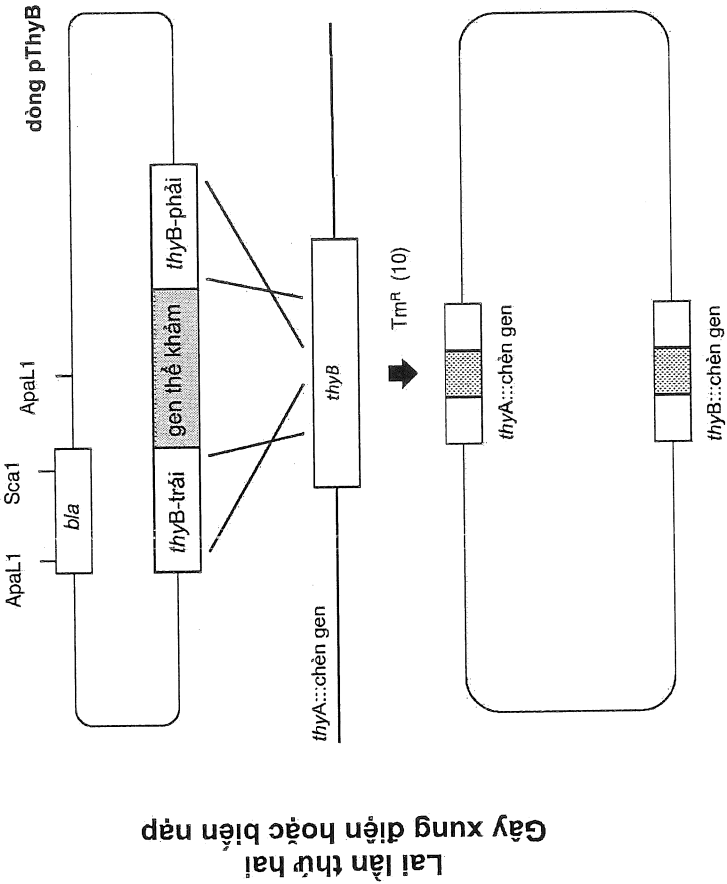


Fig.1 (tiếp theo)

