



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C12N 1/15; C12P 21/02; C12P 19/14; (13) B
C12N 15/09; C12N 9/42



1-0053815

-
- (21) 1-2020-06932 (22) 30/05/2019
(86) PCT/JP2019/021449 30/05/2019 (87) WO 2019/230860 05/12/2019
(30) 2018-105256 31/05/2018 JP
(45) 25/11/2025 452 (43) 26/04/2021 397A
(73) TORAY INDUSTRIES, INC. (JP)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038666, Japan
(72) KAGAWA, Yusuke (JP); HIRAMATSU, Shingo (JP); YAMADA, Katsushige (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) CHŨNG ĐỘT BIẾN CỦA NĂM SỢI CỦA CHI TRICHODERMA REESEI VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN

(21) 1-2020-06932

(57) Sáng chế đề cập đến chủng đột biến nấm sợi *Trichoderma* có chức năng của polypeptit được tạo ra bằng trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 giảm; và phương pháp sản xuất nhiều protein bằng cách sử dụng chủng đột biến này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*, chủng đột biến này có khả năng sản xuất protein được tăng cường, và phương pháp sản xuất protein sử dụng chủng đột biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm sợi của chi *Trichoderma* được biết đến có khả năng sản xuất protein cao, và các nghiên cứu trước đây đã được thực hiện về việc sản xuất protein sử dụng nấm sợi. Nấm sợi của chi *Trichoderma* được sử dụng đặc biệt là để sản xuất xenlulaza được phân loại làm enzym đường hóa trong số các protein sử dụng xenluloza, lactoza, xenlobioza, hoặc tương tự làm chất cảm ứng.

Biến đổi di truyền đang được nghiên cứu để làm tăng thêm lượng sản xuất xenlulaza, cụ thể là để tăng cường lượng sản xuất của β -glucosidaza, chiếm tỷ lệ nhỏ trong enzym đường hóa. Các tiến hành thử nghiệm này bao gồm quá biểu hiện hoặc làm khuyết yếu tố điều khiển việc sản xuất xenlulaza.

Tài liệu không phải sáng chế 1 mô tả rằng nấm sợi của chi *Trichoderma* được biến đổi bằng cách giảm chức năng của Cre1, là yếu tố phiên mã kiểm soát việc sản xuất xenlulaza trong số các yếu tố điều khiển việc sản xuất xenlulaza, do đó thu nhận được chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà có khả năng sản xuất xenlulaza cao.

Trong khi đó, được biết đến là biến đổi di truyền dẫn đến giảm lượng sản xuất xenlulaza. Tài liệu không phải sáng chế 2 mô tả rằng ở trường hợp khi chi *Trichoderma reesei* trong đó gen vận chuyển đường của nó đã được làm khuyết được sử dụng cùng với lactoza hoặc xenluloza làm chất kích thích, lượng sản xuất xenlulaza giảm.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu không phải sáng chế

Tài liệu không phải sáng chế 1: Juliano P, Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan,

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 77, 2013, Issue 3, P534-543

Tài liệu không phải sáng chế 2: Porciuncula Jde, Identification of Major Facilitator Transporters Involved in Cellulase Production during Lactose Culture of *Trichoderma reesei* PC-3-7, Biosci Biotechnol Biochem. 77, 1014-1022 (2013).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Như được mô tả ở trên, yếu tố phiên mã điều khiển sự sản xuất protein ở nấm sợi của chi *Trichoderma* đã được xác định, nhưng điều này chỉ được coi là một phần của cơ chế điều khiển. Sau đó, mục đích của sáng chế là thu nhận được chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà có khả năng sản xuất protein được tăng cường bằng cách thực hiện việc tìm kiếm cơ chế mới điều khiển sự sản xuất protein của nấm sợi của chi *Trichoderma*, và đề xuất phương pháp sản xuất protein sử dụng chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*.

Giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế cho là nếu gen của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà, khi được biến đổi, có thể dẫn đến việc làm tăng sự sản xuất protein có thể là đặc hiệu, sau đó lượng protein mà có thể được sản xuất bằng nấm sợi của chi *Trichoderma* có thể được làm tăng thêm. Các tác giả sáng chế đã siêng năng tiến hành thử nghiệm và, kết quả là, đã phát hiện ra rằng sự cải thiện về tính chất sản xuất protein và tính chất sản xuất β -glucosidaza có thể thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*, chủng đột biến này đã được giảm, bằng cách biến đổi di truyền, về chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Sáng chế được hoàn thành dựa trên phát hiện này.

Cụ thể hơn, sáng chế bao gồm các đối tượng (1) đến (6) sau đây.

(1) Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*, có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm.

(2) Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo mục (1), trong đó ít nhất gốc axit amin thứ 413 và các gốc axit amin kế tiếp từ bên đầu tận N ở trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được làm khuyết.

(3) Phương pháp sản xuất protein, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo mục (1) hoặc (2).

(4) Phương pháp sản xuất xenlulaza, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo mục (1) hoặc (2).

(5) Phương pháp sản xuất xenlulaza theo mục (4), phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo mục (1) hoặc (2) trong môi trường nuôi cấy bao gồm một hoặc nhiều loại chất kích thích được chọn từ nhóm gồm lactoza, xenluloza, và xylan.

(6) Phương pháp sản xuất đường từ sinh khối chứa xenluloza, phương pháp này bao gồm:

bước a là sản xuất xenlulaza bằng cách nuôi cấy chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm; và

bước b là đường hóa sinh khối bằng cách sử dụng xenlulaza thu được ở bước a.

Hiệu quả của sáng chế

Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà đã được giảm ở chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 đã cải thiện khả năng sản xuất protein khi so sánh với nấm sợi của chi *Trichoderma* trong đó chức năng của polypeptit không được giảm. Hơn nữa, đặc biệt là trong trường hợp mà protein được sản xuất là xenlulaza, hiệu quả bất ngờ là xenlulaza có các hoạt tính riêng được cải thiện khác nhau cũng thu được.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế khác biệt ở chỗ đột biến được đưa vào chủng bố mẹ của nấm sợi của chi *Trichoderma*, là vi sinh vật ban đầu có khả năng sản xuất protein tuyệt vời, nhờ đó tăng cường hơn nữa khả năng sản xuất protein. Do vậy, chủng bố mẹ của nấm sợi của chi *Trichoderma* được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn ở chủng đại, và chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà đã được cải thiện để có khả năng sản xuất protein tăng cũng có thể được sử dụng thuận lợi làm chủng bố mẹ. Ví dụ, chủng đột biến có tính chất sản xuất protein đã cải thiện bằng cách thực hiện xử lý đột biến với tác nhân

gây đột biến, chiếu xạ UV, v.v. có thể được sử dụng làm chủng bố mẹ của chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*. Ví dụ cụ thể của chủng đột biến có thể sử dụng làm chủng bố mẹ bao gồm: chi *Trichoderma parareesei* (ATCC MYA-4777), là tổ tiên với chi *Trichoderma reesei*; chủng QM6a (NBRC31326), chủng QM9123 (ATCC24449), chủng QM9414 (NBRC31329), chủng PC-3-7 (ATCC66589). Chủng QM9123 (NBRC31327), chủng RutC-30 (ATCC56765), chủng CL-847 (Enzym, Microbiol. Technol. 10, 341-346 (1988)), chủng MCG77 (Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 89 (1978)), và chủng MCG80 (Biotechnol. Bioeng. 12, 451-459 (1982)), được biết đến chủng đột biến bắt nguồn từ chi *Trichoderma reesei*; và chủng bắt nguồn từ các chủng này. Chủng QM6a, chủng QM9414, và chủng QM9123 có sẵn từ NBRC (NITE Biological Resource Center), và chủng PC-3-7 và chủng RutC-30 có sẵn từ ATCC (American Type Culture Collection).

Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 là polypeptit sở hữu bởi nấm sợi của chi *Trichoderma*, và ở National Center for Biotechnology Information, polypeptit này cũng được đăng ký dưới dạng protein dự đoán (EGR44419) mà chủng *Trichoderma reesei* QM6a có. Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 là polypeptit mà chức năng của nó không được biết đến, nhưng Conserved Domain Architecture Retrieval Tool of National Center for Biotechnology Information mô tả rằng gốc axit amin thứ 26 đến thứ 499 từ phía đầu tận N có miền gen vận chuyển đường (và các chất khác). Sáng chế cho rằng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 tham gia ít nhất vào sự vận chuyển đường giữa bên trong và bên ngoài của thể nấm. Theo sáng chế, cụm từ “giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2” có nghĩa là gen mã hóa EGR44419 có đột biến.

Theo sáng chế, sự giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ ra trạng thái trong đó trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 đã trải qua đột biến, dẫn đến sự giảm hoặc loại bỏ chức năng của polypeptit. Ngoài ra, sự giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 cũng bao gồm trường hợp trong đó trình tự bazơ khác với trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 đã trải qua đột biến và điều này dẫn đến sự giảm hoặc loại bỏ biểu hiện của polypeptit gồm

trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Đột biến của trình tự bazơ là do thay thế, làm khuyết, chèn hoặc sao chép bazơ, v.v..

Ví dụ cụ thể của gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ví dụ của phương pháp làm giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm phương pháp đưa vào đột biến mà gây ra làm khuyết toàn phần miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), làm khuyết một phần miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), thay đổi ở cấu hình của miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), hoặc làm khuyết toàn phần polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Có thể giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, cũng bằng cách đưa vào đột biến mà làm cho giảm hoặc loại bỏ biểu hiện của polypeptit.

Cụm từ “làm khuyết miền gen vận chuyển đường (và các chất khác)” có nghĩa là mất toàn phần hoặc một phần miền, thay đổi toàn bộ hoặc một số miền thành (các) axit amin khác nhau, hoặc kết hợp của chúng. Cụ thể hơn là, cụm từ đó có nghĩa là độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của miền gen vận chuyển đường (và các chất khác) là 80% hoặc ít hơn, tốt hơn là 50% hoặc ít hơn, tốt hơn là 20% hoặc ít hơn, tốt hơn là 10% hoặc ít hơn, tốt hơn là 5% hoặc ít hơn, tốt hơn là 3% hoặc ít hơn, tốt hơn là 1% hoặc ít hơn, và tốt hơn là 0%.

Theo sáng chế, ví dụ cụ thể của trường hợp trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được giảm bằng đột biến, như làm khuyết, thay thế, hoặc bổ sung, đã xảy ra ở trình tự axit amin nằm ở miền gen vận chuyển đường (và các chất khác) bao gồm đột biến thay đổi khung ở trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 1 trong đó 11 bazơ đã được đưa vào vị trí thứ 1415. Được giả sử rằng đột biến làm cho việc dịch mã kết thúc ở vị trí thứ 419 trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 và điều này đã rút ngắn trình tự axit amin cấu thành miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), dẫn đến sự giảm chức năng ban đầu.

Việc làm khuyết toàn phần miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), làm khuyết một phần miền gen vận chuyển đường (và các chất khác), và làm khuyết toàn phần polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 thu được bằng

cách khiến trình tự gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 trải qua đột biến thay đổi khung hoặc dừng codon do làm khuyết, chèn, thay thế bazơ, v.v..

Việc giảm hoặc loại bỏ biểu hiện của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 thu được bằng cách gây đột biến cho vùng khởi động hoặc vùng kết thúc của gen mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2. Nhìn chung, vùng khởi động và vùng kết thúc tương ứng với vùng có chiều dài hàng trăm bazơ trước và sau khi gen tham gia vào quá trình phiên mã. Ví dụ cụ thể của trình tự bazơ chứa gen khởi động và gen tham gia vào quá trình phiên mã của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Để đưa vào đột biến di truyền này, có thể sử dụng phương pháp đột biến di truyền hiện có như xử lý đột biến với tác nhân gây đột biến được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc với chiếu xạ UV, v.v., tái tổ hợp gen như tái tổ hợp tương đồng sử dụng gen đánh dấu lựa chọn và đột biến bởi gen nhảy.

Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế có khả năng sản xuất protein được tăng cường so với nấm sợi của chi *Trichoderma* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 không được giảm. Trong trường hợp mà chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế được nuôi cấy, nồng độ protein tăng thu được khi so sánh với dung dịch nuôi cấy của nấm sợi của chi *Trichoderma* trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 không được giảm. Hơn nữa, trong trường hợp mà protein là enzym, enzym này đã tăng hoạt tính riêng. Trong bản mô tả này, nồng độ protein làm tăng tỷ lệ hoặc hoạt tính riêng enzym làm tăng tỷ lệ không bị giới hạn cụ thể miễn là nồng độ hoặc hoạt tính riêng tăng, nhưng tỷ lệ tăng tốt hơn là 20% hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra đã được giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế có thể có đột biến gen mang lại sự cải thiện về lượng sản xuất protein. Ví dụ cụ thể của nó bao gồm đột biến gen mà giảm chức năng của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 8. Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 là polypeptit sở hữu bởi chi *Trichoderma reesei*, và ở National Center for Biotechnology Information,

polypeptit này được đăng ký dưới dạng protein dự đoán EGR50654 mà chủng *Trichoderma reesei* QM6a có. Polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 là polypeptit mà chức năng của nó không được biết đến, nhưng Conserved Domain Architecture Retrieval Tool of National Center for Biotechnology Information mô tả rằng gốc axit amin thứ 95 đến 277 từ bên đầu tận N có “miền giữa của miền 4G yếu tố khởi đầu sinh vật nhân chuẩn” (sau đây gọi tắt là “miền MIF4G”) và rằng gốc axit amin thứ 380 đến 485 từ bên đầu tận N có miền MA-3. Hai miền, MIF4G và MA-3, được biết đến có chức năng liên kết với ADN hoặc ARN (Biochem. 44, 12265-12272 (2005); Mol. Cell. Biol. 1, 147-156 (2007)). Sáng chế cho rằng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 ít nhất có chức năng liên kết với ADN và/hoặc ARN.

