



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

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

(11) 
1-0020965

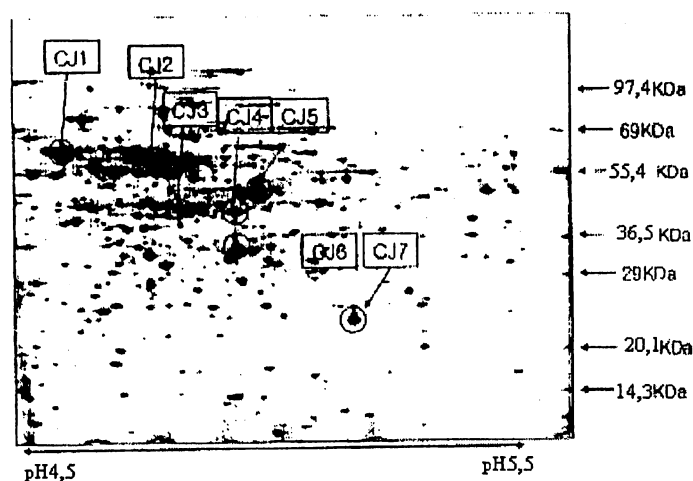
(51)⁷ C12N 15/11, 15/63, 15/70, 1/20

(13) B

- (21) 1-2007-01419 (22) 16.12.2005
(86) PCT/KR2005/004338 16.12.2005 (87) WO2006/065095 22.06.2006
(30) 10-2004-0107215 16.12.2004 KR
(45) 27.05.2019 374 (43) 26.11.2007 236
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul, Republic of Korea
(72) PARK, Young-Hoon (KR), KIM, Hyun-Soo (KR), CHOI, Hye-Jin (KR), LEE, Jin-Ho (KR), HWANG, Soo-Youn (KR), SIM, Jae-Ick (KR), KANG, Tae-Sun (KR), LEE, Won-Sik (KR)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyên (INVENCO.,LTD)

(54) GEN KHỞI ĐẦU AXIT NUCLEIC THU ĐƯỢC TỪ VI KHUẨN LOÀI CORYNEBACTERIUM, BẢNG BIỂU HIỆN CHỨA GEN KHỞI ĐẦU VÀ VECTƠ CHỨA BẢNG BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ CHỨA VECTƠ VÀ PHƯƠNG PHÁP BIỂU HIỆN GEN SỬ DỤNG TẾ BÀO NÀY

(57) Sáng chế đề xuất gen khởi đầu chứa ít nhất một polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No.: từ 1 đến 7, bảng biểu hiện chứa gen khởi đầu, vectơ chứa bảng biểu hiện, tế bào chủ chứa vectơ, và phương pháp biểu hiện gen sử dụng tế bào chủ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất gen khởi đầu axit nucleic có nguồn gốc từ vi khuẩn loài *Corynebacterium*, băng biểu hiện chứa gen khởi đầu, vectơ chứa băng biểu hiện, tế bào chủ chứa vectơ, và phương pháp biểu hiện gen sử dụng tế bào chủ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn dạng hình que là vi sinh vật được sử dụng để sản xuất nguyên liệu hoá học để sử dụng trong nhiều ứng dụng, như thức ăn gia súc, thuốc, và thức ăn chứa L-lysine, L-threonine, và nhiều axit nucleic. Chúng vi khuẩn dạng hình que có năng suất cao có thể được phát triển thông qua kỹ thuật xử lý gen và kỹ thuật chuyển hoá. Để thu được chủng vi khuẩn dạng hình que có năng suất cao, thì gen liên quan tới nhiều con đường chuyển hoá cần được biểu hiện trong vi khuẩn dạng hình que. Để có kết quả này, phải phát hiện được gen khởi đầu thích hợp.