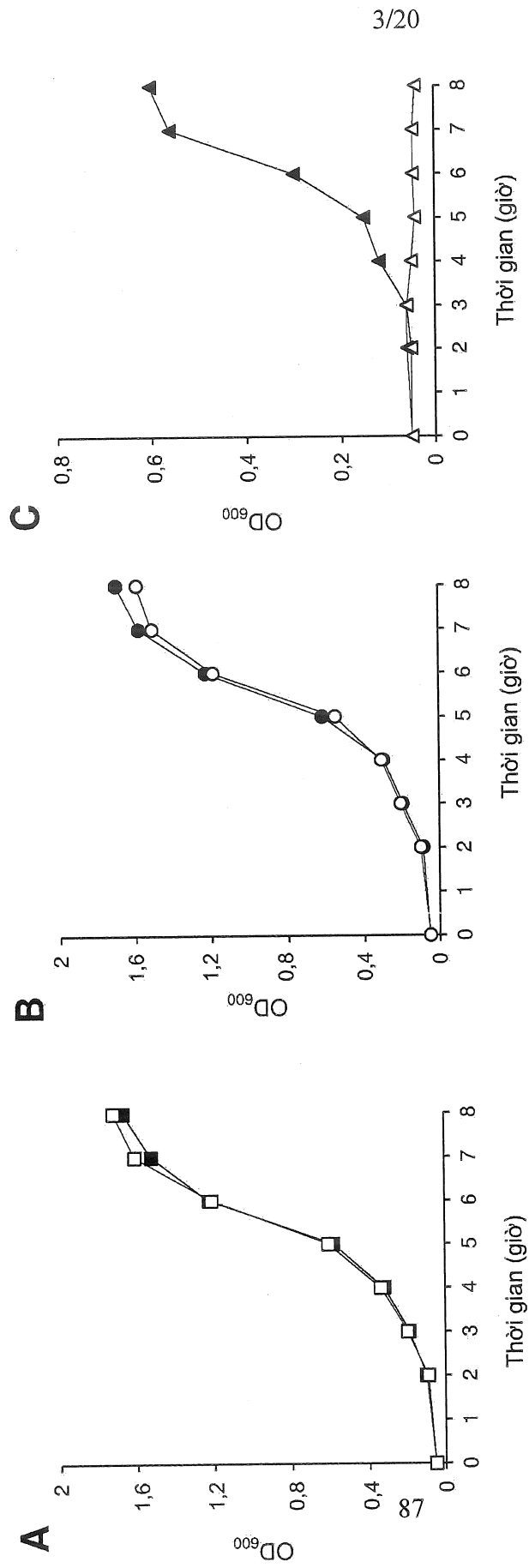


Fig. 2

4/20

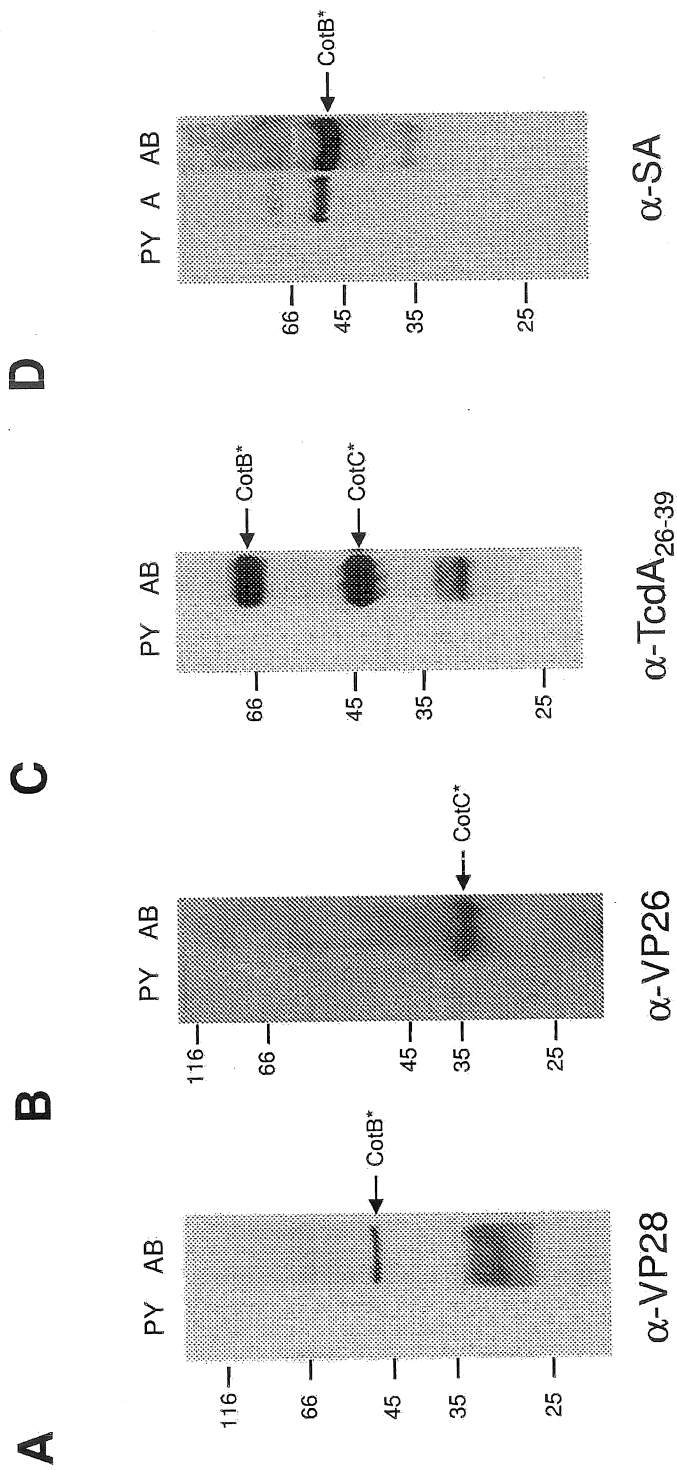


Fig. 3

5/20

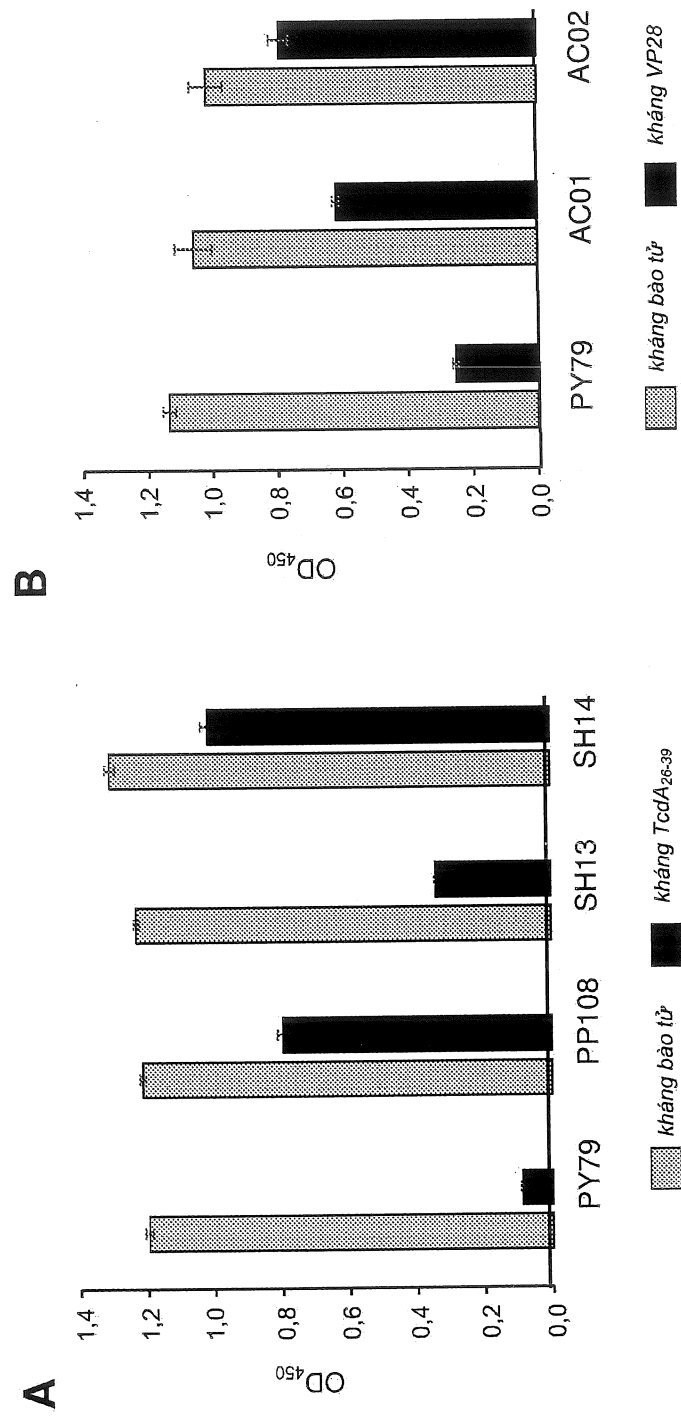


