



(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) 
1-0019556

(51)⁷ **C12N 15/31, 15/63, 15/52, C08F 2/14** (13) **B**

- (21) 1-2011-02397 (22) 05.05.2010
(86) PCT/MY2010/000071 05.05.2010 (87) WO2010/143933 16.12.2010
(30) PI-2009-2412 12.06.2009 MY
(45) 27.08.2018 365 (43) 27.02.2012 287
(73) UNIVERSITI SAINS MALAYSIA (MY)
11800 Pulau Pinang, Malaysia.
(72) K.SUDESH KUMAR A/L C.KANAPATHI PILLAI (MY), MOHAMMED RAZIP
BIN SAMIAN (MY), AMIRUL AL-ASHRAF BALAKRISHNAN BIN ABDULLAH
(MY), KESAVEN A/L BHUBALAN (MY)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ HA VIP (HAVIP CO., LTD.)

(54) **POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH
POLYME SYNTHETAZA VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT POLYME**

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, thể biến nạp được biến nạp bởi vector và quy trình sản xuất polyme.

SEQ ID NO: 1

MQQFVNSLSLGQDQSDAPHPLTGAWSQLMSQTNQLQLQSSLYQQQLGLWTQF
LGQTAGNDASAPSAKPSDRRFASPEWDEHPFYSFLKQSYLQTSKWMMELVDK
T
QIDESAKDKLSFATRQYLDAMAPSNFMLTNPDVVKRAIETQGESLVEGMKNM
M
EDIQKGHISMSDESKFQIGKNLVVTPGEVVFRNELIELIQYTPTEKVHEKPLLF
VP
PCINKYYLMDLQPDNSMVRHFVGGYRVFLVSWRSAPPEMKNFTWETYIEKG
V
FAAAEAVQKITKQPTMNALGFCVGGVILTTALCVAQAKGLKYFDSATFMTSLI
D
HAEPGEISFFIDEALVASREAKMAAGGIISGKEIGRTFASLRANDLVWNYVVNN
Y
LLGKTPAPFDLLYWNDAVDLPLPMHTFMLRQFYINNALITPGAITLCGVPIDIS
K
IDIPVYMFAAREDHIVLWSSAYSGLKYLSGTPSRRFVLGASGHIAGSINPVTKD
KR
NYWTNEQLPVNPPEEWLEGAQSHPGSWWKDWDALAPQSGKQVPAPKMLGS
K EFPPLQPAPGSYVLAKAMPPVAAALN

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polyme synthaza và mã hóa gen cho enzym này. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến gen chức năng mã hóa cho enzym của polyme synthaza, vector tái tổ hợp chứa gen, thể biến nạp được biến nạp bởi vector và quy trình sản xuất polyme liên quan đến sự tổng hợp của polyme giống chất dẻo bằng cách sử dụng thể biến nạp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các polyhydroxyalkanoat (PHAs) là các polyme lưu trữ vi khuẩn có những đặc tính gần giống các đặc tính của các chất dẻo thương mại. Hầu hết PHAs là các nhựa dẻo nóng và có thể được xử lý bằng nhiệt giống các chất dẻo tổng hợp dẫn xuất từ chất hóa dầu với ưu điểm là có khả năng phân hủy sinh học. PHAs cũng được tái tạo tự nhiên vì chúng có thể được sản xuất từ các nguồn tài nguyên có thể tái tạo chẳng hạn như đường, dầu thực vật và cacbon dioxit. Poly(3-hydroxybutyrat) [P(3HB)] là loại đầu tiên của PHA được nhận dạng và là PHA phổ biến nhất được tìm thấy trong tự nhiên.

Các đặc tính của PHA có thể được biến đổi để phù hợp với các ứng dụng khác nhau bằng cách điều chỉnh sự kết hợp hoặc/và thành phần của các monome thứ cấp. Các vi sinh vật tổng hợp polyme có thể được chia thành 2 nhóm, bao gồm các polyme tổng hợp với các đơn vị monome C3 đến C5 và các polyme tổng hợp với các đơn vị monome từ C6 đến C14. Các vi sinh vật tương ứng này có polyme synthaza chất nền cụ thể. Polyme chứa ít nhất đơn vị monome C6 là các vật liệu polyme mềm với các đặc tính đàn hồi.

Ngày càng nhiều mối quan tâm đến PHA đã dẫn đến sự phân lập các chủng vi khuẩn mới để sản xuất polyme mới và cải tiến. Việc sản xuất PHA bằng cả hai vi sinh vật Gram âm và Gram dương đã được nghiên cứu và khảo chứng. Các gen liên quan trong quá trình sinh tổng hợp PHA bao gồm emzym chìa khóa của nó, PHA synthaza, từ các vi sinh vật này đã được nhận dạng và định rõ.

Đã có một số giải pháp kỹ thuật được cấp patent đã biết liên quan đến polyme

synthaza và gen mã hóa chúng. Patent US6812013 bộc lộ PHA synthaza hữu dụng trong quy trình điều chế PHA, gen mã hóa enzym này, vector tái tổ hợp chứa gen, thể biến nạp được biến nạp bởi vector, quy trình sản xuất PHA synthaza bằng cách sử dụng thể biến nạp và quy trình điều chế PHA bằng cách sử dụng thể biến nạp. Sáng chế này khác biệt ở chỗ thể biến nạp thu được bằng cách chuyển gen PHA synthaza từ *Pseudomonas putida* vào trong vi sinh vật vật chủ được nuôi cấy để sản xuất PHA synthaza hoặc PHA.

US2004146998 A cũng đề cập đến thể biến nạp và quy trình sản xuất polyme bằng cách sử dụng thể biến nạp này. Sáng chế này bộc lộ gen mã hóa cho enzym tổng hợp copolyme, vi sinh vật sử dụng gen cho việc tổng hợp lên men polyme và phương pháp sản xuất polyme với sự trợ giúp của vi sinh vật. Sáng chế này tập trung vào cấu trúc của thể biến nạp chứa gen enzym được kết hợp tổng hợp polyeste, trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc được chuyển vào trong nấm men.

Quy trình và thể biến nạp được cải tiến để sản xuất polyme bằng cách sử dụng tương tự được bộc lộ trong patent EP1626087. Sáng chế này đã đưa ra catxet biểu hiện gen chứa gen mã hóa cho PHA synthaza thu được từ *Aeromonas caviae*. Nấm men cũng được sử dụng dưới dạng vật chủ và sự đột biến đã được chuyển trong trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc để cho phép catxet được hoạt động trong nấm men.

