



(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) 
1-0019758

(51)⁷ **A23K 1/165, C12N 1/20, 15/11, 15/55, 9/16, C12P 21/02** (13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2007-00582 | (22) | 17.10.2005 | | |
| (86) | PCT/IB2005/003376 | 17.10.2005 | (87) | WO2006/043178A3 | 27.04.2006 |
| (30) | GB 0423139.5 | 18.10.2004 | GB | | |
| (45) | 25.09.2018 | 366 | (43) | 25.09.2007 | 234 |
| (73) | DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)
Langebrogade 1, P.O. Box 17, DK-1001 Copenhagen K, Denmark | | | | |
| (72) | MIASNIKOV, Andrei (FI), KUMAR, Vijay (FI), KENSCH, Oliver (DE),
PELLENGAHR, Klaus (DE), LEUTHNER, Birgitta (DE), KETTLING, Ulrich
(DE), KOLTERMANN, Andre (DE) | | | | |
| (74) | Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP) | | | | |
-

(54) **POLYPEPTIT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ BIẾN THỂ ENZYM PHYTAZA, THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN ĐỘNG VẬT BAO GỒM POLYPEPTIT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit, phương pháp sản xuất polypeptit, thực phẩm và chế phẩm thức ăn động vật bao gồm polypeptit. Cụ thể, sáng chế đề cập đến một tế bào chủ được gây biến nạp hoặc chuyển nhiễm với một axit nucleic mã hóa enzym phytaza vi khuẩn và các dạng biến thể của chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực enzym làm các chất phụ gia thực phẩm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phytaza, trình tự nucleotit đối với phytaza này, phương pháp sản xuất phytaza và việc sử dụng chúng để làm tăng khả năng tiêu hóa phosphat trong thực phẩm và thức ăn động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phytat là dạng tích trữ phospho chính trong ngũ cốc và các cây họ đậu. Tuy nhiên, các động vật một khoang bụng như lợn, gia cầm và cá không thể chuyển hóa hoặc hấp thu phytat (hoặc axit phytic) và do đó nó bị đào thải, dẫn đến tình trạng ô nhiễm phospho ở các khu vực chăn nuôi động vật rất lớn. Ngoài ra, axit phytic cũng đóng vai trò làm chất chống dinh dưỡng trong các động vật một khoang bụng bởi các tác nhân kim loại cation hóa như canxi, đồng và kẽm.

Để cung cấp các phosphat đủ cho sự phát triển và sự khỏe mạnh của các động vật này, phosphat vô cơ được bổ sung vào các chế độ ăn của chúng. Sự bổ sung này khá tốn kém và có thể làm tăng hơn nữa các vấn đề về ô nhiễm môi trường.

Nhờ sự hoạt động của phytaza, phytat nói chung được thủy phân để tạo các inositol- phosphat thấp và phosphat vô cơ. Các phytaza là hữu dụng để làm các chất phụ gia cho thức ăn động vật vì chúng cải thiện giá trị của phospho hữu cơ đối với động vật và làm giảm sự ô nhiễm phosphat của môi trường (Wodzinski RJ, Ullah AH. *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302 (1996)).

Một số phytaza của nấm (Wyss M. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R.M. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)) và vi

khuẩn (Greiner R. et al Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo et al. Appl. Environ. Microbiol. 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H.W. et al. Biotechnol. Lett. 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. et al. Arch. Biochem. Biophys. 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S.J. et al. Enzym and microbial technol. 18, 449-454 (1996); Zinin N.V. et al. FEMS Microbiol. Lett. 236, 283-290 (2004))) đã được mô tả trong các tài liệu này.

Tuy nhiên, cho đến nay, không có một phytaza nào trong số các phytaza trên có các tính chất cần thiết đối với việc sử dụng hiệu quả làm chất bổ sung thức ăn động vật. Cụ thể, nấm và các phytaza có xu thế không ổn định do phân giải protein (Igbasan F.A. et al. Arch. Anim. Nutr. 53,353-373 (2000)) và vì vậy dễ bị phân hủy, trong khi các phytaza vi khuẩn có tính đặc hiệu cơ chất hẹp đối với bản thân phytat và phân hủy kém các inositol phosphat có các mức phosphoryl hóa vừa phải (Greiner R. et al., Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J et al. Biochem. J. 352, 623-628 (2000)).

Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các phytaza được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh chung, sáng chế đề cập đến phytaza có nguồn gốc từ vi khuẩn hoặc các dạng biến đổi (biến thể) của nó. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phytaza có nguồn gốc từ vi khuẩn, *Buttiauxella sp.* và các dạng thay đổi/biến đổi của nó được chọn và/hoặc thiết kế để có các tính đặc hiệu được cải thiện so với enzym (gốc) trong tự nhiên (hoang dã).

Sáng chế rất có lợi vì nó đề xuất phytaza mới mà có các tính chất kiến trúc đặc biệt hữu dụng và hiệu quả làm các enzym cho thức ăn. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các polypeptit phytaza mới đã được phân lập và/hoặc tinh chế như được mô tả ở đây, hoặc một đoạn chức, hoặc các biến thể hoặc các dạng biến đổi của nó. Sáng chế cũng đề xuất trình tự axit nucleic mã hóa phytaza này.

Để có thể sử dụng hữu hiệu làm enzym bổ sung vào thực phẩm hoặc thức ăn động vật, phytaza phải kết hợp được một số tính chất khác nhau. Để có thể phân

hủy axit phytic trong môi trường axit của dạ dày động vật nó phải hoạt động ở độ pH thấp, tốt hơn trong khoảng giá trị pH rộng. Ngoài ra, nó phải có hoạt tính đặc hiệu cao và tốt hơn nếu độ bền nhiệt cao để protein có thể chịu đựng được nhiệt độ cao thông thường được sử dụng trong việc điều chế lương thực như các viên thức ăn.

Cũng quan trọng là enzym phải có tính đặc hiệu cơ chất rộng cho phép nó thủy phân không chỉ phytat mà còn các sản phẩm trung gian của quá trình phân giải phytat như inositol pentaphosphat, các tetraphosphat và các triphosphat. Các nghiên cứu về sự phân giải phytat ở lợn chỉ ra rằng các inositol oligophosphat này còn duy trì tính không tan mức độ lớn trong ruột non và ruột già và như vậy không thể tiếp cận được với các phosphatase kiềm được sản xuất bởi hệ vi khuẩn ruột (Schlemmer U. et al. Arch. Anim. Nutr. 55, 255-280 (2001)). Những thay đổi về các biên dạng tính đặc hiệu cơ chất của các enzym khác nhau được xác định. Ví dụ, các inositol-triphosphat được tạo ra bởi được tạo ra bởi dạng phytaza có nguồn gốc từ *B. subtilis* về cơ bản chịu được sự thủy phân tiếp theo bởi enzym này [Kerovuo J. et al. Biochem J. 352, 623-628 (2000)].

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất plasmit hoặc hệ vector, hoặc sinh vật được biến nạp gen hoặc sinh vật chuyển gen bao gồm một phytaza mới như được mô tả ở đây hoặc dạng biến đổi của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các sinh vật chuyển gen được làm thay đổi để biểu hiện phytaza mới như được mô tả dưới đây hoặc dạng biến đổi của chúng, và vì vậy có khả năng sản xuất phytaza. Sáng chế còn đề xuất phương tiện và phương pháp để sản xuất phytaza bằng công nghệ sinh học và việc sử dụng chúng làm các chất phụ gia thức ăn.

Các khía cạnh của sáng chế được trình bày trong yêu cầu bảo hộ và trong mô tả dưới đây.

Để dễ tham khảo, các khía cạnh của sáng chế sẽ được phân tích dưới các tiêu đề của các phần thích hợp. Tuy nhiên, nội dung bộc lộ dưới từng tiêu đề của các phần không cần thiết bị giới hạn mỗi phần cụ thể.

Như được sử dụng liên quan đến sáng chế, các thuật ngữ “sản xuất”, “đang sản xuất”, “được sản xuất”, “có thể sản xuất”, “sự sản xuất” là đồng nghĩa với các thuật ngữ tương ứng “điều chế”, “đang điều chế”, “được điều chế”, “sự điều chế”, “được tạo ra”, “sự tạo ra” và “có thể tạo ra”.

Như được sử dụng liên quan đến sáng chế, các thuật ngữ “biểu hiện”, “làm biểu hiện”, “được biểu hiện” và “có thể biểu hiện” là đồng nghĩa với các thuật ngữ tương ứng “sự phiên mã”, “phiên mã”, “được phiên mã” và “có thể phiên mã”.

Như được sử dụng liên quan đến sáng chế, các thuật ngữ “biến nạp” và “sự chuyển nhiễm” dùng để chỉ phương pháp đưa các trình tự axit nucleic vào các vật chủ, các tế bào chủ, các mô hoặc các cơ quan.

Các khía cạnh khác liên quan đến các trình tự nucleotit mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm: cấu trúc bao gồm các trình tự theo sáng chế; vector bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; plasmid bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; tế bào được biến nạp bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; mô được biến nạp bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; cơ quan được biến nạp bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; vật chủ được biến nạp bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế; sinh vật được biến nạp bao gồm các trình tự để sử dụng trong sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm các phương pháp biểu hiện trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế sử dụng các trình tự này, như sự biểu hiện trong tế bào chủ; bao gồm phương pháp chuyển nhiễm các trình tự này. Sáng chế còn bao gồm phương pháp phân lập trình tự nucleotit, như phân lập từ tế bào chủ.

Các khía cạnh khác liên quan đến các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế bao gồm: cấu trúc mã hóa các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; vector mã hóa các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; plasmid mã hóa các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; tế bào được biến nạp biểu hiện các trình tự axit

amin để sử dụng trong sáng chế; mô được biến nạp biểu hiện các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; cơ quan được biến nạp biểu hiện các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; vật chủ được biến nạp biểu hiện các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế; vi sinh vật được biến nạp biểu hiện các trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tinh chế trình tự axit amin để sử dụng trong sáng chế sử dụng các trình tự này, như sự biểu hiện trong một tế bào chủ; bao gồm các phương pháp chuyển nhiễm chủng, và sau đó tinh chế trình tự nói trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện phép phân tích SDS PAGE của phytaza tái tổ hợp từ *Buttiauxella* P1-29 được tinh chế bằng bằng phép sắc ký DEAE-Sepharose. Hình vẽ thể hiện vết quét của ảnh số của đường chứa một mẫu phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella*.

Fig.2 thể hiện biên dạng pH của dạng phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29

Fig.3 thể hiện tính đặc hiệu cơ chất của phytaza tái tổ hợp tinh khiết có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29 với phần inositol phosphat có mức phosphoryl hóa khác nhau và các cơ chất mẫu khác nhau. Các ký hiệu viết tắt: IP6 – axit phytic, IP5, IP4 và IP3 – các hỗn hợp của các inositol penta-, tetra- và triphosphat đồng phân tương ứng. Fru P2 – fructoza 1,6-diphosphat, Fru P1 – fructoza 6-phosphat.

SEQ ID NO: 1 liệt kê trình tự thu được để nhận dạng giống vi khuẩn.

SEQ ID NO: 2 liệt kê trình tự polynucleotit bao gồm gen phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29.

SEQ ID NO: 3 liệt kê trình tự axit amin của gen phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến một enzym bao gồm trình tự axit amin tương ứng với phytaza thu được từ *Buttiauxella* sp. hoặc dạng biến đổi, đồng đẳng, biến thể, dạng tương tự chức hoặc đoạn có hiệu lực của nó.

Thuật ngữ “phytaza” có nghĩa là protein hoặc polypeptit mà có khả năng xúc tác cho phản ứng thủy phân các este của axit phosphoric, bao gồm phytat và giải phóng phosphat vô cơ. Một số phytaza, ngoài phytat, còn có khả năng thủy phân ít nhất một số inositol-phosphat có các mức phosphoryl hóa vừa phải.

Thuật ngữ “tương ứng với phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp.” có nghĩa là enzym không cần phải thu được từ một nguồn *Buttiauxella* sp. Cách khác, enzym tốt hơn nếu phải có các đặc tính chức giống hoặc có trình tự như của enzym của phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp. Ví dụ, phytaza *Buttiauxella* sp. Phytaza có thể là một biến thể có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp., nhưng không xuất hiện tự nhiên ở các loài *Buttiauxella*.

Buttiauxella spp. bao gồm, *Buttiauxella agrestis*, *Buttiauxella brennerae*, *Buttiauxella ferragutiae*, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella izardii*, *Buttiauxella noackiae*, *Buttiauxella warmboldiae*. Các giống của loài *Buttiauxella* là có sẵn từ nguồn của DSMZ, the German National Resource Centre for Biological Material (Trung tâm tài nguyên vật liệu sinh học quốc gia Đức). Các phytaza, tốt hơn nếu được nhận dạng từ *Buttiauxella* spp. bằng các phương pháp được mô tả ở trên, ví dụ lai với SEQ ID No: 2. Các giống *Buttiauxella* spp. được ưu tiên để phân lập các polypeptit và các polynucleotit theo sáng chế được liệt kê trong phần các ví dụ.

Các thuật ngữ “phytaza trong tự nhiên” hoặc “kiểu trong tự nhiên” theo sáng chế mô tả enzym phytaza với trình tự axit amin được tìm thấy trong tự nhiên.

Các thuật ngữ “biến thể enzym phytaza” “biến thể phytaza” hoặc “biến thể” theo sáng chế mô tả enzym phytaza có trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin của một phytaza gốc nhưng khác bởi một hoặc nhiều gốc thế, gốc điền và/hoặc gốc bị xóa axit amin, đều dùng để chỉ “các thể đột biến”. Sáng chế đề cập

đến biến thể enzym phytaza cũng có thể là một enzym phytaza gốc trái qua các vòng của các phương pháp điều chế các biến thể phytaza như phương pháp phát triển phân tử.

Thuật ngữ "các polypeptit đồng đẳng", theo sáng chế, cũng được mô tả là "các chất đồng đẳng" ở đây, mô tả các polypeptit, tốt hơn là các enzym phytaza (tức là "các phytaza đồng nhất" hoặc "các enzym tương đồng") với độ đồng nhất trình tự lớn hơn 75% so với một trình tự axit amin của các polypeptit/các phytaza/các enzym đầu tiên, tốt hơn là có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%.

Thuật ngữ "dạng tương đương chức của chúng" có nghĩa là enzym phải có các đặc tính chứ gần giống với enzym phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp.. Thuật ngữ "dạng biến đổi" hoặc "biến thể" có nghĩa là enzym được biến đổi từ dạng gốc của nó, nhưng giữ các đặc tính chức enzym như của enzym của một phytaza *Buttiauxella* sp. Cụ thể, các thuật ngữ "biến thể" hoặc "dạng biến đổi" bao gồm các enzym phytaza với một trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin của phytaza kiểu hoang/gốc và có một hoặc nhiều gốc axit amin thế, gốc axit amin thêm và/hoặc gốc axit amin bị xóa, đều dùng để chỉ các thể đột biến. Các dạng biến đổi hoặc các biến thể có thể thể hiện các đặc tính enzym thay đổi so với enzym gốc. Tốt hơn nếu, các dạng biến đổi hoặc các biến thể có một hoặc nhiều phenotip tăng sau đây: độ bền nhiệt tăng và/hoặc; độ ổn định phân giải enzym tăng (ví dụ pepsin) và/hoặc; hoạt tính đặc hiệu tăng và/hoặc; tính đặc hiệu cơ chất rộng và/hoặc; một hoạt tính vượt ra ngoài khoảng pH rộng. Thuật ngữ đoạn "chức" hoặc "có hiệu lực" có nghĩa là một đoạn hoặc một phần của phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp. mà có chức hoặc hiệu lực enzym gần giống.

Tốt hơn, nếu enzym phytaza theo khía cạnh này của sáng chế có trình tự giống với hoặc một chuỗi có trình tự có ít nhất 75% độ đồng nhất (độ tương đồng) với enzym của phytaza *Buttiauxella* sp.

Một cách thích hợp, enzym bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc một trình tự có ít nhất 75% độ đồng nhất (tương đồng) với nó

hoặc một đoạn chức của chúng. Trong một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất một polypeptit tinh khiết và/hoặc được phân lập có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc một trình tự có ít nhất 75% độ đồng nhất (tương đồng) với nó hoặc một đoạn hiệu lực của chúng. Khi đề cập đến SEQ ID No: 3 và các polypeptit bao gồm SEQ ID No: 3, sáng chế cũng đề cập đến các polypeptit mà được dịch mã cùng hoặc sau trong quá trình biểu hiện, ví dụ bằng cách tách peptit tín hiệu. Việc tách sau khi dịch mã cũng có thể xảy ra ở đầu C. Vì vậy, theo một phương án được ưu tiên, đoạn hiệu lực của chúng (cũng dùng để chỉ đoạn chức của chúng) là polypeptit trưởng thành được sản xuất bởi vật chủ tự nhiên hoặc một vật chủ biểu hiện thích hợp.

Trong một phương án khác, phytaza được đặc trưng ở chỗ nó có nguồn gốc từ giống *Buttiauxella* sp. P1-29 được lưu giữ với số truy cập NCIMB 41248.

Trong một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến một phytaza theo một phương án bất kỳ của khía cạnh thứ nhất của sáng chế bao gồm một hoặc nhiều thể đột biến ở các vị trí sau (đánh số theo sự đánh số ở SEQ ID NO: 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

Các vị trí này được đặc trưng ở chỗ sự đột biến gen của enzym ở các vị trí này dẫn đến sự cải thiện đối với các đặc tính enzym mong muốn.

Các việc thế sau có thể là các biến thể được ưu tiên:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y
 T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y
 A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 G 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, hoặc Y
 K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 L 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, hoặc Y
 A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y
 N 351. A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y

Thuật ngữ “sự đột biến bảo toàn” có nghĩa là sự đột biến đối với các gốc axit amin được bảo toàn về các đặc tính axit amin so với gốc axit amin được chỉ ra. Các đặc tính axit amin bao gồm kích cỡ của gốc, tính kỵ nước, tính có cực, điện tích, giá trị pK, và các đặc tính axit amin khác được biết trong lĩnh vực này. Các thể đột biến bảo toàn được ưu tiên được liệt kê dưới đây như là các dạng thay thế bảo toàn.

Trong một phương án đặc biệt được ưu tiên, các thể đột biến nằm ở một hoặc nhiều vị trí sau: K59; T167; K240; T167; K240; D244; Q289; T209 và F197

Các thể đột biến được ưu tiên ở các vị trí đặc hiệu này được liệt kê ở trên, các thể đột biến được ưu tiên hơn bao gồm: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K và F197S.

Trong một phương án được ưu tiên khác nữa, sáng chế đề xuất một phytaza bao gồm một tổ hợp của các thể đột biến được lựa chọn từ nhóm bao gồm:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K;

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K;

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F và

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

Do đó, phytaza được ưu tiên theo sáng chế là biến thể bao gồm trình tự axit amin được liệt kê là trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc một đoạn hiệu lực của chúng, (hoặc dạng tương tự của chúng, tốt hơn nếu phytaza được đặc trưng ở chỗ nó có nguồn gốc từ loài *Buttiauxella* sp. P1-29 được lưu giữ với số truy cập NCIMB 41248, hoặc dạng tương tự của chúng), ngoại trừ có một hoặc nhiều thể đột biến axit amin được liệt kê ở trên hoặc một trong số các tổ hợp của các thể đột biến được liệt kê ở trên.

Trong các phương án này, danh pháp chỉ ra phytaza bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 3 với các dạng đột biến được chỉ ra bằng cách tham chiếu các vị trí của các axit amin trong trình tự SEQ ID NO: 3. Danh pháp này được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Một cách thích hợp, các biến thể này thể hiện các đặc tính cải thiện liên quan đến một đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính sau: tính bền nhiệt, khoảng pH, tính bền với pepsin, hoạt tính đặc hiệu, tính đặc hiệu cơ chất, và tính đặc hiệu cơ chất rộng hơn. Các phương pháp thích hợp để xác định các đặc tính này được bộc lộ dưới đây.

Cụ thể, những cải tiến đối với đặc tính phytaza được nhắm tới là tính bền enzym dưới các điều kiện xử lý thức ăn và thực phẩm, là tính bền enzym trong quá trình đến dạ dày, và là hoạt tính enzym và tính bền trong dạ dày người và động vật và/hoặc đường ruột tạo nên các biến thể cải thiện đặc biệt thích hợp cho việc sử dụng làm các chất phụ gia thức ăn. Như vậy, những cải biến này bao gồm trong số các thông số khác: sự tăng độ bền ở nhiệt độ cao, tốt hơn là ở nhiệt độ trên 65°C, sự tăng độ bền chống lại sự tiêu hóa phân giải protein, tốt hơn là proteaza của đường tiêu hóa như pepsin, sự tăng hoạt tính xúc tác ở độ pH thấp, tốt hơn nếu hoạt tính xúc tác dưới độ pH 5,5, và hiệu quả nói chung liên quan đến việc giải phóng các nhóm phosphat từ phytat, và tốt hơn là các inositol phosphat bổ sung.

Hệ danh pháp

Trong phần mô tả này và các yêu cầu bảo hộ một chữ cái và ba chữ cái thông tường mã hóa cho các gốc axit amin được sử dụng. Để dễ tham khảo, các thể đột biến trong các biến thể enzym được mô tả bằng cách sử dụng hệ danh pháp sau: gốc axit amin trong enzym gốc; vị trí; (các) axit amin được thế. Theo hệ danh pháp này, việc thế, ví dụ một gốc alanin cho một gốc glyxin ở vị trí 20 được chỉ ra là Ala20Gly hoặc A20G. Sự xóa alanin ở cùng vị trí được thể hiện là Ala20* hoặc A20*. Sự điền một gốc axit amin bổ sung (ví dụ một glyxin) được chỉ ra là Ala20AlaGly hoặc A20AG. Sự xóa một đoạn đuôi liên tục các gốc axit amin (ví dụ giữa alanin ở vị trí 20 và glyxin ở vị trí 21) được chỉ ra là Δ (Ala20-Gly21) hoặc Δ (A20-G21). Khi một trình tự enzym gốc chứa một đoạn mất so với trình tự enzym được sử dụng để đánh số một sự xen ở vị trí này (ví dụ một alanin ở vị trí được xóa 20) được chỉ ra là *20Ala or *20A. Các thể đột biến bội được phân tách bằng cách một ký hiệu thêm vào hoặc một gạch chéo. Ví dụ, hai thể đột biến ở các vị trí 20 và 21 thế alanin và axit glutamic bằng glyxin và serin, tương ứng, được chỉ ra là

A20G+E21S hoặc A20G/E21S. Khi một gốc axit amin ở một vị trí nhất định được thế bằng hai hoặc nhiều gốc axit amin khác, các gốc này được tách biệt bằng một dấu phẩy hoặc một dấu gạch chéo. Ví dụ, sự thế alanin ở vị trí 30 bằng glyxin hoặc axit glutamic được chỉ ra là A20G,E hoặc A20G/E, hoặc A20G, A20E. Khi một vị trí thích hợp để thay đổi được xác định ở đây không cần phương pháp thay đổi đặc hiệu bất kỳ đã được gợi ý, cần phải hiểu rằng gốc axit amin bất kỳ có thể được thế cho gốc axit amin ở vị trí đó. Như vậy, ví dụ, khi một cái biến đổi với alanin ở vị trí 20 được nhắc tới nhưng không đặc hiệu, cần phải hiểu rằng alanin này có thể được xóa hoặc được thế bằng gốc axit amin khác bất kỳ (tức là một gốc bất kỳ trong số gốc R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V).

Một cách thích hợp, phytaza hoặc dạng tương đương chức của sáng chế được đặc trưng ở chỗ phytaza này có hoạt tính đặc hiệu ít nhất là 100 U/mg hoặc 200U/mg, tốt hơn nếu ít nhất, 300 U/mg trong đó hoạt tính đặc hiệu nói trên được xác định bằng cách ủ phytaza này trong một dung dịch chứa 2mM phytat, 0,8mM CaCl_2 trong 200mM đệm natri axetat ở độ pH bằng 3,5 như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 1. Phytaza theo sáng chế hoặc dạng tương đương chức của chúng cũng có thể thích hợp được đặc trưng ở chỗ phytaza này có hoạt tính tối đa ở khoảng pH bằng 4 - 4,5 trong đó hoạt tính này được xác định bằng cách ủ phytaza này trong một dung dịch chứa 2mM phytat, 0,8mM CaCl_2 trong 200mM đệm natri axetat. Phytaza theo sáng chế cũng có thể thích hợp được đặc trưng ở chỗ phytaza này có 40% hoặc hơn hoạt tính tối đa được quan sát ở độ pH bằng 2,5 và 5,5 trong đó đệm glyxin hydroclorua được sử dụng để xác định hoạt tính ở độ pH bằng 2,5.