Fig. 4

6/20

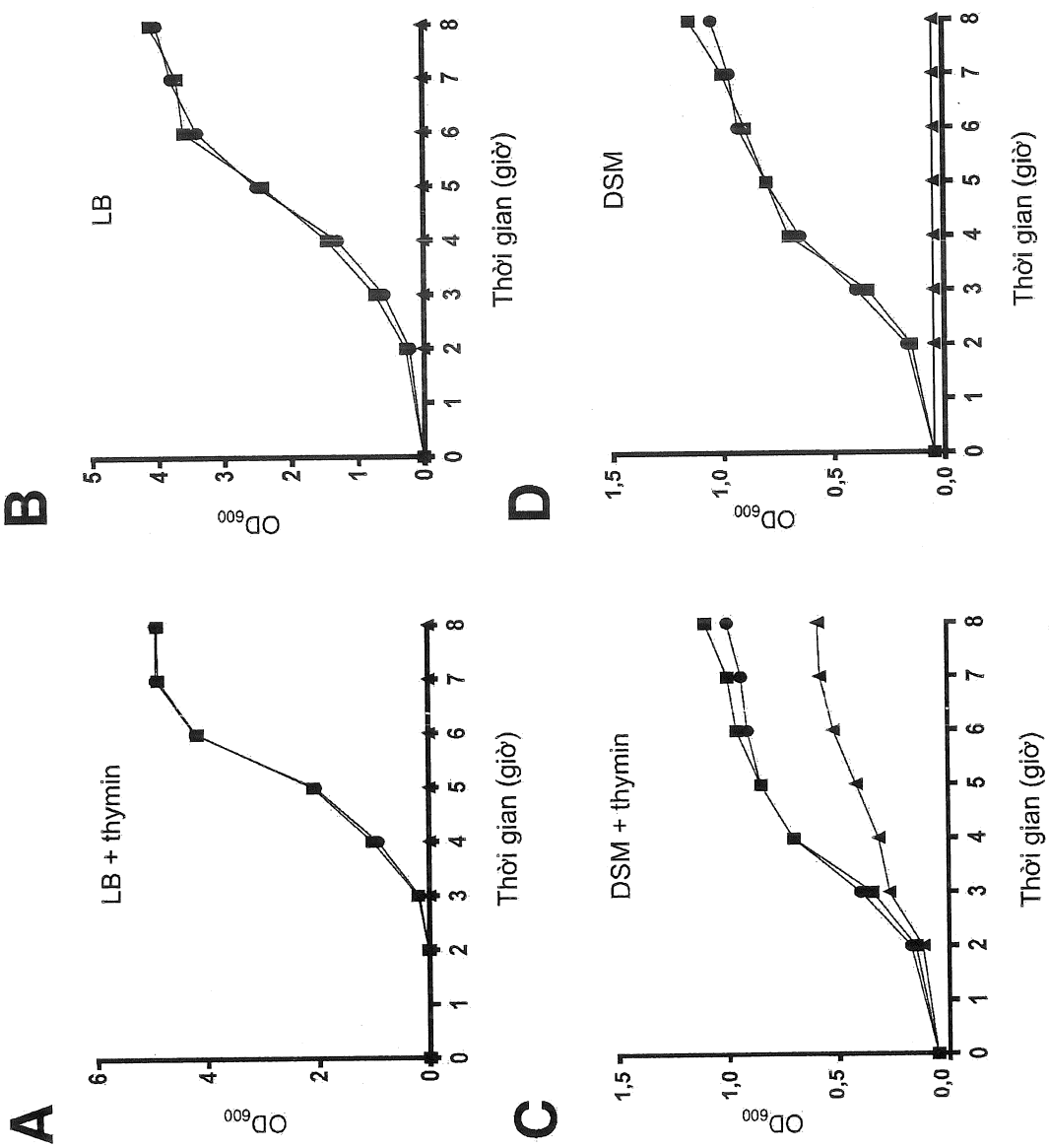


Fig. 5

7/20

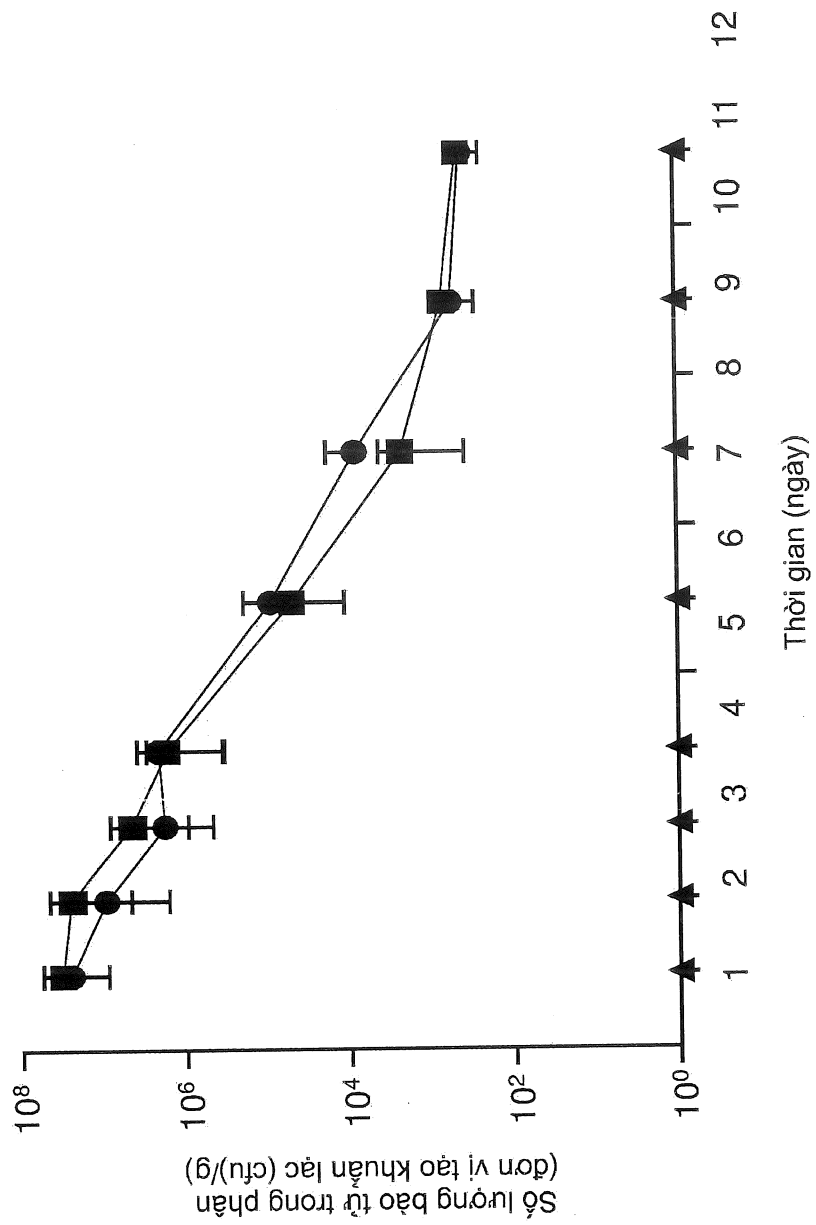
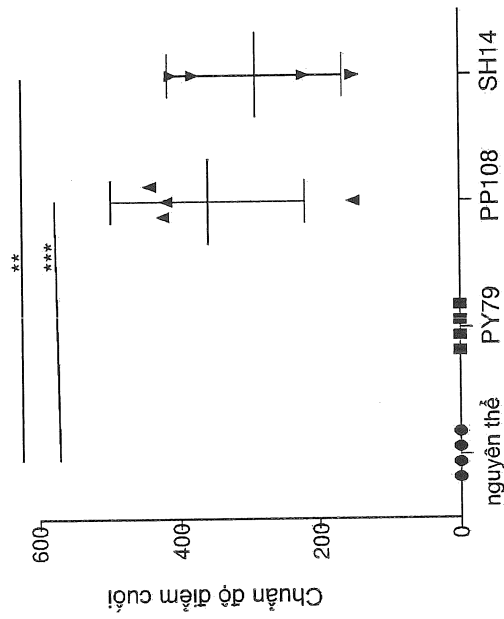