Một số giải pháp kỹ thuật đã được cấp patent bộc lộ sự kết hợp giữa gen mã hóa polyme synthaza và các gen khác. US2008233620 A bộc lộ thể biến nạp và quy trình sản xuất sản phẩm biểu hiện gen trong nấm men. Thể biến nạp thu được bằng cách chuyển nhiều gen mã hóa enzym liên quan trong tổng hợp PHA như sự kết hợp của PHA synthaza và gen axetoaxetyl CoA reductaza. Trong US2003146703 A, vi sinh vật tái tổ hợp biểu hiện cả PHA synthaza và PHA depolymeraza nội bào được bộc lộ. Sáng chế này cho phép tổng hợp và phân hủy đồng thời PHA.

Hầu hết các giải pháp kỹ thuật được cấp patent đều bộc lộ thể biến nạp và quy trình sản xuất polyme hoặc PHA bằng cách sử dụng thể biến nạp đã bộc lộ. Tuy nhiên, các giải pháp kỹ thuật được cấp patent này liên quan đến gen PHA synthaza được lấy từ vùng khác của bộ gen của các loài vi sinh vật khác nhau. Như vậy cho đến nay, vẫn chưa có giải pháp kỹ thuật nào được cấp patent có liên quan đến việc kết hợp các đơn vị monome C3 đến C7 dưới dạng tổng hợp của polyme synthaza. Do đó, sáng chế này

mong muốn đưa ra đoạn ADN cải tiến của gen polyme synthaza để tạo ra vector tái tổ hợp và thể biến nạp có thể hữu dụng trong việc tạo ra polyme synthaza có mức độ hoạt tính tăng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là đề xuất gen polyme synthaza thu được từ các loài vi khuẩn, và sự tổng hợp của polyme synthaza được mã hóa bởi gen với sự kết hợp của các đơn vị monome hữu dụng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất đoạn ADN mới của polyme synthaza được kết thành vector thích hợp để tạo ra vector tái tổ hợp, và nhờ đó tạo ra thể biến nạp chứa polyme synthaza.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất polyme synthaza có mức độ hoạt tính tăng.

Mục đích khác nữa của sáng chế là phát triển phương pháp sản xuất các polyme hiệu quả hơn nữa bằng cách sử dụng thể biến nạp chứa polyme synthaza.

Ít nhất một trong các mục đích trên được đáp ứng, toàn bộ hoặc một phần, bởi sáng chế, trong đó một trong các phương án của sáng chế mô tả polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, trong đó một hoặc nhiều axit amin được thế, mất, thay thế hoặc bổ sung, polypeptit có hoạt tính polyme synthaza.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo phương án ưu tiên khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2, trong đó T được thay bằng U; hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit được phân lập, trong đó polynucleotit được phân lập là sự mã hóa cho polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza; hoặc

polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, trong đó một hoặc nhiều axit amin bị thế, mất, thay thế hoặc bổ sung, polypeptit có hoạt tính polyme synthaza. Tốt hơn, vector tái tổ hợp là plasmid.

Theo phương án khác của sáng chế, thể biến nạp được biến nạp bởi vector dưới dạng được thể hiện theo các phương án được bộc lộ nói trên.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất polyme bao gồm các bước: nuôi cấy thể biến nạp chứa polynucleotit được phân lập như được thể hiện trong các phương án nói trên trong môi trường chứa các vật liệu có thể polyme được; và tái tạo polyme từ môi trường được nuôi cấy. Tốt hơn là, polyme là PHA.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ dễ dàng nhận thấy rằng sáng chế rất thích hợp để thực hiện các mục đích và đạt được các kết quả và các ưu điểm đã đề cập cũng như những thuộc tính vốn có. Các phương án được mô tả ở đây không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Với mục đích để dễ dàng hiểu sáng chế, sáng chế được minh họa trên các hình vẽ kèm theo là các phương án ưu tiên từ thử nghiệm của sáng chế khi được xem xét trong mối quan hệ với phần mô tả sau đây, sáng chế, hoạt động, cấu trúc và nhiều ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu dễ dàng và đúng.

Fig.1 thể hiện trình tự axit amin của polypeptit của polyme synthaza như được mô tả trong một trong các phương án ưu tiên của sáng chế.

Fig.2 thể hiện trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polyme synthaza như được mô tả ở một trong số các phương án ưu tiên của sáng chế.

Fig.3 thể hiện trình tự nucleotit của các nucleotit khuếch đại được dùng cho việc khuếch đại PCR của polyme synthaza như được mô tả ở một trong số các phương án ưu tiên của sáng chế.

Fig.4 thể hiện phổ ¹H-NMR của P(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat-co-3-hydroxyhexanoat), một trong số các ví dụ về copolyme được tổng hợp bởi thể biến nạp như được mô tả ở một trong số các phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến polyme synthaza và gen mã hóa enzym này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến gen chức năng mã hóa enzym của polyme synthaza, vector tái tổ hợp chứa gen, thể biến nạp được biến nạp bởi vector và quy trình sản xuất polyme synthaza liên quan đến sự tổng hợp của polyme giống chất dẻo bằng cách sử dụng thể biến nạp.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả theo các phương án ưu tiên của sáng chế và bằng cách dẫn chiếu đến các hình vẽ và phần mô tả kèm theo. Tuy nhiên, cần hiểu rằng việc giới hạn phần mô tả với các phương án ưu tiên của sáng chế và các hình vẽ chỉ đơn thuần giúp dễ dàng thảo luận sáng chế và hiển nhiên là những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể tạo ra các cải biến khác nhau thuộc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ gắn kèm.

Theo một phương án, sáng chế bộc lộ polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza. SEQ ID NO:1 được thể hiện trên Fig.1.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, polynucleotit được phân lập là gen polyme synthaza. Ngoài ra, gen polyme synthaza này có thể mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, hoặc trình tự ở đó một hoặc nhiều axit amin bị mất, thay thế bằng hoặc bổ sung vào trình tự axit amin của SEQ ID NO:1. Ngay cả khi một hoặc nhiều axit amin của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 có thể đã qua các đột biến chẳng hạn như bị mất, thay thế, hoặc bổ sung, polynucleotit mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin được chứa trong gen của sáng chế tới mức mà polypeptit có hoạt tính polyme synthaza. Ví dụ, polynucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, trong đó methionin ở vị trí đầu tiên bị mất cũng được chứa trong gen của sáng chế. Nói cách khác, gen theo sáng chế không chỉ bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 mà còn trình tự nucleotit thoái hóa của nó, ngoại trừ các codon thoái hóa, mã hóa cho cùng một polypeptit. Các đột biến nói trên chẳng hạn như mất, thay thế hoặc bổ sung có thể được tạo ra bởi các đột biến định hướng phụ thuộc vị trí đã biết.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, polynucleotit được phân lập chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc trình tự bổ sung của nó được bộc lộ. SEQ ID NO:2 được thể hiện trên Fig.2. Theo phương án khác của sáng chế, polynucleotit được

phân lập chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2, trong đó T được thay bằng U; hoặc trình tự bổ sung của nó. Các polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính polyme synthaza.