Một cách thích hợp, theo một phương án, phytaza hoặc dạng tương đương chức theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ phytaza này có hoạt tính đặc hiệu bằng 330 U/mg hoặc cao hơn trong đó hoạt tính đặc hiệu nói trên được xác định bằng cách ủ phytaza này trong một dung dịch chứa 2mM phytat, 0,8mM CaCl_2 trong 200mM đệm natri axetat ở độ pH bằng 3,5. Trong một phương án khác, phytaza theo sáng chế hoặc dạng tương đương chức của chúng cũng có thể thích hợp được đặc trưng ở chỗ phytaza này có hai giá trị hoạt tính tối đa khoảng pH bằng 3 và pH trong

khoảng 4 – 4,5 trong đó hoạt tính này được xác định bằng cách ủ phytaza này trong một dung dịch chứa 2mM phytate, 0,8mM CaCl_2 trong 200mM đệm natri axetat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phân tử axit nucleic tinh khiết và/hoặc được phân lập hoặc trình tự nucleotit mã hóa cho enzym bao gồm trình tự axit amin tương ứng với phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp., hoặc một đồng đẳng của chúng. Một cách thích hợp, phân tử axit nucleic tinh khiết và/hoặc được phân lập nói trên mã hóa cho một polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc một trình tự có ít nhất 75% độ đồng nhất (tương đồng) với nó hoặc một đoạn có hiệu lực của nó. Theo một phương án, phân tử axit nucleic mã hóa cho một polypeptit bao gồm SEQ ID NO:3 và bao gồm các thể đột biến ở các vị trí được ưu tiên được liệt kê ở đây hoặc bất kỳ thể đột biến nào trong số các thể đột biến đặc hiệu hoặc các dạng kết hợp của các thể đột biến được liệt kê ở đây. Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất một phân tử axit nucleic tinh khiết và/hoặc được phân lập bao gồm một trình tự nucleotit mà giống với, hoặc là phần bổ sung vào, hoặc chứa các nhóm thể codon thích hợp đối với trình tự bất kỳ trong số các trình tự của SEQ ID NO: 2 hoặc bao gồm một trình tự mà có ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 2.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến một trình tự nucleotit và việc sử dụng một trình tự nucleotit được chỉ ra là:

- (a) trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID NO:2,
- (b) một trình tự nucleotit mà là một biến thể, dạng tương tự, dẫn xuất hoặc đoạn của trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 2;
- (c) một trình tự nucleotit là một dạng bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 2;
- (d) một trình tự nucleotit là một dạng bổ sung của một biến thể, dạng tương tự, dẫn xuất hoặc đoạn của trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID No: 2;

- (e) một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với trình tự nucleotit được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 2;
- (f) một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với một biến thể, dạng tương tự, dẫn xuất hoặc đoạn của trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 2;
- (g) một trình tự nucleotit là một dạng bổ sung của một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với trình tự nucleotit được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 2;
- (h) một trình tự nucleotit là một dạng bổ sung của một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với một biến thể, dạng tương tự, dẫn xuất hoặc đoạn của trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 2;
- (i) một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với dạng bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 2;
- (j) một trình tự nucleotit mà có khả năng lai với dạng bổ sung của một biến thể, dạng tương tự, dẫn xuất hoặc đoạn của trình tự nucleotit được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 2.

Một nucleotit được coi là lai được với một trong số các nucleotit nêu trên (e), (f), (g), (h), (i) hoặc (j) nếu nó có khả năng lai dưới các điều kiện chặt chẽ trung bình, tốt hơn nữa là điều kiện chặt chẽ cao, thậm chí tốt hơn nữa là dưới các điều kiện rất chặt chẽ.

Để điều chế một thể lai các protocol sinh học phân tử chuẩn thẩm tách để thẩm tách có thể được sử dụng (ví dụ phương pháp thẩm tách miền Nam - Southern đối với việc lai ADN. Lượng ADN đích phụ thuộc vào sự dư thừa tương đối trình tự đích. Nếu trình tự đích tinh khiết được sử dụng, khoảng giữa 1 và 5 picograms ADN trên một kilobaza polynucleotit là được ưu tiên. Điển hình, giới hạn phát hiện là khoảng 0,5 pg ADN đối với đoạn dò phóng xạ với hoạt tính đặc hiệu là 10^9 dpm/mg mà tương đương với một gen sao đơn dài 500 bp trong 3,3 mg ADN hệ gen của một hệ gen phức hợp (ví dụ người). Trên thực tế người ta sẽ sử dụng khoảng 10 mg ADN hệ gen – ví dụ để tách bằng sàng các sinh vật, như các vi sinh

vật, mà chứa một phytaza mã hóa polynucleotit theo sáng chế. Nếu ADN đích là vi khuẩn hoặc, ví dụ, một plasmid thì sẽ phải pha loãng ADN để tránh sự tiếp xúc quá mức. ADN đích được thẩm tách, ví dụ bằng phương pháp thẩm tách điểm, hoặc thông qua phương pháp thẩm tách từ một gel điện chuyển. Các điều kiện được ưu tiên được mô tả trong cuốn 'Membrane Transfer and Detection Methods, Amersham International plc, UK - PI/162/85/1). Màng nylon tích điện dương Hybond N+ tốt hơn nếu được sử dụng (Amersham Life Science). Đoạn dò tốt hơn là được điều chế theo bộ kit đánh dấu của Pharmacia's 'Ready to Go ADNTM để điều chế một gen prob > 1×10^9 dpm/microgam. Gen đoạn dò được sử dụng trong đệm lai với nồng độ 1×10^6 dpm trên ml đệm lai. Các dung dịch thẩm tách tốt hơn nếu được lai trước trong đệm lai (6 x SSC, 5 x dung dịch denhardt, và 0,5% SDS, và ADN tích dịch cá hồi biến tính pha thành 100 mg/ml. Đệm) trong thời gian một giờ ở nhiệt độ 65°C, tiếp theo bằng cách lai trong đệm lai chứa đoạn dò đánh dấu biến tính và lắc trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 65°C. (Các) dung dịch thẩm tách sau đó được rửa bằng một thể tích thích hợp đệm rửa (điển hình 50ml) trong 2xSSC, 0,1% SDS trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 65°C, tiếp theo rửa lần thứ hai trong một thể tích thích hợp đệm rửa (điển hình 50ml) trong đệm rửa giống như vậy (2xSSC, 0,1% SDS) đối với việc rửa chặt chẽ trung bình, hoặc 0,1% x SSC, 0,1% SDS trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 65°C (điều kiện chặt chẽ cao), lần rửa thứ hai có thể được lặp lại ở nhiệt độ 70°C đối với điều kiện rửa chặt chẽ cao.

Trình tự nucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự mã hóa cho SEQ ID NO: 3 hoặc một đoạn có hiệu lực của nó hoặc một biến thể, dạng biến đổi, dạng tương tự hoặc dẫn xuất của chúng.

Cụ thể, sáng chế đề xuất một plasmid hoặc hệ vector bao gồm một phytaza như được mô tả ở đây hoặc một đồng đẳng hoặc dẫn xuất của chúng. Tốt hơn nếu, plasmid hoặc hệ vector bao gồm một trình tự axit nucleic như được thể hiện ở SEQ ID No: 2 hoặc một trình tự mà có ít nhất 75% độ tương đồng với nó hoặc một đoạn có hiệu lực của nó. Một cách thích hợp, plasmid hoặc hệ vector là một vector biểu hiện để biểu hiện một enzym bất kỳ trong số các enzym được mã hóa bởi một trình tự axit nucleic như được thể hiện ở một trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID

No: 2 hoặc một trình tự mà có ít nhất 75% độ tương đồng (đồng nhất) với nó trong một vi sinh vật. Các vector biểu hiện thích hợp được mô tả ở trên. Ngoài ra, sáng chế đề xuất một plasmid hoặc hệ vector để biểu hiện một enzym bất kỳ trong số các enzym được biến đổi hoặc các biến thể hoặc các đoạn có hiệu lực được mô tả ở trên. Các vector biểu hiện thích hợp được mô tả ở trên.

Các biến thể phytaza

Sáng chế được sáng tạo để cải thiện các đặc tính của một phytaza gốc bằng cách biến đổi một hoặc nhiều gốc axit amin của trình tự axit amin của phytaza gốc.

Các enzym phytaza được sử dụng làm các enzym gốc theo sáng chế bao gồm các phytaza kiểu hoang thu được từ vi khuẩn, cụ thể, tốt hơn nếu các phytaza có thể thu được từ hoặc có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp. có trình tự axit amin như được trình bày trong trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc một đoạn có hiệu lực của nó, hoặc một trình tự axit amin với độ đồng nhất với SEQ ID No: 3 lớn hơn 75%, tốt hơn là lớn hơn 80%, tốt hơn nữa là lớn hơn 90%, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 95%, 96%, 97%, 98% tốt hơn là lớn hơn 99% (tức là độ tương đồng polypeptit), hoặc một đoạn có hiệu lực của nó.

Các biến thể enzym phytaza biến đổi theo sáng chế tốt hơn nếu có độ đồng nhất với SEQ ID No: 3 hoặc một đoạn có hiệu lực của nó lớn hơn 75%, tốt hơn là lớn hơn 80%, tốt hơn nữa là lớn hơn 90%, tốt hơn nữa là lớn hơn 95%, 96%, 97%, 98% tốt hơn là lớn hơn 99%. Tuy nhiên, sáng chế cũng bao gồm các biến thể có thể khác loại, (tức là không tương đồng) với SEQ ID No3. Ví dụ các biến thể được sản xuất bởi các kỹ thuật tái tổ hợp như tái tổ hợp trung gian ngoại, hoặc family shuffling, có thể tạo ra các biến thể, mặc dù được điều chế bằng cách sử dụng phytaza gốc theo sáng chế, có thể có độ tương đồng nhỏ hơn 75%.

Việc sắp hàng trình tự cũng như việc xác định sự đồng nhất trình tự có thể một cách thích hợp được thực hiện bằng các chương trình máy tính được biết trong lĩnh vực này như GAP được cung cấp bởi gói chương trình GCG (GCG program package) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), *JouARNI of Molecular*

Biology, 48, p. 443-453). GAP có thể được sử dụng với việc xác lập sau đây phép so sánh trình tự polypeptit: điểm phạt tạo ra GAP bằng 3.0 và điểm phạt mở rộng GAP là 0,1. Việc sắp hàng trình tự được sử dụng, ví dụ, để xác định các vị trí tương ứng trong các polypeptit tương đồng.

Các enzym phytaza được mô tả đặc tính sau khi biểu hiện khác loại trong một hoặc nhiều vật chủ biểu hiện sau: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Các vật chủ biểu hiện khác có thể được sử dụng.

Những cải thiện về đặc tính phytaza theo sáng chế được nhắm tới để sử dụng trong quá trình xử lý thức ăn và thực phẩm cũng như sử dụng làm một chất phụ gia thêm vào các sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm. Cụ thể, những cải thiện nhằm vào tính bền dưới các điều kiện xử lý thức ăn hoặc thực phẩm, tính bền trong quá trình thức ăn xuống dạ dày, và hoạt tính và tính ổn định trong dạ dày người và động vật và/hoặc đường tiêu hóa. Những cải thiện này bao gồm trong số các thông số khác độ bền tăng ở nhiệt độ cao, tốt hơn nếu ở nhiệt độ trên 65°C, tính bền chống lại sự tiêu hóa phân giải protein tăng, tốt hơn là chống lại proteaza của đường tiêu hóa, sự tăng hoạt tính xúc tác ở độ pH thấp, tốt hơn là hoạt tính xúc tác dưới pH 5,5, và hiệu quả nói chung trong việc giải phóng các nhóm phosphat từ phytat.

Sự tăng độ bền ở nhiệt độ cao được xác định bởi nhiệt độ làm mất hoạt tính enzym. Nhiệt độ làm mất hoạt tính enzym được xác định là nhiệt độ tại đó hoạt tính còn lại của một enzym phytaza sau khi ủ trong một khoảng thời gian nhất định và sau đó làm lạnh đến nhiệt độ phòng là 50% hoạt tính còn lại của chính enzym phytaza này được ủ trong một cùng một khoảng thời gian dưới cùng điều kiện ở nhiệt độ phòng. Sự khác nhau về độ bền nhiệt là hiệu số về °C giữa nhiệt độ làm mất hoạt tính enzym của hai enzym này.

Các vị trí và/hoặc đoạn sẽ được gây đột biến để thu được các đặc tính cải thiện được pháp hiện nhờ phép phân tích trình tự và cấu trúc của các phytaza kiểu hoang cũng như bằng cách gây đột biến gen các enzym gốc, cụ thể bằng cách đưa các thể đột biến vào trình tự axit amin kiểu hoang như được xác định ở trình tự SEQ ID No: 3, và tách bằng sàng các biến thể enzym có các đặc tính cải thiện. Bằng cách

này, các đoạn cũng như các vị trí nhất định trong các enzym gốc đã được xác định là cải thiện đáng kể các đặc tính của các enzym phytaza.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến các biến thể phytaza có các đặc tính cải thiện so với phytaza gốc, bao gồm các thể đột biến ở một hoặc nhiều vị trí sau (đánh số theo thứ tự đánh số ở SEQ ID No: 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

và/hoặc ở các vị trí tương ứng trong một phytaza tương đồng với phytaza như được thể hiện ở trình tự axit amin của trình tự SEQ ID No: 3. Các vị trí này được đặc trưng ở chỗ sự đột biến gen của các vị trí này đem lại một cải thiện đối với các đặc tính của các enzym

K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K và F197S.

hoặc các thể đột biến bảo toàn ở mỗi vị trí.

Các tổ hợp được ưu tiên đặc biệt của các thể đột biến bao gồm:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K;

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K;

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F và

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

Phương pháp điều chế các biến thể phytaza

Theo một khía cạnh rộng sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế (các) biến thể enzym phytaza.

Trong một phương án được ưu tiên phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza bao gồm các bước lần lượt dưới đây:

- a) Lựa chọn ít nhất một enzym phytaza gốc, trong đó ít nhất một enzym phytaza gốc được chọn từ i) một polypeptit bao gồm trình tự axit amin tương ứng với một phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp., hoặc một dạng biến đổi, một polypeptit tương đồng, một biến thể, một dạng tương tự chức hoặc một đoạn có hiệu lực của nó, như được mô tả ở đây hoặc ii) ít nhất một biến thể enzym phytaza như được mô tả ở đây;
- b) Tạo ra ít nhất một biến thể phytaza bằng cách tạo ra ít nhất một dạng biến đổi khác của enzym phytaza gốc nói trên mà có thể là bằng cách xen, xóa hoặc thế hoặc kết hợp của chúng, một gốc axit amin trong enzym phytaza gốc nói trên để thu được ít nhất một biến thể enzym phytaza;
- c) Tách bằng sàng ít nhất một biến thể enzym phytaza nói trên để xác định biến thể enzym phytaza cải thiện, so với enzym phytaza gốc có (các) tính chất cải thiện được lựa chọn từ:
 - i. độ ổn định nhiệt cao và/hoặc
 - ii. hoạt tính đặc hiệu và/hoặc
 - iii. độ bền đối với sự phân giải protein
- d) Điều chế biến thể enzym phytaza được cải thiện nói trên, tốt hơn là sản xuất một biến thể enzym phytaza tinh khiết và/hoặc được phân lập.

Trong một phương án được ưu tiên, trong thời gian thực hiện bước b) một tập hợp các biến thể enzym phytaza được tạo ra và trong bước c) ít nhất một phần tập hợp nói trên của các biến thể enzym phytaza được tách bằng sàng.

Trong một phương án được ưu tiên bước a) bao gồm gây đột biến gen một trình tự nucleotit theo các điểm từ 11 đến 13 mã hóa một enzym phytaza gốc, và bước b) bao gồm biểu hiện trình tự nucleotit được biến đổi nhận được trong bước (a) trong một tế bào chủ, và bước c) bao gồm tách bằng sàng các tế bào chủ, hoặc (các) dịch chiết của chúng, thu một biến thể enzym phytaza cải thiện với (các) đặc tính cải thiện nói trên.

Trong một phương án khác sau bước c), và tùy ý bước d), còn bao gồm ít nhất vòng tiếp theo lặp lại các bước từ a) đến c), và tùy ý bước d) trong đó, tốt hơn là trong (các) vòng tiếp theo nói trên, ít nhất một enzym phytaza gốc trong bước a) được chọn từ ít nhất một biến thể enzym phytaza và/hoặc một biến thể phytaza cải thiện nói trên được điều chế theo phương pháp này.

Tốt hơn nếu trong một phương án khác bước c) bao gồm tách bằng sàng các tế bào chủ biểu hiện một biến thể enzym phytaza được cải thiện so với i) enzym phytaza gốc nói trên và/hoặc ii) một polypeptit bao gồm SEQ ID No: 3 chứa đoạn chức của nó, có giá trị chênh lệch độ bền nhiệt ít nhất bằng 2,5.

Trong một phương án khác bước c) bao gồm tách bằng sàng các tế bào chủ biểu hiện một biến thể enzym phytaza được cải thiện so với i) enzym phytaza gốc nói trên và/hoặc ii) một polypeptit bao gồm SEQ ID No: 3 chứa đoạn chức của nó có độ bền với pepsin ít nhất bằng 30.

Trong một phương án khác, bước c) bao gồm tách bằng sàng các tế bào chủ biểu hiện một biến thể enzym phytaza được cải thiện so với i) enzym phytaza gốc nói trên và/hoặc ii) polypeptit bao gồm SEQ ID No: 3 có tỷ lệ hoạt tính đặc hiệu so với phytaza được mã hóa bởi SEQ ID No: 3 ít nhất bằng 110.

Sáng chế cũng đề xuất một phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza, phương pháp này bao gồm:

a) Lựa chọn một enzym phytaza gốc, trong đó enzym phytaza gốc được chọn từ:

- i. một enzym phytaza gốc có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID No: 3 chứa đoạn chức của nó
- ii. một enzym phytaza gốc có nguồn gốc từ *Buttiauxella* spp.
- iii. ít nhất một biến thể enzym phytaza

b) Sản xuất ít nhất một dạng khác bằng cách xen, xóa hoặc thế của một gốc axit amin trong enzym phytaza gốc để thu được một biến thể enzym phytaza,

c) Tách bằng sàng một biến thể enzym phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều:

- i. độ ổn định nhiệt cao và/hoặc
 - ii. hoạt tính đặc hiệu và/hoặc
 - iii. độ bền đối với sự phân giải protein và/hoặc
- d) Điều chế biến thể enzym phytaza

Tùy ý, ít nhất các bước a) đến c) có thể được lặp lại trong một hoặc nhiều vòng (lặp) tiếp theo. Vì vậy, cũng được dự định rằng enzym phytaza gốc là một biến thể enzym phytaza được điều chế bởi các vòng trước đó của phương pháp từ a) đến c) nói trên.

Trong một phương án khác sáng chế đề xuất một phương pháp điều chế một biến thể phytaza, bao gồm các bước dưới đây:

(a) tạo ra một enzym phytaza gốc, được lựa chọn từ

(i) một enzym phytaza có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc đoạn có hiệu lực của nó

- (ii) một enzym phytaza có nguồn gốc từ *Buttiarella* spp.,
 - (iii) ít nhất một biến thể enzym phytaza
- (b) tạo ra một tập hợp các biến thể phytaza bằng cách làm thay đổi phytaza gốc, Tốt hơn nếu, (các) dạng thay đổi nói trên nhận được qua việc xen, làm xóa hoặc thế ít nhất bằng một gốc axit amin trong phytaza gốc, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng.
- (c) tách bằng sàng tập hợp một biến thể phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều đặc tính cải thiện sau::
- (i) độ ổn định nhiệt cao và/hoặc
 - (ii) hoạt tính đặc hiệu cao và/hoặc
 - (iii) độ bền đối với sự phân giải protein cao,
- (d) lựa chọn một hoặc nhiều biến thể phytaza từ tập hợp các phytaza.
- (e) tùy ý lặp lại tuần hoàn các bước từ (a) đến (c), và tốt hơn là trong đó các biến thể phytaza được chọn từ một chu kỳ được sử dụng các phytaza đầu tiên trong chu kỳ tiếp theo.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất một phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza, phương pháp này bao gồm:

- a) Làm đột biến gen trình tự nucleotit mã hóa một enzym phytaza gốc, trong đó enzym phytaza gốc được chọn từ
 - i. một enzym phytaza gốc có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID No: 3 hoặc đoạn có hiệu lực của nó
 - ii. một enzym phytaza gốc có nguồn gốc từ *Buttiarella* spp.
 - iv. ít nhất một biến thể enzym phytaza

b) Biểu hiện trình tự nucleotit được biến đổi nhận được trong bước (a) trong một tế bào chủ, và

c) Tách bằng sàng các tế bào chủ biểu hiện một biến thể enzym phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều đặc tính cải thiện sau:

i) độ ổn định nhiệt cao và/hoặc

ii) hoạt tính đặc hiệu cao và/hoặc

iii) độ bền đối với sự phân giải protein cao và/hoặc

d) Điều chế biến thể enzym phytaza được biểu hiện bởi tế bào chủ

Tùy ý, các bước từ a) đến c), tùy ý bao gồm bước d) có thể được lặp lại trong một hoặc nhiều vòng (lặp) tiếp theo.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất một phương pháp điều chế một biến thể phytaza, bao gồm các bước dưới đây:

(a) làm đột biến gen trình tự nucleotit mã hóa một enzym phytaza gốc để tạo ra một tập hợp các biến thể nucleotit được biến đổi, trong đó tốt hơn nếu, (các) dạng thay đổi nói trên nhận được qua việc xen, xóa hoặc thế ít nhất bằng một gốc axit amin trong phytaza gốc, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng, và trong đó enzym phytaza gốc được chọn từ

(i) một enzym phytaza có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc đoạn có hiệu lực của nó

(ii) một enzym phytaza có nguồn gốc từ *Buttiarella* spp.,

(iii) ít nhất một biến thể enzym phytaza

(b) biểu hiện tập hợp các biến thể nucleotit nhận được ở bước (a) trong một tập hợp các tế bào chủ tương ứng, và

(c) tách bằng sàng tập hợp một biến thể phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều đặc tính cải thiện sau::

(i) độ ổn định nhiệt cao và/hoặc

(ii) hoạt tính đặc hiệu cao và/hoặc

(iii) độ bền đối với sự phân giải protein cao,

(d) lựa chọn một hoặc nhiều biến thể phytaza từ tập hợp các phytaza.

(e) tùy ý lặp lại các bước từ (a) đến (c) theo chu kỳ, và tốt hơn nếu trong đó các biến thể phytaza được chọn từ một chu kỳ được sử dụng cho các phytaza đầu tiên trong chu kỳ tiếp theo.

Khi thích hợp, trong các phương pháp nói trên để điều chế một biến thể enzym phytaza, trình tự nucleotit nói trên tốt hơn là một trình tự ADN.

Trình tự nucleotit tốt hơn là một phân tử axit nucleic tinh khiết và/hoặc được phân lập hoặc trình tự nucleotit mã hóa cho enzym bao gồm trình tự axit amin tương ứng với phytaza *Buttiauxella* sp., hoặc một đồng đẳng của chúng như được mô tả ở đây.

Phytaza gốc tốt hơn là được lựa chọn từ SEQ ID No: 3 hoặc đoạn có hiệu lực của nó hoặc một đồng đẳng của phytaza *Buttiauxella* sp. như được bộc lộ trong SEQ ID No: 3. như được mô tả ở đây.

Trong các phương án trên của sáng chế, mà đề cập đến các phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza enzym phytaza gốc/nucleotit mã hóa enzym phytaza gốc/nucleotit tốt hơn là một phytaza kiểu hoang.

Tuy nhiên, trong một phương án khác, gốc có thể là một biến thể được điều chế bởi các vòng gây đột biến gen trước đó. Tức là theo một phương án, các phương pháp điều chế các biến thể enzym phytaza được lặp lại, trong đó các bước từ a) đến c) (tùy ý bao gồm bước d)) được lặp lại ít nhất nhiều hơn một lần. Trong

các phương án này, các phương pháp đột biến gen được sử dụng trong vòng đột biến thứ nhất tốt hơn là PCR pron sai số, tốt hơn nữa là PCR ngưỡng sai số. Các vòng tiếp theo có thể là PCR pron sai số, tốt hơn nữa là PCR ngưỡng sai số, nhưng cách khác có thể là gây đột biến trên cơ sở tái tổ hợp, trong đó các nhóm ít nhất gồm hai biến thể cải thiện độc lập được xác định trong các vòng đột biến gen đầu, được tái tổ hợp trong vòng thứ hai hoặc tiếp theo của quá trình đột biến gen để thu được ít nhất một biến thể tái tổ hợp (ví dụ sử dụng các phương pháp tái tổ hợp trong gen hoặc phản ứng chuỗi enzym tái tổ hợp).

Sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực rằng các phương pháp đột biến gen khác cũng có thể được sử dụng, bao gồm thiết kế tỷ lệ, đột biến gen quét vị trí, hoặc đột biến gen được tạo ra bằng phương pháp hóa học/phóng xạ.

Trong các phương án trên của sáng chế, mà đề cập đến các phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza biến thể enzym phytaza tốt hơn là được tách bằng sàng để thu được biến thể có độ ổn định nhiệt cao.

Trong các phương án trên của sáng chế, mà đề cập đến các phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza, biến thể enzym phytaza tốt hơn là được tách bằng sàng để thu được biến thể có ít nhất một thông số riêng lẻ, tốt hơn nếu được lựa chọn từ độ ổn định nhiệt cao, độ bền đối với sự phân giải protein cao hoặc hoạt tính đặc hiệu cao, tốt nhất là độ ổn định nhiệt cao.

Tốt hơn nếu, việc tách bằng sàng để thu được enzym có thông số đầu tiên nói trên, được tiến hành ở ít nhất vòng đột biến gen thứ nhất bao gồm ít nhất bằng các bước từ a) đến c), trong đó bước c) bao gồm ít nhất việc tách bằng sàng để thu được enzym có thông số đầu tiên nói trên. Vòng đột biến gen thứ nhất này sau đó có thể được tiếp tục bởi các vòng (lặp lại) đột biến gen tiếp theo và việc lựa chọn bao gồm các bước từ a) đến c) (tùy ý bao gồm bước d)) trong đó việc lựa chọn trong các vòng tiếp theo nói trên có thể được lựa chọn từ cùng một thông số lựa chọn như được sử dụng trong bước c) của vòng thứ nhất nói trên, hoặc cách khác một thông số khác.