Ví dụ cụ thể của gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 9. Ví dụ của đột biến gen mà giảm chức năng của EGR50654 bao gồm làm khuyết toàn phần miền MIF4G và/hoặc miền MA-3 sở hữu bởi EGR50654, làm khuyết một phần của miền MIF4G và/hoặc miền MA-3, và đột biến gen mà thay đổi mối quan hệ kết cấu giữa miền MIF4G và miền MA-3. Ngoài ra, chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 có thể cũng được giảm bằng cách đưa vào đột biến mà giảm hoặc loại bỏ biểu hiện của polypeptit. Ví dụ cụ thể của làm khuyết chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 bao gồm đột biến ở trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 9 mà làm khuyết bất kỳ trong số các bazơ nằm trong khoảng từ bazơ thứ 1039 đến bazơ thứ 1044.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất protein bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma*, chủng đột biến này đã được giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Protein cần được sản xuất theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng protein được tiết ra từ thể nấm có thể được sản xuất thích hợp. Enzym được ưu tiên trong số này. Được ưu tiên hơn là enzym đường hóa như xenlulaza, amylaza, invertaza, chitinaza, và pectinaza. Vẫn được ưu tiên hơn là xenlulaza.

Xenlulaza mà có thể được sản xuất theo sáng chế bao gồm khác nhau hydrolaza,

bao gồm enzym có hoạt động phân hủy chống lại xylan, xenluloza, và hemixenluloza. Ví dụ cụ thể của nó bao gồm xenlobiohydrolaza (EC 3.2.1.91), tạo ra xenlobioza bằng cách thủy phân mạch xenluloza, endoglucanaza (EC 3.2.1.4), thủy phân mạch xenluloza từ phần trung tâm của nó, β -glucosidaza (EC 3.2.1.21), thủy phân xenlooligosaccarit và xenlobioza, xylanaza (EC 3.2.1.8), được đặc trưng bởi tác động lên hemixenluloza và, cụ thể là, lên xylan, và β -xylosidaza (EC 3.2.1.37), thủy phân xylooligosaccarit. Như đã nêu trên, chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế có hoạt tính sản xuất protein tăng cường hay không được xác định chắc chắn bằng cách xác định sự cải thiện trong hoạt tính riêng xenlulaza bằng cách xác định rằng hoạt tính riêng của bất kỳ hydrolaza nào trong số đó cải thiện. Xenlulaza được sản xuất theo sáng chế có hoạt tính cải thiện của, cụ thể là, β -glucosidaza trong số các enzym này.

Hoạt tính riêng β -glucosidaza được xác định bằng phương pháp sau đây. Đầu tiên, 10 μ L enzym pha loãng được bổ sung vào 90 μ L đệm axetat 50 mM chứa p-nitrophenyl- β -glucopyranosit 1 mM (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Japan), và hỗn hợp được phép phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, 10 μ L natri cacbonat 2 M được bổ sung và được trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ at 405 nm được đo. Cuối cùng, việc giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Hoạt tính riêng β -xylosidaza được xác định bằng phương pháp sau đây. Đầu tiên, 10 μ L enzym pha loãng được bổ sung vào 90 μ L đệm axetat 50 mM chứa p-nitrophenyl- β -xylopyranosit 1 mM (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Japan), và hỗn hợp được phép phản ứng ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, 10 μ L natri cacbonat 2 M được bổ sung và được trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ at 405 nm được đo. Cuối cùng, việc giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và vì vậy hoạt tính riêng được tính toán.

Hoạt tính riêng cellobiohydrolaza được xác định bằng phương pháp sau đây. Đầu tiên, 10 μ L enzym pha loãng được bổ sung vào 90 μ L đệm axetat 50 mM chứa p-nitrophenyl- β -lactopyranosit 1 mM (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Japan), và hỗn hợp được phép phản ứng ở 30°C trong 60 phút. Sau đó, 10 μ L natri cacbonat 2 M được bổ sung và được trộn kỹ để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ at 405 nm được đo. Cuối cùng, việc giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt

tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Chế phẩm môi trường nuôi cấy ở bước nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn nó là chế phẩm môi trường nuôi cấy trong đó chi *Trichoderma reesei* có thể tạo ra protein, và chế phẩm môi trường nuôi cấy được biết đến cho vi khuẩn của chi *Trichoderma* có thể được sử dụng. Việc sử dụng có thể được thực hiện làm nguồn nitơ, ví dụ, polypepton, bouillon, CSL, hoặc bánh đậu nành. Chất kích thích để sản xuất protein có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Trong trường hợp sản xuất xenlulaza theo sáng chế, chủng đột biến có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa một hoặc nhiều chất kích thích được chọn từ nhóm gồm lactoza, xenluloza, và xylan. Để đưa xenluloza hoặc xylan, sinh khối chứa xenluloza hoặc xylan có thể được bổ sung làm chất kích thích. Ví dụ cụ thể của sinh khối chứa xenluloza hoặc xylan bao gồm không chỉ thực vật như thực vật có hạt, dương xỉ, rêu, tảo và cây ở nước, mà còn là vật liệu xây dựng phế thải. Thực vật có hạt được phân loại thành cây hạt trần và cây hạt kín, và cả hai đều có thể được sử dụng thuận lợi. Thực vật hạt kín còn được phân loại thành cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Ví dụ cụ thể của cây một lá mầm được sử dụng tốt hơn là bao gồm bã mía, cỏ switchgrass, cỏ napier, erianthus, râu ngô, lõi ngô, rơm rạ và rơm lúa mì, và ví dụ cụ thể của cây hai lá mầm được sử dụng tốt hơn là bao gồm bột củ cải đường, bạch đàn, sồi và bạch dương trắng.

Sản phẩm đã xử lý sơ bộ có thể được sử dụng làm cho sinh khối chứa xenluloza hoặc xylan. Phương pháp xử lý sơ bộ không bị giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, phương pháp được biết đến như xử lý axit, xử lý axit sulfuric, xử lý axit sulfuric loãng, xử lý kiềm, xử lý thủy nhiệt, xử lý cận tới hạn, xử lý nghiền mịn, và xử lý hấp có thể được sử dụng. Bột giấy có thể được sử dụng làm sinh khối đã xử lý sơ bộ chứa xenluloza hoặc xylan.

Tài liệu không phải sáng chế 2 mô tả rằng ở trường hợp khi chủng đột biến thu được bằng cách làm khuyết gen vận chuyển đường từ *Trichoderma reesei* được nuôi cấy, sử dụng lactoza làm chất kích thích dẫn đến giảm lượng sản xuất xenlulaza. Tuy nhiên, ở trường hợp khi chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế được nuôi cấy sử dụng lactoza làm chất kích thích, không chỉ thu được việc cải thiện lượng

sản xuất protein mà còn cải thiện các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau.

Phương pháp nuôi cấy đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và đột biến có thể được nuôi cấy, ví dụ, bằng cách nuôi cấy lỏng sử dụng ống ly tâm, bình, bình lên men, bể chứa, v.v. hoặc nuôi cấy rắn sử dụng đĩa, v.v.. Chi *Trichoderma reesei* tốt hơn là được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, và trong số các phương pháp nuôi cấy này, nuôi cấy chìm là thực hiện nuôi cấy bằng cách sử dụng bình lên men hoặc trong khi sục khí và khuấy trong bể được ưu tiên. Tốc độ sục khí tốt hơn là nằm trong khoảng 0,1-2,0 vvm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 0,3-1,5 vvm, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng 0,5-1,0 vvm. Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng 25-35°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 25-31°C. Điều kiện độ pH trong khi nuôi cấy tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 7,0, tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Trong khoảng thời gian nuôi cấy, việc nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện cho phép sản xuất protein cho đến khi lượng protein có thể phục hồi được tích lũy. Thông thường, khoảng thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng 24-240 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 36-192 giờ.

Phương pháp thu hồi protein có trong dung dịch nuôi cấy trong đó đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* đã được nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, nhưng protein có thể được thu hồi bằng cách loại bỏ thể nấm của nấm sợi của chi *Trichoderma* từ dung dịch nuôi cấy. Ví dụ của phương pháp loại bỏ thể nấm bao gồm ly tâm, tách màng và ép lọc.

Hơn nữa, trong trường hợp mà dung dịch nuôi cấy trong đó đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* đã được nuôi cấy được sử dụng làm dung dịch protein mà không loại bỏ thể nấm khỏi đó, dung dịch nuôi cấy tốt hơn là được xử lý sao cho thể nấm của nấm sợi của chi *Trichoderma* không thể phát triển trong đó. Ví dụ của phương pháp xử lý để ngăn chặn thể nấm phát triển bao gồm xử lý nhiệt, xử lý hóa học, xử lý axit/kiềm, và xử lý UV.

Trong trường hợp mà protein là enzym, dung dịch nuôi cấy mà thể nấm đã được loại bỏ khỏi đó hoặc đã được xử lý sao cho thể nấm không thể phát triển như được nêu trên, có thể được sử dụng trực tiếp làm dung dịch enzym.

Xenlulaza thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi

Trichoderma theo sáng chế, trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 đã được giảm, cao ở các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau, cụ thể là ở hoạt tính riêng của β -glucosidaza, so với xenlulaza thu được bằng cách nuôi nấm sợi của chi *Trichoderma* trong đó chức năng của polypeptit không được giảm. Do vậy, xenlulaza có thể phân hủy thích hợp sinh khối chứa xenluloza để cung cấp dung dịch đường hóa có nồng độ glucoza cao, làm cho nó có thể thu được số lượng lớn đường. Phương pháp đường hóa sinh khối chứa xenluloza để sản xuất đường không bị giới hạn cụ thể. Phản ứng đường hóa có thể được tiến hành theo phương pháp từng đợt hoặc phương pháp liên tục.

Điều kiện cho phản ứng đường hóa không bị giới hạn cụ thể. Nhiệt độ phản ứng đường hóa tốt hơn là nằm trong khoảng 25-60°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 30-55°C. Thời gian phản ứng đường hóa tốt hơn là nằm trong khoảng 2-200 giờ. Độ pH trong phản ứng đường hóa tốt hơn là nằm trong khoảng 3,0-7,0, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 4,0-6,0. Trong trường hợp xenlulaza bắt nguồn từ chi *Trichoderma*, độ pH tối ưu cho phản ứng bằng 5,0. Hơn nữa, do độ pH thay đổi trong khi thủy phân, được ưu tiên bổ sung chất đệm vào dung dịch phản ứng hoặc tiến hành phản ứng trong khi giữ độ pH không đổi bằng cách sử dụng axit hoặc kiềm.

Chế phẩm enzym vì vậy được sử dụng có thể được tách và được thu hồi từ dung dịch đường hóa thu được bằng cách đường hóa sinh khối chứa xenluloza. Phương pháp tách và thu hồi chế phẩm enzym không bị giới hạn cụ thể. Sử dụng có thể được thực hiện bằng phương pháp trong đó dung dịch đường hóa được lọc với màng siêu lọc hoặc loại tương tự để thu hồi chế phẩm enzym trên mặt không thấm. Theo nhu cầu, bước loại bỏ chất rắn khỏi dung dịch đường hóa có thể được tiến hành trước khi lọc. Xenlulaza đã thu hồi lại có thể được sử dụng cho phản ứng đường hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả cụ thể dưới đây bằng cách đề cập đến các ví dụ.

Ví dụ tham chiếu 1: Phương pháp đo nồng độ protein

Chất thử để đo nồng độ protein (thử nghiệm protein Quick Start Bradford, được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) được sử dụng. 5 μ L dung dịch nuôi cấy nấm sợi loãng được bổ sung vào 250 μ L chất thử đo nồng độ protein trở về nhiệt độ phòng.

Sau khi để yên hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, độ hấp thụ ở 595 nm được đo sử dụng đầu đọc vi đĩa. Bằng cách sử dụng BSA làm chất chuẩn, nồng độ protein được tính dựa vào đường cong hiệu chỉnh.

Ví dụ tham chiếu 2: Phương pháp đo hoạt tính riêng của xenlulaza

Phương pháp đo hoạt tính riêng của β -glucosidaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -glucopyranosit 1 mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn đều để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Phương pháp đo hoạt tính riêng của β -xylosidaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -xylopyranosit 1mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn đều để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Phương pháp đo hoạt tính riêng của xenlobiohydrolaza

Thêm 10 μ L dịch pha loãng enzym vào 90 μ L đệm axetat 50mM chứa p-nitrophenyl- β -lactopyranosit 1mM (Sigma-Aldrich Japan sản xuất), và hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 60 phút. Sau đó, thêm 10 μ L natri cacbonat 2M và trộn đều để dừng phản ứng, và sự tăng độ hấp thụ ở 405 nm được đo. Cuối cùng, sự giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol mỗi phút được xác định là 1 U hoạt tính, và hoạt tính riêng được tính bằng cách chia nó cho lượng protein.