Fig. 6

8/20

B. IgA trong phân



A. IgG trong huyết thanh

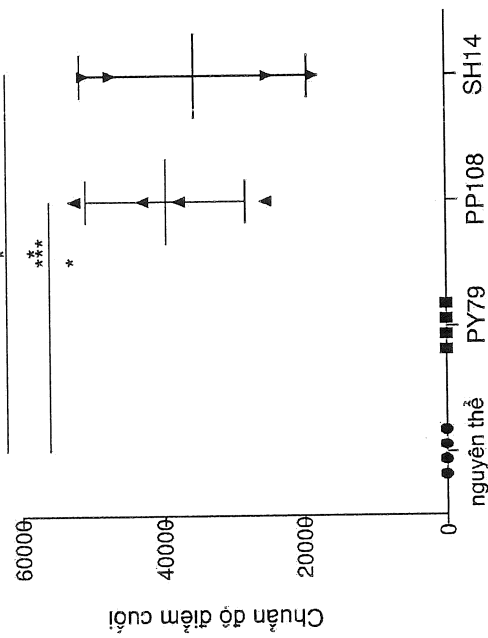
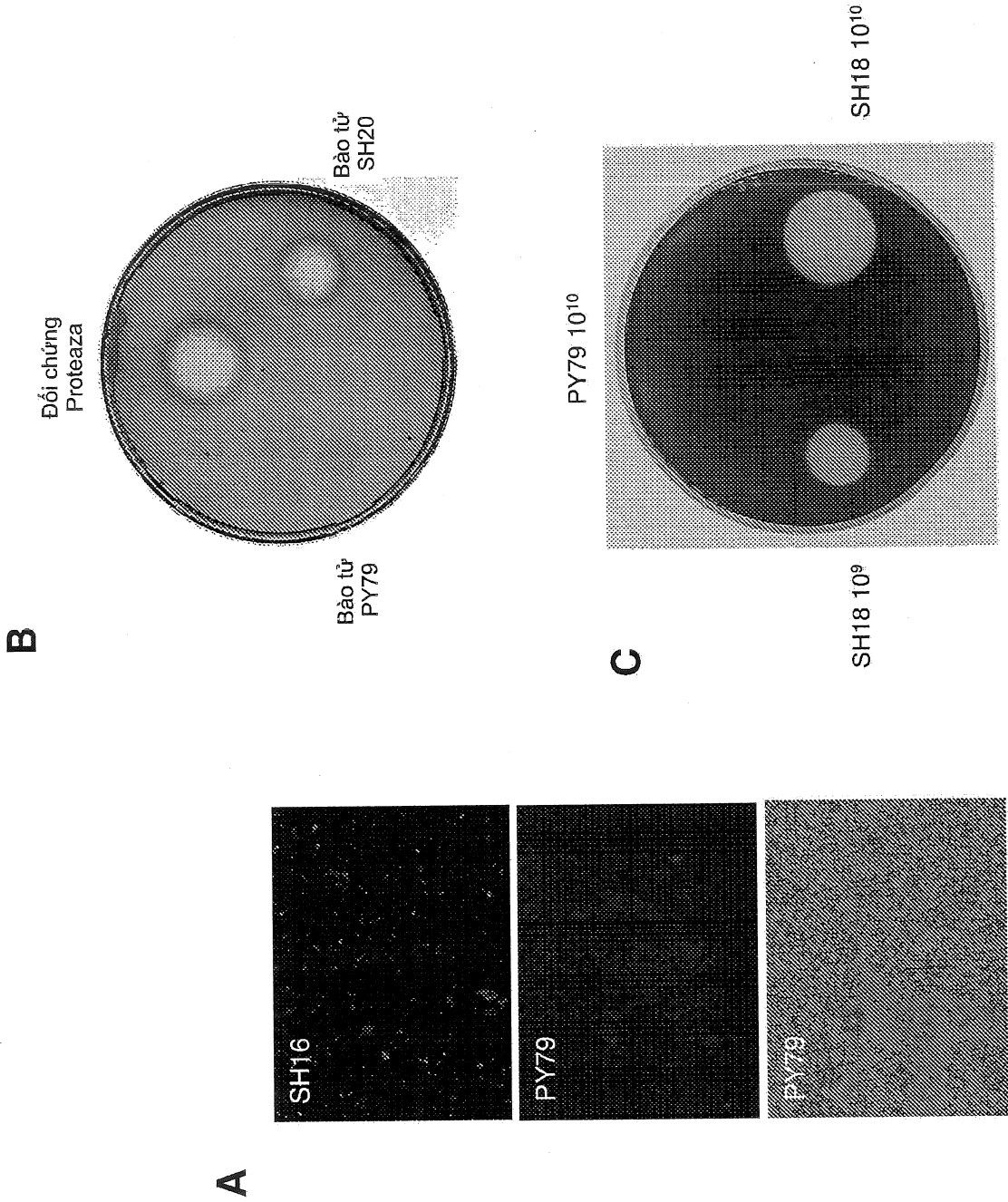
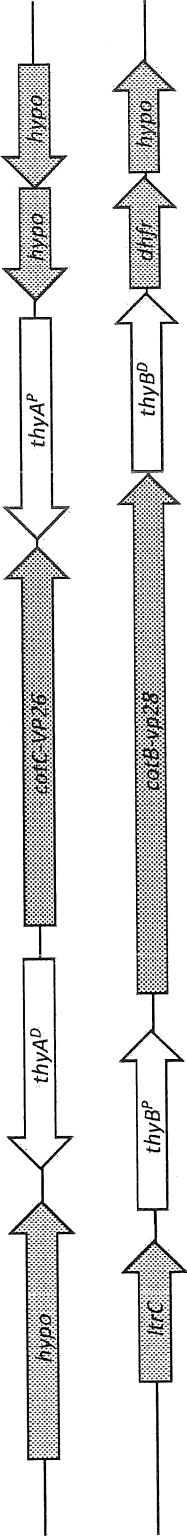


Fig. 7

9/20





CotC-VP26

MGYYKKYEEYTVKTTYKKYYEYDKDYDCDYDKKYDDYDKKYDHDKKDYVVEYKKHKHYKLMFENLTNLDVAIIAISIAIIALIVI
MVIMIVENTRVGRSVANYDQMMRVPIQRRRAKVMSIRGERSYNTPLGKVAAMKNGLSKDKMDKDVSAIDLVISTVTAPRTDPAGTGAENSNMTL
KILNNTGVDLLINDITVRPTVIAGNIKGNTMSNTYFSSKDIKSSSSKITLIDVCSKFEDGAAFEATMNIGFTSKNVIDIKDEIKKK

