



(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)



1-0053240

(51)^{2022.01} C12N 9/00; C12P 21/02; C12N 15/52; (13) B
C12N 15/81

(21) 1-2023-03316

(22) 08/09/2021

(86) PCT/KR2021/012176 08/09/2021

(87) WO 2022/145623 07/07/2022

(30) 10-2021-0000361 04/01/2021 KR

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/09/2023 426A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

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

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

(54) BIẾN THỂ GLUTAMAT-XYSTEIN LIGAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
GLUTATHION SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2023-03316

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể glutamat–xystein ligaza mới và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng biến thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể glutamat-xystein ligaza mới và phương pháp sản xuất glutathion sử dụng biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glutathion (GSH) là hợp chất lưu huỳnh hữu cơ thường có trong hầu hết các tế bào, và glutathion có dạng tripeptit trong đó có ba axit amin, glyxin, glutamat và xystein được kết hợp với nhau.

Trong cơ thể, glutathion tồn tại dưới hai dạng: dạng glutathion khử (Reduced Glutathione: GSH) và dạng glutathion oxy hóa (Oxidized Glutathione: GSSG). Glutathion khử (GSH) tồn tại ở tỷ lệ tương đối cao trong các điều kiện bình thường, được phân bố chủ yếu trong các tế bào gan và da của cơ thể con người và có vai trò quan trọng như chức năng chống oxy hóa bằng cách phân hủy và loại bỏ các gốc oxy, chức năng khử độc bằng cách loại bỏ các hợp chất ngoại sinh như các chất độc, chức năng làm trắng bằng cách ức chế sản sinh sắc tố melanin, v.v..

Do sự sản sinh glutathion giảm dần do quá trình lão hóa, việc giảm sản sinh glutathion có vai trò quan trọng trong các chức năng chống oxy hóa và khử độc, và sẽ thúc đẩy sự tích tụ của các gốc oxy, là một trong những nguyên nhân chính của quá trình lão hóa, và do đó cần cung cấp glutathion bên ngoài (Sipes IG et al., The role of Glutathione in the toxicity of xenobiotic compounds: metabolic activation of 1,2-dibromoethane by Glutathione, Adv Exp Med Biol. 1986;197:457–67.).

Với nhiều chức năng khác nhau, glutathion đã thu hút nhiều sự chú ý như nguyên liệu trong các lĩnh vực khác nhau như dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, v.v., và cũng được sử dụng trong việc điều chế các thành phần hương liệu, thực phẩm, và các phụ gia thức ăn chăn nuôi. Glutathion được biết đến có tác dụng đáng kể trong việc tăng hương vị của các nguyên liệu và duy trì hương vị đậm đà, và glutathion có thể được sử dụng như chất điều vị *kokumi* bằng cách sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các chất khác. Thông thường, các chất *kokumi* có hương vị đậm đà hơn so với các chất *umami* hiện có như các axit nucleic, bột ngọt (Mononatri glutamat: MSG), v.v., và được biết đến là được

tạo ra bởi sự phân hủy và lão hóa của các protein.

Tuy nhiên, mặc dù nhu cầu tăng về glutathion có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực ở trên, quá trình tổng hợp enzym vẫn chưa được thương mại hóa do chi phí sản xuất cao, và thị trường không được kích lệ đáng kể do đòi hỏi chi phí đáng kể cho sản xuất công nghiệp glutathion.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng vi khuẩn đã đưa vào biến thể glutamat-xystein ligaza mới phát triển có thể sản xuất glutathion với năng suất cao, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể glutamat-xystein ligaza, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin trong protein có hoạt tính glutamat-xystein ligaza.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể, và vector chứa polynucleotit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản xuất glutathion bằng cách đưa vào bất kỳ một hoặc nhiều biến thể; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất glutathion, trong đó phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong phần mô tả này nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể bên dưới.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy, hoặc có thể xác định chắc chắn bằng cách sử dụng không quá nhiều thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Ngoài ra, các phương án tương đương này được hiểu là nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Khía cạnh của sáng chế có thể đề xuất biến thể glutamat–xystein ligaza bao gồm việc thay thế axit amin trong protein có hoạt tính glutamat–xystein ligaza, trong đó việc thay thế bao gồm thay thế methionin cho axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Biến thể có thể là biến thể protein trong đó glyxin là axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin của glutamat–xystein ligaza có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin.

“glutamat–xystein ligaza (GCL)” theo sáng chế là enzym còn được gọi là “glutamat–xystein ligaza” hoặc “gamma-glutamylxystein synthetaza (GCS)”. Glutamat–xystein ligaza được biết đến là xúc tác cho phản ứng sau:



Hơn nữa, phản ứng được xúc tác bởi glutamat–xystein ligaza được biết đến là bước đầu tiên của quá trình tổng hợp glutathion.

Theo sáng chế, trình tự axit amin của glutamat–xystein ligaza là trình tự axit amin được mã hóa bởi gen *gsh1*, và cũng có thể được đề cập đến là “GSH1 protein” hoặc “glutamat–xystein ligaza”. Trình tự axit amin tạo ra glutamat–xystein ligaza theo sáng chế có thể thu được từ Ngân hàng gen (GenBank) của Trung tâm Quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI), là cơ sở dữ liệu đã biết. Glutamat–xystein ligaza có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc về cơ bản gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ khác, glutamat–xystein ligaza có thể có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*, và đối với ví dụ khác, axit amin tương ứng với vị trí 653 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 của *Saccharomyces* có thể là glyxin. Tuy nhiên, glutamat–xystein ligaza không bị giới hạn ở đó, và có thể bao gồm bất kỳ trình tự nào mà không bị giới hạn ở đó, miễn là đó là trình tự có cùng hoạt tính glutamat–xystein ligaza như trình tự axit amin.

Ví dụ cụ thể, glutamat–xystein ligaza theo sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Hơn nữa, rõ ràng rằng các protein có các trình tự

axit amin trong đó một số trình tự được xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào cũng được bao gồm trong phạm vi của protein là mục tiêu của biến thể theo sáng chế miễn là các trình tự axit amin có sự đồng nhất hoặc tương đồng như vậy và thể hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của protein nêu trên.

Hơn nữa, đối với ví dụ của glutamat–xystein ligaza theo sáng chế, glutamat–xystein ligaza được xác định như protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, nhưng không loại trừ vùng phía trước hoặc phía sau trình tự vô nghĩa của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cam, và rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật rằng các protein cũng được bao gồm trong phạm vi của glutamat–xystein ligaza theo sáng chế miễn là chúng có hoạt tính tương tự hoặc tương ứng với hoạt tính của protein gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Tức là, theo sáng chế, mặc dù thuật ngữ “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin đã được biểu hiện bởi SEQ ID NO cụ thể”, “protein hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin đã được biểu hiện bởi SEQ ID NO cụ thể” được sử dụng, rõ ràng rằng bất kỳ protein bao gồm trình tự axit amin trong đó một số trình tự được xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào có thể được sử dụng trong sáng chế miễn là protein hoặc polypeptit có hoạt tính tương tự hoặc tương ứng với hoạt tính của polypeptit gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” hoặc “polypeptit biến đổi” đề cập đến protein, trong đó một hoặc nhiều axit amin khác với các axit amin trong trình tự đã nêu khi thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi, nhưng các chức năng hoặc đặc tính của protein vẫn được duy trì. Đối với các mục đích của sáng chế, biến thể có thể là biến thể glutamat–xystein ligaza, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin trong glutamat–xystein ligaza đã được mô tả ở trên, hoặc polypeptit biến đổi có hoạt tính glutamat–xystein ligaza. Đối với biến thể của sáng chế, “biến thể glutamat–xystein ligaza” cũng có thể được mô tả là “polypeptit (biến đổi) có hoạt tính glutamat–xystein ligaza”, hoặc “biến thể GSH1”.

Biến thể khác với các trình tự được xác định bằng cách thay thế, xóa, hoặc thêm vào một số axit amin. Biến thể này có thể thường được xác định bằng cách biến đổi một hoặc nhiều axit amin của trình tự axit amin của protein và đánh giá các đặc tính của protein

biến đổi. Nói cách khác, khả năng của biến thể có thể tăng lên, không thay đổi, hoặc giảm xuống, so với khả năng của protein tự nhiên. Hơn nữa, một số biến thể có thể bao gồm polypeptit biến đổi trong đó một hoặc nhiều phần như trình tự dẫn đầu đầu N hoặc miền xuyên màng bị loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần bị loại bỏ từ đầu N và/hoặc C của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” hoặc “polypeptit biến đổi” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ, chẳng hạn như sửa đổi, protein đã sửa đổi, đột biến, mutein, dị biệt, biến thể, v.v., và thuật ngữ không bị giới hạn miễn là nó được sử dụng với ý nghĩa là sửa đổi.

Đối với các mục đích của sáng chế, biến thể có thể có hoạt tính tăng cường của protein biến đổi, so sánh với protein không biến đổi hoặc kiểu dại tự nhiên, hoặc có thể tăng lượng sản sinh glutathion, so sánh với protein trước khi biến đổi, hoặc polypeptit kiểu dại tự nhiên hoặc polypeptit không biến đổi, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cùng các đặc tính cấu trúc và/hoặc đặc tính hóa học. Ví dụ, biến thể có thể có một hoặc nhiều sự thay thế bảo thủ trong khi vẫn duy trì một hoặc nhiều hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin này thường có thể xảy ra dựa trên sự tương tự về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc.

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

Hơn nữa, biến thể có thể bao gồm việc xóa hoặc bổ sung các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các đặc tính và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc trình tự dẫn đầu) tại đầu N của protein tham gia vào chuyển hướng đồng dịch mã hoặc sau dịch mã của protein. Hơn nữa, polypeptit cũng có thể được liên hợp với trình tự hoặc trình tự liên kết khác để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit.