Trong các vòng lặp lại của các phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza nói trên, tốt hơn là thông số đầu tiên được chọn từ độ ổn định nhiệt cao, độ bền đối với sự phân giải protein cao hoặc hoạt tính đặc hiệu cao, tốt nhất là độ ổn định nhiệt cao. Tốt hơn nếu, khi vòng đột biến gen thứ nhất được tiến hành để lựa chọn các biến thể có độ ổn định nhiệt cao, trong thời gian tiến hành (các) vòng (lặp lại) đột biến tiếp theo bao gồm các bước từ a) đến c), thông số nói trên được chọn từ độ ổn định nhiệt cao, độ bền đối với sự phân giải protein cao hoặc hoạt tính đặc hiệu cao, tốt nhất là độ bền đối với sự phân giải protein cao hoặc hoạt tính đặc hiệu cao.

Trong các phương án trên theo sáng chế, mà đề cập đến các phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza biến thể enzym phytaza tốt hơn là được tách bằng sàng để thu được độ ổn định nhiệt cao và độ bền đối với sự phân giải protein cao và hoạt tính đặc hiệu cao trong ít nhất một vòng đột biến (các bước từ a đến c), tốt hơn nếu nhiều hơn một vòng, tức là các vòng lặp lại lựa chọn.

Enzym phytaza gốc tốt hơn là có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29.

Trong các phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza, phương pháp mà bao gồm gây đột biến trình tự ADN mã hóa một enzym phytaza gốc, trình tự ADN mã hóa một enzym phytaza gốc tốt hơn là được sử dụng để gây đột biến ngẫu nhiên, tốt hơn nữa là đột biến PCR pron sai số, thậm chí tốt hơn nữa là đột biến PCR ngưỡng sai số.

Các phương pháp được ưu tiên để gây đột biến trình tự ADN mã hóa một enzym phytaza gốc là PCR pron sai số, tốt hơn nữa là PCR ngưỡng sai số, các phương pháp đột biến khác có thể được sử dụng thay thế cho PCR pron sai số /ngưỡng sai số hoặc kết hợp với phương pháp PCR pron sai số /ngưỡng sai số. Xem Ví dụ 12 để tham khảo các phương pháp PCR pron sai số và PCR ngưỡng sai số thích hợp. Phương pháp thích hợp khác để thực hiện PCR đột biến gen được bộc lộ bởi Cadwell và Joyce (PCR Methods Appl. 3(1994), 136-140)”

Thuật ngữ 'sự biểu hiện trong một tế bào chủ' khi được sử dụng trong ngữ cảnh các phương án của sáng chế dùng để chỉ 'một phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza' tốt hơn là được xác định là phương pháp sản xuất biến thể enzym phytaza trong một sinh vật sống, cơ quan hoặc tế bào như được xác định ở đây. Các vật chủ được ưu tiên là *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Các enzym phytaza được trình bày chi tiết ở đây được mô tả đặc điểm sau khi biểu hiện khác loại trong một hoặc nhiều vật chủ biểu hiện sau: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Tuy nhiên, xét đến mục đích lựa chọn các biến thể enzym phytaza như được mô tả ở đây, các phương pháp này có thể được sử dụng *in vitro* các phương pháp biểu hiện các biến thể enzym phytaza, tốt hơn là để sử dụng trong bước (c) của các phương pháp nói trên, mà sử dụng các cơ chế phiên mã và dịch mã được phân lập từ một hoặc nhiều tế bào được phân lập từ một hoặc nhiều sinh vật sống hoặc virus. Phương pháp sản xuất *in vitro* các phytaza biến đổi theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để lựa chọn các phytaza biến đổi ưu tiên. Một cách thích hợp, sự biểu hiện *in vitro* có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn. Để tham khảo, xem 'In vitro Expression Guide' available from Promega Inc (Part# BR053).

Xác định các kiểu hình biến đổi

Các biến thể có độ bền nhiệt cao (sự chênh lệch về độ bền nhiệt) tốt hơn là được xác định sử dụng các phương pháp được bộc lộ trong Ví dụ 12.

Enzym phytaza biến đổi được điều chế bởi phương pháp điều chế các biến thể enzym phytaza tốt hơn là có giá trị chênh lệch về độ bền nhiệt (T.D) ít nhất bằng 1,5, tốt hơn nữa là 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 tốt nhất là ít nhất 20.

Các biến thể bền đối với sự phân giải protein cao tốt hơn là được xác định sử dụng các phương pháp được bộc lộ trong Ví dụ 12.

Tốt hơn nếu biến thể enzym phytaza theo sáng chế có độ bền đối với sự phân giải protein (hoạt tính còn lại) ít nhất bằng 45%, tốt hơn nếu 50%, 55%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 65%, tốt nhất là ít nhất 70%.

Tốt hơn nếu biến thể phytaza theo sáng chế có hoạt tính đặc hiệu lớn hơn 100% hoạt tính wt ở độ pH bằng 4,0, tốt hơn nếu lớn 105%, 110%, tốt hơn nữa là lớn hơn 114%.

Các phương án cải biến khác

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế thức ăn động vật bao gồm một biến thể enzym phytaza, phương pháp này bao gồm các bước liên tiếp sau i) thực hiện một hoặc nhiều phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza nói trên, và ii) bổ sung biến thể enzym phytaza đã điều chế vào thức ăn động vật.

Theo một phương án cụ thể sáng chế đề xuất một phương pháp điều chế thức ăn động vật bao gồm một biến thể enzym phytaza, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) Lựa chọn một enzym phytaza gốc, trong đó enzym phytaza gốc được chọn từ
 - i. một enzym phytaza gốc có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID No: 3 hoặc đoạn có hiệu lực của nó,
 - ii. một enzym phytaza gốc có nguồn gốc từ *Buttiauxella* spp., tốt hơn nếu *Buttiauxella* P1-29. và/hoặc
 - iii. ít nhất một biến thể enzym phytaza;
- b) Tạo ra ít nhất một dạng khác bằng cách xen, xóa hoặc thế của một gốc axit amin trong enzym phytaza gốc để thu được một biến thể enzym phytaza.
- c) Tách bằng sàng một biến thể enzym phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều đặc tính cải thiện sau:

- i. độ ổn định nhiệt cao và/hoặc
- ii. hoạt tính đặc hiệu và/hoặc
- iii. độ bền đối với sự phân giải protein và/hoặc

d) Điều chế biến thể enzym phytaza

e) Bổ sung biến thể enzym phytaza đã điều chế vào thức ăn động vật.

Trong một phương án khác sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế thức ăn động vật bao gồm một biến thể enzym phytaza.

a) Gây đột biến trình tự nucleotit (tốt hơn nếu ADN) mã hóa một enzym phytaza gốc, trong đó nucleotit nói trên được chọn từ một nucleotit mã hóa cho

i. một enzym phytaza gốc có ít nhất 75% độ tương đồng với SEQ ID No: 3 chứa đoạn chức của nó , và/hoặc

ii. một enzym phytaza gốc có nguồn gốc từ *Buttiauxella* spp., tốt hơn là *Buttiauxella* P1-29.

b) Biểu hiện trình tự nucleotit đã đột biến (tốt hơn nếu ADN) nhận được trong bước (a) trong một tế bào chủ, và

c) Tách bằng sàng các tế bào chủ biểu hiện để thu được một biến thể enzym phytaza so với enzym phytaza gốc có các đặc tính cải thiện, như được mô tả ở đây, tốt hơn nếu được lựa chọn từ một hoặc nhiều đặc tính cải thiện sau:

- i. độ ổn định nhiệt cao và/hoặc
- ii. hoạt tính đặc hiệu cao và/hoặc
- iii. độ bền đối với sự phân giải protein cao và/hoặc

d) Điều chế biến thể enzym phytaza được biểu hiện bởi tế bào chủ

f) Bổ sung biến thể enzym phytaza đã điều chế vào thức ăn động vật.

Các phương án được mô tả và các khía cạnh được ưu tiên của phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza cũng áp dụng cho các phương pháp điều chế nói trên cho thức ăn động vật bao gồm một biến thể enzym phytaza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một tế bào chủ được gây biến nạp hoặc chuyển nhiễm với một axit nucleic mã hóa một phytaza như được mô tả ở đây.

Một cách thích hợp, tế bào chủ theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm một phytaza gồm có một trình tự axit amin, hoặc đoạn có hiệu lực của nó, như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc một trình tự mà có ít nhất 75% độ tương đồng với nó.

Trong một phương án được ưu tiên, tế bào chủ nói trên sản xuất một phytaza.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một tế bào chủ được gây biến nạp hoặc truyền nhiễm với một axit nucleic mã hóa một phytaza theo sáng chế. Tốt hơn nếu, phytaza là một phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp. như được mô tả ở đây hoặc một đồng đẳng hoặc dẫn xuất của nó. Một cách thích hợp, enzym phytaza này bao gồm một trình tự axit amin, hoặc đoạn có hiệu lực của nó, như được ở hiện trong một trình tự bất kỳ của trình tự SEQ ID No: 3 hoặc một trình tự mà có ít nhất 75% độ tương đồng (đồng nhất) với nó. Tốt hơn nếu, tế bào chủ nói trên tạo ra một phytaza.

Theo một phương án, trình tự nucleotit mà có thể được sử dụng trong sáng chế có thể thu được từ (mặc dù nó không bắt buộc phải thu được từ) *Buttiauxella* sp., mặc dù phải nhận thừa nhận rằng các enzym được phân lập hoặc tinh chế từ các giống tương đương có thể được sử dụng như nhau.

Một cách thích hợp, tế bào chủ có nguồn gốc từ một vi sinh vật bao gồm vi khuẩn và nấm, bao gồm men. Trong một phương án đặc biệt được ưu tiên tế bào chủ là một tế bào vi khuẩn chưa có nhân điển hình. Các tế bào chủ vi khuẩn thích hợp bao gồm vi khuẩn từ các nhóm phân loại sinh vật chưa có nhân điển hình khác nhau bao gồm proteobacteria, bao gồm các thành viên của phân nhóm vi khuẩn

alpha, beta, gamma, delta và epsilon, gram-dương như Actinomycetes, Firmicutes, Clostridium và các họ tương tự, flavobacteria, cyanobacteria, vi khuẩn lưu huỳnh màu lục, vi khuẩn không lưu huỳnh màu lục, và archaea. Đặc biệt được ưu tiên là Enterobacteriaceae như proteobacteria *Escherichia coli* thuộc giống chia nhỏ gamma và vi khuẩn GC-Gram dương thấp như *Bacillus*.

Các tế bào chủ nấm thích hợp bao gồm men được lựa chọn từ nhóm bao gồm Ascomycota bao gồm Saccharomycetes như *Pichia*, *Hansenula*, và *Saccharomyces*, Schizosaccharomycetes như *Schizosaccharomyces pombe* và Ascomycota biến thái dần bao gồm *Aspergillus*.

Các tế bào chủ có nhân điển hình thích hợp khác bao gồm các tế bào côn trùng như SF9, SF21, Trychoplusiani và tế bào M121. Ví dụ, các polypeptit theo sáng chế có thể thuận lợi được biểu hiện trong các hệ tế bào côn trùng. Cùng với sự biểu hiện trong các tế bào côn trùng trong dung dịch nuôi cấy, các gen phytaza có thể được biểu hiện trong toàn bộ các sinh vật côn trùng. Các vector virus như baculovirus cho phép làm truyền nhiễm hoàn toàn côn trùng. Các côn trùng lớn như nhộng tằm cung cấp một sản lượng cao protein khác loại. Protein này có thể được chiết từ các côn trùng theo các kỹ thuật chiết thông thường. Các vector biểu hiện này thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm toàn bộ các vector có khả năng biểu hiện các protein ngoại trong các dòng tế bào côn trùng.

Các tế bào chủ khác bao gồm các tế bào thực vật được lựa chọn từ nhóm bao gồm các thể nguyên sinh, các tế bào, calli, các mô, các cơ quan, các hạt, mầm, noãn, hợp tử v.v.. Sáng chế cũng đề xuất toàn bộ thực vật có thể được biến nạp và bao gồm ADN tái tổ hợp theo sáng chế.

Thuật ngữ "thực vật" nói chung bao gồm tảo có nhân thực, các thực vật có phôi bao gồm Bryophyta, Pteridophyta và Spermatophyta như Gymnospermae và Angiospermae.

Tốt hơn nữa, tế bào chủ nói trên là một vi sinh vật. Các vi sinh vật được ưu tiên bao gồm các tế bào vi khuẩn chưa có nhân điển hình tốt hơn là, *E. coli*, *B.*

subtilis và các loài khác của giống *Bacillus*, men, tốt hơn là *Hansenula polymorpha* và *Schizosaccharomyces pombe*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một tế bào vi khuẩn giống *Buttiauxella* sp. P1-29 được nộp lưu bởi Danisco Global Innovation, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460 Kantvik, Finland on 22 September 2004 với số hiệu lưu giữ NCIMB 41248. Tế bào này có thể được đưa trực tiếp vào thức ăn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp sản xuất các phytaza bao gồm việc gây truyền nhiễm một tế bào chủ bằng một vector biểu hiện hoặc plasmit theo sáng chế, nuôi cấy tế bào chủ nói trên dưới các điều kiện để biểu hiện phytaza và chiết phytaza này từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ.

Một cách thích hợp, phương pháp nói trên là để sản xuất một phytaza bao gồm biểu hiện một trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc một trình tự có ít nhất 75% độ tương đồng với nó hoặc một đoạn có hiệu lực của nó trong một tế bào chủ và chiết protein đã được tiết ra từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ.

Một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một chế phẩm thức ăn bao gồm một phytaza theo sáng chế. Tốt hơn nếu, chế phẩm thức ăn bao gồm một phytaza với hàm lượng 10-10000 U/kg thức ăn, tốt hơn là 200-2000U/kg thức ăn, tốt hơn nữa là 500-1000 U/kg thức ăn.

Theo một phương án, chế phẩm thức ăn bao gồm một tế bào chủ theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề xuất việc sử dụng một phytaza theo sáng chế trong thực phẩm hoặc thức ăn động vật.

Các khía cạnh được ưu tiên

Các khía cạnh được ưu tiên được trình bày các yêu cầu bảo hộ kèm theo đây và trong phần mô tả và các Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Các ưu điểm bổ sung

Sáng chế là rất thuận lợi vì nó đề xuất các phytaza có một số tính chất khiến chúng đặc biệt hữu hiệu làm chất phụ gia cho thức ăn động vật.

Cụ thể, các phytaza theo sáng chế hoạt động ở độ pH thấp và, tốt hơn là trong khoảng pH từ 2 đến 5,5 với hoạt tính tối đa ở khoảng pH 4 - 4,5. Một cách thích hợp, các phytaza theo sáng chế hoạt động ở các độ pH thấp (duy trì khoảng 40% hoạt tính tối đa ở độ pH bằng 2,5) trong môi trường dạ dày.

Ngoài ra, các phytaza theo sáng chế được tiết hiệu quả trong cả vật chủ tự nhiên và trong quá trình biểu hiện khác loại như vậy dẫn đến việc sản xuất và phân lập hiệu quả hơn để bổ sung vào thức ăn.

Ngoài ra, các phytaza theo sáng chế, tốt hơn là có khoảng hoạt tính đặc hiệu cơ chất rộng bao gồm các cơ chất penta- tetra, tri và di-phosphat từ đó làm tăng tổng lượng phosphat sẵn sàng để hấp thụ bởi động vật (phosphat sẵn có). Các phytaza theo sáng chế cũng tốt hơn là có hoạt tính đặc hiệu cao trong khoảng 300 U/mg +/- xấp xỉ 10%, tốt hơn nếu ít nhất 300 U/mg.

Các sản phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm các chất phụ gia/các chất bổ sung vào thực phẩm hoặc thức ăn. Các sản phẩm này cũng có thể hữu dụng trong việc sản xuất thương mại các inositol-phosphat khác nhau.

PHYTAT/AXIT PHYTIC/CÁC PHYTAZA

Axit phytic (*myo*-inositol hexakisphosphat) là một thành phần quan trọng trong ngũ cốc, hạt họ đậu và hạt có dầu. Dạng muối, phytat, là dạng dự trữ chính phospho trong các thực vật này.

Các phytaza xúc tác quá trình thủy phân phosphat monoeste của axit phytic mà dẫn đến sự hình thành từng bước các *myo*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- và monophosphat, cũng như giải phóng phosphat vô cơ.

Các thuật ngữ “phytaza kiểu hoang” hoặc “kiểu hoang” được sử dụng ở đây để chỉ một enzym phytaza có một trình tự axit amin được tìm thấy trong tự nhiên.

Các thuật ngữ “biến thể phytaza” hoặc “biến thể” hoặc “dạng biến đổi” để chỉ một enzym phytaza với một trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin của một phytaza gốc có một hoặc nhiều gốc thế, xen và/hoặc mất axit amin, đều dùng để chỉ “các thể đột biến”.

Các thuật ngữ “phytaza gốc” hoặc “enzym gốc” để chỉ một enzym phytaza lấy từ một biến thể phytaza được dẫn xuất. Một phytaza gốc có thể là một phytaza kiểu hoang hoặc biến thể phytaza khác. Cụ thể, theo sáng chế, một “phytaza gốc” có thể có nguồn gốc từ một giống *Buttiauxella* sp.. Một cách thích hợp, “phytaza gốc” có nguồn gốc từ *Buttiauxella* giống P1-29 như được mô tả ở đây tốt hơn là có trình tự axit amin được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO:3.

Được phân lập

Theo một khía cạnh, tốt hơn nếu trình tự axit amin hoặc nucleotit là ở dạng được phân lập. Thuật ngữ “được phân lập” có nghĩa là trình tự ít nhất về cơ bản không lẫn với ít nhất một phần khác, với nó phần trình tự này về bản chất liên quan đến tự nhiên và được tìm thấy trong tự nhiên.

Được tinh chế

Theo một khía cạnh, tốt hơn nếu trình tự axit amin hoặc nucleotit là ở dạng tinh khiết. Thuật ngữ “được tinh chế” có nghĩa là trình tự nằm ở trạng thái tương đối tinh khiết ít nhất 1%, 5% tinh khiết hoặc 10% tinh khiết, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% tinh khiết. Trong một phương án được ưu tiên, khi đề cập đến một polypeptit, độ tinh khiết như được xác định ở trên được xác định dưới dạng được tinh chế từ các polypeptit bằng phương pháp điện chuyển SDS-PAGE. Trong một phương án được ưu tiên, khi đề cập đến một polynucleotit, độ tinh khiết như được xác định ở trên được xác định dưới dạng được tinh chế từ các polynucleotit khác.

TRÌNH TỰ NUCLEOTIT

Phạm vi của sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit mã hóa các enzym có các tính chất đặc hiệu như được xác định ở đây.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit” được sử dụng ở đây dùng để chỉ một trình tự oligonucleotit, axit nucleic hoặc một trình tự polynucleotit, và dạng biến thể, các chất đồng đẳng, các đoạn và các dẫn xuất của chúng (như các phần của chúng). Trình tự nucleotit có thể có nguồn gốc tái tổ hợp hoặc tổ hợp hoặc hệ gen mà có thể là sợi đôi hoặc sợi đơn là sợi có nghĩa hoặc sợi không có nghĩa.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit” hoặc “phân tử axit nucleic” liên quan đến sáng chế bao gồm ADN hệ gen, cADN, ADN tổng hợp, và ARN. Tốt hơn là, nó có nghĩa là ADN, tốt hơn nữa là trình tự cADN mã hóa cho các enzym theo sáng chế.

Trong một phương án được ưu tiên, trình tự nucleotit khi liên quan đến hoặc khi được bao gồm trong phạm vi của sáng chế không bao gồm trình tự nucleotit tự nhiên theo sáng chế khi nằm trong môi trường tự nhiên của nó và khi nó được liên kết với (các) trình tự liên quan tự nhiên của nó mà cũng nằm trong môi trường tự nhiên của nó (chúng). Để dễ tham khảo, chúng ta sẽ gọi phương án được ưu tiên này là “trình tự nucleotit không tự nhiên”. Theo khía cạnh này, thuật ngữ “trình tự nucleotit tự nhiên” có nghĩa là toàn bộ trình tự nucleotit nằm trong môi trường tự nhiên của nó khi được liên kết điều khiển với một gen khởi đầu mà nó được kết hợp một cách tự nhiên, gen khởi đầu này cũng nằm trong môi trường tự nhiên của nó. Tuy nhiên, trình tự axit amin được bao gồm bởi phạm vi của sáng chế có thể được phân lập và/hoặc tinh chế sau khi biểu hiện một trình tự nucleotit trong sinh vật tự nhiên của nó. Tuy nhiên, tốt hơn là trình tự axit amin được bao gồm trong phạm vi của sáng chế có thể được biểu hiện bởi một trình tự nucleotit trong sinh vật tự nhiên của nó nhưng trong đó trình tự nucleotit không nằm dưới sự điều khiển của gen khởi đầu mà nó được kết hợp tự nhiên trong sinh vật đó.

ĐIỀU CHẾ MỘT TRÌNH TỰ NUCLEOTIT

Điển hình, trình tự nucleotit được bao gồm trong phạm vi của sáng chế hoặc các trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp (tức là ADN tái tổ hợp). Tuy nhiên, trong một phương án thay thế theo sáng chế, trình tự nucleotit có thể được tổng hợp, toàn bộ hoặc một phần, sử dụng các phương pháp hóa học đã được biết rõ trong lĩnh vực này (xem tài liệu của Caruthers MH *et al.*, (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23 và Horn T *et al.*, (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

Một trình tự nucleotit mã hóa hoặc một enzym mà có các tính chất đặc hiệu như được xác định ở đây hoặc một enzym thích hợp cho việc làm biến đổi có thể được xác định và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế từ tế bào hoặc sinh vật bất kỳ sản xuất enzym này. Các phương pháp khác nhau được biết rõ trong lĩnh vực này để xác định và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế các trình tự nucleotit. Ví dụ, các kỹ thuật khuếch đại PCR để điều chế nhiều hơn một trình tự có thể được sử dụng ngay khi một trình tự thích hợp được xác định và/hoặc phân lập và/hoặc tinh chế.

Dưới dạng ví dụ, một thư viện ADN hệ gen và/hoặc cADN có thể được thiết kế bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể hoặc ARN thông tin lấy từ sinh vật sản xuất enzym. Nếu trình tự axit amin của enzym hoặc một phần của trình tự axit amin của enzym được biết, các oligonucleotit đoạn dò được đánh dấu có thể được tổng hợp và sử dụng để xác định các clon mã hóa enzym từ thư viện hệ gen được điều chế từ vi sinh vật. Các khác, một oligonucleotit đoạn dò được đánh dấu chứa các trình tự tương đồng với một gen enzym đã biết khác có thể được sử dụng để xác định các clon mã hóa enzym. Trong trường hợp sau, các điều kiện lai và rửa có độ chặt chẽ thấp được sử dụng.

Các khác, các clon mã hóa enzym có thể được xác định bằng cách xen các đoạn ADN hệ gen vào một vector biểu hiện, như một plasmit, gây biến nạp vi khuẩn âm enzym với thư viện ADN hệ gen thu được, và sau đó đặt vi khuẩn được biến nạp trên các tấm aga-aga chứa một cơ chất cho enzym (ví dụ maltoza cho

glucosidaza (maltaza) tạo ra enzym), do đó cho phép các clon biểu hiện enzym được xác định.

Trong một phương án khác nữa, trình tự nucleotit mã hóa enzym có thể được điều chế theo phương pháp tổng hợp bởi các phương pháp chuẩn được thiết lập bất kỳ, ví dụ phương pháp phosphoroamidit được mô tả bởi Beucage S.L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* **22**, p 1859-1869, hoặc phương pháp được mô tả bởi Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* **3**, p 801-805. Trong phương pháp phosphoroamidit, các oligonucleotit được tổng hợp, ví dụ trong một thiết bị tổng hợp ADN tự động, được tính chế, ủ, thất và tách dòng trong các vector thích hợp.

Trình tự nucleotit có thể có nguồn gốc tổng hợp và hệ gen hỗn hợp, có nguồn gốc cADN và tổng hợp hỗn hợp, hoặc gốc cADN và hệ gen hỗn hợp, được điều chế bằng cách thất các đoạn có gốc tổng hợp, hệ gen hoặc cADN (khi thích hợp) theo các kỹ thuật chuẩn. Mỗi đoạn được thất tương ứng với các phần khác nhau của toàn bộ trình tự nucleotit. Trình tự ADN cũng có thể được điều chế bằng phản ứng mạch polymeraza (PCR) sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu, ví dụ như được mô tả trong US 4,683,202 hoặc trong tài liệu của Saiki R K *et al.*, (*Science* (1988) **239**, pp 487-491).

Do có sự thoái hóa mã gen, các trình tự nucleotit có thể được sản xuất dễ dàng trong đó việc sử dụng codon bộ ba, cho một số hoặc tất cả các axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit gốc này, đã được thay đổi để sản xuất một trình tự nucleotit có độ tương đồng thấp so với trình tự nucleotit gốc mà mã hóa cho nó, hoặc một biến thể, trình tự axit amin mà được mã hóa bởi trình tự nucleotit gốc. Ví dụ, đối với hầu hết các axit amin, sự thoái hóa mã gen nằm ở vị trí thứ ba trong codon bộ ba (vị trí thứ ba (wobble)) (tham khảo xem tài liệu của Stryer, Lubert, *Biochemistry*, Third Edition, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7) do đó, một trình tự nucleotit trong đó toàn bộ codon bộ ba được làm "trơ" ở vị trí thứ ba sẽ giống khoảng 66% với trình tự nucleotit gốc tuy nhiên, trình tự nucleotit đã được sửa sẽ mã hóa cho chính nó, hoặc một biến thể, trình tự axit amin đầu tiên dưới dạng trình tự nucleotit gốc.

Do đó, sáng chế còn đề cập đến trình tự nucleotit bất kỳ có sử dụng codon bộ ba khác cho ít nhất một codon bộ ba mã hóa axit amin, mà mã hóa cho nó, hoặc một biến thể, trình tự polypeptit là trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit gốc.