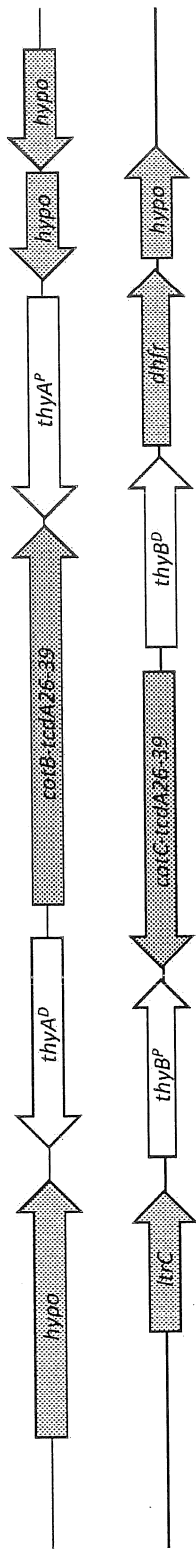
SEQ ID NO: 11

CotB-VP28

MSKRRMKYHSNNEISYNFLHSMKDKIVTVYRGGPESKKGKLTAVKSDYIALQAEKKIYYQLEHVKSITEDTNNSTTTTETEEMLDADDFHSLI
GHLINQSVQFNQGGPESKKGRLVWLGDYAAALNTNEDGVVYFNHIIKSISKEHPDLKIEEQTPVGVLSEADDLSEVFKSLTHKWVSNIRGGPE
AIEGILVDNADGHYTIKQNEVLRIYPFHIKSISLGPKGSYKKEDQKNEQNQEDNNDKDSNFISSKSYSSSKSRSLKSSDDQSSKLMDSF
TLSVWSAILAITAVIAVIFVIFRYHNTVTKTIETHGTGNIETNMNENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMKKEEDADLVITP
VEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVWNNTSRKINITGMQMVPKINPSKAFVGSSNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTTFGAPIAATAGGNLFDMYV
HVTYSGTETE

SEQ ID NO: 12

Fig. 9



CotB-TcdA₂₆₋₃₉

MSKRMRKYSNNEISYYNFLHSMKDKIVTVYRGGPESKKGKLTAVKSDYIALQAEKKIYYQLEHVKSITEDTNNSTTTIETEEMLDADDHSLHGLNQSVQFNQGGPESKKGRLVWLGGDYAALNTNEDGVVYFNHHSKHEPDLKIEEQTPVGVLEADDLSEVFKSLTHKWVSINRGGPEAIEGILVDNADGHTYIVKNQEVLRIPFHHKISLGPKGSKYKEDQKNEQNEQEDNNDKDSNFISSKSYSSSKSSKRSLSKSSDDQSSKLASTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTHNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTTAVATGWQTINGKKYYFNTNTSIASGTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSGNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYFFGVGVDGVKAP

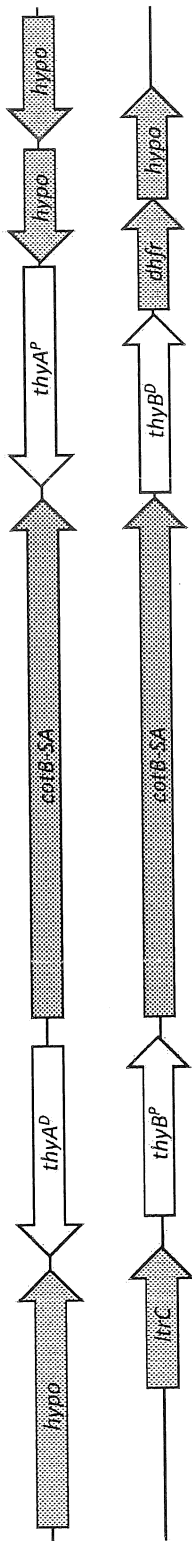
SEQ ID NO: 13

CotC-TcdA₂₆₋₃₉

MGYYKKYKEEYTVKTKYYKKYYEYDKDYDCDYDKKYDDYDKKYDHDKKDYDVVVEYKKHKHKKHYKLASTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTHNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTTAVATGWQTINGKKYYFNTNTSIASGTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSGNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYFFGVGVDGVKAP

SEQ ID NO: 14

Fig. 10

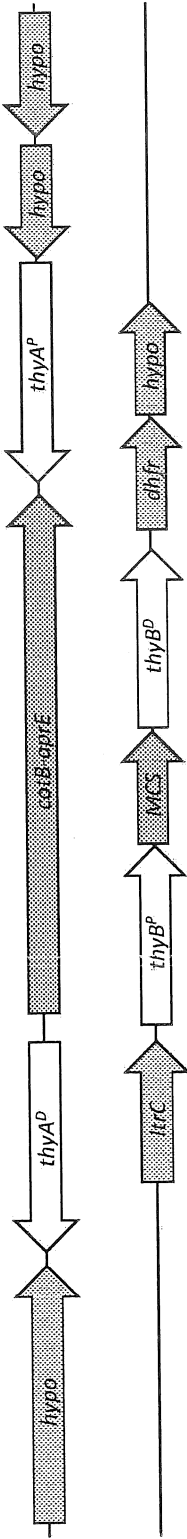


CotB-SA

MSKRRMKYHSNNEISYYNFLHSMKDKIVTVYRGGPESKKGKLTAVKSDYIALQAEKKIYYQLEHVKSITEDTNSTTTIETEMLDADDFHSLIGHLINQSVQFN
QGGPESKKGRLVWLGDDYAALNTNEDGVVYFNIIHHSISKHEPDLKIEEQTPVGVLEADDLSEVFKSLTHKWVSINRGGPEAIEGILVDNADGHYTVKNQEV
LRIYFFHIKISISLGPKGSYKKEDQKNEQNEQNDKDSNFISSKSYSSSKSRSLKSSDDQSSIQDPSKDSKAGVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADG
ALGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDFTFTKVKPSAO
ASIDAAKAGVNGNPLDAVQQ

SEQ ID NO: 15

Fig. 11

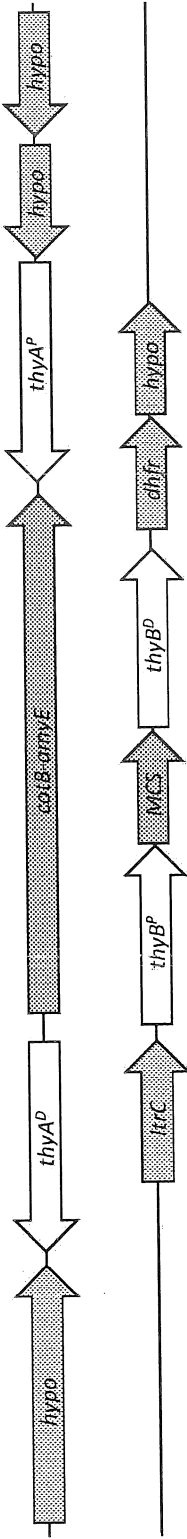


CotB-AprE

MSKRMRMYHSNNEISYNNFLHSMKDKIVTVYRGGPESKKGKLTAVKSDYIALQAEKKIYYQLEHVKSITEDTNSTTTTETEEMLDADDFHSLIGHLINQS
VOFNQGGPESKKGRLVWLGDYAAALNTNEDGVVYFNHIIKSISKHEPDLKIEEQTPVGVLEADDLSEVFKSLTHKWVSINRGGPEAIEGILVDNADGHY
TIVKNQEVLRIPYFHIKISLGPKGSYKKEDQKNEQNQEDNNDKDSNFSISSKSYSSSKSRSLKSSDDQSSKLAQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSN
VKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGASFVPSETNPYQDQSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLDTSGSGQYSWIINGIEWAISNNMDVINMS
LGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVAAAAAGNEGSSGSTVGYPAKYPSTIAGAVNSSNQRFSSAGSELDMAPGVSIQSTLPGGTYGYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRDRLESTATYLGNSFYFGKGLINVQAAAQ