Gen polyme synthaza tốt hơn được nhân bản từ vi sinh vật thích hợp. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, gen polyme synthaza được tách ra từ vi sinh vật thuộc các chủng *Chromobacterium* được phân lập từ nước sạch. Gen theo sáng chế có thể thu được bằng tổng hợp hóa học hoặc kỹ thuật phản ứng dây chuyền polymeraza (PCR) bằng cách sử dụng ADN bộ gen dưới dạng mẫu hoặc bằng cách lai chủng nhờ sử dụng đoạn ADN có trình tự nucleotit dưới dạng thí nghiệm.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, phương pháp phát hiện PCR được sử dụng để thu được đoạn ADN của gen polyme synthaza bằng cách sử dụng ADN bộ gen từ *Chromobacterium* sp. dưới dạng mẫu. Ban đầu, ADN bộ gen được phân lập từ chủng *Chromobacterium* sp. Điều này đã biết trong giải pháp kỹ thuật mà bất kỳ môi trường thích hợp nào, ví dụ, môi trường giàu dinh dưỡng, có thể được dùng để điều chế ADN bộ gen. Để thu được đoạn ADN chứa gen polyme synthaza thu được từ *Chromobacterium* sp., một thí nghiệm tốt hơn được chuẩn bị. Các vùng bảo tồn tốt của gen polyme synthaza được chọn từ trình tự axit amin đã biết và các trình tự nucleotit mã hóa chúng có thể được ước lượng để thiết kế các oligonucleotit. Cặp mỗi của các nucleotit khuếch đại được thiết kế để đạt được mục đích này. Ví dụ về các nucleotit khuếch đại được thể hiện trên Fig.3, trong đó SEQ ID NO:3 được sử dụng dưới dạng mỗi hướng về phía trước và SEQ ID NO:4 được sử dụng dưới dạng mỗi ngược.

Đoạn ADN được khuếch đại có thể được phân hủy bởi enzym hạn chế thích hợp, ví dụ *ApaI* và *Sall*. Sau đó, đoạn ADN được dephosphorylat hóa bằng việc xử lý photphataza kiềm. Đoạn ADN được kết thành vectơ trước đó được tách ra bởi enzym hạn chế, có thể là *ApaI* và *Sall*.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, vectơ tái tổ hợp chứa polynucleotit được phân lập, trong đó polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza; hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, trong đó một hoặc nhiều axit amin bị thế, mất, thay thế hoặc bổ sung, polypeptit có hoạt tính polyme synthaza.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, plasmit hoặc thể thực khuẩn có khả năng

sao chép tự chủ trong vi sinh vật chủ được sử dụng dưới dạng vector. Vector plasmit có thể được sử dụng bao gồm pBR322, pUC18 và pBluescript II, trong khi vector thể thực khuẩn có thể được sử dụng EMBL3, M13, lambda gtl. Các vector này có thể có được trên thị trường. Các vector có thể sao chép tự chủ trong hai hoặc nhiều hơn hai tế bào vật chủ chẳng hạn *Escherichia coli* hoặc *Bacillus brevis*, cũng như các vector kiểu thoi khác, có thể cũng được sử dụng. Các vector này cũng được tách ra bởi các enzym hạn chế sao cho đoạn của chúng có thể đạt được.

Theo đó, ADN ligaza thông thường được sử dụng để kết đoạn ADN thu được thành đoạn vector. Đoạn ADN và đoạn vector được ủ và sau đó được kết để tạo ra vector tái tổ hợp.

Theo phương án khác của sáng chế, thể biến nạp thu được bằng cách chuyển vector tái tổ hợp theo sáng chế vào trong vật chủ tương tích với vector biểu hiện được dùng trong việc chuyển vector tái tổ hợp nói trên. Sáng chế không có dự định giới hạn việc sử dụng một vật chủ cụ thể miễn là nó có khả năng biểu hiện gen đích. Các ví dụ thích hợp có thể được sử dụng là các vi sinh vật thuộc chủng *Cupriavidus*, *Pseudomonas* hoặc *Bacillus*; hoặc nấm men từ chủng *Saccharomyces* hoặc *Candida*; hoặc các tế bào động vật chẳng hạn dòng tế bào COS hoặc CHO.

Nếu vi sinh vật, chẳng hạn các vi sinh vật thuộc chủng *Cupriavidus* hoặc *Pseudomonas* được sử dụng dưới dạng vật chủ, ADN tái tổ hợp theo sáng chế tốt hơn được tạo thành sao cho nó chứa trình tự khởi đầu, đoạn ADN theo sáng chế, và chuỗi tận cùng sao mã. Điều này nhằm đảm bảo sự xuất hiện của sự sao chép tự chủ trong vật chủ. Tốt hơn, vector biểu hiện bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các dẫn xuất pGEM-T và pBBR1MCS-2. Tương tự, trình tự khởi đầu có thể là loại bất kỳ được tạo ra mà nó có thể được biểu hiện trong vật chủ. Ví dụ về các trình tự khởi đầu thu được từ *E. coli* hoặc thể thực khuẩn bao gồm trình tự khởi đầu trp, trình tự khởi đầu lac, trình tự khởi đầu pL, trình tự khởi đầu pR và trình tự khởi đầu T7.

Để dẫn vector tái tổ hợp vào trong vi sinh vật vật chủ, các phương pháp đã biết bất kỳ có thể được sử dụng. Ví dụ, nếu vi sinh vật vật chủ là *E. coli*, phương pháp canxi và phương pháp điện di có thể được sử dụng. Nếu ADN thể thực khuẩn được sử dụng, phương pháp bao gói *in vitro* có thể được chấp nhận.