Ngoài ra, các sinh vật đặc hiệu điển hình có một khuynh hướng là các codon bộ ba được sử dụng để mã hóa cho các axit amin. Các bảng sử dụng codon được ưu tiên là rất có sẵn, và có thể được sử dụng để điều chế các gen được tối ưu hóa bởi codon. Các kỹ thuật tối ưu hóa codon thường được sử dụng để tối ưu hóa sự biểu hiện của các gen biến đổi trong một thể chủ khác loại.

TIẾN HÓA PHÂN TỬ

Khi một trình tự nucleotit mã hóa enzym được phân lập và/hoặc tinh chế, hoặc một trình tự nucleotit tinh khiết mã hóa enzym đã được nhận dạng, người ta có thể mong muốn thay đổi trình tự nucleotit được chọn, ví dụ có thể mong muốn gây đột biến trình tự để điều chế một enzym theo sáng chế.

Các thể đột biến có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các oligonucleotit tổng hợp. Các oligonucleotit này chứa các trình tự nucleotit nằm cạnh các vị trí đột biến mong muốn.

Một phương pháp thích hợp được bộc lộ trong tài liệu của Morinaga *et al* (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Một phương pháp khác đưa các thể đột biến vào trong các trình tự nucleotit mã hóa enzym được mô tả trong tài liệu của Nelson và Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151).

Thay cho việc đột biến trực tiếp vị trí, như được mô tả ở trên, có thể tạo ra các thể đột biến một cách ngẫu nhiên ví dụ sử dụng một bộ kit thương mại như bộ kit đột biến gen GeneMorph PCR của hãng Stratagene, hoặc bộ kit đột biến gen ngẫu nhiên Diversify PCR của Clontech.

Một phương pháp thứ ba để thu được các trình tự mới là phân đoạn các trình tự nucleotit không tương đồng, hoặc bằng cách sử dụng bất kỳ các enzym giới hạn

nào hoặc một enzym như ADNza I, và lắp ráp lại các trình tự nucleotit đầy đủ mã hóa cho các protein chức. Cách khác, có thể sử dụng một hoặc nhiều trình tự nucleotit không đồng nhất và tạo ra các thể đột biến trong quá trình tái lắp ráp trình tự nucleotit đầy đủ.

Vì vậy, có thể tạo ra các thể đột biến trực tiếp vị trí hoặc ngẫu nhiên trong một trình tự nucleotit, hoặc *in vivo* hoặc *in vitro*, và sau đó tách bằng sàng để thu được polypeptit được mã hóa có độ chức cải thiện bằng các phương pháp khác nhau.

Ví dụ không giới hạn, các thể đột biến hoặc biến thể tự nhiên của một trình tự polynucleotit có thể được tái tổ hợp với kiểu hoang hoặc các thể đột biến khác hoặc các biến thể tự nhiên để tạo ra các biến thể mới. Các biến thể mới này cũng có thể được tách bằng sàng để thu được polypeptit được mã hóa có độ chức cải thiện. Việc sản xuất các biến thể được ưu tiên mới có thể thu được bằng các phương pháp khác nhau đã được thiết lập trong lĩnh vực này, ví dụ phương pháp đột biến ngưỡng sai phân (Error Threshold Mutagenesis) (WO 92/18645), đột biến ngẫu nhiên trung gian oligonucleotit (US 5,723,323), sắp xếp lại ADN (US 5,605,793), lắp ráp gen trung gian exo (WO 0058517). Các phương pháp thích hợp khác được mô tả, ví dụ trong các công bố đơn quốc tế các số WO 0134835, WO 02/097130, WO 03/012100, WO03/057247, WO 2004/018674, US 6,303,344 và US 6,132,970.

Việc áp dụng các phương pháp phát triển phân tử tương tự và được nói tới ở trên cho phép xác định và chọn lọc được các biến thể của các enzym theo sáng chế có các đặc tính được ưu tiên mà không cần những kiến thức trước đó về cấu trúc hoặc chức năng của protein, và cho phép sản xuất được các thể đột biến hoặc các biến thể không thể đoán trước nhưng có ích lợi. Có nhiều ví dụ về việc ứng dụng phương pháp phát triển phân tử trong lĩnh vực này để tối ưu và thay đổi hoạt tính enzym, các ví dụ này bao gồm, nhưng không chỉ được giới hạn ở một hoặc nhiều ứng dụng sau: hoạt tính hoặc biểu hiện được tối ưu hóa trong một tế bào chủ hoặc *in vitro*, hoạt tính enzym tăng, tính đặc hiệu sản phẩm và/hoặc cơ chất thay đổi, độ bền

cấu trúc hoặc enzym tăng hoặc giảm, hoạt tính/tính đặc hiệu enzym thay đổi trong các điều kiện môi trường được ưu tiên, ví dụ nhiệt độ, độ pH, cơ chất.

Các phương pháp phát triển phân tử nêu trên có thể được sử dụng trong các phương pháp điều chế một biến thể enzym phytaza như được mô tả ở đây.

TRÌNH TỰ CÁC AXIT AMIN

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm các trình tự axit amin của các enzym có các tính chất đặc hiệu như được xác định ở đây.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “polypeptit” và/hoặc thuật ngữ “protein”. Trong một số ví dụ, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “peptit”. Trong một số ví dụ, thuật ngữ “trình tự axit amin” đồng nghĩa với thuật ngữ “enzym”.

Trình tự axit amin có thể được điều chế/được phân lập từ một nguồn thích hợp, hoặc nó có thể được tổng hợp hoặc nó có thể được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Enzym được bao gồm trong sáng chế có thể được sử dụng cùng với các enzym khác. Vì vậy, sáng chế cũng bao hàm một tổ hợp của các enzym trong đó tổ hợp này bao gồm enzym của sáng chế và một enzym khác, mà có thể là một enzym khác theo sáng chế. Khía cạnh này được thảo luận trong phần sau.

Tốt hơn nếu trình tự axit amin khi liên quan đến hoặc khi được bao hàm trong phạm vi của sáng chế không phải là một enzym tự nhiên. Về mặt này, thuật ngữ “enzym tự nhiên” có nghĩa là toàn bộ enzym có trong môi trường tự nhiên của nó và khi nó được biểu hiện bởi trình tự nucleotit tự nhiên của nó.

CÁC BIẾN THỂ/CÁC CHẤT TƯƠNG ĐỒNG/CÁC DẪN XUẤT

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng các biến thể, các chất tương đồng và các dẫn xuất của trình tự axit amin bất kỳ của một enzym hoặc của trình tự nucleotit bất kỳ mã hóa enzym này.

Ở đây, thuật ngữ “dạng tương tự” có nghĩa là một thực thể có độ tương đồng nhất định với các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit. Ở đây, thuật ngữ “độ tương đồng” có thể được hiểu tương đương với “độ đồng nhất”. Một cách thích hợp, “độ tương đồng” trong ngữ cảnh này dùng để chỉ phần trăm của độ đồng nhất trình tự giữa hai enzym sau khi sắp hàng các trình tự của chúng sử dụng các thuật toán sắp hàng như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Trong ngữ cảnh này, một trình tự axit amin tương đồng như định nghĩa bao gồm một trình tự axit amin mà có thể có độ đồng nhất ít nhất 75, 80, 81, 85 hoặc 90%, tốt hơn là độ đồng nhất ít nhất 95, 96, 97, 98 hoặc 99% với trình tự này. Điển hình, các trình tự tương tự sẽ bao gồm các vị trí hoạt động giống nhau v.v., ví dụ so với trình tự axit amin nói đến. Mặc dù độ tương đồng cũng có thể được xem xét dưới dạng độ tương tự (tức là các gốc axit amin có các chức/các tính chất hóa học tương tự), trong ngữ cảnh này theo sáng chế, ưu tiên thể hiện độ tương đồng dưới dạng độ đồng nhất trình tự.

Thuật ngữ “đoạn chức” có nghĩa là một đoạn polypeptit có các tính chất đặc trưng của polypeptit đó. Trong ngữ cảnh này theo sáng chế, một đoạn chức của một enzym phytaza là một đoạn có khả năng cắt carotenoid của toàn bộ protein.

Trong ngữ cảnh này, độ tương đồng trình tự axit amin như được định nghĩa bao gồm một trình tự axit amin mà có thể có độ đồng nhất ít nhất 75, 80, 81, 85 hoặc 90%, tốt hơn là độ đồng nhất ít nhất 95, 96, 97, 98 hoặc 99% với một trình tự nucleotit mã hóa một enzym theo sáng chế (enzym sáng chế). Điển hình, các trình tự tương tự sẽ bao gồm các trình tự mã hóa cho các vị trí hoạt động v.v. giống với trình tự axit amin của sáng chế. Mặc dù độ tương đồng cũng có thể được xem xét dưới dạng độ tương tự (tức là các gốc axit amin có các chức / các tính chất hóa học tương tự), trong ngữ cảnh này của sáng chế, ưu tiên thể hiện độ tương đồng dưới dạng độ đồng nhất trình tự.

Đối với các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit, việc so sánh độ tương đồng có thể được tiến hành bằng mắt, hoặc thông thường hơn, với sự trợ giúp của các chương trình so sánh trình tự có sẵn để tìm trên thị trường. Các chương trình

máy tính có sẵn trên thị trường này có thể tính toán % độ tương đồng giữa hai hoặc nhiều trình tự.

% tương đồng có thể được tính đối với các trình tự kề nhau, tức là một trình tự được sắp hàng với trình tự khác và từng axit amin trong mỗi trình tự được so sánh trực tiếp với axit amin tương ứng ở trình tự kia, mỗi lần một gốc. Phương pháp này còn được gọi là sắp hàng "không tạo khe". Điển hình, các phương pháp sắp hàng không tạo khe này được thực hiện chỉ đối với số tương đối ít gốc.

Mặc dù đây là một phương pháp nhất quán và rất đơn giản, nhưng nó không đủ khi xem xét đến việc, ví dụ, trong một cặp giống nhau khác của các trình tự, việc xen hoặc xóa sẽ gây ra việc các gốc axit amin tiếp theo sẽ bị đẩy ra khỏi hàng, như vậy có khả năng gây ra sự giảm mạnh % độ đồng nhất khi một việc sắp hàng toàn bộ được thực hiện. Do đó, các phương pháp so sánh trình tự tốt nhất được thiết kế để tạo ra sự sắp hàng tối ưu khi xét đến việc có thể có sự xen và xóa đoạn mà không bị phạt quá mức điểm tương đồng tổng thể. Việc này có thể đạt được bằng cách xen "các khe" trong khi sắp hàng trình tự để có gắng tối đa hóa độ tương đồng vùng.

Tuy nhiên, các phương pháp phức tạp hơn này quy định "sự phạt khe" đối với mỗi khe xảy ra khi sắp hàng để, đối với cùng một số axit amin đồng nhất, một phép sắp hàng trình tự với càng ít khe càng tốt- phản ánh độ liên quan cao giữa hai trình tự được so sánh- sẽ đạt được điểm cao hơn là một với nhiều khe. Phương pháp "chi phí khe Affine" điển hình được sử dụng mà chịu một mức chi phí tương đối cao đối với sự tồn tại của một khe và một điểm phạt nhỏ hơn cho mỗi gốc tiếp tiếp trong khe. Đây là phương pháp thông thường được sử dụng cho hệ thống tính điểm khe. Các mức phạt khe cao tất nhiên sẽ tạo ra việc sắp hàng tối ưu với ít khe hơn. Các chương trình sắp hàng tốt nhất cho phép các điểm phạt khe được làm thay đổi. Tuy nhiên, tốt hơn nếu sử dụng các giá trị mặc định khi sử dụng phần mềm này để so sánh trình tự. Ví dụ khi sử dụng gói GCG Wisconsin Bestfit, điểm phạt khe mặc định cho trình tự các axit amin là -12 đối với một khe và -4 với mỗi gốc mở rộng.

Việc tính toán % độ tương đồng tối đa đầu tiên đòi hỏi một sự sắp hàng tối ưu, có xem xét đến các điểm phạt khe. Chương trình máy tính thích hợp để tiến

hàng sự sắp hàng này là GCG Wisconsin Bestfit package (Devereux *et al* 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Các ví dụ về phần mềm khác mà có thể tiến hành so sánh trình tự bao gồm, nhưng không chỉ được giới hạn ở, gói BLAST (see Ausubel *et al.*, 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed – Chapter 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) và GENWORKS thích hợp làm công cụ so sánh. Cả hai chương trình BLAST và FASTA đều có sẵn để tra cứu trực tuyến hoặc ngoại tuyến (xem tài liệu của Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, pages 7-58 to 7-60).

Tuy nhiên, đối với một số ứng dụng, tốt hơn là sử dụng phần mềm GCG Bestfit. Một công cụ mới được gọi là các BLAST 2 SEquences cũng có sẵn để so sánh protein và trình tự nucleotit (xem tài liệu của *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8 và tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Mặc dù % độ tương đồng có thể được đo dưới dạng độ đồng nhất, quá trình sắp hàng bản thân nó diễn hình hoàn toàn không dựa trên sự so sánh cặp đôi. Để thay thế, một khung điểm tương tự được sắp xếp từ cao đến thấp thường được sử dụng để quy định điểm đối với mỗi phép so sánh pairwise trên cơ sở tính tương tự hóa học và khoảng cách phát triển. Ví dụ về khung này thường được sử dụng là khung BLOSUM62 - khung mặc định đối với bộ BLAST của chương trình. Các chương trình GCG Wisconsin thường sử dụng các giá trị mặc định chung hoặc bảng so sánh ký hiệu thông thường nếu được cấp (xem sổ tay người sử dụng để biết thêm chi tiết). Đối với một số ứng dụng, tốt hơn nếu sử dụng các giá trị mặc định chung đối với gói GCG, hoặc trong trường hợp phần mềm khác, khung mặc định, như BLOSUM62.

Cách khác, phần trăm độ đồng nhất có thể được tính toán sử dụng nhiều đặc điểm sắp hàng trong ADNSISTM (Hitachi Software), trên cơ sở một thuật toán, tương tự với CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Khi phần mềm này đem lại sự sắp hàng tối ưu, có thể tính % độ tương đồng, tốt hơn là % độ đồng nhất. Phần mềm thực hiện việc này như là một phần của việc so sánh trình tự và đưa ra một kết quả dưới dạng một con số.

Theo một khía cạnh ưu tiên của sáng chế, phần mềm sau và các thông số thiết lập để tính toán phần trăm độ tương đồng/đồng nhất trình tự được sử dụng. Đối với trình tự các axit amin phần trăm đồng nhất (tương đồng) hoặc "dương" được tính toán bởi chương trình AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 của hãng Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA.) cho mỗi cặp đôi có thể của trình tự các axit amin. Các thông số thiết lập là các thông số mặc định (điểm phạt mở khe - 10, Điểm phạt mở rộng khe 0,1).

Đối với các trình tự axit nucleic, phần trăm đồng nhất (tương đồng) hoặc "dương" được tính toán bởi chương trình AlignX VectorNTI programme do hãng Informax Inc. (USA) cung cấp cho mỗi cặp đôi có thể của các trình tự axit nucleic. Việc thiết lập là mặc định đối với ADN là: điểm phạt mở khe: 15 và Điểm phạt kéo dài khe: 6,66. (các thông số thiết lập giống như cho việc đa sắp hàng).

Tốt hơn nếu độ đồng nhất (tương đồng) axit amin được tính theo toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin hoặc đối với axit nucleic theo một polynucleotit tương ứng mã hóa cho trình tự axit amin dài đầy đủ tương ứng.

Các trình tự cũng có thể được làm mất, xen hoặc thế các gốc axit amin để tạo ra sự thay đổi cảm và kết quả là tạo ra cơ chất tương tự về chức năng. Việc thế axit amin có chủ ý có thể được thực hiện trên cơ sở tính tương tự về các tính chất của axit amin (như tính có cực, điện tích, độ tan trong nước, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính (vừa ưa nước vừa kỵ nước của các gốc) và do đó nó hữu dụng để nhóm các axit amin với nhau trong các nhóm chức. Các axit amin có thể được nhóm với nhau trên cơ sở các tính chất của mạch nhánh riêng của chúng. Tuy nhiên, sẽ là hữu dụng hơn nếu cũng bao gồm các dữ liệu đột biến. Các bộ axit amin nhận được theo cách như vậy có khả năng sẽ được bảo toàn vì các lý do về cấu trúc. Các bộ các axit amin này có thể được mô tả dưới dạng một sơ đồ Venn diagram (Livingstone C.D. và Barton G.J. (1993) "Protein SEquence alignments: a

strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745-756) (Taylor W.R. (1986) "The classification of amino: acid conservation" *J.Theor.Biol.* **119**; 205-218). Các phương pháp thế bảo toàn có thể được thực hiện, ví dụ theo bảng dưới đây, bảng này mô tả một sơ đồ được nói chung chấp nhận Venn mà dùng để nhóm các axit amin.

BỘ		DƯỚI BỘ	
Kỵ nước	F W Y H K M I L V A G C	Thơm	F W Y H
		Béo	I L V
Có cực	W Y H K R E D C S T N Q	Tích điện	H K R E D
		Tích điện dương	H K R
		Tích điện âm	E D
Nhỏ	V C A G S P T N D	Rất nhỏ	A G S

Sáng chế cũng bao gồm sự thế tương đồng (thế và thay thế được sử dụng ở đây đều có nghĩa là trao đổi một gốc axit amin tồn tại, bằng một gốc khác) mà có thể xảy ra tức là kiểu thế dạng tương tự bằng dạng tương tự như bazơ bằng bazơ, axit bằng axit có cực bằng có cực v.v.. Sự thế không tương đồng cũng có thể xảy ra tức là từ một lớp gốc này với một gốc khác hoặc cách khác liên quan đến việc bao gồm cả các axit amin không tự nhiên như ornithin (dưới đây được ký hiệu là Z), axit diaminobutyric ornithin (dưới đây được ký hiệu là B), norleucine ornithin (dưới đây được ký hiệu là O), pyriylalanin, thienylalanin, naphthylalanin và phenylglyxin.

Việc thay thế cũng có thể được thực hiện bằng các axit amin không tự nhiên.

Các trình tự axit amin đột biến có thể bao gồm các nhóm đệm thích hợp mà có thể được xen vào giữa hai gốc axit amin của trình tự bao gồm các nhóm alkyl như metyl, etyl hoặc các nhóm propyl bổ sung vào các gốc đệm axit amin như gốc

glyxin β -alanin. Một dạng biến đổi khác, liên quan đến sự có mặt của một hoặc nhiều gốc axit amin dưới dạng peptoid, sẽ được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Để tránh sự nghi ngờ, “dạng peptoid” được sử dụng để chỉ các gốc axit amin biến đổi trong đó nhóm thế α -carbon nằm trên nguyên tử nitơ của gốc này chứ không phải là nguyên tử carbon α . Các quá trình điều chế các peptit dưới dạng peptoid đã được biết trong lĩnh vực này, ví dụ trong tài liệu của Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) **89**(20), 9367-9371 và Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) **13**(4), 132-134.

Các trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm các nucleotit tổng hợp hoặc cải biến. Một số kiểu cải biến khác đối với các oligonucleotit đã được biết trong lĩnh vực này. Các kiểu này bao gồm khung metylphosphonat và phosphorothioat và/hoặc bổ sung các mạch acridin hoặc polylysin ở các đầu 3' và/hoặc 5' của phân tử. Đối với các mục đích theo sáng chế, cần phải hiểu rằng các trình tự nucleotit được mô tả ở trên có thể được biến đổi bằng phương pháp bất kỳ có sẵn trong lĩnh vực này. Biến đổi này có thể được thực hiện để làm tăng in vivo hoạt tính hoặc chu kỳ sống của các trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng các trình tự nucleotit mà phần bổ sung của các trình tự được thể hiện ở đây, hoặc bất kỳ đoạn hoặc dẫn xuất nào của nó. Nếu trình tự là một trình tự là có sự bổ sung vào một đoạn của chúng thì trình tự này có thể được sử dụng làm một đoạn dò để nhận dạng các trình tự mã hóa tương tự trong các sinh vật khác v.v..

Các polynucleotit mà không có độ tương đồng 100% với các trình tự của sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế có thể thu được theo một số cách. Các biến thể của các trình tự được mô tả ở trên có thể thu được, ví dụ bằng đánh dấu các thư viện ADN được lấy từ một loạt các cá thể, ví dụ các cá thể từ các tập hợp khác. Ngoài ra, các polynucleotit đồng đẳng khác có thể thu được và các chất đồng đẳng này và các đoạn của chúng, nói chung sẽ có thể được lai với các trình tự được đưa ra trong danh sách ở đây. Các trình tự này có thể có được bằng cách đánh dấu các thư viện cADN được lấy từ hoặc các thư viện ADN hệ gen được lấy từ các loài khác, và đánh dấu các

thư viện này với các đoạn dò bao gồm toàn bộ hoặc một phần của một gốc bất kỳ trong số các trình tự trong danh sách trình tự đính kèm theo bản mô tả này dưới các điều kiện chặt chẽ từ trung bình đến cao. Các phương pháp tương tự có thể được xem xét áp dụng để thu được các trình tự tương tự của các loài và các biến thể lạ của các trình tự polypeptit hoặc nucleotit theo sáng chế.

Các biến thể và các dạng tương tự của loài/giống cũng có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR thoái hóa mà sẽ sử dụng các đoạn mồi được thiết kế cho các trình tự đích trong các biến thể và các dạng tương tự mã hóa cho các trình tự axit amin được bảo toàn trong các trình tự của sáng chế. Các trình tự được bảo toàn có thể được đoán trước, ví dụ bằng cách sắp hàng các trình tự axit amin từ các biến thể/các dạng tương tự. Sự sắp hàng trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm máy tính được biết trong lĩnh vực này. Ví dụ phần mềm GCG Wisconsin PileUp là được sử dụng rộng rãi.

Các đoạn mồi được sử dụng trong phép PCR thoái hóa sẽ chứa một hoặc nhiều vị trí thoái hóa và sẽ được sử dụng ở các điều kiện chặt chẽ thấp hơn các điều kiện sử dụng để tách dòng các trình tự với các đoạn mồi đơn ngược lại khỏi các trình tự đã biết.

Các khác, các polynucleotit này có thể thu được bằng phép đột biến gen trực tiếp vị trí các trình tự đã được mô tả đặc tính. Phương pháp này có thể hữu dụng khi ví dụ các thay đổi trình tự codon cần là cần thiết để tối ưu hóa mức độ ưu tiên codon đối với một tế bào chủ cụ thể mà trong đó các trình tự polynucleotit được biểu hiện. Các thay đổi trình tự khác có thể là mong muốn để tạo các vị trí nhận dạng enzym giới hạn, hoặc để thay đổi tính chất hoặc chức năng của các polypeptit được mã hóa bởi các polynucleotit.

Các polynucleotit (các trình tự nucleotit) theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra một đoạn mồi, ví dụ đoạn mồi PCR, một đoạn mồi đối với một phản ứng khuếch đại khác, một đoạn mồi ví dụ được đánh dấu bằng một chất đánh dấu biểu lộ bằng phương pháp thông thường sử dụng các chất đánh dấu phóng xạ hoặc không phóng xạ, hoặc các polynucleotit có thể được tách dòng trong các vector. Các đoạn

mỗi, các đoạn dò và các đoạn khác sẽ bao gồm ít nhất 15, tốt hơn là ít nhất 20, ví dụ ít nhất 25, 30 hoặc 40 nucleotit chiều dài và cũng được bao hàm bởi thuật ngữ các polynucleotit theo sáng chế được sử dụng ở đây.

Các polynucleotit như các đoạn dò và các polynucleotit ADN và theo sáng chế được sản xuất theo phương pháp tái tổ hợp, tổng hợp, hoặc bất kỳ phương pháp này có sẵn được các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết. Chúng có thể được tách đơn dòng bằng các kỹ thuật chuẩn.

Nói chung, các đoạn dò sẽ được sản xuất bởi phương pháp tổng hợp, bao gồm sản xuất theo từng bước các trình tự axit nucleic mong muốn, mỗi lần một nucleotit. Các kỹ thuật thực hiện việc sản xuất này sử dụng các công nghệ tự động có sẵn trong lĩnh vực này.

Các polynucleotit dài hơn, nói chung sẽ được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp, ví dụ sử dụng các kỹ thuật tách đơn dòng RCR (phản ứng mạch polymeraza). Các đoạn dò có thể được thiết kế để chứa các vị trí nhận dạng enzyme thích hợp để ADN được khuếch đại có thể được tách đơn dòng trong một vector clon thích hợp.

HOẠT TÍNH SINH HỌC

Tốt hơn, nếu các trình tự biến thể v.v., ít nhất hoạt động sinh học là giống với các trình tự được thể hiện ở đây.

Được sử dụng ở đây “hoạt động sinh học” dùng để chỉ một trình tự có một tính chức cấu trúc tương tự (không cần phải ở mức độ giống), và/hoặc chức điều hòa tương tự (không cần phải ở mức độ giống), và/hoặc chức sinh hóa tương tự (không cần phải ở mức độ giống) với trình tự tự nhiên.

Cụ thể, các trình tự cải biến hoặc các dạng biến đổi của chúng có biên dạng enzyme tương tự với biên dạng của phytaza được xác định ở đây. Biên dạng này bao gồm các đặc tính như các đặc tính của một protein tiết, có độ pH tối ưu nằm trong

khoảng từ 2 đến 5,5, tốt hơn là từ 4,0 đến 4,5, giữ được mức ít nhất 50% hoạt tính tối đa ngoài khoảng pH 2,0-5,5 và/hoặc có hoạt tính đặc hiệu lớn hơn 300 U/mg.