Ví dụ tham chiếu 3: Thử nghiệm đường hóa sinh khối chứa xenluloza

Làm sinh khối cần được đường hóa, xenluloza được nghiền thành bột bắt nguồn từ gỗ Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 (J. Rettenmaier & Sohne sản xuất)

hoặc bã mía được nghiền thành bột đến đường kính hạt trung bình là 100 μm được sử dụng. Làm dung dịch enzym, sản phẩm lọc thu được bằng cách lấy mẫu 1ml dung dịch nuôi cấy chi *Trichoderma reesei* hoặc chủng đột biến chi *Trichoderma reesei*, ly tâm dung dịch nuôi cấy đã lấy mẫu, thu hồi chất nổi bề mặt sau khi loại bỏ thể nấm, và lọc chất nổi bề mặt qua dụng cụ lọc 0,22 μm , được sử dụng. Xenluloza được nghiền thành bột bắt nguồn từ gỗ Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 (J. Rettenmaier & Sohne sản xuất) is sau đây thường được gọi là “Arbocel B800”.

Phản ứng đường hóa

Phản ứng đường hóa được tiến hành theo cách sau đây. Đưa vào ống 2 mL Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 hoặc bã mía được nghiền thành bột đến đường kính hạt trung bình 100 μm và đệm natri axetat (độ pH 5,2) để dẫn đến nồng độ cuối cùng bằng 0,1 M. Nước tinh khiết được bổ sung với một lượng để dẫn đến nồng độ chất rắn ở thời điểm khởi đầu phản ứng bằng 8% khối lượng trong trường hợp sử dụng Arbocel (nhãn hiệu đã được đăng ký) B800 hoặc 10% khối lượng trong trường hợp sử dụng bã mía. Dung dịch enzym còn được bổ sung để bắt đầu phản ứng trong điều kiện phản ứng 50°C sử dụng rotato khối nhiệt. Mẫu thu được sau khi phản ứng đường hóa đã được tiến hành trong 24 giờ được ly tâm trong 10 phút trong điều kiện 10000 $\times$ g và chất nổi bề mặt được lấy ra. Phản ứng đường hóa được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch nước natri hydroxit 1 N vào chất nổi bề mặt với lượng của một phần mười khối lượng của chất nổi bề mặt. Nồng độ đường ở dung dịch đường hóa sau khi chấm dứt phản ứng được xác định bằng cách đưa dung dịch đường hóa để phân tích đường bằng UPLC được thể hiện dưới đây. Với dung dịch enzym cần được sử dụng ở phản ứng đường hóa, lượng bổ sung của nó được tính toán từ nồng độ protein của dung dịch nuôi cấy và hoạt tính riêng để thích hợp cho điều kiện được sử dụng ở mỗi trong số các ví dụ và ví dụ so sánh.

Xác định nồng độ đường

Dung dịch đường hóa được phân tích định lượng cho glucoza, xyloza và xenlobioza trong điều kiện sau đây sử dụng hệ thống ACQUITY (nhãn hiệu đã được đăng ký) UPLC (Waters).

Phân tích định lượng được tiến hành trên cơ sở đường cong hiệu chỉnh được chuẩn bị với mẫu tiêu chuẩn của glucoza, xyloza, và xenlobioza. Các nồng độ

xenobioza thấp hơn 1 g/L được coi là dưới giới hạn phát hiện.

Cột: Cột AQUITY (nhãn hiệu đã được đăng ký) UPLC BEH Amit 1,7 μm 2,1 $\times$ 100 mm

Phương pháp tách: HILIC

Pha động: pha động A: 80% axetonitril, dung dịch TEA 0,2% chứa nước, và pha động B: 30% axetonitril, dung dịch TEA 0,2% chứa nước, theo gradien sau đây. Gradien là gradien tuyến tính đạt đến tỷ lệ trộn tương ứng với thời gian dưới đây.

Điều kiện khởi đầu: (A 99,90%, B 0,10%), 2 phút sau khi bắt đầu: (A 96,70%, B 3,30%), 3,5 phút sau khi bắt đầu: (A 95,00%, B 5,00%), 3,55 phút sau khi bắt đầu: (A 99,90%, B 0,10%), 6 phút sau khi bắt đầu: (A 99,90%, B 0,10%)

Phương pháp phát hiện: ELSD (bộ dò tán xạ ánh sáng bay hơi)

Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút

Nhiệt độ: 55°C

Ví dụ 1

Chuẩn bị chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* QM9414 I có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm:

Chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* có chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm được tạo ra bằng cách chuẩn bị mảnh ADN gồm trình tự gen được nêu trong SEQ ID NO: 3 dưới dạng mảnh ADN chứa gen mã hóa polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 trong đó chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 đã được giảm, và sau đó biến đổi chủng *Trichoderma reesei* QM9414 với mảnh ADN. Bằng phương pháp này, chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* thu được trong đó 11 bazơ đã được chèn vào vị trí thứ 1415 trong SEQ ID NO: 1 để có polypeptit trong đó việc dịch mã kết thúc ở vị trí thứ 419 ở SEQ ID NO: 2. Axetamit và gen acetamidaza (AmdS) (amdS) có khả năng phân hủy axetamit được sử dụng làm gen đánh dấu lựa chọn để đưa mảnh ADN. Để cho phép mảnh ADN gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 3 được đưa cùng chiều và ngược chiều của trình tự ADN chứa amdS, plasmit để đưa đột biến được tạo ra để bổ sung tương đồng một phần vào trình tự gen của chủng *Trichoderma*

reesei QM9414.

Cụ thể là, đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn ADN đã tổng hợp được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 với enzym giới hạn AflIII và KpnI được sử dụng làm đoạn ADN ngược chiều. Ngoài ra, PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen được tách theo cách thông thường từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414 và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 5 và 6, và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý đoạn khuếch đại thu được với enzym giới hạn MluI và SpeI được sử dụng làm đoạn ADN cùng chiều. Các đoạn ADN ngược chiều và cùng chiều được đưa vào plasmit được cài xen amds bằng cách sử dụng enzym giới hạn AflIII và KpnI và enzym giới hạn MluI và SpeI, theo thứ tự, để tạo cấu trúc cho plasmit để đưa đột biến vào. Plasmit để đưa đột biến vào sau đó được xử lý với enzym giới hạn PacI và SphI, và chủng *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC #31329) được biến nạp với đoạn ADN thu được được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3. Các thao tác liên quan đến kỹ thuật sinh học phân tử được thực hiện như được mô tả trong Molecular cloning, laboratory manual, 1st, 2nd, 3rd (1989). Ngoài ra, việc biến nạp được tiến hành sử dụng kỹ thuật chuẩn, nghĩa là, phương pháp PEG tế bào trần, và cụ thể là, được thực hiện như được mô tả trong Gene, 61, 165-176 (1987). Chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* thu được được sử dụng làm chủng đột biến QM9414 I trong các thử nghiệm dưới đây.

Ví dụ 2

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng đột biến QM9414 I:

Nuôi cấy trong bình tam giác

Sau khi bào tử của chủng đột biến QM9414 I được tạo ra ở ví dụ 1 được pha loãng với nước muối sinh lý là $1,0 \times 10^7$ /mL, 0,1 mL dung dịch bào tử loãng được cấy vào 10 mL môi trường bình được thể hiện ở bảng 1 hoặc 2 mà được đặt trong bình có vách ngăn 50 mL, và được ủ trên máy lắc trong điều kiện 28°C và 120 rpm trong 120 giờ. Nồng độ protein trong dung dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp được mô tả ở ví dụ tham chiếu 1, và các hoạt tính riêng xenulaza khác nhau được xác định bằng phương pháp được mô tả ở ví dụ tham chiếu 2. Kết quả thu được sau khi nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1 được đưa ra trong bảng 3, và kết quả thu được sau khi nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2 được đưa

ra trong bảng 4.

Bảng 1

Arbocel B800 (J. Rettenmaier & Sohne sản xuất)	20 g
5× dung dịch Mandel*	200 mL
10× dung dịch amoni tartrat**	100 mL
Dịch ngâm ngô	50 g
Dung dịch yếu tố vi lượng***	1 mL
Tween 80	0,5 mL
PE-M	1 mL
	(mỗi 1 L)

* 5× dung dịch Mandel chứa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 g/L, KH_2PO_4 10 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L.

** 10× dung dịch amoni tartrat chứa amoni tartrat 92 g/L.

*** Dung dịch yếu tố vi lượng chứa H_3BO_3 0,3 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,3 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L, và ZnCl_2 10 g/L.

Bảng 2

Lactoza	20 g
5× dung dịch Mandel*	200 mL
10× Dung dịch amoni tartrat**	100 mL
Dịch ngâm ngô	50 g
Dung dịch yếu tố vi lượng***	1 mL
Tween 80	0,5 mL
PE-M	1 mL
	(mỗi 1 L)

Gom dung dịch nuôi cấy

Sau 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy, 1 mL dung dịch nuôi cấy được gom. Dung dịch nuôi cấy được ly tâm ở điều kiện 15.000×g và 4°C trong 10 phút để thu được chất nổi bề mặt. Chất nổi bề mặt là sản phẩm được lọc qua dụng cụ lọc 0,22 µm, và sản phẩm lọc được sử dụng làm dung dịch xenlulaza trong các thử nghiệm dưới đây.

Xác định nồng độ protein và các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau

Nồng độ protein trong dung dịch nuôi cấy ở 120 giờ từ lúc bắt đầu nuôi cấy được đo sử dụng kỹ thuật được mô tả trong ví dụ tham chiếu 1, và sau đó, các hoạt tính riêng của xenlulaza được xác định bằng phương pháp được mô tả ở ví dụ tham chiếu 2. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và 4.

Ví dụ 3

Chuẩn bị chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* QM9414 II được giảm chức năng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2:

Chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* được giảm chức năng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được tạo ra bằng cách sản xuất mảnh ADN gồm trình tự gen được nêu trong SEQ ID NO: 10, và sau đó biến đổi chủng *Trichoderma reesei* QM9414 với mảnh ADN. Bằng phương pháp này, amdS được xen

giữa bazơ thứ 435 và thứ 436 ở SEQ ID NO: 1, và thu được chủng đột biến chỉ *Trichoderma reesei* được giảm chức năng SEQ ID NO: 2. Để cho phép mảnh ADN gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 10 được đưa ở phía trên và ở phía dưới của trình tự ADN chứa amdS, plasmit để đưa đột biến được tạo ra để bổ sung một phần tương đồng vào trình tự gen của chủng *Trichoderma reesei* QM9414.

Cụ thể là, PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen được tách theo cách thông thường từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414 và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12, và mảnh ADN thu được bằng cách xử lý mảnh khuếch đại thu được với enzym giới hạn AflIII và NotI được sử dụng làm mảnh ở phía trên. Ngoài ra, PCR được tiến hành sử dụng ADN hệ gen và các oligo ADN được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14, và mảnh ADN thu được bằng cách xử lý mảnh khuếch đại thu được với enzym giới hạn MluI và SphI được sử dụng làm mảnh ADN ở phía dưới. Mảnh ADN ở phía trên và ở phía dưới được đưa vào plasmit được xen amdS bằng cách sử dụng enzym giới hạn AflIII và NotI và enzym giới hạn MluI và SphI, lần lượt, để cấu trúc plasmit cho việc đưa đột biến. Plasmit để đưa đột biến sau đó được xử lý với enzym giới hạn AflIII và SphI, và chủng *Trichoderma reesei* QM9414 được biến nạp với ADN thu được được thể hiện bằng SEQ ID NO: 10 theo cách như được mô tả ở ví dụ 1. Chủng đột biến chỉ *Trichoderma reesei* thu được được sử dụng làm chủng đột biến QM9414 II ở thí nghiệm sau đây.

Ví dụ 4

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng đột biến QM9414 II:

Việc nuôi cấy được thực hiện bởi cùng các công đoạn và điều kiện như ở ví dụ 2 ngoại trừ việc chủng đột biến QM9414 II được sử dụng thay cho chủng đột biến QM9414 I thu được ở ví dụ 1, và nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy và nhiều hoạt tính riêng khác nhau của xenulaza được xác định. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và 4.

Ví dụ so sánh 1

Thử nghiệm sản xuất protein sử dụng chủng *Trichoderma reesei* QM9414

Việc nuôi cấy được thực hiện bởi cùng các điều kiện và công đoạn như ở ví dụ 2 ngoại trừ việc chủng QM9414 được sử dụng thay cho chủng đột biến QM9414 I thu

được ở ví dụ 1, và nồng độ protein chứa trong dung dịch nuôi cấy và nhiều hoạt tính riêng khác nhau của xenlulaza được xác định bằng cùng phương pháp như ở ví dụ 2. Kết quả thu được sau khi nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1 được cho ở bảng 3, và kết quả thu được sau khi nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2 được cho ở bảng 4.

Bảng 3

Nuôi cấy với Arbocel B800	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ 2	Ví dụ 4
	Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 I	Chủng đột biến QM9414 II
Giá trị tương đối của nồng độ protein	1	1,5	1,3
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -glucosidaza	1	1,9	1,7
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -xylosidaza	1	1,3	1,9
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza	1	1,3	1,1

Bảng 4

Nuôi cấy với lactoza	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ 2	Ví dụ 4
	Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 I	Chủng đột biến QM9414 II
Giá trị tương đối của nồng độ protein	1	1,7	1,4
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -glucosidaza	1	4,3	1,6
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng β -xylosidaza	1	2,5	1,2
Giá trị tương đối của hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza	1	3,5	1,1

Kết quả từ ví dụ 2, ví dụ 4 và ví dụ so sánh 1 chỉ ra rằng sau đây liên quan đến việc nuôi cấy ở môi trường được thể hiện ở bảng 1. Khi nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy trong đó chủng *Trichoderma reesei* QM9414 được nuôi cấy được cho là 1, giá trị tương đối của nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy của chủng đột biến QM9414 I là 1,5 và giá trị tương đối của nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy của chủng đột biến QM9414 II là 1,3. Được hiểu từ các kết quả này là khi chi *Trichoderma reesei* được giảm chức năng của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được nuôi cấy, lượng sản xuất protein có thể được tăng khi so sánh với trường hợp trong đó chức năng của polypeptit không được giảm.