SEQ ID NO: 16

Fig. 12



CotB-AmyE

MSKRRMKYHSNNEISYNFLHSMKDKIVTVYRGGPESKKGKLTAVKSDYIALQAEKKIYYQLHVKSITEDTNNSTTTTETEEMLDADDFHSLIGHLINQS
VQFNQGGPESKKGRLVWLGDYAAALNTNEDGVVYFNHIIKHSIKHEPDLKIEEQTPVGVLADDLSEVFKSLTHKWVSINRGGPEAIEGILVDNADGHY
TIVKNQEVLRIPYFHIKISLGPKGSYKKEDQKNEQNEQDNDKDSNFISSKSSKRSLSKSSDDQSSKLETANKSNEVAASSVKNGTILHAWN
WSFNLTQNMKEIRDAGYAAIQTSPIQVKEGNQGDKSMRNWYWL YQPTSYQIGNRYLGTQEFEKDMCAAAEKYGLKVIVDAVINHTTSDYAAISDEIK
RIPNWTGNTQIKNWSDRWDVTQNSLLGLYDWNITQNTQTEVQTYLKGFLERALNDGADGFRYDAAKHIELPDDGNYGSRFWPNITNTSAEFQYGEILQD
SASRDTAYANYMNV TASNYGHSIRSALKNRNLSVSNISHYASDVADKLVTWVESHDITYANDEEESTWMSDDDIRLGWAVIGSRSGSTPLFFSRPEGG
NGVRFPGKSQIGDRGSALFKDQAITAVNQFNVMAGQPEELSNPNNQIFMNRQSGKGVLANAGSSSVTVNTSTKLPDGRYDNRAGAGSFQVA
NGKLTGTINARSAAVLYSDDIGNAPQVFLQYGTGAVHSFNDQLTVTLRANAKTTKAVYQINNGQQTAFKDGDRLTIGKGPIGTITYNIRLTGTNGEAE
RTQEYTFVKKDPQAQTNIIGYQNPDPHWGQVNAVYIKHDGGGAIELTGSWPGKAMTKNANGIYTLTPANADTANAKVIFNNGSAQVPGQNQPGFDYVQN
GLYNNSGLNGYLP