SỰ LAI HÓA

Sáng chế cũng bao gồm các trình tự mà là có phần bổ sung vào các trình tự axit nucleic theo sáng chế hoặc các trình tự có khả năng lai với các trình tự của sáng chế hoặc với các trình tự là phần bổ sung của nó.

Thuật ngữ “lai” được sử dụng ở đây sẽ bao gồm “quá trình một sợi của axit nucleic kết hợp với một sợi bổ sung thông qua sự cặp đôi bazơ” cũng như quá trình khuếch đại như được tiến hành trong các công nghệ phản ứng mạch polymeraza (PCR).

Sáng chế cũng bao hàm việc sử dụng các trình tự nucleotit mà có khả năng lai với các trình tự mà là phần bổ sung vào các trình tự được thể hiện ở đây, hoặc dạng phái sinh, đoạn hoặc dẫn xuất của chúng.

Thuật ngữ “biến thể” cũng bao hàm các trình tự mà là phần bổ sung vào trình tự mà có khả năng lai với các trình tự nucleotit được thể hiện ở đây.

Tốt hơn nữa, thuật ngữ “biến thể” bao hàm các trình tự mà có phần bổ sung vào các trình tự mà có khả năng lai dưới các điều kiện chặt chẽ (ví dụ 50°C và 0,2xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na₃xitrat pH 7,0}) với các trình tự nucleotit được thể hiện ở đây.

Tốt hơn nữa là thuật ngữ “biến thể” bao hàm các trình tự mà là phần bổ sung vào các trình tự mà có khả năng lai dưới các điều kiện chặt chẽ cao (ví dụ 65°C và 0,1xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na₃xitrat pH 7,0}) với các trình tự nucleotit được thể hiện ở đây.

Sáng chế cũng đề cập đến các trình tự nucleotit mà có thể lai với các trình tự nucleotit theo sáng chế (bao gồm các trình tự bổ sung vào các trình tự được thể hiện ở đây).

Sáng chế cũng đề cập đến các trình tự nucleotit mà là phần bổ sung vào các trình tự mà có thể lai với các trình tự nucleotit theo sáng chế (bao gồm các trình tự bổ sung của các trình tự được thể hiện ở đây).

Cũng bao gồm trong phạm vi của sáng chế là các trình tự polynucleotit mà có khả năng lai với các trình tự nucleotit được thể hiện ở đây dưới các điều kiện từ chặt chẽ vừa phải đến tối đa.

Trong một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit mà có thể lai với trình tự nucleotit theo sáng chế, hoặc phần bổ sung của chúng, dưới các điều kiện chặt chẽ (ví dụ 50°C và 0,2xSSC).

Trong một khía cạnh được ưu tiên hơn, sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit mà có thể lai với trình tự nucleotit theo sáng chế, hoặc phần bổ sung của chúng, dưới các điều kiện chặt chẽ cao (ví dụ 65°C và 0,1xSSC).

ĐỘT BIẾN TRỰC TIẾP VỊ TRÍ

Khi một trình tự nucleotit mã hóa enzym được phân lập và/hoặc tinh chế, hoặc trình tự nucleotit tinh khiết mã hóa enzym được xác định, người ta có thể mong muốn gây đột biến trình tự để điều chế một enzym theo sáng chế.

Các thể đột biến có thể tạo ra bằng cách sử dụng các oligonucleotit. Các oligonucleotit này chứa các trình tự nucleotit nằm cạnh các vị trí đột biến mong muốn.

Một phương pháp thích hợp được bộc lộ bởi Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) **2**, p646-649). Một phương pháp khác đưa các thể đột biến vào các trình tự nucleotit mã hóa enzym được mô tả bởi Nelson và Long (*Analytical Biochemistry* (1989), **180**, p 147-151). Một phương pháp khác nữa được mô tả bởi Sarkar và Sommer (*Biotechniques* (1990), **8**, p404-407 – “The megaprimer method of site directed mutagenesis”).

TÁI TỔ HỢP

Theo một khía cạnh, trình tự để sử dụng trong sáng chế là một trình tự tái tổ hợp— tức là một trình tự mà đã được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp này thuộc khả năng hiểu biết của chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Các kỹ thuật này được giải thích trong tài liệu, ví dụ, J. Sambrook, E. F. Fritsch, và T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

TỔNG HỢP

Theo một khía cạnh, trình tự để sử dụng trong sáng chế là một trình tự tổng hợp – tức là một trình tự mà được điều chế bởi phương pháp tổng hợp hóa học hoặc enzym *in vitro*. Nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các trình tự được điều chế với việc sử dụng codon tối ưu các sinh vật chủ - như men methylotrophic *Pichia* và *Hansenula*.

BIỂU HIỆN CÁC ENZYM

Trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế có thể được kết hợp vào một vector có thể thay thế tái tổ hợp. Vectơ này có thể được sử dụng để thay thế và biểu hiện trình tự nucleotit, dưới dạng enzym, trong và/hoặc từ một tế bào chủ tương thích.

Việc biểu hiện có thể được kiểm soát sử dụng các trình tự điều khiển, ví dụ các trình tự điều hòa.

Enzym được sản xuất bởi tế bào tái tổ hợp chủ bằng cách biểu hiện trình tự nucleotit có thể được tiết hoặc được chứa trong tế bào phụ thuộc vào trình tự và/hoặc vector được sử dụng. Các trình tự mã hóa có thể được thiết kế với các trình tự tín hiệu làm tăng khả năng tiết trực tiếp các trình tự mã hóa cơ chất qua một màng tế bào có nhân điển hình hoặc không có nhân điển hình cụ thể.

Một cách thuận lợi, các enzym theo sáng chế được tiết.

VECTOR BIỂU HIỆN

Các thuật ngữ “plasmid”, “hệ vectơ” hoặc “vector biểu hiện” có nghĩa là một cấu trúc có thể biểu hiện *in vivo* hoặc *in vitro*. Trong ngữ cảnh này theo sáng chế, các cấu trúc này có thể được sử dụng để đưa các gen mã hóa các enzym vào các tế bào chủ. Một cách thích hợp, các gen mà sự biểu hiện của nó được tạo ra có thể được gọi là “các gen chuyển có thể biểu hiện”.

Tốt hơn, nếu vector biểu hiện được kết hợp vào hệ gen của một sinh vật chủ thích hợp. Thuật ngữ “được kết hợp” tốt hơn nếu bao gồm sự kết hợp ổn định vào hệ gen.

Các trình tự nucleotit được mô tả ở trên bao gồm trình tự nucleotit theo sáng chế có thể có mặt trong một vector trong đó trình tự nucleotit được liên kết điều khiển với các trình tự điều hòa có khả năng tạo ra sự biểu hiện trình tự nucleotit bởi một sinh vật chủ thích hợp.

Các vector để sử dụng trong sáng chế có thể được làm biến nạp vào một tế bào chủ thích hợp như được mô tả dưới đây để tạo ra sự biểu hiện một polypeptit theo sáng chế.

Việc lựa chọn vector, ví dụ một plasmid, cosmit, hoặc vector thể thực khuẩn thường sẽ tùy thuộc vào tế bào chủ nào mà nó được đưa vào.

Các vector để sử dụng trong sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều các gen đánh dấu lựa chọn như một gen, mà có tính chất kháng kháng sinh ví dụ kháng ampicillin, kanamycin, chloramphenicol hoặc tetracyclin. Cách khác, việc lựa chọn có thể được hoàn thành bằng phương pháp đồng biến nạp (được mô tả trong WO91/17243).

Các vector có thể được sử dụng *in vitro*, ví dụ để sản xuất ARN hoặc được sử dụng để truyền nhiễm, biến nạp, hoặc chuyển đổi hoặc làm nhiễm một tế bào chủ.

Như vậy, trong một phương án khác, sáng chế đề xuất một phương pháp điều chế các trình tự nucleotit theo sáng chế bằng cách đưa một trình tự nucleotit theo sáng chế vào một vector có thể sao chép, đưa vector này vào một tế bào chủ tương thích, và nuôi dưỡng tế bào chủ dưới các điều kiện để có thể sao chép vector này.

Vector này còn bao gồm một trình tự nucleotit cho phép vector có thể sao chép trong tế bào chủ nói đến. Các ví dụ về các trình tự này là các gốc sao chép của các plasmid pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ101, pTZ12 và pET11.

CÁC TRÌNH TỰ ĐIỀU HÒA

Trong một số ứng dụng, trình tự nucleotit để sử dụng trong sáng chế được liên kết điều khiển với một trình tự điều hòa mà có khả năng tạo ra sự biểu hiện trình tự nucleotit, như bởi tế bào chủ đã được chọn. Ví dụ, sáng chế bao gồm một vector bao gồm trình tự nucleotit theo sáng chế được liên kết điều khiển với một trình tự điều hòa này, tức là vector này là một vector biểu hiện.

Thuật ngữ "được liên kết điều khiển" dùng để chỉ một vị trí kề nhau trong đó các thành phần được mô tả nằm trong một mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo cách chúng được dự định để hoạt động. Một trình tự điều hòa "được liên kết điều khiển" với một trình tự mã hóa được thất theo cách mà sự biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được dưới điều kiện tương thích với các trình tự điều khiển.

Thuật ngữ "các trình tự điều hòa" bao gồm các đoạn gen khởi đầu và gen tăng cường hoặc các đoạn tín hiệu điều hòa biểu hiện khác.

Thuật ngữ "gen khởi đầu" được sử dụng theo nghĩa thông thường trong lĩnh vực này, ví dụ một ARN polymeraza liên kết vị trí.

Sự biểu hiện tăng cường của trình tự nucleotit mã hóa enzym của sáng chế cũng có thể có được bằng cách lựa chọn các đoạn điều hòa khác loại, ví dụ gen khởi đầu, các đoạn dẫn đầu và kết thúc quá trình tiết.

Tốt hơn nữa, trình tự nucleotit theo sáng chế được liên kết điều khiển với ít nhất một gen khởi đầu.

Các ví dụ về các gen khởi đầu thích hợp trực tiếp phiên mã trình tự nucleotit trong một thể chủ vi khuẩn, nấm hoặc men cũng được biết rõ trong lĩnh vực này.

CÁC CẤU TRÚC

Thuật ngữ "cấu trúc" - đồng nghĩa với các thuật ngữ "tiếp hợp", "cassette" và "lai" - bao gồm một trình tự nucleotit để sử dụng theo sáng chế gắn trực tiếp hoặc gián tiếp với một gen khởi đầu.

Một ví dụ về phương thức gắn trực tiếp là cung cấp một nhóm gen đệm thích hợp như đoạn intron (nội vùng), như Sh1-intron hoặc ADH intron, làm trung gian giữa các gen khởi đầu và trình tự nucleotit theo sáng chế. Việc này cũng đúng đối với thuật ngữ "dung hợp" liên quan đến sáng chế mà bao gồm việc đính gắn trực tiếp hoặc gián tiếp. Trong một số trường hợp, các thuật ngữ không bao gồm sự kết hợp tự nhiên của trình tự nucleotit mã hóa cho protein này thường liên quan đến đoạn khởi đầu gen kiểu hoang và khi đó cả hai phải trong môi trường tự nhiên của chúng.

Kiểu cấu trúc này có thể thậm chí chứa hoặc biểu hiện một gen đánh dấu, mà cho phép chọn lựa kiểu cấu trúc gen.

Đối với một số ứng dụng, tốt hơn nếu cấu trúc theo sáng chế bao gồm ít nhất trình tự nucleotit theo sáng chế được liên kết điều khiển với một đoạn khởi đầu.

CÁC TẾ BÀO CHỦ

Thuật ngữ "tế bào chủ" - liên quan đến sáng chế bao gồm tế bào bất kỳ bao gồm trình tự nucleotit hoặc một vector biểu hiện như được mô tả ở trên và được sử dụng trong việc sản xuất tái tổ hợp một enzym có các tính chất đặc hiệu như được xác định ở đây hoặc trong các phương pháp sáng chế.

Như vậy, theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất các tế bào chủ được gây biến nạp hoặc truyền nhiễm với một trình tự nucleotit biểu hiện các

enzym được mô tả trong sáng chế. Các tế bào này sẽ được lựa chọn để sẽ tương thích với vector nói trên vào có thể ví dụ là các tế bào chưa có nhân điển hình (ví dụ vi khuẩn), nấm, men hoặc các tế bào thực vật. Tốt hơn nếu, các tế bào chủ không phải là các tế bào của người.

Các ví dụ về các sinh vật chủ vi khuẩn thích hợp là các loài vi khuẩn gram dương và âm.

Trong một phương án được ưu tiên, tế bào chủ là *Escherichia Coli* bởi vì người ta quan sát thấy phytaza của *Buttiauxella* P1-29 được tiết hiệu quả trong *E.coli*. Các enzym phytaza, bao gồm các biến thể được mô tả tính chất sau khi biểu hiện khác loại trong một hoặc nhiều vật chủ biểu hiện sau: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Vì vậy, các vật chủ này cũng được ưu tiên.

Phụ thuộc vào bản chất của trình tự nucleotit mã hóa enzym của sáng chế, và/hoặc mức độ mong muốn đối với việc xử lý tiếp theo các protein được biểu hiện, các vật chủ có nhân điển hình như men hoặc nấm khác có thể được ưu tiên. Nói chung, các tế bào men là được ưu tiên so với các tế bào nấm bởi vì chúng dễ thao tác hơn. Tuy nhiên, một số protein hoặc là được tiết kém hơn từ tế bào men, hoặc trong một số trường hợp nó không được xử lý thích hợp (ví dụ tăng glycosyl hóa quá mức trong men). Trong các ví dụ này, sinh vật chủ nấm khác nên được lựa chọn.

Việc sử dụng các tế bào chủ thích hợp - như các tế bào chủ men, nấm và thực vật - có thể tạo ra những thay đổi sau dịch mã (ví dụ myristoyl hóa, glycosyl hóa, cắt cụt, lapit hóa và tyrosin, serin hoặc threonin phospho hóa) như có thể cần để tạo ra hoạt tính sinh học tối ưu trên các sản phẩm biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế.

Tế bào chủ có thể là một giống proteaza thiếu hoặc không đầy đủ đoạn.

Kiểu gen tế bào chủ có thể được làm biến đổi để cải thiện khả năng biểu hiện.

Các ví dụ về những biến đổi tế bào chủ này bao gồm việc làm thiếu, làm không đầy đủ đoạn proteaza, bổ sung tARN hiếm, và làm thay đổi khả năng giảm nhiễm trong bào chất để làm tăng sự tạo thành liên kết disulfid.

Ví dụ, tế bào chủ *E. coli* có thể biểu hiện quá mức đối với tARN hiếm để cải thiện khả năng biểu hiện các protein khác loại như được ví dụ/được mô tả trong tài liệu của Kane (*Curr Opin Biotechnol* (1995), **6**, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of các protein khác loại in *E.coli*"). Tế bào chủ có thể thiếu hụt một số enzym giảm nhiễm để ưu tiên sự tạo thành các liên kết disulfid ổn định như được ví dụ/được mô tả trong tài liệu của Bessette (*Proc Natl Acad Sci USA* (1999), **96**, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm").

Theo một phương án, các tế bào chủ trong ngữ cảnh này của sáng chế bao gồm các tế bào mà có thể được thêm trực tiếp vào thức ăn động vật.

SINH VẬT

Thuật ngữ "sinh vật" liên quan đến sáng chế bao gồm sinh vật bất kỳ mà có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho các enzym như được mô tả trong sáng chế và/hoặc các sản phẩm nhận được từ đó, và/hoặc trong đó một gen khởi đầu có thể cho phép biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng chế khi có mặt trong sinh vật này.

Các sinh vật thích hợp có thể bao gồm sinh vật chưa có nhân điển hình, nấm, men và thực vật.

Thuật ngữ "sinh vật chuyển gen" liên quan đến sáng chế bao gồm một sinh vật bất kỳ mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho các enzym như được mô tả trong sáng chế và/hoặc các sản phẩm thu được từ đó, và/hoặc trong đó một gen khởi đầu có thể cho phép biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng chế trong sinh vật này. Tốt hơn nếu trình tự nucleotit được kết hợp trong hệ gen của sinh vật này.

Thuật ngữ “sinh vật chuyển gen” không bao hàm các trình tự mã hóa nucleotit tự nhiên trong môi trường tự nhiên của chúng khi chúng chịu sự điều khiển của gen khởi đầu tự nhiên mà cũng nằm trong môi trường tự nhiên của nó.

Vì vậy, sinh vật chuyển gen theo sáng chế bao gồm một sinh vật bao gồm một gốc bất kỳ trong số, hoặc các dạng tổ hợp của, trình tự nucleotit mã hóa cho các enzym như được mô tả trong sáng chế, các cấu trúc theo sáng chế, các vector theo sáng chế, các plasmid theo sáng chế, các tế bào theo sáng chế, các mô theo sáng chế, hoặc các sản phẩm của chúng.

Ví dụ sinh vật chuyển gen cũng có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho enzym của sáng chế dưới sự điều khiển của một gen khởi đầu khác loại.

BIẾN NẠP CÁC TẾ BÀO CHỦ/SINH VẬT

Như được chỉ ra ở trên, sinh vật chủ có thể là một sinh có nhân điển hình hoặc một sinh vật chưa có nhân điển hình. Các ví dụ về thể chủ chưa có nhân điển hình thích hợp bao gồm *E. coli* và *Bacillus subtilis*.

Các tài liệu viết về phương pháp biến nạp các thể chủ chưa có nhân điển hình được tập hợp tương đối rõ ràng trong lĩnh vực này, ví dụ xem Sambrook *et al* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Các phương pháp thích hợp được thể hiện ở các Ví dụ trình tự ở đây. Nếu một thể chủ chưa có nhân điển hình được sử dụng thì trình tự nucleotit có thể cần được biến đổi thích hợp trước khi gây biến nạp - như bằng cách loại bỏ các intron.

Các tế bào nấm sợi có thể được gây biến nạp bằng các sử dụng các phương pháp khác nhau được biết trong lĩnh vực này – như một quá trình liên quan đến sự tạo thành thể nguyên sinh và sự biến nạp các thể nguyên sinh này được tiếp theo bằng cách tái tạo thành tế bào theo một phương pháp đã biết. Việc sử dụng *Aspergillus* làm một vi sinh vật chủ được mô tả trong EP 0 238 023.

Sinh vật chủ khác có thể là một thực vật. Xem xét các kỹ thuật chung được sử dụng để biến nạp thực vật có thể tìm được trong các bài báo của Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) và Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Các hướng dẫn khác về phương pháp biến nạp thực vật cũng có thể tìm thấy trong Công bố đơn châu Âu số EP-A-0449375.

Các hướng dẫn chung về phương pháp biến nạp nấm, men và thực vật được trình bày trong các phần dưới đây.

NẤM ĐƯỢC BIẾN NẠP

Một sinh vật chủ có thể là nấm - như nấm sợi. Các ví dụ về thích hợp về các vật chủ này bao gồm các thành viên thuộc giống *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* và các giống tương tự.

Các hướng dẫn về phương pháp biến nạp nấm sợi được xem trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số US-A-5741665 mà nêu rằng các kỹ thuật chuẩn để gây biến nạp nấm sợi và nuôi cấy nấm được biết rõ trong lĩnh vực này. Một tham chiếu mở rộng về các kỹ thuật này được áp dụng đối với *N. crassa* được tìm thấy, ví dụ trong sách của Davis và de Serres, *Methods Enzymol* (1971) **17A**: 79-143.

Các hướng dẫn chung về phương pháp biến nạp nấm sợi được xem xét trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số US-A-5674707.

Theo một khía cạnh, sinh vật chủ có thể thuộc giống *Aspergillus*, như *Aspergillus niger*.

Aspergillus biến đổi gen theo sáng chế cũng có thể được điều chế bởi, ví dụ, theo các hướng dẫn sách tài liệu của Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editors) *Aspergillus*: 50 years on. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641-666).

Sự biểu hiện gen trong nấm sợi đã được xem xét trong tài liệu của Punt *et al.* (2002) *Trends Biotechnol* 2002 May;20(5):200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4):273-306.

NẤM MEN ĐƯỢC BIẾN NẠP

Trong một phương án khác, sinh vật chuyển gen có thể là nấm men

Việc xem xét các nguyên tắc biểu hiện gen khác loại trong nấm men được đề cập, ví dụ, *Methods Mol Biol* (1995), 49:341-54, và *Curr Opin Biotechnol* (1997) Oct; 8(5):554-60

Về khía cạnh này, nấm men – như các loài *Saccharomyces cerevisi* hoặc *Pichia pastoris* (xem *FEMS Microbiol Rev* (2000 24(1):45-66), có thể được sử dụng làm phương tiện để biểu hiện gen khác loại.

Việc xem xét các nguyên tắc biểu hiện gen khác loại trong *Saccharomyces cerevisiae* và việc tiết các sản phẩm gen được báo cáo bởi E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle to express heterologous genes", *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose và J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Đối với việc biến nạp men, một vài quy trình được phát triển. Ví dụ, *Saccharomyces* đột biến gen theo sáng chế có thể được điều chế theo các hướng dẫn sau của Hinnen *et al.*, (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, 275, 104); và Ito, H *et al* (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

Các tế bào men được biến nạp có thể được chọn bằng các sử dụng các gen đánh dấu chọn lọc khác nhau - như các gen đánh dấu dinh dưỡng thụ động có ưu thế hơn các gen đánh dấu kháng kháng sinh.

CÁC THỰC VẬT ĐƯỢC BIẾN NẠP/CÁC TẾ BÀO THỰC VẬT

Một sinh vật chủ thích hợp cho sáng chế có thể là thực vật. Việc xem xét các kỹ thuật chung có thể tìm được trong các bài báo của Potrykus (*Annu Rev Plant*

Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) và Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27).

NUÔI CÂY VÀ SẢN XUẤT

Các tế bào chủ được gây biến nạp với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được nuôi cấy dưới các điều kiện có lợi cho việc sản xuất enzym được mã hóa và các điều kiện thuận lợi cho việc thu hồi enzym từ các tế bào và/hoặc môi trường nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy các tế bào có thể là một môi trường thông thường bất kỳ thích hợp cho sự tăng trưởng tế bào chủ đã nói và có khả năng biểu hiện enzym.

Protein được sản xuất bởi một tế bào tái tổ hợp có thể được biểu hiện trên bề mặt của tế bào này.

Enzym này có thể được tiết từ các tế bào chủ và có thể được thu hồi một cách thuận lợi từ môi trường nuôi cấy sử dụng các quy trình đã được biết rõ.

TIẾT

Có thể mong muốn là enzym được tiết từ thể chủ biểu hiện vào môi trường nuôi cấy từ môi trường này enzym có thể được thu hồi dễ dàng hơn. Theo sáng chế, trình tự dẫn tiết có thể được chọn trên cơ sở thể chủ biểu hiện mong muốn. Các trình tự tín hiệu lai cũng có thể được sử dụng trong ngữ cảnh này của sáng chế.

Các ví dụ điển hình về các đoạn dẫn tiết khác loại là các trình tự có nguồn gốc từ gen amyloglucosidaza của nấm (AG) (*glaA* - cả 18 và 24 kiểu axit amin ví dụ từ *Aspergillus*), gen α -factor (các men ví dụ *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* và *Hansenula*) hoặc gen α -amylaza (*Bacillus*).

Ví dụ, việc tiết các protein khác loại trong *E. coli* được đề cập đến trong cuốn *Methods Enzymol* (1990) 182:132-43.

PHÁT HIỆN

Các protocol khác nhau để phát hiện và đo mức biểu hiện của trình tự axit amin được biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ bao gồm phép phân tích chất hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym (ELISA), phép phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA) và phân loại tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (FACS).

Rất nhiều kỹ thuật đánh dấu và tiếp hợp đã được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng trong các phép phân tích nucleic và axit amin khác nhau.

Một số hãng như Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), và US Biochemical Corp (Cleveland, OH) cung cấp các bộ kit thương mại và các protocol cho các quy trình này.

Các phân tử hoặc các chất đánh dấu được báo cáo thích hợp bao gồm các nuclit phóng xạ, các enzym, chất huỳnh quang, chất phát quang hóa học, hoặc các tác nhân tạo sắc tố cũng như các cơ chất, các đồng tác nhân, các chất ức chế, các hạt từ và các dạng tương tự. Các Patent hướng dẫn việc sử dụng các chất đánh dấu này bao gồm US-A-3,817,837; US-A-3,850,752; US-A-3,939,350; US-A-3,996,345; US-A-4,277,437; US-A-4,275,149 và US-A-4,366,241.

Cũng vậy các globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được sản xuất như được mô tả trong US-A-4,816,567.

Các phép phân tích thích hợp khác để phát hiện hoạt tính phytaza được biết trong lĩnh vực này và được mô tả ví dụ ở đây.

CÁC PROTEIN DUNG HỢP

Trình tự axit amin để sử dụng theo sáng chế có thể được sản xuất dưới dạng một protein, ví dụ với sự trợ giúp của các kỹ thuật chiết và tinh chế. Các ví dụ về các thành phần của protein dung hợp bao gồm glutathion-S-transferaza (GST), 6xHis, GAL4 (các miền hoạt hóa sự phiên mã và/hoặc liên kết ADN) và (β -galactosidaza). Cũng có thể thuận lợi bao gồm một vị trí cắt phân giải protein giữa

thành phần protein dung hợp và trình tự protein quan tâm để cho phép loại bỏ các trình tự protein dung hợp.

Tốt hơn nữa, protein dung hợp không chế hoạt tính của trình tự protein.

Các hệ biểu hiện dung hợp gen trong *E. coli* đã được đề cập trong *Curr Opin Biotechnol* (1995) 6(5):501-6.

Trong một phương án khác theo sáng chế, trình tự axit amin có thể được thất tạo ra một trình tự khác loại để mã hóa cho một protein khác loại. Ví dụ, để tách bằng sàng lọc thư viện peptit để có được các tác nhân có thể gây ảnh hưởng đến hoạt tính cơ chất, nó có thể được sử dụng để mã hóa cơ chất dạng thể khả biểu hiện một epitop khác loại mà được nhận dạng bởi một kháng thể có sẵn thương mại.