Theo phương án của sáng chế, biến thể có thể là biến thể glutamat–xystein ligaza,

trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin. Theo phương án của sáng chế, biến thể có thể là biến thể, trong đó glyxin tương ứng với vị trí 653 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là axit amin đã thay thế khác với axit amin trước thay thế. Trong khi đó, theo sáng chế, khi được đề cập đến “axit amin cụ thể được thay thế”, rõ ràng rằng axit amin được thay thế bằng axit amin khác với axit amin trước thay thế, ngay cả khi mặc dù không thể hiện riêng biệt rằng axit amin được thay thế bằng axit amin khác. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vị trí tương ứng” đề cập đến gốc axit amin ở vị trí được liệt kê trong protein hoặc polypeptit, hoặc gốc axit amin tương tự, tương đồng, hoặc đồng nhất với gốc được liệt kê trong protein hoặc polypeptit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng tương ứng” thường đề cập đến vị trí tương ứng hoặc tương tự trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Theo sáng chế, việc đánh số cụ thể có thể được sử dụng cho các vị trí gốc axit amin trong các protein được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, bằng cách sắp xếp protein đích để so sánh với trình tự polypeptit của protein theo sáng chế, có thể đánh số lại vị trí tương ứng với vị trí gốc axit amin của protein theo sáng chế.

Biến thể glutamat-xystein ligaza của sáng chế, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin, có thể là protein trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với nhau. Biến thể như vậy có thể là biến thể có trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và có nhiều nhất 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến thể glutamat-xystein ligaza của sáng chế, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế

bằng methionin, có thể chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Cụ thể, về cơ bản có thể gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, và cụ thể hơn, có thể gồm có bất kỳ một trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Hơn nữa, biến thể có thể chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, hoặc có thể chứa trình tự axit amin có ít nhất 80% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, miễn là axit amin ở vị trí 653 trong trình tự axit amin được cố định (tức là, trong trình tự axit amin của biến thể, axit amin tương ứng với vị trí 653 có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 giống với axit amin ở vị trí 653 có mã nhận biết SEQ ID NO: 3), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, biến thể của sáng chế có thể chứa polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Hơn nữa, rõ ràng rằng các biến thể có các trình tự axit amin trong đó một số trình tự được xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào, ngoài vị trí 653, cũng được bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là các trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể.

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

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit bảo thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và các hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bằng chương trình đang sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai hóa với toàn bộ hoặc ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% của toàn bộ chiều dài trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Rõ ràng rằng việc lai hóa còn bao gồm lai hóa polynucleotit với polynucleotit chứa đơn vị mã hóa (codon) thông thường hoặc codon trong sự xem xét thoái biến codon.

Bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán máy tính

đã biết chẳng hạn như chương trình “FASTA”, ví dụ, bằng cách sử dụng các tham số mặc định như trong Pearson et al. (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444. Ngoài ra, có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443–453) như được triển khai trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở phân tử sinh học châu Âu, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản cao hơn) (bao gồm gói chương trình GCG ((Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, and [CARILLO et al.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, BLAST của Trung tâm quốc gia công nghệ sinh học hoặc ClustalW có thể được sử dụng để xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP chẳng hạn như Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443, như được đưa ra trong, ví dụ, Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình GAP có thể được định nghĩa là giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (cụ thể, các nucleotit hoặc các axit amin) cho tổng số các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong hai trình tự. Các tham số mặc định đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (bao gồm giá trị 1 đối với đồng nhất và giá trị 0 đối với không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745 (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)) như được mô tả bởi Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353–358 (1979); (2) hàm phạt bằng 3,0 đối với mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 đối với mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển bằng 10, hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển bằng 0,5); và (3) không có hàm phạt đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối.

Ngoài ra, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự đồng nhất, tương tự, hoặc tương đồng hay không có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự này thông qua các thử nghiệm lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai hóa thích hợp được xác định có thể nằm trong phạm vi của công nghệ

và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin, có thể còn bao gồm biến dị, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 86 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Cụ thể, biến thể có thể bao gồm biến dị, trong đó xystein tương ứng với vị trí 86 được thay thế bằng axit amin khác, ví dụ, bằng arginin.

Ví dụ, biến thể có thể chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 13, về cơ bản có thể gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 13, hoặc có thể gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 13, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” là sợi ADN hoặc ARN có chiều dài tối thiểu nhất định như polyme của các nucleotit trong đó các phân tử nucleotit được liên kết với nhau thành dạng chuỗi dài bằng các liên kết cộng hóa trị.

Gen mã hóa glutamat–xystein ligaza của sáng chế có thể là gen gsh1.

Gen có thể có nguồn gốc từ nấm men. Cụ thể, gen có thể có nguồn gốc từ chi *Saccharomyces*, và tốt hơn là, gen có thể có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*. Cụ thể, gen có thể bao gồm bất kỳ gen nào mà không bị giới hạn, miễn là gen mã hóa polypeptit có hoạt tính glutamat–xystein ligaza có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*, và theo phương án của sáng chế, gen có thể là gen mã hóa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và theo phương án của sáng chế, gen có thể bao gồm trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế có thể bao gồm bất kỳ

polynucleotit mà không bị giới hạn, miễn là đó là polynucleotit mã hóa biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế và polypeptit có hoạt tính tương ứng với nó.

Trong polynucleotit mã hóa glutamat–xystein ligaza của sáng chế và mã hóa biến thể của nó, các biến đổi khác nhau có thể được tạo ra trong vùng mã hóa miễn là trình tự axit amin của polypeptit không thay đổi, xem xét đến sự thoái biến codon hoặc các codon được ưu tiên trong các sinh vật mong muốn để biểu hiện polypeptit.

Cụ thể, polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế có thể chứa bất kỳ trình tự polynucleotit mà không bị giới hạn miễn là đó là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin. Ví dụ, polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế, cụ thể, protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, hoặc polypeptit có sự đồng nhất hoặc tương đồng với nó, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Sự đồng nhất hoặc tương đồng đã được mô tả ở trên.

Hơn nữa, polynucleotit mã hóa biến thể protein của sáng chế có thể chứa đầu dò được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự mà không bị giới hạn miễn là đó là trình tự lai hóa với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần vào trình tự polynucleotit dưới các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa biến thể protein trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin.

Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện cho phép sự lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy đã được mô tả chi tiết trong các tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al., 1989, supra). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các polynucleotit có sự đồng nhất hoặc tương đồng cao, ví dụ, ít nhất 40%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, tốt nhất là, ít nhất 99% sự đồng nhất hoặc tương đồng được lai hóa với nhau và các polynucleotit có sự đồng nhất hoặc tương đồng thấp hơn sự đồng nhất hoặc tương đồng ở trên không được lai hóa với nhau, hoặc các điều kiện rửa thông thường cho phép lai Southern, trong đó rửa được thực hiện một lần, tốt hơn là hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương đương với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, 0,1%

SDS.

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

Cụ thể, polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm quá trình lai hóa ở giá trị T_m là 55°C và các điều kiện đã mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Độ nghiêm ngặt thích hợp để lai các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các thông số đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook et al., 1989, *supra*, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể của protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn được liên kết chức năng với vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) thích hợp để polypeptit mong muốn có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự điều khiển để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector có thể được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp và sau đó sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể được tích hợp vào bộ gen của chúng.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein mong muốn trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit đột biến thông qua vector để chèn vào nhiễm sắc thể nội bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bởi bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, nhưng sáng chế

không bị giới hạn ở đó. Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để phát hiện việc chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc để chọn các tế bào được biến nạp với các vector, tức là, để xác nhận việc chèn phân tử axit nucleic mong muốn, và các chỉ dấu tạo ra các kiểu hình có thể lựa chọn chẳng hạn như khả năng chống chịu thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, khả năng chống lại các tác nhân gây độc tế bào, hoặc biểu hiện của các polypeptit trên bề mặt có thể được sử dụng. Trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu chọn lọc mới có thể tồn tại hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau, và do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn lọc.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các vector biểu hiện nấm men bao gồm cả vector plasmid nấm men tích hợp (YIp) và vector plasmid ngoại nhiễm sắc thể. Vector plasmid ngoại nhiễm sắc thể có thể bao gồm plasmid nấm men episomal (YEp), plasmid nấm men sao chép (YRp) và plasmid tâm động nấm men (YCp). Ngoài ra, các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YACs) cũng có thể được sử dụng như các vector của sáng chế. Ví dụ cụ thể, các vector áp dụng có thể bao gồm pESCHIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAPα A, pGAPα B, pGAPα C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6α A, pPIC6α B, pPIC6α C, pPIC9K, pYC2/CT, vector biểu hiện nấm men pYD1, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, nấm men micron dạng A, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 và pYJ406, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích được đưa vào tế bào vật chủ hoặc vi sinh vật sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Polynucleotit đã biến nạp có thể được định vị trí bằng cách được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc định vị trí bên ngoài nhiễm sắc thể miễn là polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và/hoặc ARN mã hóa protein mong muốn. Polynucleotit có thể được đưa vào ở bất kỳ dạng nào miễn là polynucleotit

có thể được đưa vào tế bào vật chủ và sau đó được biểu hiện. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng catxet biểu hiện là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để tự sao chép. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng gen khởi động được liên kết chức năng với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Hơn nữa, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng ban đầu và được liên kết chức năng với trình tự yêu cầu đối với biểu hiện trong tế bào vật chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Hơn nữa, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết chức năng” có nghĩa là trình tự gen được liên kết chức năng với trình tự vùng gen khởi động để bắt đầu và làm trung gian dịch mã của polynucleotit mã hóa polypeptit mong muốn theo sáng chế.

Phương pháp biến nạp vector theo sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp đưa axit nucleic vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật phù hợp với tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm điện di, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE–dextran, phương pháp liposom cation, và phương pháp lithi axetat–MSO có thể được sử dụng, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Sáng chế có thể đề xuất vi sinh vật sản sinh glutathion bằng cách bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể, polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh glutathion” bao gồm các vi sinh vật kiểu dại hoặc các vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể đề cập đến tất cả các vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường thông qua việc chèn vào gen ngoại sinh hoặc tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh. Theo sáng chế, vi sinh vật có thể bao gồm bất kỳ vi sinh vật nào mà không bị giới hạn miễn là đó là vi sinh vật trong đó biến thể glutamat–xystein ligaza của sáng chế được đưa vào hoặc bao gồm.

Ví dụ, vi sinh vật là tế bào hoặc vi sinh vật được biến nạp với gen mã hóa protein đích hoặc vector chứa protein đích, và biểu hiện protein đích. Theo các mục đích của sáng chế, tế bào vật chủ hoặc vi sinh vật là bất kỳ vi sinh vật nào miễn là nó có thể sản sinh glutathion bằng cách bao gồm biến thể glutamat–xystein ligaza.