Các vector biểu hiện chẳng hạn Yep13 hoặc YCp50 được sử dụng dưới dạng vật

chủ. Theo đó, trình tự khởi đầu có thể là gal 1 hoặc trình tự khởi đầu gal 10; và phương pháp dẫn ADN tái tổ hợp vào trong nấm men bao gồm phương pháp điện di, phương pháp hạt cầu và phương pháp axetat lithi. Nếu các tế bào động vật được sử dụng dưới dạng vật chủ, các vectơ biểu hiện chẳng hạn pcDNAI hoặc pcDNAI/Amp được sử dụng. Theo đó, phương pháp chuyển ADN tái tổ hợp vào trong các tế bào động vật có thể là phương pháp điện di hoặc phương pháp phosphat kali.

Sáng chế còn bộc lộ quy trình sản xuất polyme bao gồm các bước: nuôi cấy thể biến nạp chứa polynucleotit được phân lập như được thể hiện trong phương án bất kỳ ở trên trong môi trường chứa các vật liệu có thể polyme được; và tái tạo polyme từ môi trường nuôi cấy. Polyme có thể được tạo ra và được tích lũy trong thể biến nạp.

Phương pháp thông thường được dùng để nuôi cấy vật chủ cũng được sử dụng để nuôi cấy thể biến nạp của sáng chế. Môi trường cho thể biến nạp được điều chế từ vi sinh vật thuộc chủng *Cupriavidus* hoặc *Pseudomonas* dưới dạng vật chủ bao gồm môi trường chứa nguồn cacbon có thể đồng hóa bởi vi sinh vật, trong đó nguồn nitơ, các muối vô cơ hoặc nguồn dinh dưỡng hữu cơ khác bị giới hạn, ví dụ, môi trường trong đó nguồn dinh dưỡng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,1% khối lượng của môi trường.

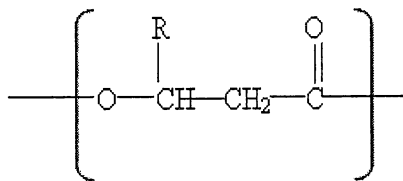
Nguồn cacbon là cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật, và đồng thời là vật liệu khởi đầu của polyme. Nguồn cacbon được sử dụng có thể thu được từ các hydrocacbon chẳng hạn glucoza, fructoza, sucroza hoặc maltoza. Hơn nữa, các chất liên quan đến dầu và chất béo có hai hoặc nhiều hơn hai nguyên tử cacbon có thể cũng được sử dụng dưới dạng nguồn cacbon. Các chất liên quan đến dầu và chất béo này bao gồm các chất béo và dầu tự nhiên, chẳng hạn dầu ngô, dầu đậu nành, dầu cây rum, dầu cây hoa hướng dương, dầu ô liu, dầu dừa, dầu cọ, dầu cải, dầu cá, dầu cá voi, dầu gia súc và mỡ lợn; các axit béo chẳng hạn axit axetic, axit propionic, axit butanoic, axit pentanoic, axit hexoic, axit octanoic, axit decanoic, axit lauric, axit oleic, axit palmitic, axit linolenic, axit linolic và axit myristic cũng như các este của chúng; các rượu chẳng hạn etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, rượu lauryl, rượu oleyl và rượu palmityl cũng như các este của chúng. Trong khi, nguồn nitơ có thể thu được từ amoniac, các muối amoni, pepton, chiết xuất thịt, chiết xuất nấm men hoặc rượu ngâm ngô. Chất vô cơ bao gồm mono kali phosphat, di-kali phosphat, magiê phosphat, magiê sulfat và natri clorua.

Việc nuôi cấy tốt hơn được thực hiện trong các điều kiện hiếm khí cùng với việc lắ ở nhiệt độ từ 30°C đến 34°C trong khoảng thời gian lớn hơn 24 giờ, tốt hơn từ 1 đến 3 ngày, sau đó sự biểu hiện được tạo ra. Trong khi nuôi cấy, các kháng sinh chẳng hạn ampicilin, kanamycin, gentamycin, antipyrin hoặc tetracyclin có thể được bổ sung vào lúc nuôi cấy. Theo đó, polyme có thể được tích lũy trong vi sinh vật và polyme có thể sau đó được tái tạo.

Để nuôi cấy vi sinh vật được chuyển đổi bởi vector biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu có thể cảm ứng, chất cảm ứng của nó, chẳng hạn isopropyl- β -D-thiogalactopyranosit (IPTG) hoặc axit indoleacrylic (IAA), có thể được bổ sung vào môi trường. Để nuôi cấy thể biến nạp từ các tế bào động vật dưới dạng vật chủ, môi trường chẳng hạn như RPMI-1640 hoặc DMEM được bổ sung huyết thanh bào thai bò có thể được sử dụng. Theo phương án ưu tiên của sáng chế, việc nuôi cấy được thực hiện thường có sự hiện diện của 5% CO₂ ở nhiệt độ từ 30°C đến 37°C trong khoảng thời gian từ 14 đến 28 ngày. Trong khi nuôi cấy, các kháng sinh chẳng hạn kanamycin hoặc penicilin có thể được bổ sung vào môi trường.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, bước tinh chế polyme có thể cũng được thực hiện. Tốt hơn, thể biến nạp được thu được từ việc nuôi cấy bằng cách ly tâm, sau đó được rửa bằng nước cất và hexan, và được làm khô. Sau đó, thể biến nạp đã làm khô được tạo huyền phù trong cloroform và được nung nóng để chiết xuất polyme từ đó. Các chất lắng có thể được tách bỏ bằng cách lọc. Tốt hơn, metanol được bổ sung vào dung dịch cloroform để kết tủa polyme. Sau khi dịch nổi bề mặt được tách bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm, các chất kết tủa được làm khô để tạo ra polyme tinh khiết. Polyme thu được được xác nhận là polyme mong muốn theo cách thông thường, ví dụ, bằng sắc ký khí, cộng hưởng từ hạt nhân hoặc phương pháp tương tự.

Polyme synthaza này có thể tổng hợp copolyme (polyme) bao gồm axit 3-hydroxyalkanoic đơn vị monome được thể hiện bởi công thức I, trong đó R là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl từ C1 đến C4.



Công thức I

Tốt hơn, polyme là polyhydroxyalkanoat. Polyme có thể là copolyme bao gồm poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) copolyme ngẫu nhiên (P(3HB-co-3HV)) hoặc poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat) copolyme ngẫu nhiên [P(3HB-co-3HHx)]. Thể biến nạp thực hiện gen polyme synthaza có khả năng tạo ra P(3HB-co-3HHx) với hiệu suất rất cao.