CÁC TRÌNH TỰ BỔ SUNG

Các trình tự để sử dụng theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều các protein bổ sung quan tâm (POIs) hoặc các trình tự nucleotit quan tâm (NOIs).

Các ví dụ không hạn chế về các POI bao gồm: các xylanaza, các lipaza, các axit phosphatase và/hoặc các trình tự khác. Các trình tự này bao gồm các enzym, ví dụ, điều hòa độ dính của thức ăn. Trình tự NOI có thể thậm chí là một trình tự vô nghĩa đối với bất kỳ trong số các trình tự khác.

POI có thể còn là một protein dung hợp, ví dụ để hỗ trợ quá trình chiết và tinh chế hoặc để làm tăng cường sự chuyển hóa in vivo.

POI thậm chí có thể được dung hợp với một trình tự tiết.

Các trình tự khác cũng tạo thuận lợi cho quá trình tiết hoặc làm tăng hiệu suất POI được tiết. Các trình tự này có thể mã hóa cho các protein chaperon như ví dụ sản phẩm của gen *Aspergillus niger cyp B* được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế Anh số 9821198.0.

NOI mã hóa cho POI có thể được thiết kế để làm thay đổi hoạt tính của chúng vì một số lý do bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở việc làm biến đổi, mà làm thay đổi quá trình xử lý và/hoặc biểu hiện sản phẩm biểu hiện của chúng. Ví dụ, NOI cũng có thể được làm biến đổi để tối ưu hóa sự biểu hiện trong một tế bào chủ cụ thể. Các thay đổi trình tự khác có thể được mong muốn để tạo ra các vị trí nhận dạng enzym giới hạn.

NOI mã hóa cho POI có thể bao gồm bên trong các nucleotit tổng hợp hoặc biến đổi của chúng – như các khung metylphosphonat và phosphorothioat.

NOI mã hóa cho POI có thể được làm biến đổi để tăng độ ổn định nội bào và nửa chu kỳ sống. Các cải biến bao gồm, nhưng không chỉ được giới hạn ở, việc bổ sung các trình tự sườn (flanking) có các đầu 5' và/hoặc 3' của phân tử hoặc việc sử dụng các liên kết phosphorothioat hoặc 2' O-metyl mà không phải là các liên kết phosphodiesteraza trong mạch chính của phân tử.

CÁC KHÁNG THỂ

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến các axit amin mà phản ứng miễn dịch với axit amin của trình tự SEQ ID NO: 3.

Các kháng thể có thể được sản xuất bởi các kỹ thuật chuẩn, như kỹ thuật tạo miễn dịch với cơ chất theo sáng chế hoặc bằng cách sử dụng một thư viện biểu hiện thể thực khuẩn.

Với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ "kháng thể", trừ khi được chỉ ra ngược lại, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn bởi mạch đơn, đơn dòng, đa dòng, chimeric, các đoạn Fab, các đoạn được sản xuất bởi một thư viện biểu hiện Fab, cũng như các mạch tương tự của chúng. Các đoạn này bao gồm các đoạn của toàn bộ các kháng thể có hoạt tính liên kết của chúng đối với một cơ chất đích, Fv, F(ab') và các đoạn F(ab')₂, cũng như các kháng thể mạch đơn (scFv), các protein dung hợp và các protein tổng hợp khác bao gồm vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Ngoài ra, các kháng thể và các đoạn của chúng có thể là các kháng thể người. Các

kháng thể trung tính, tức là, các kháng thể ức chế hoạt tính sinh học của các polypeptit cơ chất, là được đặc biệt ưu tiên đối với việc chuẩn đoán và điều trị bệnh.

Nếu các kháng thể đa dòng là mong muốn, một động vật có vú được chọn (ví dụ, chuột, thỏ, dê, ngựa, v.v..) được gây miễn dịch bằng trình tự theo sáng chế (hoặc một trình tự bao gồm một epitop miễn dịch của chúng). Phụ thuộc vào các loài chủ, các dạng độn khác nhau có thể được sử dụng để làm tăng phản ứng miễn dịch.

Huyết thanh lấy từ động vật đã được gây miễn dịch được lựa chọn và xử lý theo các quy trình đã biết. Nếu huyết thanh chứa các kháng thể đối với trình tự theo sáng chế (hoặc một trình tự bao gồm một epitop miễn dịch của chúng) chứa các kháng thể đối với các kháng nguyên khác, các kháng thể đa dòng có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc khí ái miễn dịch. Các kỹ thuật sản xuất và xử lý huyết thanh miễn dịch đa dòng được biết trong lĩnh vực này. Để điều chế các kháng thể này, sáng chế cũng đề xuất các polypeptit theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng được gắn hóa với một polypeptit để sử dụng làm các chất kháng nguyên trong động vật hoặc người.

Các kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại trình tự theo sáng chế (hoặc một trình tự bao gồm một epitop của chúng) cũng có thể được sản xuất dễ dàng bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không chỉ được giới hạn ở, kỹ thuật hybridoma của Koehler và Milstein (1975 *Nature* **256**:495-497), kỹ thuật hybridoma tế bào B của người (Kosbor *et al.*, (1983) *Immunol Today* **4**:72; Cote *et al.*, (1983) *Proc Natl Acad Sci* **80**:2026-2030) và kỹ thuật EBV-hybridoma (Cole *et al.*, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc, pp 77-96).

Ngoài ra, các kỹ thuật được phát triển để sản xuất "các kháng thể chimeric" kỹ thuật nối ghép các gen kháng thể chuột với các gen kháng thể người để thu được một phân tử với đặc tính kháng nguyên thích hợp và hoạt tính sinh học có thể được sử dụng (Morrison *et al.*, (1984) *Proc Natl Acad Sci* **81**:6851-6855; Neuberger *et al.*, (1984) *Nature* **312**:604-608; Takeda *et al.*, (1985) *Nature* **314**:452-454).

Các khác, các kỹ thuật được mô tả để sản xuất các kháng thể mạch đơn (patent Mỹ Số 4,946,779) có thể có thể được điều chỉnh để sản xuất các kháng thể mạch đơn đặc hiệu cơ chất.

Các đoạn kháng thể mà chứa các vị trí liên kết đặc hiệu đối với cơ chất có thể cũng được tạo ra. Ví dụ, các đoạn này bao gồm, nhưng không chỉ được giới hạn ở, các đoạn $F(ab')_2$ mà có thể được sản xuất bởi việc tiêu pepsin của phân thể kháng thể và các đoạn Fab mà có thể được tạo ra bởi việc làm giảm các cầu nối disulfua của các đoạn $F(ab')_2$. Cách khác, các thư viện biểu hiện Fab có thể được lập cấu trúc để cho phép nhận dạng nhanh chóng và dễ dàng các đoạn Fab đơn dòng có tính đặc hiệu mong muốn (Huse WD *et al.*, (1989) *Science* **256**:1275-1281).

ÁP DỤNG Ở QUY MÔ LỚN

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, trình tự axit amin mã hóa một phytaza có nguồn gốc từ *C. freundii* hoặc các phương pháp theo sáng chế được sử dụng cho các ứng dụng với quy mô lớn. Cụ thể, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất quy mô lớn các phytaza để sử dụng công nghiệp như các chất phụ gia/chất bổ sung vào thành phần thực phẩm hoặc thức ăn.

Tốt hơn nếu trình tự axit amin được sản xuất với lượng từ 5 g trên lít đến khoảng 10 g trên lít trên tổng thể tích nuôi cấy tế bào sau khi nuôi cấy sinh vật chủ.

Tốt hơn nếu trình tự axit amin được sản xuất với lượng từ 100mg trên lít đến khoảng 900mg trên lít trên tổng thể tích nuôi cấy tế bào sau khi nuôi cấy sinh vật chủ.

Tốt hơn nếu trình tự axit amin được sản xuất với lượng từ 250mg trên lít đến khoảng 500mg trên lít trên tổng thể tích nuôi cấy tế bào sau khi nuôi cấy sinh vật chủ.

SỬ DỤNG CÁC PHYTAZA

Như đã nêu ở trên, sáng chế cũng đề cập đến việc sản xuất các phytaza như được mô tả ở đây.

Cụ thể, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng các trình tự axit amin như được bộc lộ ở đây để sản xuất các hợp chất phosphat vô cơ và hữu cơ.

Như vậy, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các trình tự nucleotit mã hóa các phytaza để tạo ra các vector biểu hiện hoặc các hệ để biểu hiện các phytaza.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các vector biểu hiện hoặc các hệ này để tạo ra các tế bào chủ biểu hiện các phytaza.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các tế bào chủ đã được cải biến để tạo ra các tiền chất của các hợp chất phosphat vô cơ và hữu cơ hoặc để tạo ra các hợp chất phosphat hữu cơ đặc hiệu.

Các hợp chất phosphat vô cơ và hữu cơ thích hợp bao gồm các myo-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- và monophosphat.

Một cách thích hợp, sáng chế còn đề xuất một phương pháp để sản xuất một hợp chất phosphat hữu cơ bao gồm xử lý một phytat bằng một phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* sp. Tốt hơn nếu, phương pháp này được đặc trưng ở chỗ enzym bao gồm các trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NOs: 3 hoặc một trình tự có ít nhất 75% độ đồng nhất (tương đồng) với nó hoặc một đoạn có hiệu lực, hoặc một dạng biến đổi của nó. Một cách thích hợp, phosphat hữu cơ là phytat hoặc toàn bộ các đồng phân lập thể có thể có của các myo-inositol di-, tri-, tetra, và pentaphosphat. Các phosphat hữu cơ thích hợp bao gồm các inositol-tetra phosphat và các inositol-oligo phosphat. Trong một phương án được ưu tiên, phương pháp này là một quy trình công nghệ sinh học *in vivo*.

Các phương pháp để sản xuất hợp chất phosphat hữu cơ có thể thích hợp bao gồm các bước sau:

- a) tạo ra một tế bào chủ mà bao gồm các gen chuyển có thể biểu hiện bao gồm phytaza *Buttiauxella* sp.;
- b) nuôi cấy sinh vật chuyển gen dưới các điều kiện thích hợp cho việc biểu hiện gen chuyển này; và

c) thu hồi hợp chất phosphat hữu cơ từ dung dịch nuôi cấy.

Các hợp chất này có thể được sử dụng cho một số ứng dụng bao gồm trong các thử nghiệm đặc tính cho các phytaza. Một số inositol phosphat được bao hàm như là các phân tử tín hiệu trong quá trình điều hòa nội bào và có thể được sử dụng các hóa chất nghiên cứu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một phương pháp để sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn động vật. Thức ăn động vật điển hình được sản xuất trong các máy nghiền trong đó vật liệu thô đầu tiên được nghiền đến khi có cỡ hạt thích hợp và sau đó được trộn với các chất phụ gia thích hợp. Sau đó, thức ăn có thể được tạo ra dưới dạng bột nhão hoặc viên vê; dạng viên vê điển hình bao gồm một phương pháp mà theo phương pháp này nhiệt độ được cho tăng đến mức đích và sau đó thức ăn được cho qua một khuôn dập để tạo viên vê có cỡ hạt cụ thể. Sau đó, các chất phụ gia lỏng như mỡ và enzym có thể được thêm vào. Các viên vê được làm nguội trước khi vận chuyển. Việc sản xuất thức ăn động vật cũng bao gồm một bước bổ sung bao gồm bước làm dàn rộng trước khi tạo viên vê.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng một trình tự axit amin mã hóa một phytaza hoặc một tế bào chủ biểu hiện một phytaza để tạo ra một phytaza để sử dụng trong việc sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm cho động vật. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng một trình tự axit amin như được mô tả ở đây trong quá trình sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng một tế bào chủ theo sáng chế trong quá trình sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng một vector biểu hiện hoặc hệ biểu hiện theo sáng chế trong quá trình sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng enzym làm một thành phần trong hỗn hợp thức ăn với các thành phần khác để cung cấp cho động vật.

KẾT HỢP VỚI CÁC THÀNH PHẦN KHÁC

Các enzym theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các thành phần khác hoặc các chất mang.

Các chất mang thích hợp cho các enzym thực phẩm bao gồm lúa mì (bột thô). Ngoài ra cũng sử dụng một số các kỹ thuật tạo viên bao nang bao gồm các kỹ thuật trên cơ sở vỏ bọc sáp/chất béo, bổ sung gồm thực vật v.v..

Các ví dụ về các thành phần khác bao gồm một hoặc nhiều: các chất làm đặc, các chất tạo gen, các chất tạo nhũ tương, các chất liên kết, các chất cải biến tinh thể, các chất làm ngọt (bao gồm các chất làm ngọt nhân tạo), các chất cải biến độ lưu biến, các chất làm ổn định, các chất chống oxy hóa, các thuốc nhuộm, các enzym, các chất mang, các chất độn, các phụ gia, các chất pha loãng, các chất bôi trơn, các chất tạo hương vị, các chất tạo màu, các chất làm huyền phù, các chất phân rã, các chất liên kết hạt v.v.. Các thành phần này có thể là các thành phần trong tự nhiên. Các thành phần khác này có thể được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật hóa học và/hoặc enzym.

Thuật ngữ “chất tạo gen hoặc chất làm đặc” được sử dụng ở đây dùng để chỉ một sản phẩm ngăn quá trình tách khi đổ chậm hoặc ngăn sự chuyển động của các hạt, hoặc các giọt nhỏ của chất lỏng không trộn lẫn, không khí hoặc các chất rắn không tan.

Thuật ngữ “chất làm ổn định” như được sử dụng ở đây được xác định là một thành phần hoặc hỗn hợp các thành phần để giữ cho sản phẩm (ví dụ một sản phẩm thức ăn) không bị biến đổi theo thời gian.

Thuật ngữ “chất nhũ hóa” được sử dụng ở đây dùng để chỉ một thành phần (ví dụ một thành phần sản phẩm thức ăn) mà ngăn ngừa sự tách của các dung dịch nhũ tương.

Được sử dụng ở đây thuật ngữ “chất liên kết” dùng để chỉ một thành phần (ví dụ một thành phần thức ăn) mà liên kết sản phẩm với nhau thông qua một phản ứng hóa học hoặc vật lý.

Thuật ngữ “chất cải biến tinh thể” được sử dụng ở đây dùng để chỉ một thành phần (ví dụ một thành phần thức ăn) mà tác động vào quá trình kết tinh của chất béo hoặc nước.

"Các chất mang" hoặc "các chất độn" có nghĩa là các vật liệu thích hợp cho sử dụng hợp chất và bao gồm bất kỳ vật liệu nào được biết trong lĩnh vực này như, ví dụ, chất lỏng, gel, dung môi, chất pha loãng dung dịch, chất tạo dung dịch, hoặc các chất tương tự không độc và không tương tác với bất kỳ thành phần nào của chế phẩm theo cách thức gây hại.

Các ví dụ về các chất mang dinh dưỡng bao gồm, ví dụ, ngũ cốc, nước, các dung dịch muối, cồn, silicon, sáp, mỡ, dầu thực vật, và các chất tương tự.

Các ví dụ về các chất phụ gia bao gồm một hoặc nhiều: xenluloza vi tinh thể và các xenluloza khác, lactoza, natri xitrat, canxi carbonat, dibazơ canxi phosphat, glyxin, tinh bột, đường sữa và các polyetylen glycol có phân tử lượng cao.

Các ví dụ về các chất làm phân rã bao gồm một hoặc nhiều: tinh bột (tốt hơn nếu tinh bột ngô, khoai tây, sắn), natri tinh bột glycollat, croscarmenloza natri và các silicat phức hợp nhất định.

Các ví dụ về liên kết hạt bao gồm một hoặc nhiều: polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), hydroxypropylxenluloza (HPC), sucroza, maltoza, gelatin và acacia.

Các ví dụ về các chất bôi trơn bao gồm một hoặc nhiều: magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat và đã tan.

Các ví dụ về các chất pha loãng bao gồm một hoặc nhiều: nước, etanol, propylen glycol và glyxerin, và các hỗn hợp của chúng.

Các thành phần khác có thể được sử dụng đồng thời (ví dụ khi chúng được trộn với nhau hoặc thậm chí khi chúng được cấp bởi các con đường khác nhau) hoặc liên tiếp (ví dụ chúng được cấp bởi các con đường khác nhau).

Được sử dụng ở đây thuật ngữ “thành phần thích hợp cho việc tiêu thụ bởi người và động vật” có nghĩa là một hợp chất mà được hoặc có thể được thêm vào chế phẩm theo sáng chế dưới dạng một chất bổ sung mà có thể làm lợi về dinh dưỡng, một chất thay thế dạng sợi hoặc có tác động có lợi nói chung đến sự tiêu thụ.

Ví dụ, các thành phần có thể là tiền sinh học như alginat, xanthan, pectin, gồm đậu chấu (LBG), inulin, gồm guar, galacto-oligosaccarit (GOS), fructo-oligosaccarit (FOS), lactosucroza, các oligosaccarit đậu tương, palatinoza, các isomalto-oligosaccarit, các gluco-oligosaccarit và các xylo-oligosaccarit.

CÁC CHẤT LÀM THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN

Các hợp chất có thể được sử dụng làm – hoặc để điều chế - các chất thực phẩm hoặc thức ăn. ở đây, thuật ngữ “thức ăn” được sử dụng với nghĩa rộng – và bao gồm thực phẩm và các sản phẩm cho người cũng như thức ăn cho động vật (tức là thức ăn). Thuật ngữ “thức ăn” được sử dụng liên quan đến các sản phẩm làm thức ăn cho động vật trong ngành chăn nuôi động vật. Trong một khía cạnh được ưu tiên, thực phẩm hoặc thức ăn là để cho việc tiêu thụ bởi các động vật một khoang bụng như lợn, gia cầm và cá.

Thực phẩm hoặc thức ăn có thể ở dưới dạng dung dịch hoặc chất rắn – phụ thuộc vào việc sử dụng và/hoặc kiểu ứng dụng và/hoặc kiểu cung cấp.

CÁC THÀNH PHẦN THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN VÀ CÁC THÀNH PHẦN PHỤ

Các hợp chất này có thể được sử dụng làm thành phần thực phẩm hoặc thức ăn.

Được sử dụng ở đây thuật ngữ “thành phần thực phẩm hoặc thức ăn” bao gồm công thức chế phẩm, mà được hoặc có thể được thêm vào thức ăn hoặc lương thực và

bao gồm các chế phẩm mà có thể được sử dụng ở các mức thấp trong rất nhiều các sản phẩm khác nhau.

Thành phần thực phẩm có thể ở dưới dạng dung dịch hoặc chất rắn – phụ thuộc vào việc sử dụng và/hoặc kiểu ứng dụng và/hoặc kiểu cung cấp.

Các hợp chất này có thể là - hoặc có thể được bổ sung vào - các chất bổ sung thực phẩm.

CÁC CHẾ PHẨM THỰC PHẨM HOẶC THỨC ĂN

Các chế phẩm thức ăn cho các động vật một dạ dày điển hình bao gồm các chế phẩm bao gồm các sản phẩm thực vật chứa phytat. Các chế phẩm này bao gồm bột ngũ cốc thô, bột đỗ tương thô, bột hạt cải dầu, bột hạt bông, ngô, lúa mì, lúa mạch, và các thức ăn chứa bột lúa miến.

Các phytaza được mô tả ở trên có thể là - hoặc có thể được bổ sung vào - chất làm thức ăn hoặc thực phẩm và các chế phẩm của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất một phương pháp điều chế một thành phần thức ăn hoặc thực phẩm hoặc thành phần bổ sung, phương pháp này bao gồm việc trộn các phytaza được sản xuất bởi quá trình theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế với một thành phần khác. Phương pháp để điều chế một thành phần thức ăn cũng là một khía cạnh của sáng chế. Các phương pháp để điều chế thức ăn động vật được nêu ở trên. Enzym cũng có thể được thêm vào dưới dạng một công thức chế phẩm rắn, hoặc một chất phụ gia thức ăn, như là chất trộn trước. Dạng rắn điển hình được thêm vào trước khi hoặc trong bước trộn, và một dạng lỏng điển hình được thêm vào sau bước tạo viên.

DƯỢC PHẨM

Các phytaza theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các dược phẩm hoặc kết hợp với lương thực để tạo ra một số tác dụng dược học. Ví dụ, EP 1,389,915 mô tả việc sử dụng một phytaza trong thực phẩm hoặc đồ uống để làm

tăng tính có sẵn của Canxi, Sắt và/hoặc Kẽm của thực phẩm hoặc đồ uống cho người.

Ngoài ra, EP 1,392,353 mô tả một thuốc hoặc chế phẩm bổ sung dinh dưỡng chứa phytaza, mà hữu dụng trong việc làm tăng tính có sẵn sinh học của các nguyên tố sinh học, ví dụ canxi và sắt, và để chống lại các bệnh liên quan đến thiếu hụt các nguyên tố này.

Ở đây, thuật ngữ “dược học” được sử dụng theo nghĩa rộng – và bao gồm các dược phẩm và/hoặc chất dinh dưỡng cho người cũng như các dược phẩm và/hoặc các chất dinh dưỡng cho động vật (tức là các ứng dụng cho thú y). Trong một khía cạnh được ưu tiên, dược phẩm là được sử dụng cho người và/hoặc cho ngành chăn nuôi.

Dược phẩm có thể dùng cho các mục đích trị bệnh - mà nó có tác dụng cứu chữa hoặc làm giảm hoặc phòng bệnh về bản chất. Dược phẩm có thể thậm chí sử dụng cho các mục đích chẩn đoán.

Khi được sử dụng làm – hoặc để điều chế - một dược phẩm, sản phẩm và/hoặc các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều: chất mang dược dụng, chất pha loãng dược dụng, chất phụ gia dược dụng, chất phụ trợ dược dụng, thành phần có hoạt tính dược.

Dược phẩm có thể ở dưới dạng dung dịch hoặc chất rắn – phụ thuộc vào việc sử dụng và/hoặc kiểu ứng dụng và/hoặc kiểu cung cấp.

THÀNH PHẦN DƯỢC PHẨM

Sản phẩm và/hoặc các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm các thành phần dược phẩm. Ở đây, sản phẩm và/hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể là một thành phần hoạt hóa duy nhất hoặc nó có thể là ít nhất một trong số (tức là 2 hoặc nhiều hơn) các thành phần hoạt hóa.

Thành phần dược phẩm có thể ở dưới dạng một dung dịch hoặc một chất rắn – phụ thuộc vào việc sử dụng và/hoặc kiểu ứng dụng và/hoặc kiểu cung cấp.

Thành phần dược phẩm có thể ở dưới dạng một sản phẩm sủi bọt để cải thiện các tính chất tan của dược phẩm.

CÁC DẠNG CHẾ PHẨM

Sản phẩm và/hoặc các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng theo dạng thích hợp bất kỳ - hoặc riêng rẽ hoặc với có mặt trong một chế phẩm. Tương tự, các phytaza được điều chế theo sáng chế (tức là các thành phần – như các thành phần thực phẩm, các thành phần thực phẩm chức năng hoặc các thành phần dược phẩm) có thể được sử dụng theo dạng thích hợp bất kỳ.

Các ví dụ về các dạng thích hợp bao gồm một hoặc nhiều: viên nén, viên thuốc, viên bao nang, viên noãn, các dung dịch hoặc huyền phù, mà có thể chứa các chất tạo hương vị và tạo màu, để sử dụng cho các ứng dụng giải phóng trung gian, chậm, cải biến, duy trì liên tục, xung hoặc có điều khiển

Ví dụ, nếu sản phẩm và/hoặc chế phẩm được sử dụng dưới dạng viên nén – như đối với việc sử dụng làm một thành phần chức năng - các viên nén cũng có thể chứa một hoặc nhiều: các chất phụ gia, các chất làm tan rã, các chất liên kết tạo hạt, hoặc các chất bôi trơn.

Các ví dụ về các chất mang dinh dưỡng để sử dụng trong việc điều chế các dạng này bao gồm, ví dụ, nước, các dung dịch nước muối, rượu, silicon, sáp, mỡ và các dạng tương tự.

Các tá dược được ưu tiên cho các dạng này bao gồm lactoza, tinh bột, xenluloza, đường sữa hoặc các polyethylen glycol có phân tử lượng cao.

Đối với các dạng huyền phù nước và/hoặc cồn ngọt, các hợp chất tách carotenoid có thể được kết hợp với các chất tạo hương vị và làm ngọt khác nhau, chất tạo màu hoặc thuốc nhuộm, với các chất nhũ hóa và/hoặc tạo huyền phù và với các chất pha loãng như nước, etanol, propylen glycol và glyxerin, và các hỗn hợp của chúng.

Các dạng này cũng có thể bao gồm các viên bao nang gelatin; viên bao nang sợi; các viên nén sợi v.v..

CÁC KỸ THUẬT HỆ PHƯƠNG PHÁP TÁI TỔ HỢP ADN CHUNG

Sáng chế sử dụng, ngoại trừ được chỉ ra khác, các kỹ thuật hóa học, sinh học phân tử, vi sinh, ADN tái tổ hợp và miễn dịch thông thường, đều thuộc khả năng hiểu biết của một chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật này được giải thích trong các tài liệu. Xem, ví dụ, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, và A. Kahn, 1996, *ADN Isolation and SEQuencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; vaf, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: ADN Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of ADN* Methods in Enzymology, Academic Press.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa trong các ví dụ không hạn chế dưới đây.

Ví dụ 1. Thử nghiệm hoạt tính phytaza.