“Glutathion” theo sáng chế được sử dụng thay thế với “GSH”, và đề cập đến tripeptit gồm có 3 axit amin: glutamat, xystein, và glyxin. Glutathion có thể được sử dụng làm nguyên liệu cho dược phẩm, thực phẩm chức năng cho sức khỏe, thành phần hương vị, phụ gia thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, “vi sinh vật sản sinh glutathion” bao gồm các vi sinh vật trong đó đột biến gen xảy ra tự nhiên hoặc nhân tạo, và là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường thông qua việc chèn vào gen ngoại sinh hoặc tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, và có thể là các vi sinh vật trong đó các biến đổi gen đã xảy ra hoặc hoạt tính được tăng cường để sản xuất glutathion mong muốn. Theo mục đích của sáng chế, vi sinh vật sản sinh glutathion có thể đề cập đến vi sinh vật chứa glutamat-xystein ligaza để sản sinh lượng lớn glutathion mong muốn, so với vi sinh vật không biến đổi hoặc kiểu dại. “Vi sinh vật sản sinh glutathion” có thể được sử dụng thay thế với “vi sinh vật sản sinh glutathion”, “vi sinh vật có khả năng sản sinh glutathion”, “chủng sản sinh glutathion”, “chủng có khả năng sản sinh glutathion”, v.v..

Loại vi sinh vật sản sinh glutathion không bị giới hạn cụ thể, miễn là vi sinh vật có thể sản sinh glutathion, nhưng nó có thể là vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể, *Saccharomyces cerevisiae*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Chủng bố mẹ của vi sinh vật sản sinh glutathion bao gồm biến thể không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó có thể sản sinh glutathion. Vi sinh vật có thể bao gồm các đột biến chẳng hạn như tăng cường con đường sinh tổng hợp để tăng khả năng sản sinh glutathion, giải phóng ức chế phản hồi, bất hoạt các gen làm suy yếu con đường thoái hóa hoặc con đường sinh tổng hợp, không loại trừ đột biến xảy ra tự nhiên. Theo một phương án, vi sinh vật có thể bao gồm đột biến làm tăng khả năng sản sinh glutathion trong vùng điều hòa biểu hiện của glutamat-xystein ligaza. Đột biến có thể là bất kỳ một hoặc nhiều đột biến được chọn từ vùng phía trước -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C) và -409(T→C) của GSH1 ORF, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Vi sinh vật chứa bất kỳ một hoặc nhiều biến thể của sáng chế; polynucleotit mã hóa biến thể; và vectơ chứa polynucleotit có thể là vi sinh vật biểu hiện biến thể glutamat-xystein ligaza, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 trong trình tự axit

amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Glutamat-xystein ligaza và biến thể của glutamat-xystein ligaza đã được mô tả ở trên.

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

Vi sinh vật biểu hiện biến thể của protein theo sáng chế có thể là vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện biến thể của protein theo sáng chế, và do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế vi sinh vật biểu hiện biến thể của protein theo sáng chế.

Theo sáng chế, “đưa vào protein” đề cập đến biểu hiện hoạt tính của protein cụ thể mà không có sẵn ban đầu bởi vi sinh vật, hoặc biểu hiện hoạt tính tăng cường so với hoạt tính nội tại của protein tương ứng hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa vào protein có thể đề cập đến việc đưa protein cụ thể, đưa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào nhiễm sắc thể của vi sinh vật, hoặc đưa vector chứa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào vi sinh vật, nhờ đó biểu hiện hoạt tính của protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường” của hoạt tính polypeptit hoặc protein có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein được so với hoạt tính nội tại. Sự tăng cường có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như điều chỉnh lên, biểu hiện quá mức, tăng lên, v.v.. Trong phần mô tả này, việc tăng lên có thể bao gồm cả hoạt tính biểu hiện mà không có sẵn ban đầu và biểu hiện hoạt tính tăng cường, so với hoạt tính nội tại hoặc hoạt tính trước khi biến đổi. “Hoạt tính nội tại” có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi thay đổi tính trạng hoặc vi sinh vật không biến đổi khi tính trạng được thay đổi bởi đột biến gen do các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. Hoạt tính nội tại có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. Thực tế là hoạt tính của polypeptit hoặc protein được “tăng cường” hoặc “tăng lên” so với hoạt tính nội tại, có nghĩa là hoạt tính của polypeptit hoặc protein được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit hoặc protein

cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi thay đổi tính trạng hoặc vi sinh vật không biến đổi.

“Tăng cường hoạt tính” có thể đạt được thông qua việc đưa vào polypeptit hoặc protein ngoại lai hoặc tăng cường hoạt tính nội tại của polypeptit hoặc protein, cụ thể, thông qua việc tăng cường hoạt tính nội tại của polypeptit hoặc protein. Việc tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể được xác nhận bằng sự tăng mức độ hoạt tính và mức độ biểu hiện của polypeptit hoặc protein tương ứng hoặc lượng sản phẩm được sản sinh từ protein tương ứng.

Để tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein, các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được áp dụng, và phương pháp này không bị giới hạn miễn là hoạt tính của polypeptit hoặc protein mong muốn có thể được tăng cường, so với hoạt tính của polypeptit hoặc protein của vi sinh vật trước khi được biến đổi. Cụ thể, có thể sử dụng kỹ thuật di truyền và/hoặc kỹ thuật protein đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, là các phương pháp thông thường của sinh học phân tử, nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó (Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1–16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012, v.v.).

Cụ thể, phương pháp tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein sử dụng kỹ thuật di truyền có thể được thực hiện bằng các phương pháp, ví dụ:

- 1) tăng số lượng bản sao nội bào của gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein;
- 2) thay thế vùng điều hòa biểu hiện gen trên nhiễm sắc thể mã hóa polypeptit bằng trình tự có hoạt tính mạnh;
- 3) biến đổi codon khởi đầu của polypeptit hoặc protein hoặc trình tự bazơ mã hóa vùng 5'-UTR;
- 4) biến đổi trình tự axit amin của polypeptit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein;
- 5) đưa vào polynucleotit ngoại lai mã hóa hoạt tính của polypeptit hoặc protein hoặc biến thể tối ưu hóa codon của polynucleotit; hoặc
- 6) kết hợp của các phương pháp nêu trên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein sử dụng phương pháp kỹ thuật protein có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biến đổi hoặc biến đổi hóa học vùng tiếp xúc được lựa chọn bằng cách phân tích cấu trúc ba chiều của polypeptit hoặc protein, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

(1) Sự tăng số lượng bản sao nội bào của gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, đưa vector vào tế bào vật chủ, trong đó vector sao chép và hoạt động độc lập với tế bào vật chủ và được liên kết chức năng với gen hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein tương ứng. Ngoài ra, phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ, trong đó vector được liên kết chức năng với gen và có khả năng chèn gen hoặc polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

(2) Sự thay thế vùng điều hòa biểu hiện gen (trình tự điều hòa biểu hiện) trên nhiễm sắc thể mã hóa polypeptit hoặc protein với trình tự có hoạt tính mạnh có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách gây đột biến trong trình tự thông qua việc xóa, chèn, thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ trình tự nucleotit, hoặc sự kết hợp của chúng hoặc bằng cách thay thế bằng trình tự bằng trình tự nucleotit có hoạt tính mạnh hơn để tăng cường thêm hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở vùng gen khởi động (promotor), trình tự vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Phương pháp có thể được thực hiện cụ thể bằng cách liên kết promotor dị hợp thay vì promotor nội tại, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Các ví dụ về các promotor đã biết đối với sinh vật nhân thực bao gồm các promotor cho yếu tố kéo dài dịch mã 1 (translation elongation factor 1: TEF1), glycerol-3-phosphat dehydrogenaza 1 (GPD1), các enzym 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc glycolytic chẳng hạn như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza, và các ví dụ về promotor nấm men khác là promotor cảm ứng với lợi thế bổ sung của phiên mã được điều hòa bởi các điều kiện tăng trưởng bao gồm các promotor cho rượu dehydrogenaza 2, isoxytocrom C, axit

phosphatase, các enzym phân hủy liên kết với chất chuyển hóa nitơ, metallothionein, glyceraldehyt-3-phosphat dehydrogenase, và các enzym chịu trách nhiệm sử dụng maltoza và galactosa, và khi tế bào vật chủ là nấm men, các promoter sẵn có có thể bao gồm promoter TEF1, promoter TEF2, promoter GAL10, promoter GAL1, promoter ADH1, promoter ADH2, promoter PHO5, promoter GAL1-10, promoter TDH3 (promoter GPD), promoter TDH2, promoter TDH1, promoter PGK1, promoter PYK2, promoter ENO1, promoter ENO2, và promoter TPI1, và các vector và promoter thích hợp để sử dụng trong biểu hiện nấm men còn được mô tả trong patent châu Âu số EP 073657, nhưng các promoter không bị giới hạn ở đó. Các chất tăng cường nấm men cũng có thể được sử dụng thuận lợi với các promoter nấm men, nhưng chúng không bị giới hạn ở đó.

(3) Việc biến đổi codon khởi đầu của polypeptit hoặc protein hoặc trình tự bazơ mã hóa vùng 5'-UTR có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách thay thế codon khởi đầu nội tại của polypeptit hoặc protein bằng codon khởi đầu khác có mức độ biểu hiện cao hơn của polypeptit hoặc protein, so với khởi đầu nội tại, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

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

Vector được sử dụng tại đây có thể còn bao gồm chỉ dấu lựa chọn để phát hiện việc chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn đã được mô tả ở trên.

(5) Sự đưa vào polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit hoặc protein có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách đưa polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit hoặc protein có sự đồng nhất/tương tự với sự đồng nhất/tương tự của polypeptit hoặc protein, hoặc bằng cách đưa polynucleotit biến thể được tối ưu hóa codon của nó vào tế bào vật chủ. Vùng hoặc trình tự của polynucleotit ngoại lai không bị giới hạn cụ thể miễn là polynucleotit

ngoại lai biểu hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự với hoạt tính của polypeptit hoặc protein. Ngoài ra, polynucleotit được tối ưu hóa codon để phiên mã và dịch mã tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai đã đưa vào trong tế bào vật chủ có thể được đưa vào tế bào vật chủ. Sự đưa vào có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp biến đổi đã biết được lựa chọn phù hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Khi polynucleotit đã đưa vào được biểu hiện trong tế bào vật chủ, polypeptit hoặc protein được sản sinh, nhờ đó tăng cường hoạt tính của polynucleotit.