Hơn nữa, dung dịch nuôi cấy thu được ở ví dụ 2, ví dụ 4, và ví dụ so sánh 1 được kiểm tra hoạt tính riêng xenlulaza bằng phương pháp được mô tả ở ví dụ tham chiếu 2. Kết quả là, sau đây được tìm thấy. Khi các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau ở dung dịch nuôi cấy trong đó chủng *Trichoderma reesei* QM9414 được nuôi cấy được cho là 1, hoạt tính riêng β -glucosidaza là chủng đột biến QM9414 I: 1,9, và chủng đột biến QM9414 II: 1,7, hoạt tính riêng β -xylosidaza là chủng đột biến QM9414 I: 1,3, và chủng đột biến QM9414 II: 1,9, và hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza là chủng đột biến QM9414 I: 1,3, và chủng đột biến QM9414 II: 1,1. Được hiểu từ các kết quả này là xenlulaza thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* được giảm chức năng polypeptit được đại diện bởi trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 không chỉ đạt được lượng sản xuất protein cải thiện mà còn dẫn đến hiệu quả bất ngờ là thu được cải thiện ở các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau, khi so sánh với trường hợp trong đó chức năng polypeptit không được giảm.

Trong khi đó, đối với nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy chứa lactoza được thể hiện ở bảng 2, sau đây được tìm thấy. Khi nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy trong đó chủng QM9414 được nuôi cấy được cho là 1, giá trị tương đối của nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy của chủng đột biến QM9414 I là 1,7 và giá trị tương đối của nồng độ protein ở dung dịch nuôi cấy của chủng đột biến QM9414 II là 1,4. Được hiểu từ các kết quả này là khi chi *Trichoderma reesei* được giảm chức năng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 được nuôi cấy, lượng sản xuất protein có thể được tăng khi so sánh với trường hợp trong đó chức năng của polypeptit không được giảm.

Hơn nữa, dung dịch nuôi cấy thu được được kiểm tra cho hoạt tính riêng xenlulaza bằng phương pháp được mô tả ở ví dụ tham chiếu 2. Kết quả là, sau đây được tìm thấy. Khi các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau ở dung dịch nuôi cấy trong đó chủng QM9414 được nuôi cấy được cho là 1, hoạt tính riêng β -glucosidaza là chủng đột biến QM9414 I: 4,3, và chủng đột biến QM9414 II: 1,6, hoạt tính riêng β -xylosidaza là chủng đột biến QM9414 I: 2,5, và chủng đột biến QM9414 II: 1,2, và hoạt tính riêng xenlobiohydrolaza là chủng đột biến QM9414 I: 3,5, và chủng đột biến QM9414 II: 1,1. Được hiểu từ các kết quả này là xenlulaza thu được bằng cách nuôi cấy chủng đột biến chi *Trichoderma reesei* được giảm chức năng polypeptit được đại diện bởi trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 không chỉ đạt được lượng sản xuất protein cải thiện mà còn dẫn đến hiệu quả bất ngờ là thu được cải thiện ở các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau, khi so sánh với trường hợp trong đó chức năng polypeptit không được giảm. Các kết quả này tiết lộ rằng nuôi cấy chủng đột biến QM9414 I, được giảm chức năng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, ở môi trường nuôi cấy chứa lactoza đạt được sự cải thiện lớn về các hoạt tính riêng xenlulaza khác nhau hơn nuôi cấy nó ở môi trường nuôi cấy chứa xenluloza.

Ví dụ 5

Thử nghiệm phản ứng đường hóa sử dụng xenlulaza từ chủng đột biến QM9414 I

Sử dụng dung dịch nuôi cấy thu thập được ở 120 giờ sau khi khởi đầu nuôi cấy chủng đột biến QM9414 I thu được ở ví dụ 2 trong môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1, thử nghiệm phản ứng đường hóa sinh khối chứa xenluloza được tiến hành theo công đoạn và điều kiện được mô tả ở bảng 5 và ví dụ tham chiếu 3. Là sinh khối chứa xenluloza, sử dụng Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 hoặc bã mía được nghiền thành bột. Kết quả của nó được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 5

Arbocel B800 hoặc bã mía được nghiền thành bột	80 mg
Đệm natri axetat 1 M (độ pH 5,2)	100 μ L
Lượng bổ sung enzym	0,06 mg (mỗi 1 mL)

Bảng 6

		Ví dụ so sánh	Ví dụ 5
		Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 I
Arbocel B800	Nồng độ glucoza (g/L)	3,3	4,8
	Nồng độ xyloza (g/L)	3,9	4,9
Bã mía	Nồng độ glucoza (g/L)	1,4	1,7
	Nồng độ xyloza (g/L)	2,3	2,5

Ví dụ 6

Thử nghiệm phản ứng đường hóa 1 sử dụng xenlulaza từ chủng đột biến QM9414

II

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được tiến hành theo công đoạn và điều kiện được mô tả ở ví dụ tham chiếu 3 sử dụng dung dịch nuôi cấy thu thập được ở 120 giờ sau khi khởi đầu nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1, dung dịch nuôi cấy chủng đột biến QM9414 II thu được ở ví dụ 4. Điều kiện phản ứng cho phản ứng đường hóa của Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 được thể hiện ở bảng 7, và điều kiện phản ứng cho phản ứng đường hóa của bã mía được nghiền thành bột được thể hiện ở bảng 8. Kết quả của nó được thể hiện ở bảng 9.

Bảng 7

Arbocel B800	100 mg
Đệm natri axetat 1 M (độ pH 5,2)	100 μ L
Lượng bổ sung enzym	450 μ L (mỗi 1 mL)

Bảng 8

Bã mía được nghiền thành bột	100 mg
Đệm natri axetat 1 M (độ pH 5,2)	100 μ L
Lượng bổ sung enzym	400 μ L (mỗi 1 mL)

Bảng 9

Chất nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy từ nuôi cấy Arbocel B800 được sử dụng		Ví dụ so sánh	Ví dụ 6
		Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 II
Đường hóa Arbocel B800	Nồng độ glucoza (g/L)	13,0	14,3
	Nồng độ xyloza (g/L)	8,5	9,1
Đường hóa bã mía	Nồng độ glucoza (g/L)	6,1	6,5
	Nồng độ xyloza (g/L)	4,1	4,1

Ví dụ so sánh 2

Thử nghiệm phản ứng đường hóa 1 sử dụng xenlulaza từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được thực hiện bởi cùng công đoạn và điều kiện như trong ví dụ 5 hoặc 6, ngoại trừ việc sử dụng được thực hiện bằng dung dịch nuôi cấy thu thập được ở 120 giờ sau khi khởi đầu nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1, dung dịch nuôi cấy chủng *Trichoderma reesei* QM9414 thu được ở ví dụ so sánh 1. Kết quả của nó được thể hiện ở bảng 6 và 9.

Ví dụ 7

Thử nghiệm phản ứng đường hóa sử dụng xenlulaza từ chủng đột biến QM9414

II

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được tiến hành theo công đoạn và điều kiện được mô tả ở bảng 6 và ví dụ tham chiếu 3 sử dụng dung dịch nuôi cấy thu thập được ở 120 giờ sau khi khởi đầu nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2, dung dịch nuôi cấy chủng đột biến QM9414 II thu được ở ví dụ 4. Điều kiện phản ứng cho phản ứng đường hóa của Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 được thể hiện ở bảng 10, và điều kiện phản ứng cho phản ứng đường hóa của bã mía được nghiền thành bột được thể hiện ở bảng 11. Kết quả của nó được thể hiện ở bảng 12.

Bảng 10

Arbocel B800	100 mg
Đệm natri axetat 1 M (độ pH 5,2)	100 μ L
Lượng bổ sung enzym	350 μ L
	(mỗi 1 mL)

Bảng 11

Bã mía được nghiền thành bột	100 mg
Đệm natri axetat 1 M (độ pH 5,2)	100 μ L
Lượng bổ sung enzym	400 μ L
	(mỗi 1 mL)

Bảng 12

Chất nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy từ nuôi cấy lactoza được sử dụng		Ví dụ so sánh	Ví dụ 7
		Chủng QM9414	Chủng đột biến QM9414 II
Đường hóa Arbocel B800	Nồng độ glucoza (g/L)	5,9	7,2
	Nồng độ xyloza (g/L)	3,4	4,5
Đường hóa Bã mía	Nồng độ glucoza (g/L)	2,9	3,9
	Nồng độ xyloza (g/L)	2,5	3,0

Ví dụ so sánh 3

Thử nghiệm phản ứng đường hóa 2 sử dụng xenlulaza từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414

Thử nghiệm phản ứng đường hóa của sinh khối chứa xenluloza được thực hiện bởi cùng công đoạn và điều kiện như trong ví dụ 7, ngoại trừ việc sử dụng được thực hiện bằng dung dịch nuôi cấy thu thập được ở 120 giờ sau khi khởi đầu nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2, dung dịch nuôi cấy chủng *Trichoderma reesei* QM9414 thu được ở ví dụ so sánh 1. Kết quả của nó được thể hiện ở bảng 12.

Kết luận

Kết quả từ ví dụ 5 và ví dụ so sánh 2 chỉ ra sau đây. Đối với phản ứng đường hóa Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 với dung dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1, sử dụng xenlulaza thu được từ chủng *Trichoderma reesei* QM9414 dẫn đến dung dịch được đường hóa có nồng độ glucoza là 3,3 g/L, trong khi sử dụng chủng QM9414 đột biến I dẫn đến nồng độ glucoza là 4,8 g/L. Hơn nữa, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến nồng độ xyloza ở dung dịch đường

hóa là 3,9 g/L, trong khi sử dụng chủng QM9414 đột biến I dẫn đến nồng độ xyloza là 4,9 g/L.

Đối với phản ứng đường hóa bã mía được nghiền thành bột, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 1,4 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến I dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 1,7 g/L. Sử dụng chủng QM9414 dẫn đến hàm lượng xyloza tự do là 2,3 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến I dẫn đến hàm lượng xyloza tự do là 2,5 g/L.

Kết quả của ví dụ 6 và ví dụ so sánh 2 tiết lộ các điều sau đây. Đối với phản ứng đường hóa Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 với dung dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 13 g/L, trong đó sử dụng chủng QM9414 đột biến II dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 14,3 g/L. Hơn nữa, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến hàm lượng xyloza tự do là 8,5 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến hàm lượng xyloza tự do là 9,1 g/L. Đối với phản ứng đường hóa bã mía được nghiền thành bột, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 6,1 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến hàm lượng glucoza tự do là 6,5 g/L. Cả hai chủng QM9414 và chủng đột biến II cho hàm lượng xyloza tự do là 4,1 g/L.

Kết quả của ví dụ 7 và ví dụ so sánh 3 tiết lộ các điều sau đây. Đối với phản ứng đường hóa Arbocel (nhãn hiệu được đăng ký) B800 với dung dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy ở môi trường nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến nồng độ glucoza là 5,9 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến nồng độ glucoza là 7,2 g/L. Hơn nữa, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến nồng độ xyloza là 3,4 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến nồng độ xyloza là 4,5 g/L. Đối với phản ứng đường hóa bã mía được nghiền thành bột, sử dụng chủng QM9414 dẫn đến nồng độ glucoza là 2,9 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến nồng độ glucoza là 3,9 g/L. Sử dụng chủng QM9414 dẫn đến nồng độ xyloza là 2,5 g/L, trong đó sử dụng chủng đột biến II dẫn đến nồng độ xyloza là 3,0 g/L. Được hiểu từ các kết quả này là xenlulaza được sản xuất bằng chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma* mà được giảm chức năng polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể sản xuất số lượng đường lớn hơn xenlulaza được sản xuất bằng chủng QM9414.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma reesei*, có biểu hiện của polypeptit gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 giảm, trong đó chủng đột biến này có khả năng sản xuất xenlulaza cải thiện so với chủng bố mẹ *Trichoderma reesei* không được biến đổi của chủng đột biến này.
2. Phương pháp sản xuất protein, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma reesei* theo điểm 1.
3. Phương pháp sản xuất xenlulaza, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma reesei* theo điểm 1.
4. Phương pháp sản xuất xenlulaza theo điểm 3, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến, trong môi trường nuôi cấy bao gồm một hoặc nhiều loại chất kích thích được chọn từ nhóm gồm lactoza, xenluloza, và xylan.
5. Phương pháp sản xuất đường từ sinh khối chứa xenluloza, phương pháp này bao gồm:
 - bước a) sản xuất xenlulaza bằng cách nuôi cấy chủng đột biến *Trichoderma reesei* theo điểm 1; và
 - bước b) đường hóa sinh khối bằng cách sử dụng xenlulaza thu được ở bước a.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Chủng đột biến của nấm sợi của chi *Trichoderma reesei* và phương pháp sản xuất protein của nó.