Quy trình thông thường sản xuất poly(3-hydroxybutyrat) [P(3HB)] xuất hiện vấn đề về các đặc tính vật lý có khả năng chịu va đập kém do polyme này là polyme tinh thể cao. Độ kết tinh được hạ thấp bằng cách chuyển 3-hydroxyvalerat có năm nguyên tử cacbon hoặc 3-hydroxyhexanoat có sáu nguyên tử cacbon vào trong chuỗi polyme. Polyme hoạt động như vật liệu polyme linh hoạt cũng là tuyệt đối trong khả năng chịu nhiệt và khả năng định hình.

Theo sáng chế, copolyme P(3HB-co-3HHx) có thể được sản xuất với năng suất cao bằng cách sử dụng polyme synthaza của *Chromobacterium* sp. được sử dụng. Do polyme mong muốn có thể thu được với một lượng lớn bằng cách sử dụng phương pháp nói trên, nó có thể được sử dụng dưới dạng vật liệu có thể phân hủy sinh học được bao gồm sợi, màng hoặc các loại khác nhau. Hơn nữa, gen theo sáng chế có thể được dùng để gây chủng tạo ra copolyme P(3HB-co-3HHx) cao.

Sáng chế bao gồm các nội dung trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo cũng như phần mô tả ở trên. Mặc dù sáng chế đã được mô tả dưới dạng các phương án ưu tiên với mức độ cụ thể, nhưng cần hiểu rằng sự bộc lộ này của phương án ưu tiên chỉ được thực hiện như một ví dụ và các thay đổi khác trong các chi tiết cấu trúc, sự tổ hợp và sắp xếp khác của các phần có thể được dùng đến mà không vượt quá phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được đề cập dưới đây để minh họa cho các khía cạnh và phương án

khác nhau của sáng chế. Các ví dụ này không giới hạn sáng chế mà sáng chế chỉ bị giới hạn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1: Nhân bản gen polyme synthaza từ *Chromobacterium* sp. USM2

Đầu tiên, thư viện ADN bộ gen đã được phân lập từ *Chromobacterium* sp. USM2. *Chromobacterium* sp. USM2 đã được nuôi cấy qua đêm trong 50 ml môi trường giàu dinh dưỡng (1% pepton, 1% chiết xuất thịt, 0,5% chiết xuất nấm men, pH 7,0) ở 30°C và sau đó ADN bộ gen đã thu được từ vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn.

Để thu được đoạn ADN chứa gen polyme synthaza từ *Chromobacterium* sp. USM2, thí nghiệm sau đó được chuẩn bị. Hai oligonucleotit vùng cụ thể được thiết kế bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu NCBI dưới dạng quy chiếu, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4, đã được tổng hợp.

Gen polyme synthaza được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng các oligonucleotit dưới dạng các mồi và ADN bộ gen từ *Chromobacterium* sp. USM2 dưới dạng template. PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng 30 chu trình, mỗi chu trình bao gồm phản ứng ở 95°C trong khoảng thời gian 20 giây, ở 60°C trong khoảng thời gian 180 giây, và ở 60°C trong khoảng thời gian 180 giây.

Chuỗi nucleotit của 1,7 kbp *ApaI-SalI* từ đoạn này được xác định bằng phương pháp Sanger. Gen polyme synthaza chứa trình tự nucleotit (1704) SEQ ID NO:1 đã thu được.

Ví dụ 2: Điều chế thể biến nạp *Cupriavidus necator*

Đoạn gen polyme synthaza *ApaI-SalI* đầu tiên được gắn vào trong vector nhân bản pGEM-T (Promega) mà trước đó được cắt bởi cùng enzym hạn chế. Đoạn này sau đó được phân hủy lại bởi các enzym hạn chế *ApaI* và *SalI* và đoạn gen polyme synthaza *ApaI-SalI* thu được được gắn vào trong vector tái tổ hợp pBBR1MCS-2 có khả năng biểu hiện trong các vi sinh vật thuộc chủng *Cupriavidus*, và plasmit tái tổ hợp thu được được biến đổi thành *Cupriavidus necator* PHB-4 (DSM 541) (chủng thiếu khả năng tổng hợp polyme) bằng phương pháp biến đổi liên hợp.

Đầu tiên, plasmit tái tổ hợp được sử dụng để biến nạp *E. coli* S17-1 bằng phương pháp canxi clorit. *E. coli* tái tổ hợp theo đó thu được và *C. necator* PHB-4

được biến nạp liên hợp. *E. coli* tái tổ hợp và *C. necator* PHB-4 lần lượt được nuôi cấy qua đêm trong 1,5 ml môi trường LB và môi trường giàu chất dinh dưỡng ở 30°C, mỗi 0,1 ml được kết hợp và nuôi cấy trong dụng cụ lắc ở nhiệt độ phòng trong khoảng 1 giờ. Hỗn hợp sau đó được ủ không lắc trong khoảng thời gian 30 phút, và sau đó được lắc trong khoảng 30 phút. Hỗn hợp vi sinh vật được đặt trên thạch Simmon xitrat chứa 50 mg/l kanamycin và được nuôi cấy ở 30°C trong 2 ngày.

Do *C. necator* PHB-4 được biểu hiện chịu được kanamycin bằng cách truyền plasmit trong *E. coli* tái tổ hợp vào nó, các nhân bản được sinh trưởng trên thạch Simmon xitrat là thể biến nạp của *C. necator*.

Ví dụ 3: Tổng hợp polyme bằng các biến nạp *C. necator*

Mỗi thể biến nạp *C. necator* H16, *C. necator* và PHB-4 được nuôi cấy vào trong 50 ml môi trường khoáng (3,32 g/l đinatri hydro phosphat, 2,8 g/l kali dihydro phosphat, 0,54 g/l ure) chứa 1 ml/l các nguyên tố vi lượng và được ủ vào trong bình ở 30°C. 50 mg/l kanamycin được bổ sung vào trong môi trường để các thể biến nạp *C. necator* và các vi sinh vật được nuôi cấy trong khoảng 48 giờ và 72 giờ.

Mỗi chủng H16, thể biến nạp *C. necator* và PHB-4 được nuôi cấy vào trong môi trường khoáng nói trên mà có 5 g/l fructoza và dầu hạt cọ thô (CPKO) được bổ sung vào đó, và mỗi chủng được nuôi cấy ở 30°C trong khoảng 72 giờ trong bình 250 ml. Natri valerat (2,5 g/l) được bổ sung để tạo ra 3-hydroxyvalerat (3HV). 50 mg/l kanamycin được bổ sung trong các môi trường cho các thể biến nạp *C. necator*. Để tổng hợp poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat-co-3-hydroxyhexanoat) [P(3HB-co-3HV-co-3HHx)] terpolyme, các nồng độ khác nhau của natri valerat và natri propionat được bổ sung cùng với 12 g/l CPKO.