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

Sự tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein ở trên có thể tăng lên trong hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein tương ứng, so với hoạt tính hoặc nồng độ của polypeptit hoặc protein được biểu hiện trong vi sinh kiểu đại hoặc vi sinh vật trước khi biến đổi, hoặc có thể là lượng tăng lên của sản phẩm thu từ polypeptit hoặc protein tương ứng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chủng trước khi biến đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi biến đổi” không loại trừ các chủng chứa các đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong các vi sinh vật và có thể đề cập đến chủng tự nhiên hoặc chủng kiểu đại, hoặc chủng trước khi được biến đổi bằng cách biến đổi gen do các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. “Chủng trước khi biến đổi” hoặc “vi sinh vật trước khi biến đổi” có thể được sử dụng thay thế cho “chủng không đột biến”, “chủng không biến đổi”, “vi sinh vật không đột biến”, “vi sinh vật không biến đổi”, hoặc “vi sinh vật nền”.

Như được sử dụng ở đây, vi sinh vật chứa biến thể glutamat–xystein ligaza, hoặc chứa polynucleotit mã hóa biến thể glutamat–xystein ligaza hoặc vector chứa polynucleotit có thể là vi sinh vật tái tổ hợp, và có thể đạt được tái tổ hợp bằng cách biến đổi gen chẳng hạn như biến nạp.

Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được điều chế bằng cách biến nạp sử dụng vector chứa polynucleotit, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Vi sinh vật tái tổ hợp có thể là nấm men, và ví dụ có thể là vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*, cụ thể là, *Saccharomyces cerevisiae*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh glutathion, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật. Vi sinh vật và glutathion đã được

mô tả ở trên.

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

Theo sáng chế, các nguồn cacbon bao gồm các cacbohyđrat chẳng hạn như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; rượu đường chẳng hạn như mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ chẳng hạn như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin chẳng hạn như axit glutamic, methionin, lysin, v.v.; và tương tự, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Hơn nữa, các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên chẳng hạn như tinh bột hydrolysat, mật đường, mật mía, cám gạo, sắn, bã mía, và dịch chiết ngô có thể được sử dụng. Cụ thể, các cacbohyđrat chẳng hạn như glucoza và mật đường đã xử lý sơ bộ tiệt trùng (cụ thể, mật đường chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng, và các lượng thích hợp của các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau mà không bị giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp hai hoặc nhiều nguồn.

Như nguồn nitơ, các nguồn nitơ vô cơ chẳng hạn như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, v.v.; và các nguồn nitơ hữu cơ chẳng hạn như các axit amin, pepton, NZ-amin, cao thịt, dịch chiết nấm men, cao mạch nha, dịch chiết ngô, casein hydrolysat, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của nó, và bánh đậu nành tách béo hoặc các sản phẩm phân hủy của nó, v.v. có thể được sử dụng. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp hai hoặc nhiều nguồn, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Các nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng của chúng. Như các hợp chất vô cơ, natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, v.v. có thể được sử dụng.

Ngoài các hợp chất này, các axit amin, các vitamin và/hoặc các tiền chất phù hợp,

v.v. có thể được bao gồm. Cụ thể, các axit L-axit amin, v.v. có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy cho chúng. Cụ thể, glyxin, glutamat, và/hoặc xystein, v.v. có thể được thêm vào, và nếu cần thiết, các L-axit amin chẳng hạn như lysin, v.v. có thể còn được thêm vào, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Các môi trường hoặc tiền chất này có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trong khi nuôi cấy chủng, độ pH của dịch nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách thêm vào các hợp chất chẳng hạn như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp. Trong khi nuôi cấy, việc tạo bọt có thể bị triệt tiêu bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt chẳng hạn như este polyglycol của axit béo. Hơn nữa, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường, hoặc khí có thể không được bơm vào hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon đioxit có thể được bơm vào để duy trì trạng thái kỵ khí và trạng thái vi hiếu khí.

Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ từ 25°C đến 40°C, tốt hơn là, từ 28°C đến 37°C, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Việc nuôi cấy có thể có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản phẩm mong muốn, cụ thể, trong 1 giờ đến 100 giờ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp sản xuất glutathion có thể còn bao gồm quá trình bổ sung sau bước nuôi cấy. Quá trình bổ sung có thể được lựa chọn thích hợp theo việc sử dụng glutathion.

Cụ thể, phương pháp sản xuất glutathion có thể bao gồm bước thu gom glutathion được tích tụ trong các tế bào qua bước nuôi cấy, ví dụ, bước thu gom glutathion từ một hoặc nhiều nguyên liệu được chọn từ chủng, sản phẩm khô, chiết xuất, nuôi cấy, và dịch ly giải của chúng, sau bước nuôi cấy

Phương pháp này có thể còn bao gồm bước ly giải chủng trước hoặc đồng thời với bước thu gom. Quá trình ly giải chủng có thể được thực hiện bằng phương pháp thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế, ví dụ, dung dịch đệm ly giải, máy siêu âm, xử lý nhiệt và ép kiểu Pháp, v.v.. Ngoài ra, bước ly giải có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở các phản ứng enzym chẳng hạn như các enzym phân hủy thành tế bào, enzym phân hủy axit nucleic, enzym chuyển axit nucleic, và enzym phân hủy protein.

Đối với các mục đích của sáng chế, nấm men khô, dịch chiết nấm men, bột hỗn hợp chiết xuất nấm men, hoặc glutathion tinh khiết có hàm lượng glutathion cao có thể được điều chế thông qua phương pháp điều chế glutathion, nhưng không giới hạn ở đó, và có thể được điều chế thích hợp theo sản phẩm mong muốn.

Như được sử dụng ở đây, “nấm men khô” có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “chủng khô”, v.v.. Nấm men khô có thể được điều chế bằng cách làm khô chủng men trong đó glutathion được tích tụ, và cụ thể, có thể được đưa vào chế phẩm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thực phẩm, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dịch chiết nấm men” có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “dịch chiết chủng”, v.v.. Dịch chiết chủng có thể đề cập đến vật liệu còn lại sau khi thành tế bào được tách ra khỏi thân tế bào của chủng. Cụ thể, chiết xuất chủng có thể đề cập đến các thành phần còn lại, không bao gồm thành tế bào, thu được bằng cách ly giải thân tế bào. Dịch chiết chủng có thể bao gồm glutathion và có thể bao gồm như các thành phần không phải glutathion, một hoặc nhiều thành phần của protein, cacbohydrat, axit nucleic và chất xơ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Bước thu gom có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, nhờ đó thu gom glutathion, là nguyên liệu mong muốn.

Bước thu gom có thể bao gồm quá trình tinh chế. Quá trình tinh chế có thể là quá trình chỉ tách glutathion tinh khiết ra khỏi chủng. Thông qua quá trình tinh chế, glutathion tinh khiết có thể được điều chế.

Khi cần thiết, phương pháp điều chế glutathion có thể còn bao gồm bước trộn tá được với nguyên liệu được chọn từ chủng thu được sau bước nuôi cấy, sản phẩm khô, dịch chiết, dịch nuôi cấy, và dịch ly giải của chúng, và glutathion thu được từ đó. Thông qua bước trộn này, hỗn hợp bột chiết xuất nấm men có thể được điều chế.

Tá được có thể được lựa chọn thích hợp để sử dụng theo mục đích sử dụng hoặc dạng của chúng, và có thể, ví dụ, được chọn từ tinh bột, glucoza, xenluloza, lactoza, glycogen, D-mannitol, sorbitol, lactitol, maltodextrin, canxi cacbonat, nhôm silicat tổng hợp, canxi monohydrogen phosphat, canxi sulfat, natri clorua, natri hydro cacbonat, lanolin tinh chế, dextrin, natri alginat, metyl xenluloza, keo silica gel, tinh bột hydroxypropyl, hydroxypropylmetylxenluloza, propylen glycol, casein, canxi lactat, primogel, gôm arabic, và cụ thể, một hoặc nhiều thành phần được chọn từ tinh bột,

glucoza, xenluloza, lactoza, đextrin, glycogen, D-mannitol, và maltodextrin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Tá dược có thể bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất làm ẩm, chất phân tán, chất huyền phù, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất đẳng trương, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng biến thể của sáng chế trong sản xuất glutathion.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật bao gồm biến thể glutamat-xystein ligaza của sáng chế trong sản xuất glutathion.

Biến thể, polynucleotit, và vi sinh vật đã được mô tả ở trên.

Các ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ và ví dụ thực nghiệm. Tuy nhiên, các ví dụ và ví dụ thực nghiệm này chỉ nhằm minh họa sáng chế, và phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ và ví dụ thực nghiệm này.

Ví dụ 1: Lựa chọn và cải thiện chủng sản sinh glutathion

Ví dụ 1-1: Lựa chọn chủng sản sinh glutathion

Các chủng thu được từ nuruk chứa nhiều chủng khác nhau, và các chủng có khả năng sản sinh glutathion được chọn bằng cách cải thiện các chủng.

Cụ thể, các mẫu ngũ cốc, chẳng hạn như gạo, lúa mạch, đậu xanh, yến mạch, v.v., được thu gom từ tổng số 20 khu vực, bao gồm Yongin, Icheon, Pyeongtaek, Hwaseong, tỉnh Gyeonggi, Hàn Quốc, và sau đó xay, nhào, bọc vải, ép chặt, quán rom, ủ lên men trong 10 ngày. Sau đó, các mẫu được sấy khô từ từ để điều chế nuruk.

Để tách chiết các chủng khác nhau từ nuruk đã điều chế, các thử nghiệm đã được tiến hành như sau. 45 ml nước muối được thêm vào 5 g nuruk và nghiền thành bột bằng máy trộn. Để tách các chủng nấm men tinh khiết, thực hiện pha loãng liên tiếp, sau đó nuôi cấy trên đĩa thạch YPD (10 g/L chiết xuất men, 20 g/L Bacto pepton, 20 g/L Glucoza, trong 1 lít nước cất) và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Sau đó, các khuẩn lạc nấm men được xếp thành vệt trên thạch YPD thông qua hình thái khuẩn lạc và kiểm tra bằng kính hiển vi. 25 ml canh thịt YPD được phân phối vào bình tam giác Erlenmeyer

250 ml, chủng tinh khiết đã phân tách được cấy vào, và nuôi cấy bằng cách lắc (ở nhiệt độ 30°C, tốc độ 200 vòng/phút) trong 48 giờ để xác nhận quá trình sản xuất glutathion, và tiến hành sàng lọc chủng.