Micro-l = microlit

Các thử nghiệm phytaza được tiến hành trong các tấm vi chuẩn độ. Hỗn hợp phản ứng (100 micro-l) chứa: phytat 2 mM và CaCl_2 0,8 mM trong đệm natri axetat 200 mM, pH 3,5. Phản ứng được cho tiến hành trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C sau thời gian này phosphat được giải phóng được đo bằng phương pháp tinh chế theo quy trình đã biết (Heinonen J.K., Lahti R.J. Anal Biochem. 113 (2), 313-317 (1981)). Tóm tắt, 200 micro-l dung dịch AMM mới điều chế (7,5 N H_2SO_4 , 15 mM amoni molybdat và axeton - 1:1:2) được thêm vào 100 micro-l hỗn hợp phản

ứng trong mỗi hố của tấm vi chuẩn độ. Độ hấp thụ ở bước sóng 390 nm được đo trong khoảng thời gian từ 10 phút đến 30 sau khi thêm chất phản ứng AMM. Lượng phosphat được đo bằng cách dựng đường chuẩn với các dung dịch phosphat với các nồng độ đã biết. Để thử nghiệm hoạt tính phytaza ở các giá trị pH khác nhau, các đệm dưới đây (tất cả đều có nồng độ 200 mM) được sử dụng: glyxin/HCl với độ pH giữa 2,0 và 3,0, natri axetat/axit axetic với độ pH giữa 3,5 và 5,5, axit Tris/maleic với độ pH giữa 6,0 và 7,5.

Ví dụ 2. Giống tạo phytaza P1-29

Giống vi khuẩn P1-29 được phân lập lần đầu từ một đồng vật liệu thực vật mục được lựa chọn từ một lòng vũng nước trong rừng miền Nam Phần Lan. Giống này có thể được nuôi cấy ưa khí ở nhiệt độ 30°C trong nhiều môi trường nuôi cấy đơn giản ví dụ LB (pepton 1%, dịch chiết men 0,5%, NaCl 1%, pH 7,4) hoặc môi trường phosphat thấp PP1 (1% pepton, dịch chiết từ thịt bò 1%, dịch chiết men 0,5%, CaCl_2 – 0,2M. Môi trường này được điều chế bằng cách điều chỉnh độ pH đến giá trị 11 bằng NaOH và đun sôi trong thời gian 10 phút. Kết tủa được loại bỏ bằng cách lọc, pH được điều chỉnh lại đến giá trị 5,5 và môi trường được tiệt trùng bằng cách hấp khử trùng trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 121°C).

Sau khi tăng trưởng trong môi trường PP1 lỏng, giống này được phát hiện là có hoạt tính phytaza ở cả hai giá trị độ pH bằng 3,5 và 5,5 (được làm thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 1). Tỷ lệ hoạt tính ở độ pH bằng 3,5 và 5,5 là khoảng 1,3. Hoạt tính cũng được đo riêng trong các tế bào và lớp nổi tầng mặt dịch nuôi cấy P3-42. Theo các số đo này, phần lớn hoạt tính phytaza được liên kết tế bào với 10-20% hoạt tính được phát hiện trong lớp nổi tầng mặt của dung dịch nuôi cấy.

Giống này được nộp lưu NCIMB với số hiệu lưu giữ 41248.

Ví dụ 3. Phân lập ADN nhiễm sắc thể từ giống P1-29

ADN nhiễm sắc thể được điều chế chủ yếu bởi quy trình chuẩn (Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1996). Một dung dịch nuôi cấy có thể tích 250 ml được nuôi qua đêm ở nhiệt độ 30°C

trong môi trường LB được chạy ly tâm ở tốc độ 10, 000 vòng/phút trong thời gian 30 phút, được rửa 20 ml dung dịch chứa 50 mM tris-HCl, 5 mM EDTA pH 8 và được làm tái huyền phù trong 10 ml TES lạnh (50 mM tris-HCl, 5 mM EDTA, glucoza 15 % pH 8). Lysozym được thêm vào 10 mg/ml, và huyền phù tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 – 60 phút cho đến khi xảy ra sự tiêu bào, được kháng định chắc chắn bằng cách pha loãng 100 micro-l hỗn hợp phản ứng với 1 ml SDS 1 % và kiểm tra sự ổn định về độ nhớt. Trong thời gian này, SDS và Proteinaza K (Sigma) được thêm vào hỗn hợp có nồng độ cuối là 1% và 0,5 mg/ml tương ứng. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 56°C sau đó bổ sung 2 ml NaCl 5 M và 1,4 ml xetyltrimetylamonium bromua 10% (Sigma). Tiếp tục ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 65°C. Dung dịch được chiết một lần với chloroform/rượu isoamyl (24:1) và một lần với phenol/chloroform. Sau khi chiết, pha nước được trộn với 0,6 thể tích isopropanol, kết tủa ADN được thu hồi bằng phương pháp ly tâm (10 000 vòng/phút, 15 phút), được rửa bằng etanol 70 %, làm khô trong chân không và làm tái huyền phù trong 2 ml dung dịch chứa 10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8, 5 micro-g/ml. ARNase.

Ví dụ 4. Xác định phân loại của giống vi khuẩn P1-29

Một đoạn của gen 16S rARN của giống P1-29 được làm khuếch đại bằng phản ứng mạch polymeraza (PCR) với polymeraza *Taq* ADN (Roche) sử dụng các đoạn mồi; 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) và 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D. J. In *Axist nucleic techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. và Goodfellow, M. eds, John Wiley & Sons, New York: pp 115-117 (1991)). Chương trình sau được sử dụng: 1) bước làm biến tính ADN ban đầu trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 95°C; 2) 30 chu kỳ 1 phút ở nhiệt độ 94°C, 1 phút ở nhiệt độ 55°C, 1 phút ở nhiệt độ 72°C; 3) bước mở rộng cuối cùng ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 10 phút. Các sản phẩm PCR, có độ dài, được tinh chế bằng phương pháp điện thẩm trong gel agarosa 0,8 % và được chiết từ gel này sử dụng một bộ kit Gel Purification Kit (Qiagen) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm PCR tinh khiết được dựng trình tự theo chương trình của Medprobe (Norway) là một dịch vụ thương mại. Đoạn được dựng trình tự được

được liệt kê là SEQ ID No: 1. Trình tự này được đem so sánh với các trình tự ADN trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Các cặp có độ tương thích cao nhất (688-689 trong số 691 nucleotit, 99,6- 99,7%) được thấy ở các trình tự chứa gen 16S ARN của một vài giống *Buttiauxella* như *B. izardii* DSM 9397, *B. gaviniae* DSM 9393 và *B. noackiae* ATCC 51607T . Do đó, giống P1-29 có thể được phân loại là *Buttiauxella* sp..

Ví dụ 5. Tách đơn dòng gen phytaza từ *Buttiauxella* sp. P1-29

ADN nhiễm sắc thể lấy từ *Buttiauxella* sp. P1-29 đã được làm tiêu một phần bằng endonucleaza giới hạn *Sau3A* và việc tiêu này được phân đoạn trên gel agarosa 1%. Các đoạn ADN có độ dài từ 3 đến 5 kb được phân lập từ gel này sử dụng một bộ tinh chế gel Purification Kit (Qiagen) và được thắt với các nhánh lambda-ZAP được làm tiêu bởi *Bam*HI (Stratagene). Các bước tiếp theo để xây dựng thư viện tuân theo các hướng dẫn của Stratagene's ZAP Express Predigested Vector/Gigapack Cloning Kit. Dạng thực khuẩn của thư viện này được chuyển đổi thành một dạng plasmit bởi quy trình “cắt đóng” như được mô tả bởi người sản xuất (Stratagene). Tách bằng sàng thư viện plasmit được tiến hành theo cách tương tự với các phương pháp được công bố sớm hơn để phát hiện hoạt tính phytaza trên các tấm Petri (Howson and Davis. Enzym Microb. Technol. 5, 377-382 (1983); Chen J.C. Biotechnology techniques 12 (10) 751-761 (1998); Riccio M.L. *et al*, J. Appl. Microbiol. 82, 177-185 (1997)). Một số clon dương tính với phytaza được phân lập và tinh chế bằng phương pháp tách dưới dòng. Các thể tách này được nuôi cấy trong dịch nuôi cấy lỏng (môi trường LB ở nhiệt độ 30°C và tốc độ khuấy 200 vòng/phút trong thời gian 24 giờ) và hoạt tính phytaza được đo (Ví dụ 1) trong các thể huyền phù tế bào thu được. Một clon có hoạt tính phytaza cao nhất (khoảng 1,2 U/ml ở độ pH bằng 3,5) được lựa chọn để mô tả đặc điểm của trình tự. ADN plasmit được phân lập từ clon này, có tên pBK(P1-29), và được mô tả đặc điểm bởi việc tạo trình tự ADN một phần với ADN điền vào (dịch vụ trình tự nhận được từ Medprobe (Đan Mạch)). Trình tự bao gồm gen phytaza được liệt kê là SEQ ID No: 2. Trình tự bị làm ngắn của *Buttiauxella* sp. P1-29 phytaza được liệt kê là SEQ ID No: 3. Việc so sánh SEQ ID No: 3 với các trình tự trong ngân hàng GenBank sử dụng dịch vụ

BLAST được cung cấp bởi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) dạng phytaza được nhận dạng *Obesumbacterium proteus* (GenBank accession No: AAQ90419) là dạng tương tự gần nhất với phytaza *Buttiauxella* sp. P1-29. Tuy nhiên, mức độ đồng nhất tương đối thấp - chỉ khoảng 74% các gốc axit amin là giống nhau trong cả hai protein.

Ví dụ 6. Khuếch đại và biểu hiện gen phytaza từ *Buttiauxella* sp. P1-29

Gen phytaza được khuếch đại bởi PCR. ADN nhiễm sắc thể của giống *Buttiauxella* sp. P1-29 được sử dụng làm khuôn mẫu và các oligonucleotit o29-5 (GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAC) và o29-3 (GGAATTCGGATCCTTA-CTGTAGCTGGCAGCCTG) làm các đoạn mồi. Sự khuếch đại được tiến hành bằng cách sử dụng bộ kit (Roche). Chương trình sau được sử dụng: 1) làm biến chất ADN ban đầu trong thời gian 3 phút ở nhiệt độ 94°C; 2) 35 vòng với thời gian 45 giây ở nhiệt độ 94°C, 45 giây ở nhiệt độ 55°C, 1 phút ở nhiệt độ 68°C, 1 phút ở nhiệt độ 72°C, 1 phút ở nhiệt độ 74°C; 3) một bước cuối khoảng 10 phút ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR thu được được tinh chế bằng phương pháp điện thẩm trong một gel agarosa 0,8 % sau đó là chiết ADN từ gen này sử dụng bộ kit Gel Purification Kit (Qiagen). Sản phẩm PCR tinh khiết được làm tiêu bằng các enzym giới hạn *NdeI* và *BamHI* và được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bởi bộ kit PCR Purification Kit (Qiagen). Vector plasmit pET11a (Novagen) này được làm tiêu bằng các endonucleaza giới hạn *NdeI* và *BamHI*, được khử phospho bằng cách sử dụng phosphatase kiềm của tôm (Roche) và được tinh chế bằng phương pháp điện thẩm trong gel agarosa 0,8 %. Dải plasmit được sắp hàng ADN được cắt từ gel này và được tinh chế sử dụng bộ kit Gel Purification Kit (Qiagen). Hai đoạn ADN tinh khiết được thắt bằng cách sử dụng ligaza ADN 4 (Roche). Hỗn hợp phản ứng thắt được làm kết tủa bằng ethanol 70%, được rửa bằng ethanol và được làm tái huyền phù trực tiếp trong 50 micro-l tế bào XL1-Blue MRF của *E. coli* khả biến bằng điện. Huyền phù được chuyển vào chậu thủy tinh truyền nhiễm điện 0,1 cm (BioRad) và được truyền nhiễm bằng điện sử dụng Gene Pulser Xcell (BioRad) được đặt ở 1800 V, 25 micro-F và 200 Ohms. Ngay sau khi truyền nhiễm bằng điện, 1 ml môi trường LB được thêm vào, huyền phù tế bào được

chuyển vào một ống nhựa 15 ml (Falcon) và được ủ ở nhiệt độ 37°C đồng thời lắc (200 vòng/phút) trong thời gian 1 giờ. Các tế bào được biến nạp được đặt trên các tấm LB chứa 100 micro-g/ml và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. 24 dạng biến nạp được nuôi trong dịch nuôi cấy lỏng và dung dịch nuôi cấy được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính phytaza và phân lập plasmit ADN. Một clon tạo ra hoạt tính phytaza cao nhất và tạo ra kiểu giới hạn dự kiến của plasmit ADN được lựa chọn. Plasmit được chứa bởi clon này được gọi là pET11(P1-29) được sử dụng để gây biến nạp thể chủ biểu hiện giống BL21(DE3)pLysS (Novagen). Huyền phù tế bào được biến nạp, được lắc trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong LB chứa glucoza 2% và được ủ với 50 ml of LB chứa ampicillin (100 micro-g/ml) và glucoza (2%) và được nuôi qua đêm ở nhiệt độ 30 °C đồng thời lắc (200 vòng/phút). OD của dung dịch nuôi cấy thu được được đo ở bước sóng 600 nm và dung dịch nuôi cấy được sử dụng để ủ 1 l LB + ampicillin (100 micro-g/ml) đến khi OD₆₀₀ bằng 0,04. Việc nuôi dưỡng được tiếp tục qua đêm ở nhiệt độ 30°C. Hoạt tính phytaza trong các dung dịch nuôi cấy điển hình bằng 8-12 U/ml. Khoảng 40% hoạt tính phytaza được tiết vào môi trường nuôi cấy và phần còn lại nằm lại trong các tế bào. Những quan sát này cho thấy phytaza có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29 được tiết trong *E.coli* có phần hiệu quả hơn ở trong thể chủ gốc của nó. Hoạt tính trong dung dịch nuôi cấy của một giống đối chứng BL21(DE3)pLysS được làm biến nạp với pET11 được nuôi dưỡng dưới các điều kiện giống nhau là dưới 0,05 U/ml.

Ví dụ 7. Tinh chế phytaza tái tổ hợp có nguồn gốc từ *Buttiauxella* P1-29.

Dung dịch nuôi cấy BL21(DE3) pLysS được làm biến nạp với pET11(P1-29) được ly tâm để loại bỏ các tế bào vi khuẩn, được cô đặc sử dụng một thiết bị cô quay đến khi đạt 1/10 thể tích ban đầu và được thẩm tách để loại nước cho đến khi suất dẫn của dung dịch giảm dưới 250 micro-S/cm. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến giá trị 8,0 bằng tris bazơ và nó được đưa vào một cột (3x20 cm) DEAE Sepharose Fast Flow (Roche) được làm cân bằng bằng 25 mM tris-HCl, pH 8,0. Cột này được rửa bằng đệm cân bằng ở tốc độ chảy là 3 ml/phút trong thời gian 30 phút sau đó pha loãng bằng ba gradient liên tiếp chứa NaCl với tris-HCl nồng độ 25 mM, pH 8,0: 0-50 mM, 50-150 mM và 150-500 mM. Mỗi gradient này được lập

trình trong thời gian 1 giờ với tốc độ chảy cố định ml/phút. Các phần 9 ml được thu hồi và được thử nghiệm hoạt tính phytaza. Một đỉnh mạnh hoạt tính được phát hiện. Protein trong phân đoạn pik này được cô đặc sử dụng các thiết bị cô Centriplus (Amicon) và được phân tích SDS PAGE sử dụng một gel 12% và hệ đệm Laemmli chuẩn. Các kết quả của phép phân tích chỉ ra việc điều chế phytaza của *Buttiauxella* P1-29 nhận được bằng DEAE Sepharose chứa chủ yếu một thành phần riêng. Các phân tích bán định lượng trên cơ sở quét hình ảnh số của gel này (Fig. 1) chỉ ra độ tinh khiết khoảng 65%.

Ví dụ 8. Biên dạng pH của phytaza tái tổ hợp thu được từ *Buttiauxella* P1-29

Phụ thuộc vào hoạt tính của phytaza của *Buttiauxella* P1-29 (được tinh chế theo Ví dụ 7) trên độ pH được nghiên cứu trong các đệm và dưới các điều kiện được mô tả trong Ví dụ 1. Enzym hoạt động trong khoảng pH rộng (2-5,5) với độ pH tối đa khoảng pH 4,5 và một "khoảng biên" của đường cong ở pH bằng 3 (Fig 2).

Ví dụ 9. Tính đặc hiệu cơ chất của phytaza tái tổ hợp thu được từ *Buttiauxella* P1-29

Các phân đoạn của các inositol phosphat chứa ba, bốn hoặc năm phosphat trên gốc inositol được phân lập bằng phép sắc ký trao đổi ion từ chất thủy phân một phần của axit phytic được xử lý với phytaza nấm (Natuphos). Việc sản xuất và tinh chế các chế phẩm này được thực hiện như một dịch vụ thương mại bởi BioChemis Ltd (St.Petersburg, Russia). Việc làm nhiễm mỗi phân đoạn này với các inositol-phosphat có các mức phosphoryl hóa khác nhau là nhỏ hơn 5% như được đánh giá bằng phép sắc ký HPLC (Sandberg A.S., Ahderinne R. J. Food Sci. 51 (3), 547-550). Fructoza 1,6-diphosphat và fructoza 6-phosphat (Sigma) thương mại được sử dụng làm các cơ chất mẫu được sử dụng để ước tính tính đặc hiệu của *Buttiauxella* P1-29 phytaza đối với các cơ chất di- và monophosphat. Hoạt tính của phytaza của *Buttiauxella* được tinh chế theo Ví dụ 7 với các cơ chất khác được đo bằng phép phân tích chuẩn (Ví dụ 1) ở độ pH bằng 3,5 sử dụng các nồng độ 2 mM của các cơ chất trong hỗn hợp phản ứng cuối. Các kết quả (Fig 3) chỉ ra rằng enzym có tính

đặc hiệu cơ chất cực kỳ rộng. Hoạt tính của nó với các penta-, tetra- và triphosphat về cơ bản là bằng hoặc cao hơn một chút so với hoạt tính với axit phytic làm cơ chất. Thậm chí fructoza 1,6-diphosphat – một cơ chất kém đối với hầu hết các phytaza, cũng được thủy phân hiệu quả bởi phytaza của *Buttiauxella* sp. (cụ thể phytaza được dẫn xuất từ P1-29). Quá trình thủy phân fructoza 6-phosphat cũng có thể phát hiện được mặc dù chúng có hiệu quả thấp hơn nhiều so với việc thủy phân của các cơ chất được thử nghiệm khác.

Ví dụ 10. Hoạt tính đặc hiệu của phytaza tái tổ hợp thu được từ *Buttiauxella* P1-29

Hoạt tính đặc hiệu của phytaza P1-29 của *Buttiauxella* được ước tính sử dụng phương pháp điều chế tinh chế theo Ví dụ 7. Hoạt tính phytaza được đo ở độ pH bằng 3,5 theo Ví dụ 1. Nồng độ phytaza được tính toán bằng cách đo tổng nồng độ của protein với bộ kit BCA Protein Assay Kit (Pierce) và hiệu chỉnh nó bởi nồng độ phytaza được ước tính bằng SDS PAGE (Ví dụ 7). Theo các phép đo này, hoạt tính đặc hiệu của phytaza tái tổ hợp thu được từ *Buttiauxella* P1-29 là khoảng 300 U/mg ở nhiệt độ 37°C.

Ví dụ 11. Tạo ra và mô tả đặc điểm của các biến thể phytaza.

Các biến thể phytaza được dựng cấu trúc bằng cách gây đột biến trình tự nucleotit SEQ ID NO: 2 sử dụng các phương pháp gây đột biến gen như được liệt kê ở trên như các phương pháp được mô tả trong tài liệu của Morinaga et al (Biotechnology (1984) 2, p 646-649), hoặc tài liệu của Nelson và Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151), hoặc protocol đột biến ngưỡng sai số Error Threshold Mutagenesis được mô tả trong WO 92/18645. Một phương pháp thích hợp khác đối với PCR đột biến được bộc lộ bởi Cadwell và Joyce (PCR Methods Appl. 3(1994), 136-140).

Các biến thể enzym phytaza được mô tả đặc điểm sau khi biểu hiện khác loại trong một hoặc nhiều vật chủ biểu hiện sau: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Các biến thể phytaza có nguồn gốc từ SEQ ID No: 3, mà khác ở một hoặc nhiều vị trí axit amin, bao gồm hai vị trí, ba vị trí, bốn vị trí, năm vị trí, sáu vị trí, bảy vị trí, tám vị trí, chín vị trí, mười vị trí, mười một vị trí, mười hai vị trí. Trong đó, các vòng đột biến lặp lại thích hợp, như được mô tả ở đây được thực hiện.

Mô tả đặc điểm các biến thể phytaza

1. Tính bền nhiệt

Tính bền nhiệt của các biến thể được mô tả bởi nhiệt độ làm mất hoạt tính enzyme của enzyme. Nhiệt độ làm mất hoạt tính enzyme được xác định bằng cách đo hoạt tính còn lại của enzyme phytaza sau khi ủ trong thời gian 10 phút ở các nhiệt độ khác nhau và sau đó làm lạnh đến nhiệt độ phòng. Nhiệt độ làm mất hoạt tính enzyme là nhiệt độ tại đó hoạt tính còn lại là 50% so với hoạt tính còn lại sau khi ủ trong một cùng một khoảng thời gian dưới cùng điều kiện ở nhiệt độ phòng. Trong đó phép nội suy và ngoại suy thích hợp từ các dữ liệu hoạt tính đo được được thực hiện để xác định nhiệt độ tương ứng với 50% hoạt tính còn lại. Mức chênh lệch độ bền nhiệt °C được tính bằng cách trừ các nhiệt độ làm mất hoạt tính enzyme của các enzyme cho nhau.

Bảng 1 liệt kê các mức chênh lệch độ bền nhiệt đối với các biến thể khác nhau:

BẢNG 1:

Các mức chênh lệch độ bền nhiệt (TD) đối với các biến thể có nguồn gốc từ phytaza gốc được thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Biến thể	T.D.
K59E	2,5
T167V	2,5
K240T	2,1

T167I	3,0
K240E	3,3
D244C	4,2
Q289Y	4,4
T209K	1,8
F197S	1,0
D125E/H193R	1,5
A294E/N303K	3,5
T167I/K240T	4,1
D223E/K240E/N351D	2,7
T167I/K240T/A294E/N303K	6,1
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8,2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	11,5
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/ N303K	15,2
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294 E/ N303K	12,0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/ A294E/ N303K	16,5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/ A294E/ N303K/I336F	17,7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/	20,2

Q289H/ A294E/N303K

Các đặc tính khác

Các đặc tính khác cũng được cải thiện

Độ bền nhiệt, hoạt tính đặc hiệu, và độ bền với pepsin của các biến thể được lựa chọn được so sánh bằng cách sử dụng các thử nghiệm như được mô tả ở trên. Độ bền với pepsin của các biến thể này được đặc trưng bởi các hoạt tính còn lại được đo ở độ pH bằng 3,5, 37°C sau khi ủ pepsin so với các điều kiện điều khiển (hoạt tính còn lại=hoạt tính sau khi ủ pepsin/hoạt tính sau khi ủ dưới các điều kiện điều khiển). Việc ủ pepsin được thực hiện trong thời gian 2 giờ ở độ pH bằng 2,0, 0,25 mg/ml pepsin, 1 mM CaCl₂ và 5 mg/ml BSA ở nhiệt độ 37°C. Các điều kiện điều khiển là 2 giờ ở độ pH bằng 5,0, 1 mM CaCl₂ và 5 mg/ml BSA ở nhiệt độ 37°C.

Bảng 2 thể hiện các tính chất của các biến thể được lựa chọn (có nguồn gốc từ và được so với trọng lượng phytaza theo SEQ ID NO: 3).

BẢNG 2:

Độ ổn định pepsin stability đối với các biến thể có nguồn gốc từ phytaza gốc được thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Biến thể	Độ ổn định pepsin [% hoạt tính còn lại]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	72
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/ N303K	34

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q 289H/A294E/ N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q 289H/A294E/ N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A2 68V/Q289H/ A294E/N303K	77

BẢNG 3:

Hoạt tính đặc hiệu đối với một biến thể có nguồn gốc từ phytaza gốc được thể hiện ở SEQ ID No: 3:

Biến thể	Hoạt tính đặc hiệu [% của lượng hoạt tính ở độ pH bằng 4,0]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q28 9Y/A294E/N303K	115

Toàn bộ công bố được nêu trong bản mô tả nó trên, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong các công bố nói trên, được nêu ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo. Các cải biến và biến đổi đối với các phương pháp và hệ thống được mô tả theo sáng chế sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà không tách khỏi phạm vi và tinh thần của sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả cùng với các phương án ưu tiên cụ thể, phải hiểu rằng sáng chế như được yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn ở các phương án cụ thể này. Thực ra, các cải biến khác nhau đối với các kiểu được mô tả để thực hiện sáng chế là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sinh học phân tử và các lĩnh vực liên quan đều được dự liệu thuộc về phạm vi của các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit bao gồm trình tự axit amin với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% với nó;

polypeptit thu được từ *Buttiauxella* sp. P1-29 được lưu giữ với số truy cập NCIMB 41248; và

polypeptit thu được bằng cách biểu hiện SEQ ID No: 2 hoặc trình tự nucleotit thu được từ *Buttiauxella* sp. P1-29 được lưu giữ với số truy cập NCIMB 41248 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90% với nó;

trong đó polypeptit này có hoạt tính phytaza và phytaza này cũng có hoạt tính đặc hiệu với cơ chất mà cho phép phytaza thủy phân ít nhất một cơ chất được chọn từ nhóm bao gồm pentaphosphat, tetraphosphat, triphosphat, fructoza 1,6-diphosphat và fructoza-6-phosphat.