Các vi sinh vật được tái tạo bằng cách ly tâm, được rửa bằng nước cất và hexan (có mặt CPKO) và được làm khô lạnh, và trọng lượng của các vi sinh vật khô được xác định. 2 ml hỗn hợp axit sulfuric/metanol (15:85) và 2 ml cloroform được bổ sung vào từ 10 đến 30 mg vi sinh vật khô, và mẫu được bịt kín và nung nóng ở 100°C trong khoảng 140 phút nhờ đó polyme trong các vi sinh vật được phân hủy thành metyleste. 1 ml nước cất được bổ sung thêm vào đó và được khuấy mạnh. Nó được bỏ lại và tách thành hai lớp, và lớp hữu cơ bên dưới được loại bỏ và phân tích các thành phần của nó bằng phép sắc ký khí mao mạch thông qua cột mao mạch Neutra BOND-1 (cột dài 25

m, đường kính trong bằng 0,25 mm và độ dày màng lỏng là 0,4 μ m, được sản xuất bởi GL Science) trong Shimadzu GC- 2010. Nhiệt độ được tăng lên với tốc độ 8°C/phút từ nhiệt độ ban đầu là 100°C. Các kết quả được thể hiện trong các Bảng 1, 2 và 3.

Bảng 1 thể hiện sự tổng hợp sinh học PHA bằng thể biến nạp *C. necator* từ fructoza, hỗn hợp của fructoza và natri valerat và CPKO.

Bảng 1

Nguồn cacbon	Chủng	Trọng lượng tế bào khô (g/l)	Hàm lượng PHA (wt%) ^b	Thành phần PHA (mol%)		
				3HB	3HV	3HHx
Fructoza	Thể biến nạp	3,1 $\pm$ 0,2	64 $\pm$ 2	100	ND	ND
	H16	3,3 $\pm$ 0,1	56 $\pm$ 1	100	ND	ND
	PHB-4	2,3 $\pm$ 0,2	0	ND	ND	ND
Fructoza	Thể biến nạp	2,8 $\pm$ 0,2	57 $\pm$ 2	40	60	ND
+	H16	3,0 $\pm$ 0,1	38 $\pm$ 2	65	35	ND
Natri valerat						
CPKO	Thể biến nạp H16	4,0 $\pm$ 0,2	63 $\pm$ 2	96	ND	4
		5,1 $\pm$ 0,4	60 $\pm$ 1	100		ND

^a được ủ trong khoảng 48 giờ ở 30°C, pH ban đầu là 7,0, 200 rpm trong môi trường khoáng Natri valerat được bổ sung trong 24 giờ nuôi cấy

^b hàm lượng PHA trong các tế bào khô đông

3HB, 3- hydroxybutyrat; 3HV, 3-hydroxyvalerat; 3HHx, 3-hydroxyhexanoatND – không được phát hiện

Dựa trên các kết quả trong Bảng 1, thể biến nạp có thể sử dụng fructoza để tạo ra P(3HB) homopolyme. Trọng lượng tế bào khô là 3,1 $\pm$ 0,2 g/l và hàm lượng polyme

là 64 ± 2 % trọng lượng của vi sinh vật gần như tương tự trọng lượng của H16 ($3,3 \pm 0,1$ g/l và 56 ± 1 % trọng lượng của vi sinh vật). Đúng như dự kiến, không có sự tích lũy nào quan sát được trong PHB-4. Trọng lượng tế bào khô cao hơn đạt được khi CPKO được sử dụng dưới dạng nguồn cacbon duy nhất. Sinh khối tế bào của thể biến nạp là $4,0 \pm 0,2$ g/l và hàm lượng polyme là 63 ± 2 % trọng lượng vi sinh vật.

Điều thú vị là, sự có mặt của CPKO, sự tích lũy của copolyme P(3HB-co-3HHx) với 4 mol% 3HHx được quan sát thấy trong thể biến nạp. Điều này không rõ ràng trong loại *Chromobacterium* sp. USM2 hoặc H16 tự nhiên.

Để kiểm tra sự tạo ra copolyme P(3HB-co-3HV), natri valerat được bổ sung vào việc nuôi cấy đã có fructoza. Thành phần 3HV được tạo ra bởi thể biến nạp gần hai lần cao hơn so với H16. Hàm lượng được tạo ra bằng thể tái tổ hợp cũng cao hơn 57 ± 2 % trọng lượng vi sinh vật so với loại tự nhiên, 38 ± 2 % trọng lượng vi sinh vật. Khả năng polyme synthaza nhân bản để tích lũy một lượng cao 3HV từ tiền chất nồng độ thấp cho thấy ái lực cao của nó về phía tổ hợp 3HV.

Bảng 2 thể hiện sự phân tích sơ lược về thời gian của sự tích lũy P(3HB-co-3HHx) bằng thể biến nạp *C. necator* từ CPKO.

Bảng 2

Thời gian (giờ)	Trọng lượng làm khô tế bào (g/l)	Hàm lượng PHA (wt%) ^b	Thành phần PHA(mol%)	
			3HB	3HHx
6	0,4	5 ± 1	89	11
12	$1,8 \pm 0,1$	27 ± 4	91	9
24	$4,5 \pm 0,6$	45 ± 2	95	5
36	$5,5 \pm 0,6$	65 ± 1	96	4
48	$7,1 \pm 0,4$	76 ± 2	97	3
60	$8,2 \pm 0,7$	81 ± 2	97	3
72	$8,8 \pm 0,5$	83 ± 4	97	3

PHA, polyhydroxyalkanoat; P(3HB), poly(3-hydroxybutyrat); P(3HHx); ply (3-hydroxyhexanoat)

^a Được ủ trong khoảng 72 giờ ở 30⁰C, pH 7.0 ban đầu, 200 rpm trong môi trường tổng hợp sinh học PHA

CPKO được bổ sung trong khi nuôi cấy (0 giờ)

^b Hàm lượng PHA trong các tế bào được khô đóng băng được xác định thông qua sắc ký khí (GC).

Từ các kết quả trên Bảng 2, 3HHx mol% phần có thể được kiểm soát trong quá trình nuôi cấy và phạm vi từ 3 đến 11 mol% có thể được sản xuất. Sinh khối tế bào cao và hàm lượng polyme thu được khi được nuôi cấy trong khoảng 72 giờ. Tổng trọng lượng tế bào khô là $8,8 \pm 0,5$ g/l và hàm lượng polyme 83 ± 4 % trọng lượng vi sinh vật thu được. Các tế bào được dự báo để sử dụng nguồn cacbon được cung cấp hiệu quả, như được chỉ ra bởi sự giảm đáng kể nồng độ của dầu còn lại cho đến khi được phát hiện ở cuối quá trình nuôi cấy trong 72 giờ.