Để cải thiện các chủng đã tách chiết chủ yếu, các đột biến ngẫu nhiên đã được tạo ra ở các chủng phân lập. Cụ thể, trong số các loại nấm men được phân lập từ nuruk, chủng trong đó việc sản sinh glutathion đã được xác nhận được tách chiết và đặt tên là chủng CJ-37. Chủng CJ-37 được nuôi cấy trong môi trường rắn, cấy giống vào canh thịt để thu được môi trường nuôi cấy, và các tế bào được chiếu tia cực tím (UV) bằng đèn UV. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã chiếu xạ UV được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường đĩa để chỉ thu được các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc, và việc sản sinh glutathion của chúng đã được kiểm tra.

Kết quả là, từ các chủng đột biến, chủng thể hiện khả năng sản sinh glutathion cao nhất được chọn làm chủng sản sinh glutathion, và được đặt tên là chủng CJ-5, và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 31 tháng 07 năm 2019, và được cấp số lưu chủng KCCM12568P.

Ví dụ 1-2: Thử nghiệm để cải thiện thêm nhằm tăng khả năng sản sinh glutathion

Để cải thiện thêm khả năng sản sinh glutathion của chủng CJ-5, các đột biến được tạo ra như sau.

Chủng CJ-5 được nuôi cấy trong môi trường rắn, cấy giống vào canh thịt để thu được môi trường nuôi cấy, và các tế bào được chiếu tia UV bằng đèn UV. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã chiếu xạ UV được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường đĩa để chỉ thu được các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc, và chủng thể hiện khả năng sản sinh glutathion cải thiện nhất được tách chiết và được đặt tên là chủng CC02-2490, được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 17 tháng 01 năm 2020, và được cấp số lưu chủng KCCM12659P.

Kết quả của việc phân tích trình tự nucleotit của gen gsh1 sinh tổng hợp glutathion liên quan đến sự tăng cường khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2490, xác nhận rằng xystein là axit amin 86 của protein GSH1 (SEQ ID NO: 1) được mã hóa bởi gen gsh1 được thay thế bằng arginin.

Ví dụ 1-3: Thử nghiệm để cải thiện thêm nhằm tăng khả năng sản sinh glutathion

Để cải thiện thêm khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2490, các đột biến được tạo ra như sau.

Chủng CC02-2490 được nuôi cấy trong môi trường rắn, cấy giống vào canh thịt để thu được môi trường nuôi cấy, và các tế bào được chiếu tia UV bằng đèn UV. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã chiếu xạ UV được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường đĩa để chỉ thu được các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc, và chủng thể hiện khả năng sản sinh glutathion cải thiện nhất được tách chiết và được đặt tên là chủng CC02-2544, được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 20 tháng 02 năm 2020, và được cấp số lưu chủng KCCM12674P.

Kết quả của việc phân tích trình tự nucleotit của gen *gsh1* sinh tổng hợp glutathion liên quan đến sự tăng cường khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2544, xác nhận rằng đã xảy ra các đột biến của vùng phía trước -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C), -409(T→C) của GSH1 ORF (SEQ ID NO: 12).

Ví dụ 2: Thử nghiệm để cải thiện thêm của chủng CC02-2544 để tăng cường khả năng sản sinh glutathion

Để cải thiện thêm khả năng sản sinh glutathion của chủng CC02-2544, các đột biến được tạo ra như sau.

Chủng CC02-2544 được nuôi cấy trong môi trường rắn, cấy giống vào canh thịt để thu được môi trường nuôi cấy, và các tế bào được chiếu tia UV bằng đèn UV. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã chiếu xạ UV được cấy chuyển trên đĩa trong môi trường đĩa để chỉ thu được các chủng đột biến tạo thành các khuẩn lạc, tiếp theo là phân tích trình tự nucleotit.

Kết quả của thử nghiệm, xác nhận rằng methionin được thay thế cho axit amin 653 (glyxin) của GSH1, là protein được mã hóa bởi gen *gsh1* sinh tổng hợp glutathion của chủng thể hiện tăng 27% về hàm lượng glutathion. Chủng này được đặt tên là CC02-2816 được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 08 tháng 12 năm 2020, và được cấp số lưu chủng KCCM12891P.

Ví dụ 3: Thử nghiệm của đột biến gốc GSH1 G653

Từ các kết quả ở trên của ví dụ 2, xác định rằng vị trí 653 của protein GSH1 đóng vai trò quan trọng trong sản sinh glutathion, và các đột biến chủng của *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CEN.PK2-1D và chủng CC02-2544 được điều chế để biểu hiện các đột biến protein trong đó axit amin ở vị trí 653 của protein GSH1 được thay thế bằng axit amin khác, và nhằm mục đích kiểm tra xem việc sản sinh glutathion có tăng lên hay không. Mặt khác, như đã đề cập ở trên, chủng CC02-2544 là chủng có các đột biến của vùng phía trước -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C), -409(T→C) của GSH1 ORF trong đột biến chủng GSH1 C86R. Trong chủng tương ứng, biến thể của axit amin ở vị trí 653 của protein GSH1 cũng được đưa vào.

Để điều chế axit amin ở vị trí 653 của protein GSH1 của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được thay thế bằng methionin, các plasmit pWAL100 và pWBR100 được sử dụng dựa trên các hàm lượng đã được bộc lộ trong tài liệu Lee TH, et al. (J. Microbiol. Biotechnol. (2006), 16(6), 979–982). Cụ thể, PCR được thực hiện như sau bằng cách sử dụng bộ gen ADN của chủng CJ-5 làm mạch khuôn. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 để thu được một phần của trình tự đầu N GSH1 chứa trình tự kế cận BamHI đầu N, codon khởi đầu GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến G653M, và sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 để thu được một phần của trình tự đầu C GSH1 chứa trình tự kế cận XhoI đầu C, codon kết thúc GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến G653M. Tiếp theo, PCR trùng lặp được thực hiện bằng cách sử dụng hai trình tự này làm các mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7, và kết quả là, phân đoạn GSH1 ORF chứa trình tự mã hóa đột biến của protein GSH1 trong đó axit amin ở vị trí 653 được thay thế bằng methionin, BamHI đầu N, và trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C. Phân đoạn ORF được xử lý bằng BamHI và XhoI và sau đó nhân dòng vào vector pWAL100 đã được xử lý bằng các enzym tương tự để điều chế vector pWAL100-GSH1(G653M).

Hơn nữa, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN của chủng CJ-5 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 để thu được phân đoạn 500 bp sau khi codon kết thúc GSH1 ORF chứa các trình tự enzym giới hạn SpeI đầu N và NcoI đầu C. Sau đó, đoạn gen được nhân dòng vào pWBR100

đã được xử lý với cùng enzym giới hạn để điều chế vector pWBR100-GSH1.

Cuối cùng, để điều chế phân đoạn ADN cần đưa vào nấm men, sản phẩm PCR chứa trình tự mã hóa đột biến của methionin và một phần của KIURA3 thu được bằng cách sử dụng vector pWAL100-GSH1 (G653M) đã điều chế trước đó làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 10, và sản phẩm PCR chứa một phần của KIURA3 và 500 bp sau khi codon kết thúc GSH1 thu được bằng cách sử dụng vector pWBR100-GSH1 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 9, và sau đó mỗi sản phẩm PCR được biến nạp vào *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CC02-2544 với cùng tỉ lệ mol. PCR được thực hiện trong điều kiện biến tính nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 1 phút, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút cho mỗi kb. Quá trình biến đổi men được thực hiện theo phương pháp lithi axetat đã được biến đổi từ phương pháp trong ấn phẩm của Geitz (Nucleic Acid Research, 20(6), 1425). Cụ thể, các tế bào nấm men có O.D. từ 0,7 đến 1,2 được rửa bằng dung dịch đệm lithi axetat/TE hai lần, và sau đó các sản phẩm PCR và ADN sợi đơn (Sigma D-7656) được trộn với nhau và nuôi cấy trong dung dịch đệm PEG lithi axetat/TE/40% trong 30 phút ở nhiệt độ 30°C và 42°C trong 5 phút, và sau đó các tế bào được nuôi cấy trong đĩa thạch SC (2% glucoza) mà không bao gồm uraxil cho đến khi các khuẩn lạc có thể nhìn thấy được, và thu được chủng trong đó trình tự mã hóa đột biến GSH1 G653M và gen KIURA3 được đưa vào. Sau đó, để loại bỏ KIURA3, từng chủng được nuôi cấy qua đêm trong 2 ml YPD, pha loãng với tỷ lệ 1/100, và được nuôi cấy trải trong đĩa thạch SC (2% glucoza) chứa 0,1% 5-FOA để điều chế chủng đột biến *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D GSH1 G653M và chủng đột biến *S. cerevisiae* CC02-2544 GSH1 G653M mà từ đó chỉ dấu uraxil đã bị loại bỏ. Chủng có khả năng biểu hiện biến thể của protein GSH1 trong đó các loại của axit amin ngoài methionin đã được thay thế cũng được điều chế theo cách tương tự, ngoại trừ việc sử dụng cặp mồi trong đó trình tự mã hóa methionin ở vị trí 653 trên các trình tự cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng trình tự mã hóa axit amin khác.

Bảng 1

Đoạn mồi	Trình tự 5' → 3'
F_BamHI_GSH1 (SEQ ID NO: 4)	GGTAGGATCCATGGGACTCTTAGCTTTGGGCAC

R_GSH1_G653M (SEQ ID NO: 5)	GTCAATTCCATTTTGAATCGTCCA
F_GSH1_G653M (SEQ ID NO: 6)	ATTCAAAAATGGAATTGACATCCTT
R_XhoI_GSH1 (SEQ ID NO: 7)	ATGACTCGAGTTAACATTTGCTTTCTATTGAAGGC
F_SpeI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 8)	TAGAACTAGTACTCCTTTTATTTCGGTTGTGAA
R_NcoI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 9)	GCTGCCATGGGAATAGTGTGAACCGATAACTGTG T
R_AL sát thủ (SEQ ID NO: 10)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR sát thủ (SEQ ID NO: 11)	CTTGACGTTTCGTTTCGACTGATGAG

Các kết quả đo nồng độ và hàm lượng glutathion (GSH) được sản xuất bằng cách nuôi cấy từng chủng đã điều chế trong 26 giờ được thể hiện ở bảng 2 và bảng 3. Biến thể GSH1 G653M (SEQ ID NO: 13) được đưa thêm vào chủng CC02-2544. Kết quả là, nồng độ GSH tăng lên 77 mg/L từ 471,5 mg/L đến 548,5 mg/L, và kết quả là đưa biến thể GSH1 G653M (SEQ ID NO: 3) vào chủng CEN.PK-1D, nồng độ GSH tăng lên 58 mg/L từ 42 mg/L đến 100 mg/L.