<130> 19069WO01

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1870

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 1
atgaccgtcc tcacctcacc tctggccagc tataatgtgg ccaacaagct gtacaaaacc
60
actctgctca acaccgtctg cctcgtggcc ggactgtcga tcttcttctt cggctatgat
120
cagggattga tgggcggtgt taacacgacg cgcgactatg ccgagcgcac gggctttggc
180
cactgggacg aagaccagaa cattgtcgtc gtcgataagc cgctgctgca gggcggatc
240
gtagctgtct actatctccc cggaacgctg tgcggttgtc tgcttggcgg ttggcttggg
300
gatcgtatg gccgtatcaa aacaattgcc attgcctgtg cgtggagtgt ctgcgcagcc
360
gccctgcagg cctcagctat gaatgcgaac tggatgtttt gcggtatgtc gatgattctt
420
ggacaatcac aaccgaacta ttactgatga tgagatgaaa cagcccgctg tctgaacggc
480
gtcggcactg gaatcttgaa cgcaatcacg cctgtgtggg caaccgagac tgctgctcac
540
acttctcgag gccagttcgt ttccattgag ttcaccctca acattcttgg tgttggtgta
600
gcctactggc tggaattgta cgtgcctcct cactcaggat cccagtcctt gtggaaagtc
660
tcctaatgc ggtggcagtg gtacttctaa atatcacgac aacacatcct ccttcatctg
720
gagattcccg gtcgccttcc agatcctccc cctaatacct ctgttctca tcatctggat
780
catgcctgaa tcccccgct ggctcgtcaa agtgggtcgt gaagaagagg ctgccttcat
840

ccttggtcgt ctccgtggca atgagggcga ggacggcctc aaggcggaag cagagtacaa
900

tgatattgtc aacatccaca agcttgaagt agacaccgcc aagcagcaga gctactttctc
960

catgtttctt ggcatgggt ctggaaagct acacactggc cggcgcggtgc agctgggtcat
1020

ctgggtccag atattgcaag agtggatcgg tattgcgga atcaccattt acggccctga
1080

gatctttacg attgctggca tcagcgcaaa ggacagactc tgggttagcg ggatcaacaa
1140

tatcacatac atggtacgtt tagccaacac ctctcacct caaagattcc atcacactaa
1200

cacgggagca gttcgccaca ctgatctgcg tcttcaccat cgatcgcata ggtcgccgtt
1260

ggactctgta ctggggagct gtcggccagg gcatttgcgt gttcgtcgcc ggtggcctcg
1320

ctcgcgcaac catcaatgcc tcaggcaaag caagccagag ccacatcggc ggcgctgcaa
1380

cattctttgt gttctctac actgccattt tcggcgctac ctggctgacg gttccttggt
1440

tgtatccggc cgagattttc cctctgcagg ttagagccaa gggaaatgcc tgggggtgctg
1500

ttggctggtc cattggcaac ggctgggtgtg taagtgcact tttcattctc ctctcccgtc
1560

tgggctcttc tgggtctaata ttctctaggt gtcctgctt cctacgatct tcaaggcgct
1620

caacgaaaag acactctaca tttttggcgc cgtcaacgcc ctgtccatcc tcgtcgtgtg
1680

ggctctgtac cccgaatcga atcaacgaac tctagaggag atggacctcg tctttgctag
1740

cgacagcatc tgggcctggg aggctgagcg taattttgcc aagctcaagg ctgaaaaccc
1800

ggatcttggt cagggctcaa caaaccacgg agttgtagat attgagcaag ttgccgagcc
1860

aaaggagtag
1870

<210> 2
<211> 543
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 2

Met Thr Val Leu Thr Ser Pro Leu Ala Ser Tyr Asn Val Ala Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Thr Thr Leu Leu Asn Thr Val Cys Leu Val Ala Gly Leu
 20 25 30

Ser Ile Phe Phe Phe Gly Tyr Asp Gln Gly Leu Met Gly Gly Val Asn
 35 40 45

Thr Thr Arg Asp Tyr Ala Glu Arg Met Gly Phe Gly His Trp Asp Glu
 50 55 60

Asp Gln Asn Ile Val Val Val Asp Lys Pro Leu Leu Gln Gly Gly Ile
 65 70 75 80

Val Ala Val Tyr Tyr Leu Pro Gly Thr Leu Cys Gly Cys Leu Leu Gly
 85 90 95

Gly Trp Leu Gly Asp Arg Tyr Gly Arg Ile Lys Thr Ile Ala Ile Ala
 100 105 110

Cys Ala Trp Ser Val Cys Ala Ala Ala Leu Gln Ala Ser Ala Met Asn
 115 120 125

Ala Asn Trp Met Phe Cys Ala Arg Val Leu Asn Gly Val Gly Thr Gly
 130 135 140

Ile Leu Asn Ala Ile Thr Pro Val Trp Ala Thr Glu Thr Ala Ala His
 145 150 155 160

Thr Ser Arg Gly Gln Phe Val Ser Ile Glu Phe Thr Leu Asn Ile Leu
 165 170 175

Gly Val Val Val Ala Tyr Trp Leu Glu Phe Gly Thr Ser Lys Tyr His
 180 185 190

Asp Asn Thr Ser Ser Phe Ile Trp Arg Phe Pro Val Ala Phe Gln Ile
 195 200 205

Leu Pro Leu Ile Leu Leu Phe Leu Ile Ile Trp Ile Met Pro Glu Ser
 210 215 220

Pro Arg Trp Leu Val Lys Val Gly Arg Glu Glu Glu Ala Arg Phe Ile

225	230	235	240
Leu Gly Arg Leu Arg Gly Asn Glu Gly Glu Asp Gly Leu Lys Ala Glu	245	250	255
Ala Glu Tyr Asn Asp Ile Val Asn Ile His Lys Leu Glu Val Asp Thr	260	265	270
Ala Lys Gln Gln Ser Tyr Phe Ser Met Phe Phe Gly Ile Gly Ser Gly	275	280	285
Lys Leu His Thr Gly Arg Arg Val Gln Leu Val Ile Trp Leu Gln Ile	290	295	300
Leu Gln Glu Trp Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Tyr Gly Pro Glu	305	310	315
Ile Phe Thr Ile Ala Gly Ile Ser Ala Lys Asp Arg Leu Trp Val Ser	325	330	335
Gly Ile Asn Asn Ile Thr Tyr Met Phe Ala Thr Leu Ile Cys Val Phe	340	345	350
Thr Ile Asp Arg Ile Gly Arg Arg Trp Thr Leu Tyr Trp Gly Ala Val	355	360	365
Gly Gln Gly Ile Cys Met Phe Val Ala Gly Gly Leu Ala Arg Ala Thr	370	375	380
Ile Asn Ala Ser Gly Lys Ala Ser Gln Ser His Ile Gly Gly Ala Ala	385	390	395
Thr Phe Phe Val Phe Leu Tyr Thr Ala Ile Phe Gly Ala Thr Trp Leu	405	410	415
Thr Val Pro Trp Leu Tyr Pro Ala Glu Ile Phe Pro Leu Gln Val Arg	420	425	430
Ala Lys Gly Asn Ala Trp Gly Val Val Gly Trp Ser Ile Gly Asn Gly	435	440	445
Trp Cys Val Leu Leu Leu Pro Thr Ile Phe Lys Ala Leu Asn Glu Lys	450	455	460
Thr Leu Tyr Ile Phe Gly Ala Val Asn Ala Leu Ser Ile Leu Val Val			

465

470

475

480

Trp Ala Leu Tyr Pro Glu Ser Asn Gln Arg Thr Leu Glu Glu Met Asp
 485 490 495

Leu Val Phe Ala Ser Asp Ser Ile Trp Ala Trp Glu Ala Glu Arg Asn
 500 505 510

Phe Ala Lys Leu Lys Ala Glu Asn Pro Asp Leu Val Gln Gly Ser Thr
 515 520 525

Asn His Gly Val Val Asp Ile Glu Gln Val Ala Glu Pro Lys Glu
 530 535 540

<210> 3

<211> 7115

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN để biến nạp.