SEQ ID NO: 17

Fig. 13

15/20

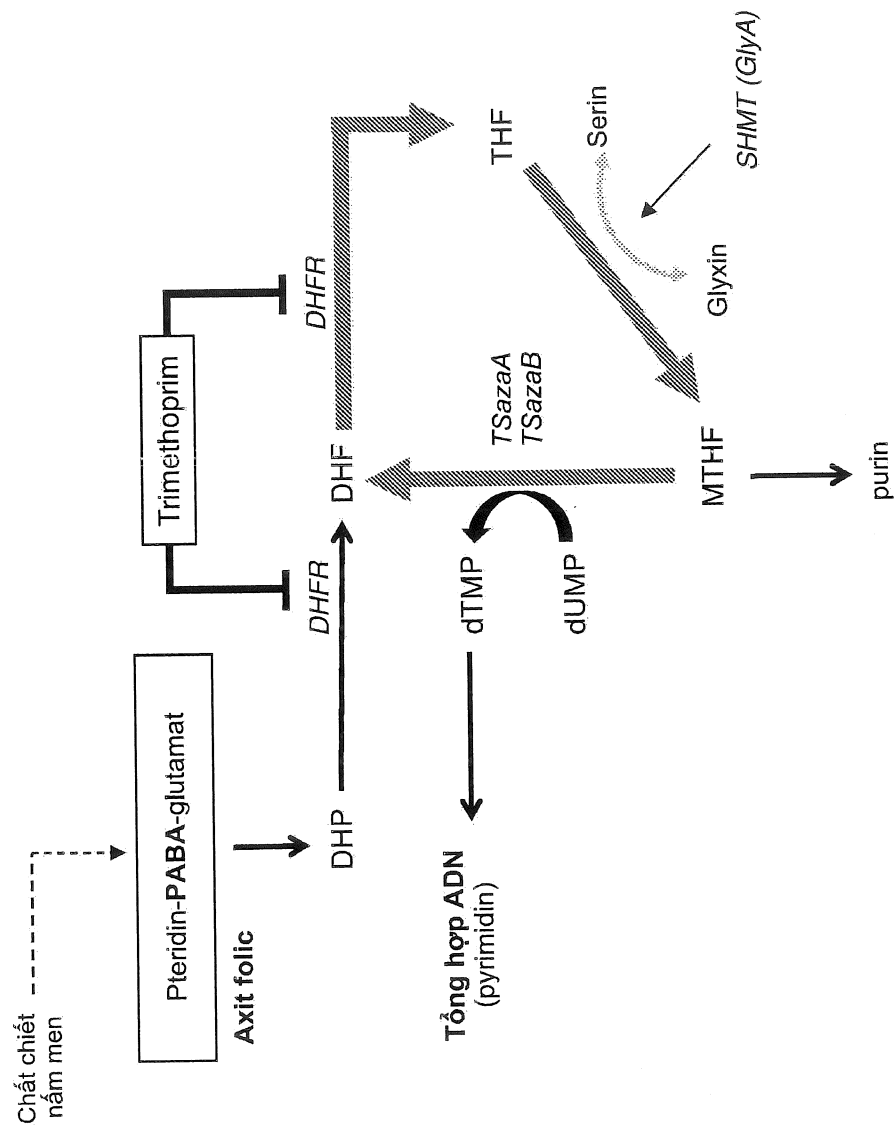


Fig. 14

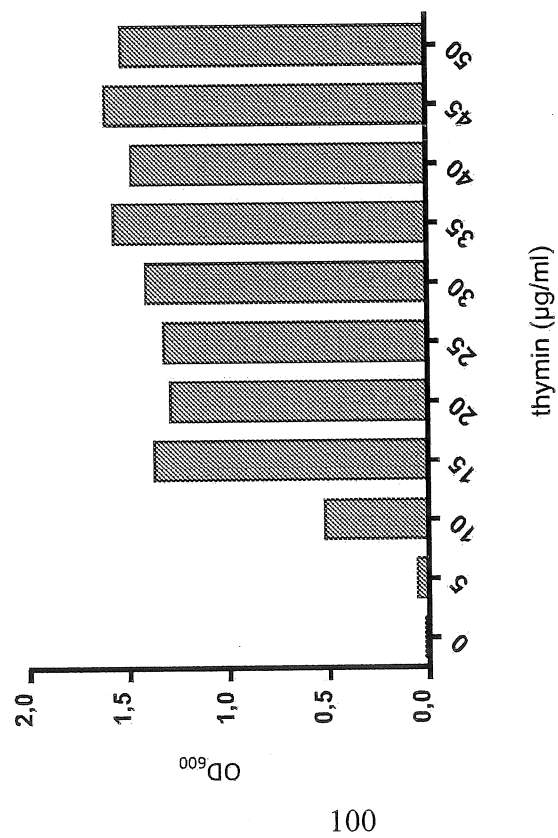
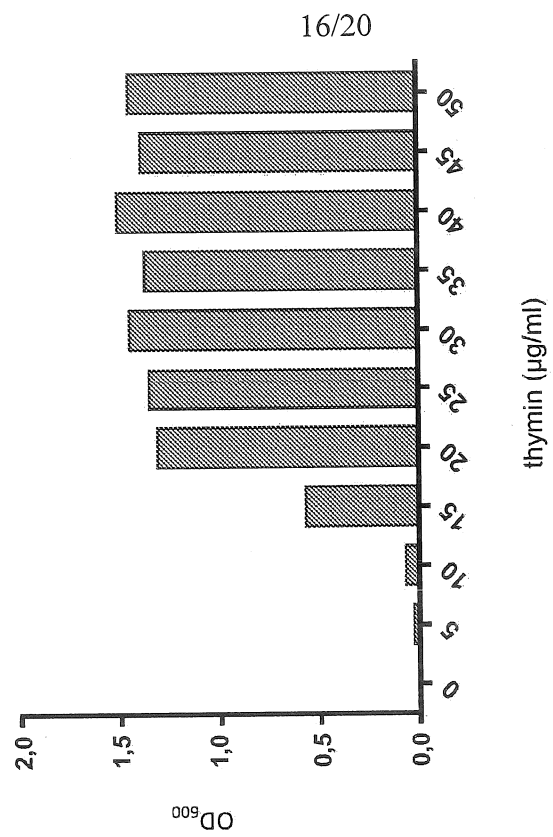