Ví dụ 3-1: Đưa biến thể GSH1 G653 vào chủng CC02-2544

Bảng 2

<i>S. cerevisiae</i> CC02-2544				
	Nồng độ GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	Nồng độ GSH so với đối chứng (số lần gấp)	Hàm lượng GSH so với đối chứng (số lần gấp)
WT (kiểu đại)	471,5	3,2	1,00	1,00
GSH1 G653M	548,5	3,8	1,16	1,19
GSH1 G653N	507,0	3,3	1,08	1,03
GSH1 G653C	440,5	3,2	0,93	1,00
GSH1 G653A	454,6	3,2	0,96	1,00
GSH1 G653L	471,5	3,2	1,00	1,00
GSH1 G653T	445,5	3,0	0,94	0,94
GSH1 G653H	443,7	3,0	0,94	0,93
GSH1 G653P	391,3	2,9	0,83	0,90
GSH1 G653V	346,5	2,4	0,73	0,75

Ví dụ 3-2: Đưa biến thể GSH1 G653 vào chủng CEN.PK-1D

Bảng 3

<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D				
	Nồng độ GSH (mg/L)	Hàm lượng GSH (%)	Nồng độ GSH so với đối chứng (số lần gấp)	Hàm lượng GSH so với đối chứng (số lần gấp)
WT (kiểu đại)	42,0	0,4	1,00	1,00
GSH1 G653M	100,0	0,9	2,38	2,37
GSH1 G653L	53,0	0,5	1,26	1,27
GSH1 G653A	40,0	0,4	0,95	1,02
GSH1 G653C	42,0	0,4	1,00	1,02
GSH1 G653N	45,0	0,4	1,07	1,02
GSH1 G653H	39,0	0,4	0,95	0,96
GSH1 G653T	37,0	0,4	0,89	0,94
GSH1 G653V	36,0	0,3	0,86	0,87
GSH1 G653P	18,0	0,2	0,43	0,51

Từ bảng này, có thể thấy rằng biến thể GSH1, trong đó glyxin ở vị trí 653 của protein GSH1 được thay thế bằng methionin, làm tăng đáng kể khả năng sản sinh glutathion.

Điều này xác nhận rằng biến thể GSH1 mới được đề xuất theo sáng chế thể hiện sự tăng lên trong sản lượng glutathion. Ngoài ra, nấm men cho thấy sản lượng cao glutathion bằng cách đưa vào biến thể GSH1 của sáng chế, sản phẩm khô, dịch chiết, dịch nuôi cấy, dịch ly giải của biến thể này, và glutathion đã sản sinh có tác dụng chống oxy hóa, tác dụng giải độc, và tác dụng tăng cường miễn dịch, và do đó chúng cũng có thể được sử dụng hữu ích trong các chế phẩm mỹ phẩm, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm dược phẩm và việc điều chế chúng.

Ví dụ tham chiếu: Thử nghiệm thay thế gốc C86 của protein GSH1

Các biến thể của chủng *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CEN.PK2-1D và chủng CJ-5 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) được điều chế để biểu hiện biến thể của protein trong đó axit amin xystein ở vị trí 86 của protein GSH1 được thay thế bằng axit amin khác. Mục đích là để kiểm tra xem sản lượng glutathion có tăng lên hay không.

Để điều chế chủng trong đó xystein ở vị trí 86 của protein GSH1 của

Saccharomyces cerevisiae được thay thế bằng arginin, các plasmit pWAL100 và pWBR100 được sử dụng dựa trên các hàm lượng đã được bộc lộ trong tài liệu Lee TH, et al. (J. Microbiol. Biotechnol. (2006), 16(6), 979–982). Cụ thể, PCR được thực hiện như sau bằng cách sử dụng bộ gen ADN của chủng CJ-5 làm mạch khuôn. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 14 để thu được một phần của trình tự đầu N GSH1 chứa trình tự kế cận BamHI đầu N, codon khởi đầu GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến C86R, và sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 7 để thu được một phần của trình tự đầu C GSH1 chứa trình tự kế cận XhoI đầu C, codon kết thúc GSH1 ORF, và trình tự mã hóa đột biến C86R. Tiếp theo, PCR trùng lặp được thực hiện bằng cách sử dụng hai trình tự này làm các mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7, và kết quả là, phân đoạn GSH1 ORF chứa trình tự mã hóa đột biến của protein GSH1 trong đó xystein ở vị trí 86 được thay thế bằng arginin, BamHI đầu N, và trình tự enzym giới hạn XhoI đầu C. Phân đoạn ORF được xử lý bằng BamHI và XhoI và sau đó nhân dòng vào vector pWAL100 đã được xử lý bằng các enzym tương tự để điều chế vector pWAL100-GSH1(C86R).

Hơn nữa, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ gen ADN của chủng CJ-5 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 để thu được phân đoạn 500 bp sau khi codon kết thúc GSH1 ORF chứa các trình tự enzym giới hạn SpeI đầu N và NcoI đầu C, sau đó được xử lý với các enzym giới hạn SpeI and NcoI. Sau đó, phân đoạn được nhân dòng vào pWBR100 đã được xử lý với cùng enzym giới hạn để điều chế vector pWBR100-GSH1.

Cuối cùng, để điều chế phân đoạn ADN cần đưa vào nấm men, sản phẩm PCR chứa trình tự mã hóa đột biến của arginin và một phần của KIURA3 thu được bằng cách sử dụng vector pWAL100-GSH1(C86R) đã điều chế trước đó làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 10, và sản phẩm PCR chứa một phần của KIURA3 và 500 bp sau khi codon kết thúc GSH1 thu được bằng cách sử dụng vector pWBR100-GSH1 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 9, và sau đó mỗi sản phẩm PCR được biến nạp vào *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D và *S. cerevisiae* CC02-2544 với cùng tỉ lệ mol. PCR được thực hiện trong điều kiện biến tính nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 1 phút, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút cho mỗi kb. Quá trình biến đổi

men được thực hiện sử dụng phương pháp lithi axetat đã được biến đổi từ phương pháp trong ấn phẩm của Geitz (Nucleic Acid Research, 20(6), 1425). Cụ thể, các tế bào nấm men có O.D. từ 0,7 đến 1,2 được rửa bằng dung dịch đệm lithi axetat/TE hai lần, và sau đó các sản phẩm PCR và ADN sợi đơn (Sigma D-7656) được trộn với nhau và nuôi cấy trong dung dịch đệm PEG lithi axetat/TE/40% trong 30 phút ở nhiệt độ 30°C và 42°C trong 15 phút, và sau đó các tế bào được nuôi cấy tĩnh trong đĩa thạch SC (2% glucoza) mà không bao gồm uraxil cho đến khi các khuẩn lạc có thể nhìn thấy được, và thu được chủng trong đó trình tự mã hóa đột biến GSH1 G653M và gen KIURA3 được đưa vào. Sau đó, để loại bỏ KIURA3, từng chủng được nuôi cấy qua đêm trong 2 ml YPD, pha loãng với tỷ lệ 1/100, và được nuôi cấy trải trong đĩa thạch SC (2% glucoza) chứa 0,1% 5-FOA để điều chế chủng đột biến *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D GSH1 C86R và chủng đột biến *S. cerevisiae* CJ-5 GSH1 C86R mà từ đó chỉ dấu uraxil đã bị loại bỏ. Chủng có khả năng biểu hiện biến thể của protein GSH1 trong đó các loại của axit amin ngoài arginin đã được thay thế cũng được điều chế theo cách tương tự, ngoại trừ việc sử dụng cặp môi trong đó trình tự mã hóa arginin ở vị trí 86 trên các trình tự cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 được thay thế bằng trình tự mã hóa axit amin khác.

Bảng 4

Đoạn môi	Trình tự 5' → 3'
F_BamHI_GSH1 (SEQ ID NO: 4)	GGTAGGATCCATGGGACTCTTAGCTTTGGGCAC
R_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 14)	TTAGCCTCCCTAAGGGACGAATCCT
F_GSH1_C86R (SEQ ID NO: 15)	CGTCCCTTAGGGAGGCTAACGATGT
R_XhoI_GSH1 (SEQ ID NO: 7)	ATGACTCGAGTTAACATTTGCTTTCTATTGAAGGC
F_SpeI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 8)	TAGAACTAGTACTCCTTTTATTTTCGGTTGTGAA
R_NcoI_GSH1_DW (SEQ ID NO: 9)	GCTGCCATGGGAATAGTGTGAACCGATAACTGTGT
R_AL sát thủ (SEQ ID NO: 10)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR sát thủ (SEQ ID NO: 11)	CTTGACGTTTCGTTTCGACTGATGAG

Các kết quả của việc đo nồng độ glutathion (GSH) được sản sinh bằng cách nuôi cấy từng chủng đã điều chế trong 26 giờ được thể hiện trong bảng 5 và bảng 6.

Bảng 5

S. cerevisiae CEN.PK2-1D

Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (số lần gấp)
WT	86,0	1,00
F	109,5	1,27
H	103,2	1,20
K	100,7	1,17
E	100,1	1,16
G	99,5	1,16
D	97,5	1,13
N	96,3	1,12
R	95,2	1,11
Y	94,6	1,10
I	93,0	1,08
L	92,2	1,07
P	92,0	1,07
W	90,8	1,06
Q	90,3	1,05
S	90,0	1,05
M	89,9	1,05
T	86,6	1,01
A	86,4	1,00
V	86,2	1,00

Bảng 6

S. cerevisiae CEN.PK2-1D

Đột biến	Nồng độ GSH (mg/L) 26 giờ	Tăng (số lần gấp)
WT	271,3	1,00
R	330,0	1,22
N	321,9	1,19
D	318,4	1,17

E	314,4	1,16
P	304,2	1,12
K	302,4	1,11
A	294,9	1,09
Q	286,4	1,06
V	285,6	1,05
F	282,5	1,04
Y	277,5	1,02
W	276,0	1,02
S	274,5	1,01
T	273,9	1,01
I	273,5	1,01
H	272,1	1,00
G	272,0	1,00

Kết quả của thử nghiệm, xác nhận rằng khi xystein ở vị trí 86 của protein GSH được thay thế bằng axit amin khác, khả năng sản sinh glutathion tăng lên, so với khả năng sản sinh glutathion của protein GSH1 kiểu dại.