<400> 3

cttaaggacc ggtggtgatg gcttagagct ccaccgactc gtcccagttc ttgactcagg
 60

cccacggaca tcattgggtgc gcataataac cgacaaaagc cggagcgcgc gacagacgtg
 120

ccgatggcgc gcgttgctgg gctgtcaacg ctccctgagg gctgtaacag agtgacgaca
 180

agaacagtat tccgggcata ctagtatcag ccagctccag cttttcccca tggagaaccc
 240

caaaactggag gcttctcttg cgataccatc tcattcattgg acagcgaccg gatggctccg
 300

acgaagcgtt taagcgtctc agctggcgaa tgggatcccc tcattctgaa cagggagccc
 360

gttttaggat accatttcct tcggaaacga tgagcttttt gatgctgcct aatcccatgc
 420

gggatgccga tcttcggatg tcccacgatg atatcatata gatataaaa ggaacccccg
 480

tctggcatct caatcctggg gaggaatgac ggagagagca cattcaacag acagcacaag
 540

atcttcgttc tcgggtgcaa ccgagcatca tcgccatgac cgtcctcacc tcacctctgg
 600

ccagctataa tgtggccaac aagctgtaca aaaccactct gctcaacacc gtctgcctcg
 660

tggccggact gtcgatcttc ttcttcggct atgatcaggg attgatgggc ggtgttaaca
720

cgacgcgcga ctatgccgag cgcattgggt ttggccactg ggacgaagac cagaacattg
780

tcgtcgtcga taagccgctg ctgcagggcg gtatcgtagc tgtctactat ctccccggaa
840

cgctgtgcgg ttgtctgctt ggcggttggc ttggtgatcg ctatggccgt atcaaaacaa
900

ttgccattgc ctgtgcgtgg agtgtctgcg cagccgccct gcaggcctca gctatgaatg
960

cgaactggat gttttgcggt atgtcgatga ttcttgga atcacaaccg aactattact
1020

gatgatgaga tgaaacagcc cgcgttctga acggcgtcgg cactggaatc ttgaacgcaa
1080

tcacgcctgt gtgggcaacc gagactgctg ctcacacttc tcgaggccag ttcgtttcca
1140

ttgagttcac cctcaacatt cttggtgttg ttgtagccta ctggctggaa ttgtacgtgc
1200

ctcctcactc aggatcccca gtcttgtgga aagtctccct aatgcggtgg cagtgggtact
1260

tctaaatatc acgacaacac atcctccttc atctggagat tcccggtcgc cttccagatc
1320

ctccccctaa tccttctggt cctcatcctc tggatcatgc ctgaatcccc ccgctggctc
1380

gtcaaagtgg gtcgtgaaga agaggctcgc ttcaccttg gtcgtctccg tggcaatgag
1440

ggcgaggacg gcctcaaggc ggaagcagag tacaatgata ttgtcaacat ccacaagctt
1500

gaagtagaca ccgccaagca gcagagctac ttctccatgt tctttggcat tgggtctgga
1560

aagctacaca ctggccggcg cgtgcagctg gtcactctggc tccagatatt gcaagagtgg
1620

atcgggtattg cgggaatcac catttacggc cctgagatct ttacgattgc tggcatcagc
1680

gcaaaggaca gactctgggt tagcgggac aacaatatca catacatggt acgttttagcc
1740

aacacctcct cacctcaaag attccatcac actaacacgg gagcagttcg ccacactgat
1800

ctgcgtcttc accatcgatc gcataggctg ccggttgact ctgtactggg gagctgtcgg
1860

ccagggcatt tgcattgttcg tcgccggtgg cctcgctcgc gcaaccatca atgcctcagg
1920

caaagcaagc cagagccaca tcggcggcgc tgcaacattc tttgtgttcc tctacactgc
1980

cattttcggc gctacctggc tgctacctgg ctgacggttc cttggttgta tccggccgag
2040

attttccctc tgcaggttag agccaaggga aatgcctggg gtgtcgttgg ctgggtccatt
2100

ggcaacggct ggtgtgtaag tgcacttttc atttctctct cccgtctggg ctcttctggt
2160

ctaattctct ctaggtgctc ctgcttctta cgatcttcaa ggcgtcaac gaaaagacac
2220

tctacatttt tggcgccgct aacgccctgt ccacccctgt cgtgtgggct ctgtaccccg
2280

aatcgaatca acgaactcta gaggagatgg acctcgtctt tgctagcgac agcatctggg
2340

cctgggaggc tgagcgtaat tttgccaaagc tcaaggctga aaaccggat cttgttcagg
2400

gctcaacaaa ccacggagtt gtagatattg agcaagttgc cgagccaaag gagtaggttc
2460

gtcgacaaga acttgacggc ctctttatac ataatttttc ctactagcgg ccgcctagtc
2520

atcattggat aggagatta ctgagcctga atgacatcaa catgttacct atgatacaat
2580

aggtcacaca aacaagcgt aagatgcact tggatgaca agcccagtag tccgtttcaa
2640

aagacctaga tgatgaacta caacatgagg tgttgccctc tgatccagtc caactgcaaa
2700

cgctgatgta tactcaatca agcctgatgt aaatgctgcg actcgattcg ctggatatga
2760

agatcaaaga gagctctgat gggccaata tagccgggtt ttgttaggac agtccaccac
2820

accgatatta gaattggtca agcaccttat catttcatag agattgaggc ttctagatct
2880

acgccaggac cgagcaagcc cagatgagaa ccgacgcaga tttccttggc acctgttgct
2940

tcagctgaat cctggcaata cgagatacct gctttgaata ttttgaatag ctgcgccgct
3000

ggagagcatc ctgaatgcaa gtaacaaccg tagaggctga cacggcaggc gttgctaggg
3060

agcgtcgtgt tctacaaggc cagacgtctt cgcggttgat atatatgtat gtttgactgc
3120

aggctgctca ggcacgacag tcaagttcgc cctcgtgct tgtgcaataa tcgcagtggg
3180

gaagccacac cgtgactccc atctttcagt aaagctctgt tgggtgttat cagcaataca
3240

cgtaatttaa actcgttagc atggggctga tagcttaatt accgtttacc agtgccgcgg
3300

ttctgcagct ttccttgcc cgtaaaattc ggcgaagcca gccaatcacc agctaggcac
3360

cagctaaacc ctataattag tctcttatca acaccatccg ctccccggg atcaatgagg
3420

agaatgaggg ggatgcgggg ctaaagaagc ctacataacc ctcatgccaa ctcccagttt
3480

acactcgtcg agccaacatc ctgactataa gctaacacag aatgcctcaa tcctgggaag
3540

aactggccgc tgataagcgc gcccgctcg caaaaaccat cctgatgaa tggaaagtcc
3600

agacgctgcc tgcggaagac agcgttattg atttcccaa gaaatcgggc atcctttcag
3660

aggccgaact gaagatcaca gaggcctccg ctgcagatct tgtgtccaag ctggcgccg
3720

gagagttgac ctcggtggaa gttacgctag cattctgtaa acgggcagca atcgcccagc
3780

agttagtagg gtccccctta cctctcaggg agatgtaaca acgccacctt atgggactat
3840

caagctgacg ctggcttctg tgcagacaaa ctgcgccac gagttcttcc ctgacgcgcg
3900

tctcgcgcag gcaagggaac tcgatgaata ctacgcaaag cacaagagac ccgttggtcc
3960

actccatggc ctccccatct ctctcaaaga ccagcttcga gtcaaggtac accgttgccc
4020

ctaagtcggt agatgtccct ttttgtcagc taacatatgc caccagggt acgaaacatc
4080

aatgggctac atctcatggc taaacaagta cgacgaaggg gactcggttc tgacaaccat
4140

gctccgcaaa gccggtgccg tcttctacgt caagacctct gtccgcaga cctgatggg
4200

ctgcgagaca gtcaacaaca tcatcggggc caccgtcaac ccacgcaaca agaactggtc
4260

gtgcggcggc agttctggtg gtgagggtgc gatcggtggg attcgtggtg gcgtcatcgg
4320

tgtaggaacg gatatcgggtg gctcgattcg agtgccggcc gcgttcaact tcctgtacgg
4380

tctaaggccg agtcatgggc ggctgccgta tgcaaagatg gcgaacagca tggaggggtca
4440

ggagacgggtg cacagcgttg tcgggcccgat tacgcactct gttgaggggtg agtccttcgc
4500

ctcttccttc ttttcctgct ctataccagg cctccactgt cctcctttct tgctttttat
4560

actatatacg agaccggcag tcaactgatga agtatgttag acctccgcct cttcaccaaa
4620

tccgtcctcg gtcaggagcc atggaaatac gactccaagg tcatcccat gccctggcgc
4680

cagtccgagt cggacattat tgccccaag atcaagaacg gcgggctcaa tatcggtac
4740

tacaacttcg acggcaatgt ccttcacac cctcctatcc tgcgcggcgt ggaaaccacc
4800

gtcgcgcac tcgccaaagc cggtcacacc gtgaccccggt ggacgccata caagcacgat
4860

ttcggccacg atctcatctc ccatactac gcggctgacg gcagcgccga cgtaatgcgc
4920

gatatcagtg catccggcga gccggcgatt ccaaatatca aagacctact gaaccgaac
4980

atcaaagctg ttaacatgaa cgagctctgg gacacgcac tccagaagtg gaattaccag
5040

atggagtacc ttgagaaatg gcgggaggct gaagaaaagg ccgggaagga actggacgcc
5100

atcatcgcg cgtattacgcc taccgctgcg gtacggcatg accagttccg gtactatggg
5160

tatgcctctg tgatcaacct gctggatttc acgagcgtgg ttgttccggt tacctttgcg
5220

gataagaaca tcgataagaa gaatgagagt ttcaaggcgg ttagtgagct tgatgccctc
5280

gtgcaggaag agtatgatcc ggaggcgtac catggggcac cggttgcagt gcaggttatc
5340

ggacggagac tcagtgaaga gaggacgttg gcgattgcag aggaagtggg gaagttgctg
5400

ggaaatgtgg tgactccata gctaataagt gtcagatagc aatttgcaca agaaatcaat
5460

accagcaact gtaaataagc gctgaagtga ccatgccatg ctacgaaaga gcagaaaaaa
5520

acctgccgta gaaccgaaga gatatgacac gcttccatct ctcaaaggaa gaatcccttc
5580

agggttgctt ttccagtcta gacgcgtctc gcatcaaact atttcggcac gtggacacat
5640

tgctccgtgg agctgggcat gtgttttaac caacctgat tacctcacac tggcggcagc
5700

aatgaatcaa catatctcaa gtacaagaga tgcagcagct gactacctgt atatcatatc
5760

tcatacatct caaatcccat cagtcatcag gccccagccc agtatcgatc ccaggcatct
5820

cggcagatgt ctttttgcag atgcttcaga aagtcgtcaa acttgacagg ctcttctcct
5880

tccaatctca tcactccatc cttgatcccc tgccatccct ccacaggcaa tttgatgtaa
5940

ctgtgcctct tgctgcagaa gtgcatgacg gggggcgatc ccaccgtctc aggatcatgt
6000

cgggccttgt agcaaagctc gcagattagg gtggttgaac attctgtaca ataatgaacc
6060

acagaatgtc cccaccaggc aaatgcagcc acgggggttac agatgccacc gtcgcaactg
6120

caaacgacta tctcgggggt cccaagatct cctcgtctc tcggtgacga cttcttgcca
6180

ctcctaatac tggccatggt ttcgtagggg gctagccctt caattgtccc aaccatcttg
6240

atagctacta caccttccga gtctgtatct tcagtatctt catcgctcgt ttcacatca
6300

tcgcttctgt cgttggaactg atttgctctc tcccaaagct cgagttcctc ctccgtgaca
6360

tgagtgattt tggagaacat tgctgatatg acgatgcgcg catagcgctg tatatcttgt
6420

ccttcgggta gagctttgct tagcaccatt agggcatggg ccagcttttc catattttgt
6480

ccatcgttcc aagacacttt atcgggttagg cctgcaaagc aatcatctag gacgctttgg
6540

agtctttcct gaaactcact tgctgtccc atcttttagac acattgacgc aagaacaatg
6600

cggcgataga ccaggcttag actcgtatag atcggcaccg acagagaaag cggcctgttc
6660

atgatgtttt tgagtgactc gagggcctct tgcttaacct tgggatctcg cgagccccgg
6720

aaaatttcgt agagaacatc agacatgaca tttaccagtc gctgcatcat ggtctgcggc
6780

tcctcgtccg tgatagagta cggatacccg cccgaggtgc tggcgaatat ctcatccagg
6840

gtcttgcgag cattctccaa atctcccttg gctctgaaat aagtaaccgc taactcaaga
6900

cgcagcggag caccagagtt gagccggctc agaaaccgaa tagcatcctg atagggcatca
6960

atcagaaagt cgacttcgcc ctctcttatt gcgagggagc gaagcttgct atgccgctca
7020

tgtccctggg tgcaatagtt ccacgccatc caggtcagtc tgtcaatagg actccagctc
7080

ttcagcgtcc gaaaatatcc agcgtaaatt taaat
7115

<210> 4

<211> 2514

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN để biến nạp.

<400> 4

cttaaggacc ggtggtgatg gcttagagct ccaccgactc gtcccagttc ttgactcagg
60

cccacggaca tcattggtgc gcataataac cgacaaaagc cggagcgatc gacagacgtg
120

cgatggcgc gcgttgctgg gctgtcaacg ctccctgagg gctgtaacag agtgacgaca
180

agaacagtat tccgggcata ctagtatcag ccagctccag cttttcccca tggagaacct
240

caaactggag gcttctcttg cgataccatc tcattcattg acagcgaccg gatggctccg
300

acgaagcgtt taagcgtctc agctggcgaa tgggatcccc tcattctgaa cagggagccc
360

gttttaggat accatttcct tcggaaacga tgagcttttt gatgctgcct aatcccatgc
420

gggatgccga tcttcggatg tcccacgatg atatcatata gatatatataa ggaacccccg
480

tctggcatct caatcctggg gaggaatgac ggagagagca cattcaacag acagcacaag
540

atcttcgttc tcgggtgcaa ccgagcatca tcgccatgac cgtcctcacc tcacctctgg
600

ccagctataa tgtggccaac aagctgtaca aaaccactct gctcaacacc gtctgcctcg
660

tggccggact gtcgatcttc ttcttcggct atgatcaggg attgatgggc ggtgttaaca
720

cgacgcgcga ctatgccgag cgcattgggt ttggccactg ggacgaagac cagaacattg
780

tcgtcgtcga taagccgctg ctgcagggcg gtatcgtagc tgtctactat ctccccggaa
840

cgctgtgcgg ttgtctgctt ggcggttggc ttggtgatcg ctatggccgt atcaaaacaa
900

ttgccattgc ctgtgcgtgg agtgtctgcg cagccgccct gcaggcctca gctatgaatg
960

cgaactggat gttttgcggt atgtcgatga ttcttggaca atcacaaccg aactattact
1020

gatgatgaga tgaacagcc cgcgttctga acggcgctcg cactggaatc ttgaacgcaa
1080

tcacgcctgt gtgggcaacc gagactgctg ctcacacttc tcgaggccag ttcgtttcca
1140

ttgagttcac cctcaacatt cttggtgttg ttgtagccta ctggctggaa ttgtacgtgc
1200

ctcctcactc aggatcccc a gtcttgtgga aagtctccct aatgcggtgg cagtgggtact
1260

tctaaatata acgacaacac atcctccttc atctggagat tcccggctgc cttccagatc
1320

ctccccctaa tccttctgtt cctcatcatc tggatcatgc ctgaatcccc ccgctggctc
1380

gtcaaagtgg gtcgtgaaga agaggctcgc ttcatccttg gtcgtctccg tggcaatgag
1440

ggcgaggacg gcctcaaggc ggaagcagag tacaatgata ttgtcaacat ccacaagctt
1500

gaagtagaca ccgccaagca gcagagctac ttctccatgt tctttggcat tgggtctgga
1560

aagctacaca ctggccggcg cgtgcagctg gtcactctggc tccagatatt gcaagagtgg
1620

atcgggtattg cgggaatcac catttacggc cctgagatct ttacgattgc tggcatcagc
1680

gcaaaggaca gactctgggt tagcgggatc aacaatatca catacatggt acgtttagcc
1740

aacacctcct cacctcaaag attccatcac actaacacgg gagcagttcg ccacactgat
1800

ctgcgtcttc accatcgatc gcataggctg ccgttggtact ctgtactggg gagctgtcgg
1860

ccagggcatt tgcattgttc tgcgcgggtg cctcgctcgc gcaaccatca atgcctcagg
1920

caaagcaagc cagagccaca tcggcggcgc tgcaacattc tttgtgttcc tctacactgc
1980

cattttcggc gctacctggc tgctacctgg ctgacggttc cttggttgta tccggccgag
2040

attttccctc tgcaggttag agccaaggga aatgcctggg gtgtcgttgg ctgggtccatt
2100

ggcaacgggt ggtgtgtaag tgcacttttc atttctctct cccgtctggg ctcttctggt
2160

ctaattctct ctaggtgctc ctgcttccta cgatcttcaa ggcgtcaac gaaaagacac
2220

tctacatttt tggcgccgct aacgccctgt ccatectcgt cgtgtgggct ctgtaccccg
2280

aatcgaatca acgaactcta gaggagatgg acctcgtctt tgctagcgac agcatctggg
2340

cctgggaggc tgagcgtaat tttgccaagc tcaaggctga aaaccggat cttgttcagg
2400

gctcaacaaa ccacggaggt gtagatattg agcaagttgc cgagccaaag gagtaggttc
2460

gtcgacaaga acttgacggg ctctttatac ataatttttc ctactagcgg ccgc
2514

<210> 5
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 5
atacgcgtct cgcaccaaac tatttcggga cg
32

<210> 6
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 6

atgcatatatt aaatttacgc tggatatattt cggacgctg

39

<210> 7

<211> 3127

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN để biến nạp.