2. Polypeptit theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính đặc hiệu ít nhất là 100 U/mg, trong đó hoạt tính đặc hiệu nói trên được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong chất đệm natri axetat 200mM ở độ pH bằng 3,5 và ở nhiệt độ 37°C.

3. Polypeptit theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính đặc hiệu ít nhất là 200 U/mg, trong đó hoạt tính đặc hiệu nói trên được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong chất đệm natri axetat 200mM ở độ pH bằng 3,5 và ở nhiệt độ 37°C.

4. Polypeptit theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính đặc hiệu ít nhất bằng 300 U/mg, trong đó hoạt tính đặc hiệu nói trên được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong chất đệm natri axetat 200mM ở độ pH bằng 3,5 và ở nhiệt độ 37°C.

5. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ, polypeptit này được phân lập và/hoặc tinh sạch.

6. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính tối đa ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 6, hoạt tính này được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong đệm natri axetat 200mM ở nhiệt độ 37°C.

7. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính tối đa ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5, hoạt tính này được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong đệm natri axetat 200mM ở nhiệt độ 37°C.

8. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ, polypeptit này có hoạt tính tối đa ở độ pH bằng 4,5, trong đó hoạt tính này được xác định bằng cách ủ polypeptit này trong dung dịch chứa phytat 2mM và CaCl_2 0,8mM trong đệm natri axetat 200mM ở nhiệt độ 37°C.

9. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, khác biệt ở chỗ, polypeptit này bao gồm ít nhất một đột biến trong số các đột biến ở các vị trí sau: 59, 70, 122, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336 hoặc 351 (đánh số theo thứ tự đánh số ở SEQ ID NO: 3).

10. Polypeptit theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, polypeptit này bao gồm một hoặc nhiều cấu trúc đột biến sau:

[cấu trúc 1-1]

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

N 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y;

hoặc

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y;

hoặc

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y;

hoặc

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, hoặc Y;

hoặc

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

S 221 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

D 223 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

G 225 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

[Cấu trúc 1-2]

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

hoặc

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, hoặc Y;

11. Polypeptit theo điểm 9 hoặc 10, khác biệt ở chỗ, polypeptit này bao gồm ít nhất một cấu trúc đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K hoặc F197S.

12. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, khác biệt ở chỗ, polypeptit này bao gồm tổ hợp của các cấu trúc đột biến được chọn từ nhóm bao gồm:

[Cấu trúc 2]

D125E/H193R; hoặc

A294E/N303K; hoặc

T167I/K240T; hoặc

D223E/K240E/N351D; hoặc

T167I/K240T/A294E/N303K; hoặc

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; hoặc

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; hoặc

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;
hoặc

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303
K; hoặc

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/
N303K; hoặc

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/
N303K/I336F; hoặc

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

13. Polypeptit theo điểm 11 hoặc 12, khác biệt ở chỗ, polypeptit được phân lập là biến thể của enzym phytaza có độ ổn định nhiệt cao hơn và/hoặc hoạt tính đặc hiệu cao hơn và/hoặc độ ổn định đối với sự phân giải protein cao hơn so với enzym phytaza gốc mà từ đó thu được enzym phytaza này.

14. Axit nucleic được phân lập được chọn từ:

i) axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13; và

ii) axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

15. Axit nucleic được phân lập được chọn từ:

i) axit nucleic mà lai với axit nucleic mã hóa polypeptit SEQ ID No: 3 trong các điều kiện chặt chẽ ở nhiệt độ 50°C trong 0,2xSSC; và

ii) axit nucleic mà lai với axit nucleic chứa SEQ ID No: 2 trong các điều kiện chặt chẽ ở nhiệt độ 50°C trong 0,2xSSC.

16. Axit nucleic được phân lập theo điểm 14, khác biệt ở chỗ, axit nucleic này mã hóa polypeptit theo điểm 1.

17. Axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó axit nucleic được phân lập này bao gồm:

trình tự nucleotit mà giống với trình tự nucleotit trong SEQ ID No: 2,

trình tự nucleotit mà bổ sung cho trình tự nucleotit trong SEQ ID NO: 2, hoặc

trình tự nucleotit bao gồm trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự nucleotit trong SEQ ID NO: 2.

18. Axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, khác biệt ở chỗ, axit nucleic này mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13.
19. Plasmit bao gồm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm 14 hoặc từ 16 đến 18.
20. Plasmit theo điểm 19, khác biệt ở chỗ, plasmit này là vector biểu hiện để biểu hiện các polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, và/hoặc bao gồm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong vi sinh vật.
21. Hệ vector bao gồm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm 14 hoặc từ 16 đến 18.
22. Hệ vector theo điểm 21, khác biệt ở chỗ, hệ vector này là vector biểu hiện để biểu hiện polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, và/hoặc bao gồm các axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong vi sinh vật.
23. Tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm bằng plasmit theo điểm 19 hoặc 20 hoặc bằng hệ vector theo điểm 21 hoặc 22.
24. Tế bào chủ theo điểm 23, khác biệt ở chỗ, tế bào chủ này chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.
25. Tế bào chủ theo điểm 23 hoặc 24, khác biệt ở chỗ, tế bào chủ nêu trên thu được từ vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, như *B. subtilis*, *E. coli*, và nấm, bao gồm nấm men như *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, và nấm sợi, như *Trichoderma* spp. và *Aspergillus* spp. như *A. oryzae*.
26. Tế bào chủ theo điểm 25, khác biệt ở chỗ, vi sinh vật này là tế bào vi khuẩn chưa có nhân điển hình.
27. Tế bào chủ theo điểm 26, khác biệt ở chỗ, vi sinh vật này là *E. coli*.

28. Tế bào vi khuẩn chủng *Buttiauxella* sp. P1-29 được lưu giữ với số truy cập NCIMB 41248.

29. Phương pháp sản xuất polypeptit bao gồm bước biểu hiện polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, và/hoặc biểu hiện các axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm 14 hoặc từ 16 đến 18 trong tế bào chủ và bước phân lập polypeptit này từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ.

30. Phương pháp sản xuất thực phẩm bao gồm bước phun polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 ở dạng lỏng lên thực phẩm này.

31. Phương pháp sản xuất thức ăn động vật bao gồm bước phun polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 ở dạng lỏng lên thức ăn động vật này.

32. Phương pháp sản xuất thực phẩm bao gồm bước trộn polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 dưới dạng sản phẩm khô với thực phẩm này.

33. Phương pháp sản xuất thức ăn động vật bao gồm bước trộn polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 dưới dạng sản phẩm khô với thức ăn động vật này.

34. Thực phẩm bao gồm i) polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và/hoặc ii) được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 30 hoặc 32.

35. Thức ăn động vật bao gồm i) polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và/hoặc ii) được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 31 hoặc 33.

36. Phương pháp điều chế biến thể enzyme phytaza, phương pháp này bao gồm các bước lần lượt dưới đây:

- a) lựa chọn ít nhất một enzyme phytaza gốc, trong đó ít nhất một enzyme phytaza gốc này được chọn từ polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13;
- b) tạo ra ít nhất một biến thể phytaza bằng cách đưa vào ít nhất một thay đổi đối với enzyme phytaza gốc nói trên mà có thể là xen, xóa hoặc thế hoặc kết hợp

của chúng, đối với gốc axit amin trong enzym phytaza gốc nói trên để thu được ít nhất một biến thể enzym phytaza;

c) sàng lọc ít nhất một biến thể enzym phytaza nói trên để xác định biến thể enzym phytaza được cải thiện, so với enzym phytaza gốc có (các) tính chất cải thiện được chọn từ:

i. độ ổn định nhiệt và/hoặc

ii. hoạt tính đặc hiệu và/hoặc

iii. độ bền đối với sự phân giải protein cao hơn; và

d) điều chế biến thể enzym phytaza được cải thiện nói trên.

37. Phương pháp theo điểm 36, khác biệt ở chỗ, bước d) tạo ra biến thể enzym phytaza được phân lập và/hoặc tinh sạch.

38. Phương pháp theo điểm 36 hoặc 37, khác biệt ở chỗ, trong bước b) tập hợp gồm các biến thể enzym phytaza được tạo ra và trong bước c) ít nhất một phần của tập hợp gồm các biến thể enzym phytaza nói trên được sàng lọc.

39. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 38, khác biệt ở chỗ, bước a) bao gồm việc gây đột biến gen axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm 14 hoặc từ 16 đến 18 mà mã hóa enzym phytaza gốc, và bước b) bao gồm việc biểu hiện axit nucleic bị đột biến thu được trong bước a) trong tế bào chủ, và bước c) bao gồm việc sàng lọc các tế bào chủ, hoặc (các) dịch chiết của chúng, đối với biến thể enzym phytaza được cải thiện với (các) tính chất được cải thiện nêu trên.

40. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39, khác biệt ở chỗ, sau bước c) còn bao gồm ít nhất một vòng tiếp theo lặp lại các bước từ a) đến c) trong đó, tốt hơn nếu, trong (các) vòng lặp tiếp theo này, ít nhất một enzym phytaza gốc trong bước a) được tạo ra theo phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39 và được chọn từ ít nhất một biến thể enzym phytaza và/hoặc biến thể

phytaza được cải thiện nêu trên được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39.

41. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39, khác biệt ở chỗ, sau bước d) còn bao gồm ít nhất một vòng tiếp theo lặp lại các bước từ a) đến d) trong đó, tốt hơn nếu, trong (các) vòng lặp tiếp theo này, ít nhất một enzym phytaza gốc của bước a) được tạo ra theo phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39 và được chọn từ ít nhất một biến thể enzym phytaza và/hoặc biến thể phytaza được cải thiện nêu trên được điều chế bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 39.

42. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 41, khác biệt ở chỗ, bước c) bao gồm việc sàng lọc các tế bào chủ biểu hiện biến thể enzym phytaza được cải thiện mà so với i) enzym phytaza gốc và/hoặc ii) polypeptit bao gồm SEQ ID No: 3 có độ chênh lệch độ bền nhiệt bằng ít nhất 2,5.

43. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 41, khác biệt ở chỗ, bước c) bao gồm việc sàng lọc các tế bào chủ biểu hiện biến thể enzym phytaza được cải thiện mà so với enzym phytaza gốc hoặc phytaza SEQ ID No: 3 có độ bền với pepsin được cải thiện ít nhất bằng 30.

44. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 41, khác biệt ở chỗ, bước c) bao gồm việc sàng lọc các tế bào chủ biểu hiện biến thể enzym phytaza được cải thiện mà so với enzym phytaza gốc hoặc phytaza SEQ ID No: 3 có tỷ lệ hoạt tính đặc hiệu được cải thiện ít nhất bằng 110.

SEQ ID No: 1

ACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT
TTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGA
TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCT
TTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCA
GCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCAAATTCT
GTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACC
TTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGC
CACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTC
AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTA
GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGG

SEQ ID No: 2:

TTTCACATAGCAAACAACAACGAGACGAACTCGACGTTACCGCTTTGCTT
CTGGAGTATATTTATCAGACTCAAACACCCCAAAGAAAAGAGGCTGTAAA
TGACGATCTCTGCGTTTAACCGCAAAAAACTGACGCTTCACCCTGGTCTG
TTCGTAGCACTGAGCGCCATATTTTCATTAGGCTCTACGGCCTATGCCAA
CGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCC
GCCACGGGGTGCGAGCACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTA
ACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAATTGGGTTATATCACGCC
ACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGT

TTCAACAACAGGGCATT TTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCA
ATTTATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAAACTGGCGAAGC
TTTCCTGGCAGGGCTTGCTCCGCAATGTGGTTTAACTATTACACCACCAGC
AGAATCTTGAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACC
TGTTCAATGGATAAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAAGAAGCTCA
AACCCCCATTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCCTTTCTGGCCTTGA
TGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGT CAGAAACACAGC
GCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGT CGAT
AAAAGATAATGGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTCGT
CTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAA
GCGGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAA
ACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCA
GACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCG
AATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAAGATCCT
GTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA
ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGC
GCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAG
CGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCGCTCCCAAACACCAC
TTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGT
AACGATCAGACGGCTGAAGGATACTGCCCCTGTCTGACGTTCACTCGCGT
GGTTAGCCAAAGCGTGGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAAATATCAGACA
AAAAAATGCCGCTCGCGATTAAGCGAACGGCATTACTTCCTAGCTTCCC
AGCTCGGATTAGCATGGCGAGAGCCGAAAAACTT

SEQ ID No:3

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILS
RHGVRAPTKMTQTMRDVT PNTWPEWPVKLG YITPRGEHLISLMGGFYRQK

FQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQ
QNLEKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPFLAL
MNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNKVALDGAIGLS
STLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA
RHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGML
NMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTP
LSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (DK)

<120> Polypeptit, phương pháp sản xuất polypeptit, phương pháp điều chế biến thể enzym phytaza, thực phẩm và thức ăn động vật bao gồm polypeptit này

<130> P021161WO

<140> PCT/IB2005/003376

<141> 2005-10-17

<150> GB 0423139.5

<151> 2004-10-18

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 691

<212> ADN

<213> Buttiauxella

<400> 1

```
actacgacgc actttatgag gtccgcttgc tctcgcgagg tcgcttctct ttgtatgcgc      60
cattgtagca cgtgtgtagc cctactcgta agggccatga tgacttgacg tcatccccac      120
cttcctccag tttatcactg gcagtctcct ttgagttccc ggccgaaccg ctggcaacaa      180
aggataaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aaccacaacat ttcacaacac gagctgacga      240
cagccatgca gcacctgtct cacagttccc gaaggcacta aggcattctct gccaaattct      300
gtggatgtca agagtaggta aggttcttcg cgttgcatcg aattaaacca catgctccac      360
cgcttggtcg ggcccccgtc aattcatttg agttttaacc ttgcggccgt actccccagg      420
cggtcgactt aacgcgttag ctccggaagc cactcctcaa gggaacaacc tccaagtcga      480
catcgtttac ggcgtggact accaggggat ctaatcctgt ttgctcccca cgctttcgca      540
cctgagcgtc agtcctttgtc cagggggccg ccttcgccac cggatttcct ccagatctct      600
acgcatttca ccgctacacc tggaattcta cccccctcta caagactcta gcctgccagt      660
ttcgaatgca gttcccaggt tgagcccggg g                                     691
```

<210> 2

<211> 1534

<212> ADN

<213> Buttiauxella

<400> 2

```
tttcacatag caaacaacaa cgagacgaac tcgacgttac cgctttgctt ctggagtata      60
```

```

tttatcagac tcaaacaccc caaagaaaag aggctgtaaa tgacgatctc tgcgtttaac 120
cgcaaaaaac tgacgcttca ccttgggtctg ttctgtagcac tgagcgccat attttcatta 180
ggctctacgg cctatgccaa cgacactccc gcttcaggct accagggtga gaaagtggta 240
atactcagcc gccacggggg gcgagcacca accaaaatga cacagaccat gcgcgacgta 300
acaccttaata cctggcccgga atggccagta aaattggggtt atatcacgcc acgcgggtgag 360
catctgatta gcctgatggg cgggtttttat cgccagaagt ttcaacaaca gggcatttta 420
tcgcagggca gttgccccac accaaactca atttatgtct gggcagacgt tgatcagcgc 480
acgcttaaaa ctggcgaagc tttcctggca gggcttgctc cgcaatgtgg tttactatt 540
caccaccagc agaatcttga aaaagccgat ccgctgttcc atccggtgaa agcgggcacc 600
tgttcaatgg ataaaactca ggtccaacag gccgttgaaa aagaagctca aacccccatt 660
gataatctga atcagcacta tattcccttt ctggccttga tgaatacgac cctcaacttt 720
tcgacgtcgg cctgggtgtca gaaacacagc gcggataaaa gctgtgattt agggctatcc 780
atgccgagca agctgtcgat aaaagataat ggcaacaaag tcgctctcga cggggccatt 840
ggcctttcgt ctacgcttgc tgaaattttc ctgctggaat atgcgcaagg gatgccgcaa 900
gcggcggtggg ggaatattca ttcagagcaa gagtgggctg cgctactgaa actgcataac 960
gtccagtttg atttgatggc acgcacgcct tatatcgcca gacataacgg cagccttta 1020
ttgcaggcca tcagcaacgc gctgaaccgc aatgccaccg aaagcaaact gcctgatatc 1080
tcacctgaca ataagatcct gtttatttgc ggacacgata ccaatattgc caatatcgca 1140
ggcatgctca acatgcgctg gacgctacct gggcaaccgc ataacacccc tccgggcggc 1200
gcttttagtct ttgagcgttt ggccgataag tcagggaaac aatatgttag cgtgagcatg 1260
gtgtatcaga ctctcgagca gttgcgctcc caaacaccac ttagccttaa tcaacctgcg 1320
ggaagcgtac agctaaaaat tcctggctgt aacgatcaga cggctgaagg atactgcccg 1380
ctgtcgacgt tcactcgcggt ggtagccaa agcgtggaac caggctgcca gctacagtaa 1440
atatcagaca aaaaaaatgc cgctcgcgat taagcgaacg gcattacttc ctagcttccc 1500
agctcggatt agcatggcga gagccgaaaa actt 1534

```

```

<210> 3
<211> 446
<212> PRT
<213> Buttiauxella

```

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (59)..(59)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (70)..(70)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (122)..(122)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (125)..(125)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (167)..(167)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (193)..(193)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (197)..(197)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (204)..(204)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (209)..(209)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (211)..(211)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (221)..(221)
<223> Axit amin bất kỳ.

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (223)..(223)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (225)..(225)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (240)..(240)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (242)..(242)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (244)..(244)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (268)..(268)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (281)..(281)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (289)..(289)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (294)..(294)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (303)..(303)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (336)..(336)

<223> Axit amin bất kỳ.

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (351)..(351)

<223> Axit amin bất kỳ.

<400> 3

Met Thr Ile Ser Ala Phe Asn Arg Lys Lys Leu Thr Leu His Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Phe Val Ala Leu Ser Ala Ile Phe Ser Leu Gly Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Ala Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile
 35 40 45
 Leu Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met
 50 55 60
 Arg Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 Tyr Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe
 85 90 95
 Tyr Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys
 100 105 110
 Pro Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Ala Asp Val Asp Gln Arg Thr
 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly
 130 135 140
 Leu Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 His Pro Val Lys Ala Gly Thr Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln
 165 170 175
 Gln Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln
 180 185 190
 His Tyr Ile Pro Phe Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser
 195 200 205
 Thr Ser Ala Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu
 210 215 220
 Gly Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Lys

19758

225		230		235		240									
Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile
				245					250					255	
Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp	Gly	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val
		275					280					285			
Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ala	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Asn	Gly
	290					295					300				
Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr
305				310						315					320
Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile
			325						330					335	
Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met
			340					345					350		
Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala
		355					360					365			
Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Val	Ser
	370					375					380				
Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro
385					390					395					400
Leu	Ser	Leu	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro	Gly
			405						410					415	
Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr
			420					425					430		
Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln		
		435					440					445			

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 4

cagcmgccgc ggtaatwc

18

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 5

acgggcggtg tgtrc

15

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 6

ggaattcata tgacgatctc tgcgtttaac

30

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 7

ggaattcgga tccttactgt agctggcagc ctg

33

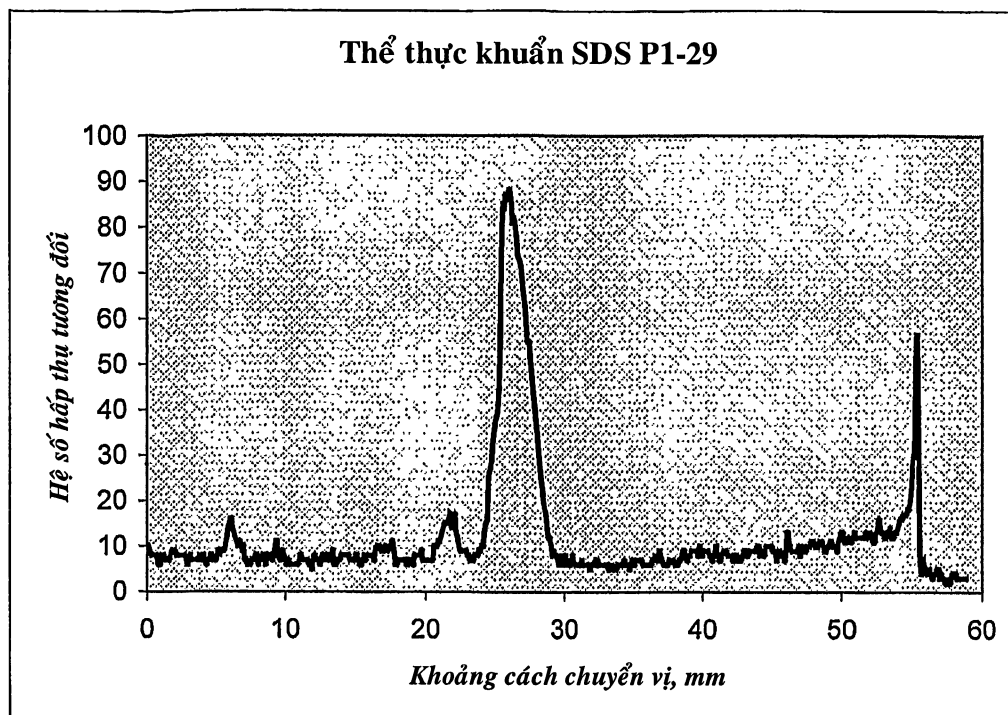


Fig.1

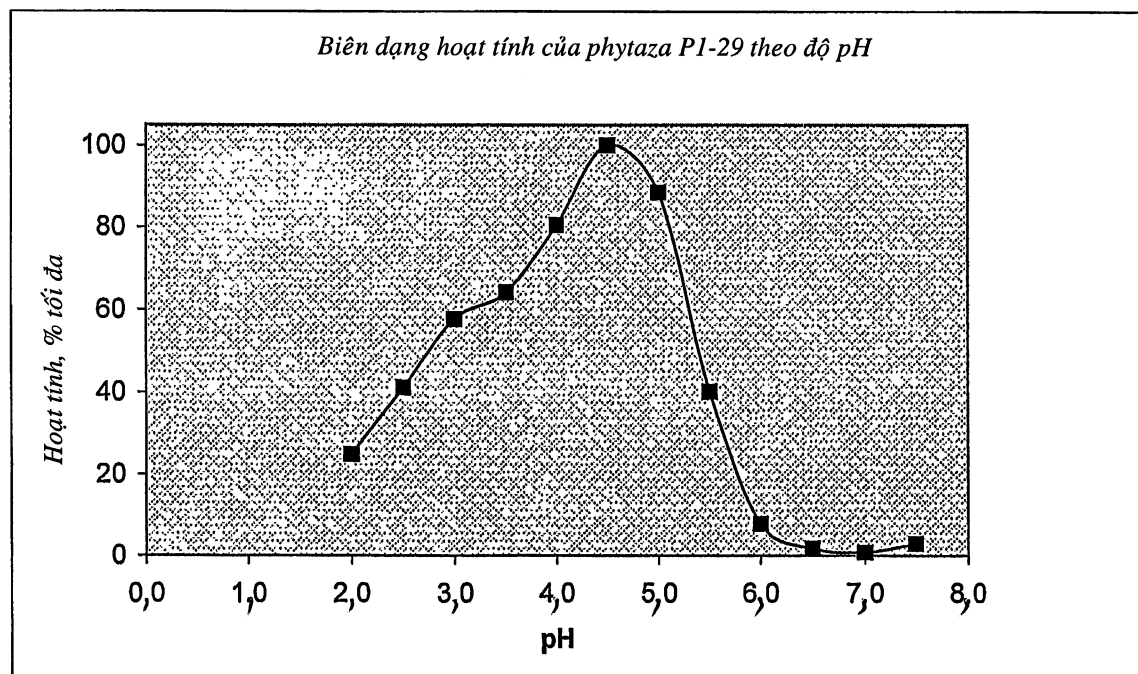


Fig.2

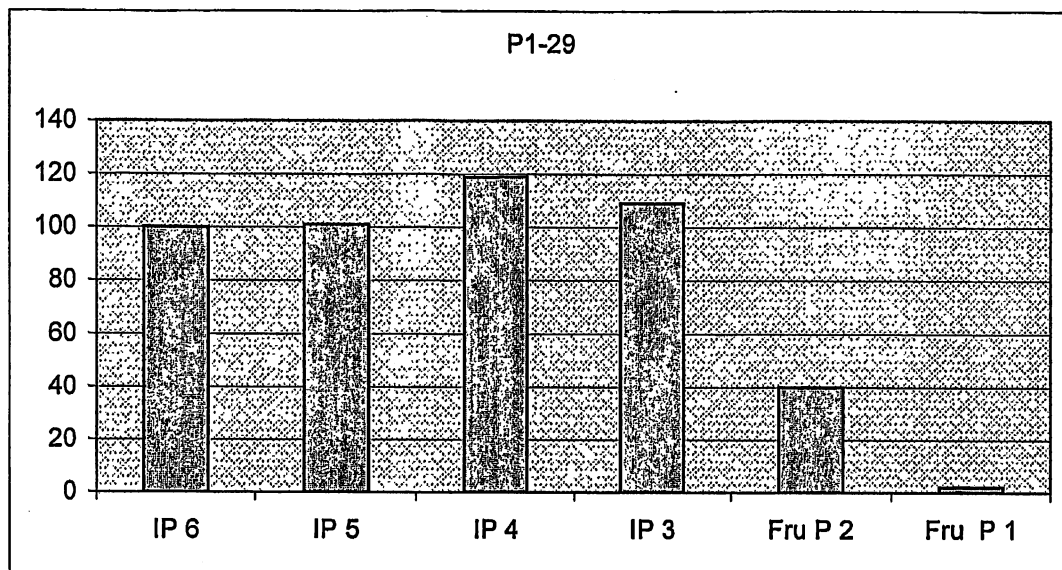


Fig.3