Điều này thể hiện rằng biến thể GSH1 trong đó xystein ở vị trí 86 của protein GSH1 được thay thế bằng axit amin khác làm tăng đáng kể khả năng sản sinh glutathion.

Dựa trên phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện ở dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc tính cơ bản của sáng chế. Đối với vấn đề này, cần hiểu rằng phương án ở trên không bị giới hạn mà chỉ nhằm minh họa trong tất cả các khía cạnh. Phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo ngoài phần mô tả trước đó, và do đó tất cả các thay đổi và biến đổi thuộc phạm vi bảo hộ của các điểm yêu cầu bảo hộ, hoặc các phương án tương đương của nó đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Biến thể glutamat–xystein ligaza mới của sáng chế làm tăng đáng kể sản lượng glutathion, và do đó biến thể này có thể được áp dụng hữu ích cho sản lượng lớn glutathion. Như đã mô tả, nấm men thể hiện sản lượng cao glutathion, sản phẩm khô, dịch chiết, dịch nuôi cấy, dịch ly giải của nó, và glutathion đã sản sinh có tác dụng chống oxy hóa, tác dụng giải độc, và tác dụng tăng cường miễn dịch, và do đó chúng cũng có

thể được sử dụng hữu ích trong các chế phẩm mỹ phẩm, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm dược phẩm, và điều chế chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể glutamat–xystein ligaza, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng methionin.
2. Biến thể theo điểm 1, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 653 là glyxin.
3. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có từ 80% đến 100% sự tương đồng trình tự với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.
4. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3.
5. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có sự thay thế bổ sung của axit amin tương ứng với vị trí 86 bằng axit amin khác.
6. Biến thể theo điểm 5, trong đó biến thể gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 13.
7. Polynucleotit mã hóa biến thể glutamat–xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6.
8. Vector chứa polynucleotit theo điểm 7.
9. Vi sinh vật sản sinh glutathion, trong đó vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể glutamat–xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.
10. Vi sinh vật theo điểm 9, trong đó vi sinh vật là trong đó vi sinh vật thuộc chi *Saccharomyces*.
11. Vi sinh vật theo điểm 9, trong đó vi sinh vật là *Saccharomyces cerevisiae*.
12. Phương pháp sản xuất glutathion, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật chứa bất kỳ một hoặc nhiều biến thể glutamat–xystein ligaza theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit trong môi trường nuôi cấy.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu gom glutathion từ một hoặc nhiều nguyên liệu được chọn từ vi sinh vật đã nuôi cấy, sản phẩm khô của vi sinh vật, dịch chiết của vi sinh vật, dịch nuôi cấy của vi sinh vật, và dịch ly giải của vi sinh vật.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> BIẾN THỂ GLUTAMAT-XYSTEIN LIGAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLUTATHION SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

<130> OPA21295

<150> KR10-2021-0000361

<151> 2021-01-04

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 678

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
20 25 30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
35 40 45

Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
50 55 60

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

Glu Asp Ser Ser Leu Cys Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
85 90 95

Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
100 105 110

Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
115 120 125

Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
130 135 140

Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
145 150 155 160

Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
165 170 175

Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
180 185 190

Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
195 200 205

Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Met	Asn	Val	Pro	Met	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Thr	
210						215					220					
Pro	Glu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Leu	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Phe	Ile	Tyr	Met	Asp	
				245					250					255		
Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Cys	Leu	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	
			260					265					270			
Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	
		275					280					285				
Phe	Ala	Pro	Ile	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Lys	
	290					295					300					
Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Val	Asp	Asp	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
				325					330					335		
Lys	Tyr	Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Gln	Asp	
		340						345					350			
Lys	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Phe	
		355					360					365				
Leu	Gly	Gly	Ser	Lys	Phe	Phe	Asn	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	Thr	Asn	Val	
	370					375					380					
Pro	Ile	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Glu	Asn	Asp	Lys	Ala	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ala	Lys	His	Phe	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Arg	
				405					410					415		
Asp	Pro	Val	Ser	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Thr	
			420					425					430			
Ser	Ser	Asn	His	Phe	Glu	Asn	Ile	Gln	Ser	Thr	Asn	Trp	Gln	Thr	Leu	
		435					440					445				
Arg	Phe	Lys	Pro	Pro	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys	Asp	Ser	
	450					455					460					
Pro	Gly	Trp	Arg	Val	Glu	Phe	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Asp	
465					470					475					480	
Phe	Glu	Asn	Ala	Ala	Tyr	Ser	Val	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Val	Asp	Ser	
				485					490					495		
Ile	Leu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asn	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ile	His	Met	Ser	Lys	
			500					505					510			
Val	Trp	Glu	Asn	Met	Lys	Ile	Ala	His	His	Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Phe	
		515					520					525				
Glu	Lys	Phe	His	Trp	Lys	Lys	Ser	Phe	Arg	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	

530					535					540					
Thr	Glu	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ser	Glu	Ile	Phe	His	Asn	Pro	Glu	Asn	Gly
545					550					555					560
Ile	Phe	Pro	Gln	Phe	Val	Thr	Pro	Ile	Leu	Cys	Gln	Lys	Gly	Phe	Val
				565					570					575	
Thr	Lys	Asp	Trp	Lys	Glu	Leu	Lys	His	Ser	Ser	Lys	His	Glu	Arg	Leu
			580					585					590		
Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	Ala	Ser	Gly	Glu	Leu	Pro
		595					600					605			
Thr	Thr	Ala	Lys	Phe	Phe	Arg	Asn	Phe	Val	Leu	Gln	His	Pro	Asp	Tyr
	610					615					620				
Lys	His	Asp	Ser	Lys	Ile	Ser	Lys	Ser	Ile	Asn	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ser
625					630					635					640
Thr	Cys	Asp	Arg	Leu	Thr	His	Leu	Asp	Asp	Ser	Lys	Gly	Glu	Leu	Thr
				645					650					655	
Ser	Phe	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Tyr	Val	Lys	Lys	Asn	Lys	Pro
		660						665					670		
Ser	Ile	Glu	Ser	Lys	Cys										
		675													

<210> 2
 <211> 2037
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2
 atgggactct tagcttttggg cacgcctttg cagtggtttg agtctaggac gtacaatgaa 60
 cacataaggg atgaaggtat cgagcagttg ttgtatatatt tccaagctgc tggtaaaaga 120
 gacaatgacc ctctttttttg gggagacgag cttgagtaca tggttgtaga ttttgatgat 180
 aaggagagaa attctatgct cgacgttttg catgacaaga tactcactga gcttaatatg 240
 gaggattcgt cccttttgta ggctaacgat gtgagttttc accctgagta tggccggtat 300
 atgttagagg caacaccagc ttctccatat ttgaattacg tgggtagtta cgttgagggt 360
 aacatgcaaa aaagacgtgc cattgcagaa tataagctat ctgaatatgc gagacaagat 420
 agtaaaaata acttgcatgt gggctccagg tctgtccctt tgacgctgac tgtcttcccg 480
 aggatgggat gccccgactt tattaacatt aaggatccgt ggaatcataa aaatgccgct 540
 tccagggtctc tgttttttacc cgatgaagtc attaacagac atgtcagggt tcctaacttg 600
 acagcatcca tcaggaccag gcgtggtgaa aaagtttgca tgaatgttcc catgtataaa 660
 gatatagcta ctccagaaac ggatgactcc atctacgac gagattgggt tttaccagaa 720
 gacaaagagg cgaaactggc ttccaaaccg ggtttcattt atatggattc catggggttt 780


```

ggcatgggct gttcgtgctt acaagtgacc tttcaggcac ccaatatcaa caaggcacgt      840
tacctgtacg atgcattagt gaatTTTtgca cctataatgc tagccttctc tgccgctgcg      900
cctgctTTTta aaggTtggt agccgaccaa gatgttcgtt ggaatgtgat atctggtgcg      960
gtggacgacc gtactccgaa ggaaagaggt gttgcgccat tactacccaa atacaacaag     1020
aacggatttg gaggcattgc caaagacgta caagataaag tccttgaaat accaaagtca     1080
agatatagtt cggTtgatct tttcttgggt gggTcgaaat ttttcaatag gacttataac     1140
gacacaaatg tacctattaa tgaaaaagta ttaggacgac tactagagaa tgataaggcg     1200
ccactggact atgatcttgc taaacatttt gcgcatctct acataagaga tccagtatct     1260
acattcgaag aactgttgaa tcaggacaac aaaacgtctt caaatcactt tgaaaacatc     1320
caaagtacaa attggcagac attacgtttt aaacCCCCca cacaacaagc aacCCcgac     1380
aaaaaggatt ctctggttg gagagtggaa ttcagaccat ttgaagtgca actattagat     1440
tttgagaacg ctgcgtattc cgtgctcata tacttgattg tcgatagcat tttgacctt     1500
tccgataata ttaacgcata tattcatatg tccaaagtat gggaaaatat gaagatagcc     1560
catcacagag atgctatcct atttgaaaaa tttcattgga aaaaatcatt tcgcaacgac     1620
accgatgtgg aaactgaaga ttattctata agcgagattt tccataatcc agagaatggt     1680
atatttctc aatttgTtac gccaatccta tgccaaaaag ggtTtgtaac caaagattgg     1740
aaagaattaa agcattcttc caaacacgag agactatact attatttaaa gctaatttct     1800
gatagagcaa gcggtgaatt gccacaaca gcaaaattct ttagaaattt tgtactacaa     1860
catccagatt acaaacatga ttcaaaaatt tcaaagtcga tcaattatga tttgctttct     1920
acgtgtgata gacttaccca ttagacgat tcaaaaggtg aattgacatc ctttttagga     1980
gctgaaattg cagaatatgt aaaaaaaaaat aagccttcaa tagaaagcaa atgttaa      2037