<400> 7

agtgtctcaa tattgaagga accttgatcg gctacgactt gggatggaaa agacatggtc

60

cgccgctata cagaagagac gcggatacag taaatacata gtgcgccaat ataggtgcgt

120

atgatagaat aaagcagggg caagaagcac aataatacta ttgttcgacg taaaatgggtg

180

tcgaaaaaga acgccccgtt gactgcgagc ttgactgcaa gcttggctgc agcatgtgac

240

tcggaagagc ttactcacca ggatcgaacc gggcgaatca tacgctgtcc ttctcttggt

300

gtactctgcc cacttcgtat gacacgagca gacaaggctg ctctcatac tactaatagc

360

agtagtgatt ctgaaaacct ggggatcgtg atgatgattg gtgcgcatgg ctgccgtatt

420

gggcctgtgg attctcagcg gagatcagct tcgacaagtg accggtgggtg atggcttaga

480

gctccaccga ctcgctccag ttcttgactc agggccacgg acatcattgg tgcgcataat

540

aaccgacaaa agccggagcg atcgacagac gtgccgatgg cgcgcgttgc tgggctgtca

600

acgctccctg agggctgtaa cagagtgcg acaagaacag tattccgggc atactagtat

660

cagccagctc cagcttttcc ccatggagaa ccccaaactg gaggcttctc ttgcgatacc

720

atctcatcat tggacagcga ccggatggct ccgacgaagc gtttaagcgt ctcagctggc

780

gaatgggatc ccctcattct gaacagggag cccgttttag gataccattt ccttcggaaa

840

cgatgagctt tttgatgctg cctaattcca tgcgggatgc cgatcttcgg atgtcccacg
900

atgatatcat atagatatat aaaggaaccc ccgtctggca tctcaatcct ggggaggaat
960

gacggagaga gcacattcaa cagacagcac aagatcttcg ttctcgggtg caaccgagca
1020

tcctcgccat gaccgtcctc acctcacctc tggccagcta taatgtggcc aacaagctgt
1080

acaaaaccac tctgctcaac accgtctgcc tcgtggccgg actgtcgatc ttcttcttcg
1140

gctatgatca gggattgatg ggcgggtgta acacgacgcg cgactatgcc gagcgcagtg
1200

gctttggcca ctgggacgaa gaccagaaca ttgtcgtcgt cgataagccg ctgctgcagg
1260

gcggtatcgt agctgtctac tatctccccg gaacgctgtg cggttgtctg cttggcgggt
1320

ggcttggtga tcgctatggc cgtatcaaaa caattgccat tgcctgtgcg tggagtgtct
1380

gcgcagccgc cctgcaggcc tcagctatga atgcgaactg gatgttttgc ggtatgtcga
1440

tgattcttgg acaatcacia ccgaactatt actgatgatg agatgaaaca gcccgcgttc
1500

tgaacggcgt cggcactgga atcttgaacg caatcacgcc tgtgtgggca accgagactg
1560

ctgctcacac ttctcgaggc cagttcgttt ccattgagtt caccctcaac attcttggtg
1620

ttgttgtagc ctactggctg gaattgtacg tgcctcctca ctcaggatcc ccagtcttgt
1680

ggaaaagtct cctaattgcg tggcagtggt acttctaaat atcacgacaa cacatcctcc
1740

ttcatctgga gattcccgtt cgccttcag atcctcccc taatccttct gttcctcatc
1800

atctggatca tgctgaatc cccccgctgg ctctgcaaag tgggtcgtga agaagaggct
1860

cgcttcatcc ttggctgtct ccgtggcaat gagggcgagg acggcctcaa ggcggaagca
1920

gagtacaatg atattgtcaa catccacaag cttgaagtag acaccgcaa gcagcagagc
1980

tacttctcca tgttctttgg cattgggtct ggaaagctac aactggccg gcgcgtgcag
2040

ctgggtcatct ggctccagat attgcaagag tggatcggtg ttgcgggaat caccatttac
2100

ggccctgaga tctttacgat tgctggcatc agcgcaaagg acagactctg ggtagcggg
2160

atcaacaata tcacatacat ggtacgttta gccaacacct cctcacctca aagattccat
2220

cactaaca cgggagcagt tcgccacct gatctgcgtc ttcaccatcg atcgcatagg
2280

tcgccgttg actctgtact ggggagctgt cggccagggc atttgcatgt tcgtcgccgg
2340

tggcctcgct cgcgcaacca tcaatgcctc aggcaaagca agccagagcc acatcggcgg
2400

cgctgcaaca ttctttgtgt tcctctacac tgccattttc ggcgctacct ggctgacggg
2460

tccttggttg tatccggccg agattttccc tctgcagggt agagccaagg gaaatgcctg
2520

gggtgtcgtt ggctgggtcca ttggcaacgg ctgggtgtgta agtgacttt tcattctcct
2580

ctcccgctctg ggctcttctg gtctaattct ctctaggtgc tcctgcttcc tacgatcttc
2640

aaggcgctca acgaaaagac actctacatt tttggcgccg tcaacgccct gtccatcctc
2700

gtcgtgtggg ctctgtaccc cgaatcgaat caacgaactc tagaggagat ggacctcgtc
2760

tttgctagcg acagcatctg ggctggggag gctgagcgta attttgccaa gctcaaggct
2820

gaaaaccgg atcttgttca gggctcaaca aaccacggag ttgtagatat tgagcaagtt
2880

gccgagccaa aggagtaggt tcgtcgacaa gaacttgacg gtctctttat acataatttt
2940

tcctactact cgcatacaaac tatttcggca cgtggacaca ttgtccgctg gagctgggca
3000

tgtgtttaaa ccaacctcga ttacctcaca ctggcggcag caatgaatca acatatctca
3060

agtacaagag atgcagcagc tgagtacctg tatatcatat ctcatatt tcaaatecca
3120

tcagtca
3127

<210> 8
<211> 859

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 8

Met Pro His Arg Glu Arg Gly Lys Gln Arg Glu Gly Gly Asp Ser Tyr
 1 5 10 15

Arg Pro Ser Arg Pro Ala Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro
 20 25 30

Arg Ala Pro Val Pro Val Arg Thr Glu Glu Glu Lys Gln Ala Ala Ala
 35 40 45

Lys Ala Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Met Arg Ser Gly Gly Thr Tyr
 50 55 60

Ile Pro Pro Ala Arg Leu Arg Ala Leu Gln Ala Gln Ile Thr Asp Lys
 65 70 75 80

Ser Ser Lys Glu Tyr Gln Arg Met Ala Trp Glu Ala Leu Lys Lys Ser
 85 90 95

Ile Asn Gly Leu Ile Asn Lys Val Asn Thr Ala Asn Ile Lys His Ile
 100 105 110

Val Pro Glu Leu Phe Gly Glu Asn Leu Val Arg Gly Arg Gly Leu Phe
 115 120 125

Cys Arg Ser Ile Met Lys Ala Gln Ala Ala Ser Leu Pro Phe Thr Pro
 130 135 140

Ile Tyr Ala Ala Met Ala Ala Ile Val Asn Thr Lys Leu Pro Gln Val
 145 150 155 160

Gly Glu Leu Leu Val Lys Arg Leu Ile Met Gln Phe Arg Lys Gly Phe
 165 170 175

Lys Arg Asn Asp Lys Ala Val Cys Leu Ser Ser Thr Thr Phe Leu Ala
 180 185 190

His Leu Ile Asn Gln Gln Val Gln His Glu Met Leu Ala Gly Gln Ile
 195 200 205

Leu Leu Leu Leu Leu His Lys Pro Thr Asp Asp Ser Val Glu Ile Ala
 210 215 220

Val Gly Phe Cys Lys Glu Val Gly Gln Tyr Leu Glu Glu Met Gln Pro
 225 230 235 240

Ala Ile Ser Met Ala Val Phe Asp Gln Phe Arg Asn Ile Leu His Glu
 245 250 255

Ser Asp Ile Asp Lys Arg Thr Gln Tyr Met Ile Glu Val Leu Phe Gln
 260 265 270

Ile Arg Lys Asp Lys Phe Lys Asp His Pro Ala Ile Lys Glu Glu Leu
 275 280 285

Asp Leu Val Glu Glu Glu Asp Gln Ile Thr His Lys Val Glu Leu Asp
 290 295 300

Gly Glu Ile Asp Val Gln Asp Gly Leu Asn Ile Phe Lys Tyr Asp Pro
 305 310 315 320

Glu Trp Glu Glu His Glu Glu Ala Tyr Lys Arg Leu Lys Ala Glu Ile
 325 330 335

Leu Gly Glu Ala Ser Asp Asp Glu Glu Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu
 340 345 350

Asp Glu Ser Ser Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Thr Lys Ala Met Glu
 355 360 365

Ile Lys Asp Gln Ser Asn Ala Asp Leu Val Asn Leu Arg Arg Thr Ile
 370 375 380

Tyr Leu Thr Ile Met Ser Ser Ala Asp Pro Glu Glu Ala Val His Lys
 385 390 395 400

Leu Met Lys Ile Asn Leu Pro Val Gly Gln Glu Pro Glu Leu Pro Ser
 405 410 415

Met Ile Val Glu Cys Cys Ser Gln Glu Lys Thr Tyr Thr Lys Phe Phe
 420 425 430

Gly Leu Ile Gly Glu Arg Phe Ala Lys Ile Asn Arg Leu Trp Cys Asp
 435 440 445

Leu Phe Glu Gln Ala Phe Val Lys Tyr Tyr Glu Thr Ile His Arg Tyr
 450 455 460

Glu Asn Asn Lys Leu Arg Asn Ile Ala Met Leu Phe Gly His Met Phe
465 470 475 480

Ala Ser Asp Ala Leu Gly Trp His Cys Leu Ser Val Ile His Leu Asn
485 490 495

Glu Glu Glu Thr Thr Ser Ser Ser Arg Ile Phe Ile Lys Ile Leu Phe
500 505 510

Gln His Ile Ser Glu Glu Ile Gly Leu Ala Lys Leu Arg Ala Arg Met
515 520 525

Thr Asp Glu Thr Leu Arg Pro Ser Leu Glu Gly Leu Phe Pro Arg Glu
530 535 540

Asn Pro Arg Asn Ile Arg Phe Ser Ile Asn Tyr Phe Thr Ser Ile Gly
545 550 555 560

Met Gly Val Leu Thr Glu Glu Met Arg Glu His Leu Met Asn Met Pro
565 570 575

Lys Pro Ala Leu Pro Ala Pro Ala Ala Gln Asp Arg Ser Asp Thr Asp
580 585 590

Ser Val Ser Ser Tyr Ser Ser Tyr Thr His Ser Ser Tyr Ser Ser Arg
595 600 605

Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Val Gly Arg Arg Ser Gly Gly Arg Gly
610 615 620

Arg Ser Leu Ser Arg Thr Pro Pro Arg Arg Gly Ala Arg Ser Arg Ser
625 630 635 640

Tyr Ser Asp Asp Ser Arg Ser Pro Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg
645 650 655

Ser Asp Ser Val Ser Thr Arg Gly Arg Arg Arg Ala Ser Tyr Ser Ala
660 665 670

Ser Pro Pro Arg Arg Gly Gly Arg Arg Val Ala Ser Arg Ser Arg Ser
675 680 685

Tyr Ser Ser Gly Ser Ser Arg Ser Pro Pro Pro Arg Asn Arg Gly Arg
690 695 700

Ala Arg Ser Asn Ser Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ser
705 710 715 720

Pro Arg Arg Gly Arg Asp Ala Asp Ser Ala Ser Pro Pro Pro Arg Arg
725 730 735

Gly Arg Pro Arg Gln Ser Pro Pro Gly Gly Pro Ala Gly Arg Arg Asn
740 745 750

Ser Ser Ser Val Gly Ser Gly Gly Pro Arg Lys Lys Pro Arg Arg Asp
755 760 765

Ser Arg Ser Pro Ser Arg Asp Tyr Ser Ser Arg Ser Pro Ser Arg Ser
770 775 780

Pro Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Pro Ala Ala Arg Gly Arg Arg Gly
785 790 795 800

Ser Tyr Thr Pro Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Pro Arg Arg Val Arg
805 810 815

Asp Gly Ser Pro Gly Arg Leu Arg Gly Gly Arg Ser Pro Ser Pro Pro
820 825 830

Leu Pro Val Lys Arg Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Ser Val Ser Arg Ser
835 840 845

Pro Pro Pro Leu Lys Arg Gly Arg Arg Asp Asn
850 855

<210> 9
<211> 2580
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 9
atgccgcacc gcgagcgcg caagcagcga gaaggcggcg actcggtaccg cccctcgagg
60