Bảng 3 thể hiện sự tổng hợp sinh học của P(3HB-co-3HV-co-3HHx) terpolyme bằng thể biến nạp *C. necator* từ các hỗn hợp của CPKO và các tiền chất có nồng độ khác nhau.

Bảng 3

Tiền chất	Trọng lượng tế bào khô (g/l)	Hàm lượng PHA (wt%) ^b	Thành phần PHA (mol%)		
			3HB	3HV	3HHx
Natri valerat					
1	$6,9 \pm 2,0$	10 ± 1	69	24	7
3	$1,9 \pm 0,2$	23 ± 6	19	79	2
5	$2,2 \pm 0,1$	33 ± 6	10	89	1
7	$3,5 \pm 0,1$	53 ± 4	14	85	1
9	$2,1 \pm 0,4$	69 ± 1	8	91	1
Natri propionat					
1	$6,0 \pm 0,2$	32 ± 1	91	1	8
3	$1,6 \pm 0,1$	2 ± 1	71	23	6
5	$2,2 \pm 0,8$	10 ± 4	47	49	4

7	$1,9 \pm 0,1$	11 ± 3	30	69	1
9	$1,8 \pm 0,3$	35 ± 3	48	51	1

^a Được ủ trong khoảng 72 giờ ở 30°C, pH 7,0 ban đầu, 200 rpm trong môi trường tổng hợp sinh học PHA. các tiền chất được bổ sung lúc nuôi cấy được 6 giờ.

CPKO được bổ sung trong khi ủ (0 giờ)

^b Hàm lượng PHA trong các tế bào khô đông được xác định thông qua sắc ký khí (GC).

Như được thể hiện trong Bảng 3, một phần 3HV mol% có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung các nồng độ tiền chất khác nhau. Nhìn chung, 3HV mol% được nhận thấy tăng lên so với sự tăng nồng độ của tiền chất. Với natri valerat, 3HV mol% nằm trong khoảng từ 24 đến 91 mol%. Sau đó, với natri propionat thì 3HV mol% nằm trong khoảng từ 1 đến 51 mol%.

Phần mol% 3HHx cao hơn khi các nồng độ thấp hơn của các tiền chất được sử dụng. Đó là 7 mol% và 8 mol% với 1 g/L natri valerat và natri propionat, tương ứng. Nồng độ polyme cao nhất là 69 ± 1 trọng lượng vi sinh vật được tạo ra khi 9 g/L natri valerat được sử dụng. Nhìn chung, sinh khối tế bào cao hơn khi nồng độ thấp hơn của các tiền chất này được cấp vào.

Sau đó, các tế bào thể biến nạp *C. necator* khô được tạo huyền phù trong cloroform và được nung nóng tới 60°C trong khoảng thời gian 4 giờ để chiết xuất polyme từ nó. Các dư lượng được loại bỏ bằng cách lọc. Metanol được bổ sung vào dung dịch cloroform này để kết tủa polyme. Sau đó chất nổi bề mặt được tách bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm, các chất kết tủa được làm khô để tạo ra polyme tinh khiết.

Polyme thu được được xác thực bằng sự cộng hưởng từ hạt nhân. Tổng 25 mg mẫu polyme được hòa tan trong 1 ml deuterat cloroform (CDCl_3). Quang phổ ^1H NMR được đo trên Bruker AVANCE 300; NC, quang phổ kế USA ở tần số 400 MHz ở 30°C. Tetramethylsilan (Me_4Si) được sử dụng dưới dạng quy chiếu chuyển dịch hóa học bên trong. Kết quả được thể hiện trên Fig. 4.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 có hoạt tính polyme synthaza.
2. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc trình tự bổ sung của nó.
3. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:2, trong đó T được thay bằng U; hoặc trình tự bổ sung của nó.
4. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó polynucleotit này được tổng hợp bằng cách khuếch đại các vùng được bảo tồn của gen polyme synthaza từ vi sinh vật chứa gen tổng hợp polyme bằng cách sử dụng cặp oligonucleotit khuếch đại có các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.
5. Vector tái tổ hợp chứa polynucleotit được phân lập theo điểm 1.
6. Vector tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó vector này là plasmit hoặc thể thực khuẩn.
7. Thể biến nạp được biến nạp bởi vector theo điểm 6.
8. Quy trình sản xuất polyme, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
nuôi cấy thể biến nạp theo điểm 7 trong môi trường chứa các vật liệu có thể polyme được; và
tái tạo polyme từ môi trường được nuôi cấy.
9. Quy trình theo điểm 8, trong đó polyme là polyhydroxyalkanoat.

SEQ ID NO: 1

MQQFVNSLSLGQDQSDAPHPLTGAWSQLMSQTNQLLQLQSSLYQQQLGLWTQF
LGQTAGNDASAPSAKPSDRRFASPEWDEHPFYSFLKQSYLQTSKWMMELVDK
T
QIDESAKDKLSFATRQYLDAMAPSNFMLTNPDVVKRAIETQGESLVEGMKNM
M
EDIQKGHISMSDESKFQIGKNLVVTPGEVVFRNELIELIQYTPPTEKVHEKPLLF
VP
PCINKYYLMDLQPDNSMVRHFVGGYRVFLVSWRSAPPEMKNFTWETYIEKG
V
FAAAEAVQKITKQPTMNALGFCVGGVILTALCVAQAKGLKYFDSATFMTSLI
D
HAEPGEISFFIDEALVASREAKMAAGGIISGKEIGRTFASLRANDLVWNYVVNN
Y
LLGKTPAPFDLLYWNNDVLDLPLPMHTFMLRQFYINNALITPGAITLCGVPIDIS
K
IDIPVYMFAAREDHIVLWSSAYSGLKYLSGTPSRRFVLGASGHIAGSINPVTKD
KR
NYWTNEQLPVNPPEEWLEGAQSHPGSWWKDWDWLAPQSGKQVPAPKMLGS
K EFPPLQPAPGSYVLAKAMPPVAAALN