```

```

<210>      3
<211>      678
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      GSH1_G653M

```

```

<400>      3
Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
  1              5              10              15

Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
          20              25              30

Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly

```

35					40					45					
Asp	Glu	Leu	Glu	Tyr	Met	Val	Val	Asp	Phe	Asp	Asp	Lys	Glu	Arg	Asn
	50					55					60				
Ser	Met	Leu	Asp	Val	Cys	His	Asp	Lys	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Asn	Met
65					70					75					80
Glu	Asp	Ser	Ser	Leu	Cys	Glu	Ala	Asn	Asp	Val	Ser	Phe	His	Pro	Glu
				85					90					95	
Tyr	Gly	Arg	Tyr	Met	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	Tyr	Leu	Asn
			100					105					110		
Tyr	Val	Gly	Ser	Tyr	Val	Glu	Val	Asn	Met	Gln	Lys	Arg	Arg	Ala	Ile
		115					120					125			
Ala	Glu	Tyr	Lys	Leu	Ser	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asp	Ser	Lys	Asn	Asn
	130					135					140				
Leu	His	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Pro
145					150					155					160
Arg	Met	Gly	Cys	Pro	Asp	Phe	Ile	Asn	Ile	Lys	Asp	Pro	Trp	Asn	His
				165					170					175	
Lys	Asn	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Val	Ile	Asn
			180					185					190		
Arg	His	Val	Arg	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Ala	Ser	Ile	Arg	Thr	Arg	Arg
		195					200					205			
Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Met	Asn	Val	Pro	Met	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Thr
	210					215					220				
Pro	Glu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Leu	Pro	Glu
225					230					235					240
Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Phe	Ile	Tyr	Met	Asp
				245					250					255	
Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Cys	Leu	Gln	Val	Thr	Phe	Gln
			260					265					270		
Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Val	Asn
		275					280					285			
Phe	Ala	Pro	Ile	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Lys
	290					295					300				
Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Ala
305					310					315					320
Val	Asp	Asp	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro
				325					330					335	
Lys	Tyr	Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Gln	Asp
		340						345					350		
Lys	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Phe
		355					360					365			

Leu Gly Gly Ser Lys Phe Phe Asn Arg Thr Tyr Asn Asp Thr Asn Val
 370 375 380
 Pro Ile Asn Glu Lys Val Leu Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Asp Tyr Asp Leu Ala Lys His Phe Ala His Leu Tyr Ile Arg
 405 410 415
 Asp Pro Val Ser Thr Phe Glu Glu Leu Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr
 420 425 430
 Ser Ser Asn His Phe Glu Asn Ile Gln Ser Thr Asn Trp Gln Thr Leu
 435 440 445
 Arg Phe Lys Pro Pro Thr Gln Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Asp Ser
 450 455 460
 Pro Gly Trp Arg Val Glu Phe Arg Pro Phe Glu Val Gln Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Glu Asn Ala Ala Tyr Ser Val Leu Ile Tyr Leu Ile Val Asp Ser
 485 490 495
 Ile Leu Thr Phe Ser Asp Asn Ile Asn Ala Tyr Ile His Met Ser Lys
 500 505 510
 Val Trp Glu Asn Met Lys Ile Ala His His Arg Asp Ala Ile Leu Phe
 515 520 525
 Glu Lys Phe His Trp Lys Lys Ser Phe Arg Asn Asp Thr Asp Val Glu
 530 535 540
 Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val
 565 570 575
 Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro
 595 600 605
 Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr
 610 615 620
 Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Met Glu Leu Thr
 645 650 655
 Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro
 660 665 670
 Ser Ile Glu Ser Lys Cys
 675

<210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> F_BamHI_GSH1

<400> 4
ggtaggatcc atgggactct tagctttggg cac

33

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

<220>
<223> R_GSH1_G653M

<400> 5
gtcaattcca tttttgaatc gtcca

25

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

<220>
<223> F_GSH1_G653M

<400> 6
attcaaaaat ggaattgaca tcctt

25

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

<220>
<223> R_XhoI_GSH1

<400> 7
atgactcgag ttaacatttg ctttctattg aaggc

35

<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> F_SpeI_GSH1_DW

<400>	8		
tagaactagt actcctttta tttcggttgt gaa			33
<210>	9		
<211>	35		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	R_NcoI_GSH1_DW		
<400>	9		
gctgccatgg gaatagtgtg aaccgataac tgtgt			35
<210>	10		
<211>	27		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	R_AL sát thủ		
<400>	10		
gagcaatgaa cccaataacg aaatctt			27
<210>	11		
<211>	24		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	F_BR sát thủ		
<400>	11		
cttgacgttc gttcgactga tgag			24
<210>	12		
<211>	500		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	S. cerevisiae CJ-5 promotơ		
<400>	12		
ctcttgaatg gcgacagcct attgcctcag tgttcctca acaaccttgg tagttggagc			60
gcaattagcg tatcctgtac catactaatt cccctctgcc cctcgacggc tgccattagt			120
cagcatggcg cgcacgtgac tacaactgtg gctggaaacc ttttcgtcct ccccggtttt			180
tcagtgagcc gactctacta caatgctttt tcattttttca ctgagaaaaa cctgcaattt			240

tccaaattag tcatgctctg tgcctccctt gacaaaggac atcttccctg ttataaaacg 300
 gcggcttacc aaaagttgaa gcttggttctt gcttcttatg agtggagcaa tcgattatat 360
 tgaatcgttg tgctggagta gttggatctt tccacgtggc ctcgagtcac ttgtagaagc 420
 tgaaaaaattg agcagggttta gtatagggct acattgtagg gtgggtttaga gtatcgaaaa 480
 tatacatata gaagaataaa 500

<210> 13
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GSH1_G653M+C86R

<400> 13
 Met Gly Leu Leu Ala Leu Gly Thr Pro Leu Gln Trp Phe Glu Ser Arg
 1 5 10 15
 Thr Tyr Asn Glu His Ile Arg Asp Glu Gly Ile Glu Gln Leu Leu Tyr
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Asp Asn Asp Pro Leu Phe Trp Gly
 35 40 45
 Asp Glu Leu Glu Tyr Met Val Val Asp Phe Asp Asp Lys Glu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Met Leu Asp Val Cys His Asp Lys Ile Leu Thr Glu Leu Asn Met
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ser Leu Arg Glu Ala Asn Asp Val Ser Phe His Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Gly Arg Tyr Met Leu Glu Ala Thr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Asn
 100 105 110
 Tyr Val Gly Ser Tyr Val Glu Val Asn Met Gln Lys Arg Arg Ala Ile
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Lys Leu Ser Glu Tyr Ala Arg Gln Asp Ser Lys Asn Asn
 130 135 140
 Leu His Val Gly Ser Arg Ser Val Pro Leu Thr Leu Thr Val Phe Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Gly Cys Pro Asp Phe Ile Asn Ile Lys Asp Pro Trp Asn His
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ala Ser Arg Ser Leu Phe Leu Pro Asp Glu Val Ile Asn
 180 185 190
 Arg His Val Arg Phe Pro Asn Leu Thr Ala Ser Ile Arg Thr Arg Arg
 195 200 205

Gly	Glu	Lys	Val	Cys	Met	Asn	Val	Pro	Met	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ala	Thr	
210						215					220					
Pro	Glu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Leu	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Pro	Gly	Phe	Ile	Tyr	Met	Asp	
				245					250					255		
Ser	Met	Gly	Phe	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Cys	Leu	Gln	Val	Thr	Phe	Gln	
			260					265					270			
Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	
		275					280					285				
Phe	Ala	Pro	Ile	Met	Leu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Lys	
	290					295					300					
Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Arg	Trp	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Val	Asp	Asp	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
				325					330					335		
Lys	Tyr	Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Gln	Asp	
			340					345					350			
Lys	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Phe	
		355					360					365				
Leu	Gly	Gly	Ser	Lys	Phe	Phe	Asn	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	Thr	Asn	Val	
	370					375					380					
Pro	Ile	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Glu	Asn	Asp	Lys	Ala	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ala	Lys	His	Phe	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Arg	
				405					410					415		
Asp	Pro	Val	Ser	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Thr	
			420					425					430			
Ser	Ser	Asn	His	Phe	Glu	Asn	Ile	Gln	Ser	Thr	Asn	Trp	Gln	Thr	Leu	
		435					440					445				
Arg	Phe	Lys	Pro	Pro	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys	Asp	Ser	
	450					455					460					
Pro	Gly	Trp	Arg	Val	Glu	Phe	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Asp	
465					470					475					480	
Phe	Glu	Asn	Ala	Ala	Tyr	Ser	Val	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Val	Asp	Ser	
				485					490					495		
Ile	Leu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asn	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ile	His	Met	Ser	Lys	
			500					505					510			
Val	Trp	Glu	Asn	Met	Lys	Ile	Ala	His	His	Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Phe	
		515					520					525				
Glu	Lys	Phe	His	Trp	Lys	Lys	Ser	Phe	Arg	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	

530

535

540

Thr Glu Asp Tyr Ser Ile Ser Glu Ile Phe His Asn Pro Glu Asn Gly

545

550

555

560

Ile Phe Pro Gln Phe Val Thr Pro Ile Leu Cys Gln Lys Gly Phe Val

565

570

575

Thr Lys Asp Trp Lys Glu Leu Lys His Ser Ser Lys His Glu Arg Leu

580

585

590

Tyr Tyr Tyr Leu Lys Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ser Gly Glu Leu Pro

595

600

605

Thr Thr Ala Lys Phe Phe Arg Asn Phe Val Leu Gln His Pro Asp Tyr

610

615

620

Lys His Asp Ser Lys Ile Ser Lys Ser Ile Asn Tyr Asp Leu Leu Ser

625

630

635

640

Thr Cys Asp Arg Leu Thr His Leu Asp Asp Ser Lys Met Glu Leu Thr

645

650

655

Ser Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ala Glu Tyr Val Lys Lys Asn Lys Pro

660

665

670

Ser Ile Glu Ser Lys Cys

675

<210>

14

<211>

25

<212>

ADN

<213>

Trình tự nhân tạo

<220>

<223>

R_GSH1_C86R

<400>

14

ttagcctccc taagggacga atcct

25

<210>

15

<211>

25

<212>

ADN

<213>

Trình tự nhân tạo

<220>

<223>

F_GSH1_C86R

<400>

15

cgtcccttag ggaggctaac gatgt

25