ccagcgcggtt cacgctcgcg ctgcgcatcg ccgcctcgcg cgccgggtgcc cgtgcggacg
120

gaggaggaga agcaggcggc ggcaaaggcc gactacgaga agctgctcaa catgcgggtcg
180

ggcggcacgt acatccccgcc ggcgaggctg agggcgctgc aggcgcagat cacggacaag
240

agcagcaagg agtaccagcg gatggcgtgg gaggcgtca agaagagcat caacggcctg
300

atcaacaagg tcaacacggc caacatcaag cacattgtgc ccgagctggt tggcgagaac
360

ctggtgcgcg gccgcggcct cttctgcgcg tccatcatga agggccaggc cgccagtttg
420

cccttcacgc ccatctacgc cgccatggcc gccattgtca acaccaagct gccgcaggtc
480

ggcgagctgc tgggtcaagcg cctcatcatg cagttccgca agggcttcaa gcgcaacgac
540

aaggccgtct gtctgtcgtc gaccaccttc ctgcgccacc tcatcaacca gcaggtgcag
600

cacgagatgc tggccggcca gatcctgctg ctgctgctgc acaagccgac cgacgacagc
660

gtcgagattg ccgtgggctt ctgcaaggag gttggccagt acctcgagga gatgcagcct
720

gccattttcca tggccgtctt cgaccagttc cgcaacatcc tccacgagtc cgacattgac
780

aagcgaacgc agtacatgat tgaggtgctc ttccagatca ggaaggacaa gttcaaggat
840

cacccggcca tcaaggagga gctggacttg gtggaggagg aggaccagat cacgcacaag
900

gtggagcttg atggcgagat tgatgtgcag gacggactca acatcttcaa gtacgacccg
960

gagtgggagg agcatgagga ggcatacaag aggctcaagg cggagattct gggcgaagcc
1020

agcgatgacg aggagggcga cgaggacgag gacgaggacg agagctccga agatgaagaa
1080

aacgaagaga caaaggccat ggagatcaag gaccagtcta acgccgactt ggtcaacctt
1140

cggaggacca tctacctcac catcatgtcg agcgccgacc cagaggaagc agttcacaag
1200

ctgatgaaga tcaacctgcc cgtcggccag gaacccgagc tgccctcgat gattgtcgag
1260

tggtgtcgcg aggagaagac gtacaccaag ttctttggct tgatcggcga gcgtttcgcc
1320

aagatcaatc ggctgtggtg cgacctcttt gagcaggcct ttgtcaagta ctacgagacg
1380

atccaccgat acgaaaacaa caagctgcgg aacattgcc a tgctgtttgg ccacatgttt
1440

gcttccgacg ctctgggctg gcactgcctt tccgtcattc acctcaacga ggaggagacc
1500

acgtcgagca gccgcacatt catcaagatt ctgttccagc acatttccga ggaaatcggc
1560

ctggctaagc tccggggcacg catgactgac gagacgctgc ggcccagcct cgaaggcctc
1620

ttccccagag agaaccctcg caacatccga ttctccatca actacttcac cagcatcggc
1680

atgggtgtac tgaccgagga gatgagagac cacctcatga acatgcccaa gcctgcgctg
1740

cccggccctg ctgctcagga ccgctcggat acggactccg tctcgagcta ttcgtcttac
1800

actcactcat catactcttc ccgctcgcgc tcacgggtccc gatctgtggg tcgtcggagc
1860

ggcggtcgag gccgatcgct ttcccgaaact ccgcctcgac gtggcgcaag gagccgatcc
1920

tactctgacg actcacggtc accgtcgcgg tcaagatcac gatcccgtc cgattccgtc
1980

tctactcgtg ggcgaaggcg agcgtcgtac tcggccagtc ctccccggcg tggtgccgt
2040

cggttgcca gcagaagccg aagctactcg tcgggtcctt cacggctctc gccaccacgg
2100

aaccgcggtc gcgcacgaag caactcgtat agttcctaca gccgctctcc atcttcttca
2160

ccacgacgcg gcagagacgc agactcggcc agcccgcctc cgcgaagggg tcgaccgcg
2220

cagagccac caggcgggtc cgcaggtcga aggaacagct cgtctgtcgg cagcggaggg
2280

ccccgcaaga agccccgacg ggacagccga tcgccgtctc gcgactattc gtcccggctc
2340

ccgtctcggg cgcgctcgag atctcgatcg cctccgccgg ctgcgcgtgg ccgaaggggc
2400

tcttatacgc cgtcacgcag ccgcagcccg cctccgcgca gggtgagggg tggctcgccg
2460

ggtcgtctga ggggtgggag gtcgcctagt cctcctttgc cggatgaagag gaggcgggat
2520

gatagcgaga gtgtttctcg gtcgcgcctt cctttgaagc gcgggagaag ggataactaa
2580

<210> 10
<211> 5789

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN để biến nạp.

<400> 10

cttaagggtg cgtatgatag aataaagcag gggcaagaag cacaataata ctattgttcg
60

atctaaaatg gtgtcgaaaa agaacgcccc gttgactgcg agcttgactg caagcttggc
120

tgcagcatgt gactcggaag agcttactca ccaggatcga accgggcgaa tcatacgctg
180

tccttctctt ggtgtactct gccacttcg tatgacacga gcagacaagg ctgctcctca
240

tactactaat agcagtagtg attctgaaaa cctggggatc gtgatgatga ttggtgcgca
300

tggctgcggt attgggcctg tggattctca gcggagatca gcttcgacaa gtgaccggtg
360

gtgatggctt agagctccac cgactcgtcc cagttcttga ctcaggccca cggacatcat
420

tgggtgcgcat aataaccgac aaaagccgga gcgatcgaca gacgtgccga tggcgcgcgt
480

tgctgggctg tcaacgctcc ctgagggtg taacagagtg acgacaagaa cagtattccg
540

ggcatactag tatcagccag ctccagcttt tccccatgga gaaccccaaa ctggaggctt
600

ctcttgcgat accatctcat cattggacag cgaccggatg gctccgacga agcgtttaag
660

cgtctcagct ggcgaatggg atccccctcat tctgaacagg gagcccgttt taggatacca
720

tttccttcgg aaacgatgag ctttttgatg ctgcctaata ccatgcggga tgccgatctt
780

cggatgtccc acgatgatat catatagata tataaaggaa ccccggtctg gcatctcaat
840

cctggggagg aatgacggag agagcacatt caacagacag cacaagatct tcgttctcgg
900

gtgcaaccga gcatcatcgc catgaccgtc ctcacctcac ctctggccag ctataatgtg
960

gccaacaagc tgtacaaaac cactctgctc aacaccgtct gcctcgtggc cggactgtcg
1020

atcttcttct tcggctatga tcagggttg atgggcgggtg ttaacacgac gcgcgactat
1080

gccgagcgca tgggctttgg ccactgggac gaagaccaga acattgtcgt cgtcgataag
1140

ccgctgctgc agggcggtat cgtagctgtc tactatctcc ccggaacgct gtgcggttgt
1200

ctgcttggcg gttggcttgg tgatcgctat ggccgtatca aaacaattgc cattgcctgt
1260

gcgtggagtg tctgcgagc cgccctgcag gcctcagcta tgaatgcgaa ctggatgttt
1320

tgcggtatgt cgatgattct tggacaatca caaccggcgg ccgcctagtc atcattggat
1380

aggcagatta ctcagcctga atgacatcaa catgttacc atgatacaat aggtcacaca
1440

aacaagcgt aagatgcact tggatatgaca agcccagtag tccgtttcaa aagacctaga
1500

tgatgaacta caacatgagg tgttgctctc tgatccagtc caactgcaaa cgctgatgta
1560

tactcaatca agcctgatgt aaatgctgcg actcgattcg ctggatatga agatcaaaga
1620

gagctctgat gggccaata tagccgggtt ttgttaggac agtccaccac accgatatta
1680

gaattggtca agcaccttat catttcatag agattgcggt ttctagatct acgccaggac
1740

cgagcaagcc cagatgagaa ccgacgcaga tttccttggc acctgttgct tcagctgaat
1800

cctggcaata cgagatacct gctttgaata ttttgaatag ctgccccgct ggagagcatc
1860

ctgaatgcaa gtaacaaccg tagaggctga cacggcaggt gttgctaggg agcgtcgtgt
1920

tctacaaggc cagacgtctt cgcggttgat atatatgtat gtttgactgc aggctgctca
1980

gcgacgacag tcaagttcgc cctcgctgct tgtgcaataa tcgcagtggg gaagccacac
2040

cgtgactccc atctttcagt aaagctctgt tgggtgttat cagcaataca cgtaatttaa
2100

actcgttagc atggggctga tagcttaatt accgtttacc agtgccgcgg ttctgcagct
2160

ttccttggcc cgtaaaattc ggcgaagcca gccaatcacc agctaggcac cagctaaacc
2220

ctataattag tctcttatca acaccatccg ctccccggg atcaatgagg agaattgagg
2280

ggatgcgggg ctaaagaagc ctacataacc ctcatgccaa ctcccagttt aactcgtcg
2340

agccaacatc ctgactataa gctaacacag aatgcctcaa tcctgggaag aactggccgc
2400

tgataagcgc gcccgctcg caaaaaccat ccctgatgaa tggaaagtcc agacgctgcc
2460

tgcggaagac agcgttattg atttcccaaa gaaatcgggc atcctttcag aggccgaact
2520

gaagatcaca gaggcctccg ctgcagatct tgtgtccaag ctggcggccg gagagttgac
2580

ctcggtgga gttacgctag cattctgtaa acgggcagca atcgcccagc agttagtagg
2640

gtcccctcta cctctcaggg agatgtaaca acgccacctt atgggactat caagctgacg
2700

ctggcttctg tgcagacaaa ctgcgcccac gagttcttcc ctgacgccgc tctcgcgcag
2760

gcaagggaac tcgatgaata ctacgcaaag cacaagagac ccgttggtcc actccatggc
2820

ctccccatct ctctcaaaga ccagcttcga gtcaaggtag accgttgccc ctaagtcgtt
2880

agatgtccct tttgtcagc taacatatgc caccagggct acgaaacatc aatgggctac
2940

atctcatggc taaacaagta cgacgaagg gactcgggtc tgacaaccat gctccgcaaa
3000

gccggtgccg tcttctacgt caagacctct gtcccgcaga ccctgatggg ctgcgagaca
3060

gtcaacaaca tcatcggggc caccgtcaac ccacgcaaca agaactggtc gtgcggcggc
3120

agttctggtg gtgaggggtg gatcggtggg attcgtggtg gcgtcatcgg tgtaggaacg
3180

gatatcggtg gctcgattcg agtgccggcc gcgttcaact tcctgtacgg tctaaggccg
3240

agtcatgggc ggctgccgta tgcaaagatg gcgaacagca tggaggggtca ggagacggtg
3300

cacagcgttg tcgggccgat tacgcactct gttgaggggt agtccttcgc ctcttccttc
3360

ttttcctgct ctataccagg cctccactgt cctcctttct tgctttttat actatatacg
3420

agaccggcag tcactgatga agtatgtag acctccgcct cttcaccaaa tccgtcctcg
3480

gtcaggagcc atggaaatac gactccaagg tcatcccat gccctggcgc cagtccgagt
3540

cggacattat tgcctccaag atcaagaacg gcgggctcaa tateggctac tacaacttcg
3600

acggcaatgt ccttccacac cctcctatcc tgcgcggcgt ggaaaccacc gtcgccgcac
3660

tcgccaaagc cggtcacacc gtgaccccggt ggacgccata caagcacgat ttgggccacg
3720

atctcatctc ccatacttac gcggctgacg gcagcgccga cgtaatgcgc gatatcagtg
3780

catccggcga gccggcgatt ccaaatatca aagacctact gaaccgaac atcaaagctg
3840

ttaacatgaa cgagctctgg gacacgcac tccagaagtg gaattaccag atggagtacc
3900

ttgagaaatg gcgggaggct gaagaaaagg ccgggaagga actggacgcc atcatcgcg
3960

cgattacgcc taccgctgcg gtacggcatg accagttccg gtactatggg tatgcctctg
4020

tgatcaacct gctggatttc acgagcgtgg ttgttccggt tacctttgcg gataagaaca
4080

tcgataagaa gaatgagagt ttcaaggcgg ttagtgagct tgatgccctc gtgcaggaag
4140

agtatgatcc ggaggcgtag catggggcac cggttgcagt gcaggttatc ggacggagac
4200

tcagtgaaga gaggacgttg gcgattgcag aggaagtggg gaagttgctg ggaaatgtgg
4260

tgactccata gctaataagt gtcagatagc aatttgcaca agaaatcaat accagcaact
4320

gtaaataagc gctgaagtga ccatgccatg ctacgaaaga gcagaaaaaa acctgccgta
4380

gaaccgaaga gatatgacac gcttccatct ctcaaaggaa gaatcccttc agggttgcgt
4440

ttccagtcta gacgcgtttc taaatatcac gacaacacat cctccttcat ctggagattc
4500

ccggtcgctt tccagatcct cccctaatac cttctgttcc tcatcatctg gatcatgcct
4560

gaatcccccc gctggctcgt caaagtgggt cgtgaagaag aggtcgcctt catccttggt
4620

cgtctccgtg gcaatgaggg cgaggacggc ctcaaggcgg aagcagagta caatgatatt
4680

gtcaacatcc acaagcttga agtagacacc gccaaagcagc agagctactt ctccatgttc
4740

tttggcattg ggtctggaaa gctacacact ggccggcgcg tgcagctggt catctggctc
4800

cagatattgc aagagtggat cggatttgcg ggaatcacca ttacggccc tgagatcttt
4860

acgattgctg gcatcagcgc aaaggacaga ctctgggtta gcgggatcaa caatatcaca
4920

tacatggtac gtttagccaa cacctcctca cctcaaagat tccatcacac taacacggga
4980

gcagttcgcc aactgatct gcgtcttcac catcgatcgc ataggtcgcc gttggactct
5040

gtactgggga gctgtcggcc agggcatttg catgttcgtc gccggtggcc tcgctcgcgc
5100

aaccatcaat gcctcaggca aagcaagcca gagccacatc ggcggcgctg caacattctt
5160

tgtgttcctc tacactgcca ttttcggcgc tacctggctg ctacctggct gacggttcct
5220

tggttgatc cgccgagat tttccctctg caggtagag ccaagggaaa tgcctgggtt
5280

gtcgttggtt ggtccattgg caacggctgg tgtgtaagtg cacttttcat tctcctctcc
5340

cgtctgggct cttctggtct aatcttctct aggtgctcct gcttcctacg atcttcaagg
5400

cgctcaacga aaagacactc tacatTTTTg gcgcgctcaa cgccctgtcc atcctcgctg
5460

tgtgggctct gtaccccgaa tcgaatcaac gaactctaga ggagatggac ctgctctttg
5520

ctagcgacag catctgggccc tgggaggctg agcgtaattt tgccaagctc aaggctgaaa
5580

acccggatct tgttcagggc tcaacaaacc acggagtgtg agatattgag caagttgccg
5640

agccaaagga gtaggttcgt cgacaagaac ttgacggtct ctttatacat aatttttctt
5700

actactcgca tcaaactatt tcggcacgtg gacacattgt ccgctggagc tgggcatgtg
5760

tttaaaccaa cctcgattac ctgcatgc
5789

<210> 11

<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 11
atgcatctta aggggtgcta tgatagaata aagcagg
37

<210> 12
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 12
atgcggccgc cggttgtgat tgtccaagaa tcatac
35

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 13
atacgcgttt ctaaatatca cgacaacaca tcc
33

<210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligo ADN cho PCR.

<400> 14
atgcatgcga ggtaatcgag gttggtttaa aca
33