Fig.1

SEQ ID NO: 2

ATGCAGCAGTTTGTCAATTCCCTGTCGCTCGGCCAGGACCAGTCCGATGCCCC
CCATCCGCTGACCGGCGCCTGGTTCGCAGCTGATGAGCCAGACCAATCAGCTC
TTGCAGCTGCAATCCAGCCTCTACCAACAGCAATTGGGCTTGTGGACGCAATT
CCTCGGCCAAACCGCCGGCAACGACGCTTCCGCGCCGTCGGCCAAGCCGAGC
GACCGCCGCTTCGCCTCGCCGGAGTGGGATGAGCATCCGTTCTACAGCTTCCT
CAAGCAGAGCTATCTGCAAACCTCCAAGTGGATGATGGAGCTGGTGGACAAG
ACCCAGATCGACGAAAGCGCTAAGGACAAGCTGTCCTTCGCCACTCGCCAGT
ACCTGGATGCCATGGCGCCCAGCAACTTCATGCTGACCAACCCCGACGTGGT
CAAACGCGCCATCGAAACCCAGGGCGAAAGCCTGGTGGAAAGGCATGAAGAA
CATGATGGAGGACATCCAGAAGGGCCATATCTCGATGTCCGACGAGAGCAAG
TTCCAAATCGGCCAAAAACCTGGTGGTGACGCCGGGCGAGGTGGTGTTCGCA
ATGAACTGATCGAGCTGATCCAGTACACGCCGACCACCGAAAAAGTCCACGA
AAAGCCCTTGCTGTTTGTCCCGCCGTGCATCAACAAGTACTACCTGATGGATC
TGCAGCCGGACAACCTCCATGGTGCGCCACTTCGTCTGGCCAGGGTTACCGCGT
TTTCCTGGTCAGCTGGCGTTCCGCCGTGCCCCGAGATGAAGAACTTCACTTGGG
AGACCTACATCGAGAAAGGCGTGTTCCGCCGCGGCCGAAGCGGTTCAGAAGAT
CACCAAGCAGCCGACCATGAACGCGCTGGGCTTCTGCGTGGGCGGCGTGATC
CTCACTACCGCGCTGTGCGTGGCCCAGGCCAAGGGTCTGAAATACTTCGACT
CCGCCACCTTCATGACGTCGCTGATCGACCACGCCGAACCGGGCGAGATCTC
CTTCTTCATCGACGAGGCGCTGGTAGCCAGCCGCGAAGCCAAAATGGCGGCC
GGCGGCATCATCAGCGGCAAGGAAATCGGACGCACTTTCGCCAGCCTGCGCG
CCAACGACCTGGTGTGGAACCTACGTCGTCAACAACCTACCTGCTGGGCAAGAC
CCCGGCGCCGTTTCGACCTGCTGTACTGGAACAACGACGCGGTGGACCTGCCG
CTGCCGATGCACACCTTCATGCTGCGGCAGTTCTACATCAACAACGCGCTGAT
CACCCCGGGCGCCATTACGCTGTGCGGCGTCCCGATCGACATCTCCAAGATC
GACATCCCGGTGTATATGTTTCGCCGCGCGCGAAGACCACATCGTGCTGTGGA
GTTCCGCCTACTCCGGCCTGAAATATCTGAGCGGCACGCCAAGCCGCCGCTTT
GTCCTGGGCGCATCCGGCCACATCGCCGGCTCGATCAACCCCGTCACCAAGG
ATAAGCGCAACTACTGGACCAACGAGCAGCTGCCGGTGAATCCGGAAGAAT
GGCTGGAGGGCGCGCAAAGCCATCCAGGCAGCTGGTGGAAAGGACTGGGACG
CCTGGCTGGCCCCGCAATCTGGAAAACAGGTTCGGGCGCCCAAGATGCTGGG
CAGCAAGGAGTTCCCCCGCTGCAGCCTGCGCCGGGCAGCTATGTGCTCGCC
AAGGCGATGCCTCCCGTCGCCGCCGCTTGAAGTGA

Fig.2

SEQ ID NO: 3

CGTAATTGGGGCCCATGCAG

SEQ ID NO: 4

AGCCGCCGCCGAAGCTTCCGATGGC

Fig.3

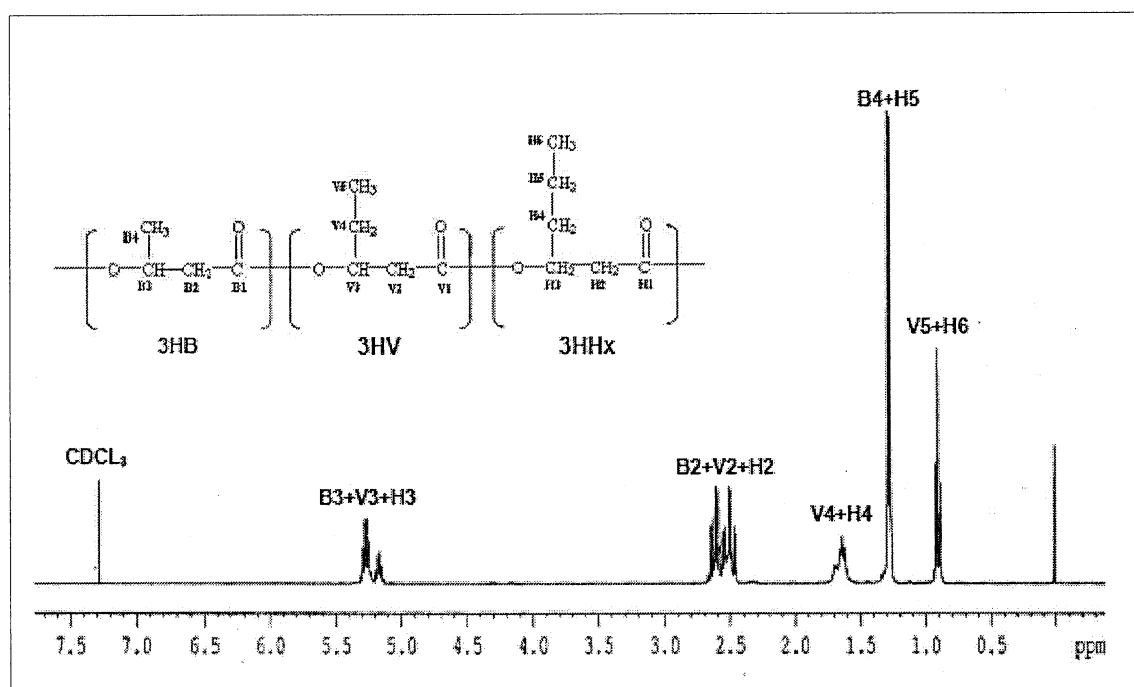


Fig.4