Fig. 15

17/20

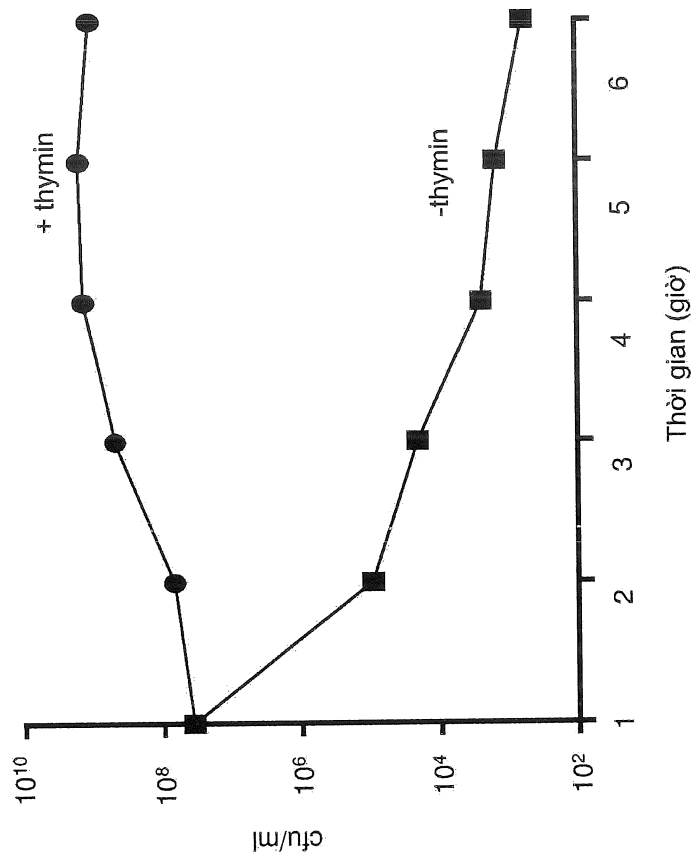


Fig. 16

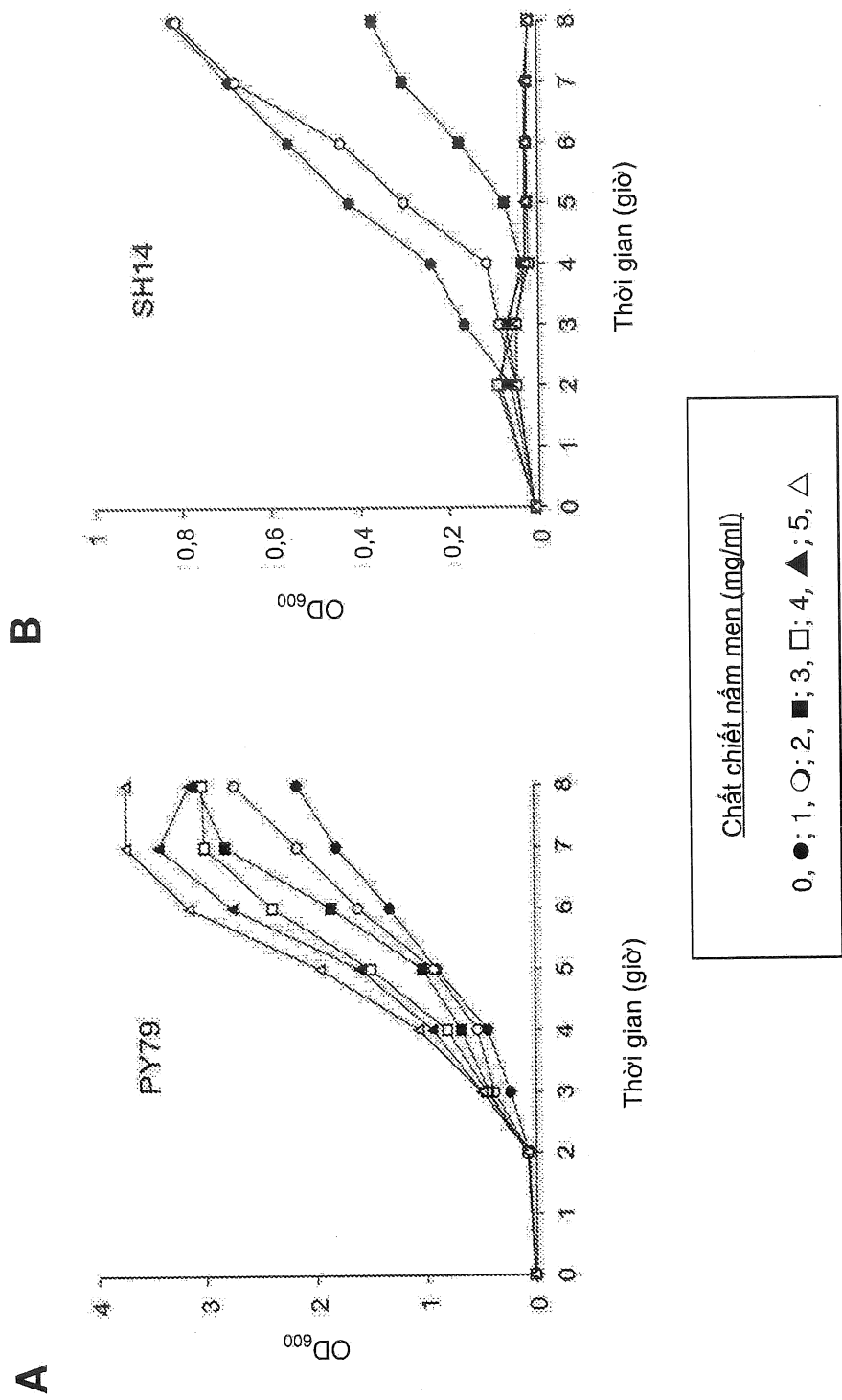


Fig. 17

19/20

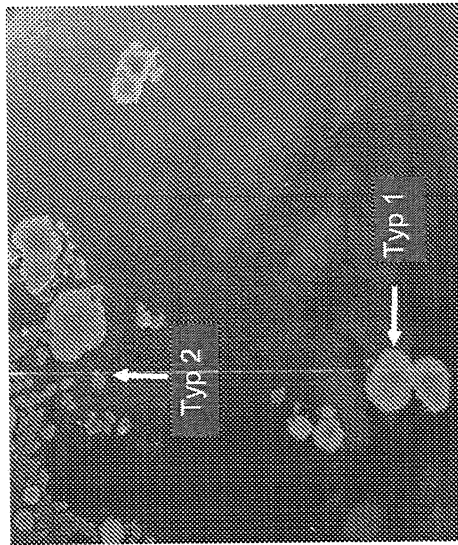


Fig. 18

20/20

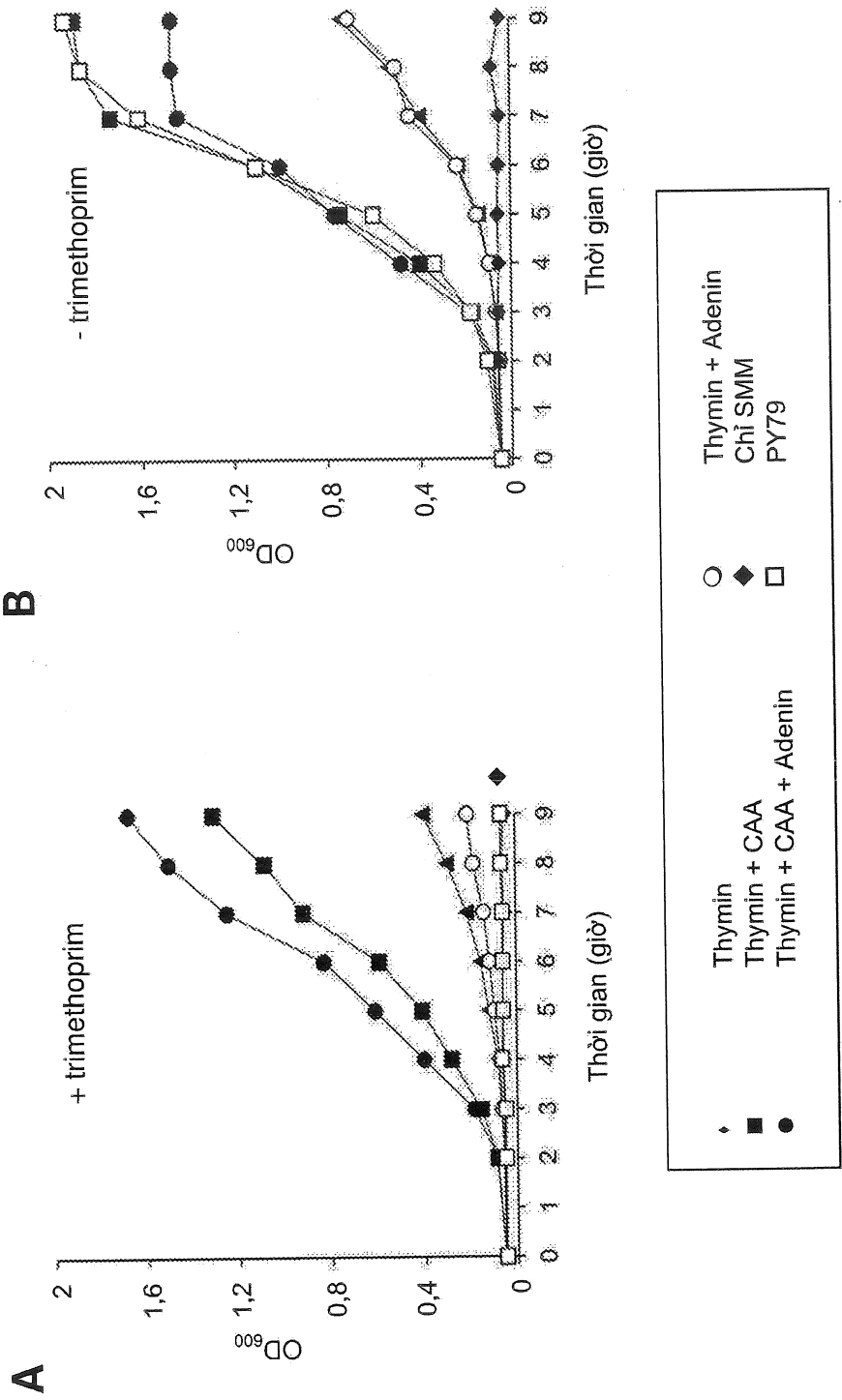


Fig. 19