Nhìn chung, trong vi khuẩn dạng hình que, gen được biểu hiện trong gen khởi đầu vốn đã có sẵn trong đó, (ví dụ, xem bài báo *Journal of Bacteriology*, 181(19), 6188- 6191, 1999). Trong khi, chưa biết về cấu trúc của trình tự gen khởi đầu để biểu hiện gen trong vi khuẩn dạng hình que, thì ngược lại cấu trúc của các vi sinh vật công nghiệp khác, như *E.coli* và *Bacillus subtilis*, là đã được biết. Do đó, phương pháp sau đây đã gợi ý tạo ra gen khởi đầu cho phép biểu hiện gen trong vi khuẩn dạng hình que. Đầu tiên, vùng gen khởi đầu của gen mà kháng với kháng sinh, như chloramphenicol, được loại bỏ. Riêng rẽ, ADN nhiễm sắc thể được tách ra từ vi khuẩn dạng hình que được tách ra bằng cách sử dụng enzym giới hạn thích hợp, và đoạn thu được được đưa vào gen mà vùng gen khởi đầu được loại bỏ. Sau đó, gen thu được được sử dụng để biến đổi vi khuẩn dạng hình que để tạo ra chủng biến đổi và đo mức độ kháng lại kháng sinh của chủng biến đổi (xem bài báo *Gene*, 102, 93-98, 1991; *Microbiology*, 142, 1297-1309, 1996.) Cụ thể là, một số lượng rất nhỏ gen khởi đầu được sử dụng trong *Corynebacterium ammoniogenesis*, một vi sinh vật sản xuất axit nucleic đã biết, đã được phát hiện. Ví dụ, gen khởi đầu có hoạt tính cao hơn khoảng 10% so với gen

khởi đầu tac được sử dụng trong E.coli (xem bài báo Biotechnol. Lett. 25, 1311-1316, 2003.) Tuy nhiên, khi nó được sử dụng để biểu hiện gen lớn, thì gen khởi đầu này thể hiện hiệu lực thấp. Patent Mỹ số 5,593,781 trình bày ADN gen khởi đầu được tách ra từ chủng *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) và có hoạt tính cao hơn gen khởi đầu tac. Tuy nhiên, ADN của gen khởi đầu này được tách ra từ loài *Brevibacterium* có thể không thể hoạt động được trong vi khuẩn khác. Do đó, vẫn có nhu cầu phát hiện trình tự gen khởi đầu mà có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* có bán sẵn trên thị trường, và có hoạt tính cao trong vi khuẩn khác.

Do đó, các tác giả của sáng chế đã tìm kiếm trình tự gen khởi đầu mạnh trong *Corynebacterium ammoniagenes* và tìm thấy rằng gen khởi đầu theo sáng chế có thể biểu hiện gen với hoạt tính cao trong *Corynebacterium ammoniagenes*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất gen khởi đầu có hoạt tính cao trong *Corynebacterium*.

Sáng chế cũng đề xuất băng biểu hiện chứa gen khởi đầu và vector chứa băng biểu hiện.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa vector.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp biểu hiện gen sử dụng tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất gen khởi đầu chứa ít nhất một polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. từ 1 đến 7.

Gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế là axit nucleic phân tách được và có hoạt tính gen khởi đầu. Ở đây, thuật ngữ "gen khởi đầu" được dùng để chỉ vùng ADN để ARN polymeraza gắn vào để khởi đầu việc sao chép gen. Thuật ngữ "gen khởi đầu tac" được dùng để chỉ gen khởi đầu thu được bằng cách kết hợp trình tự thu được từ vùng - 35 của gen khởi đầu operon tryptophan của E.coli và trình tự thu được từ vùng - 10 của gen khởi đầu operon lactoza của E.coli. Gen khởi đầu tac đã được biết là có hoạt tính gen khởi đầu cao. Gen khởi đầu có ít nhất một axit nucleic được chọn từ SEQ ID No.: 1, 4, 5, 6 và 7 có hoạt tính trong vi khuẩn loài hình que cao hơn so với gen khởi đầu tac. Cụ thể là, gen khởi đầu có ít nhất một axit nucleic được chọn từ SEQ

ID No.: 1 và 4 có hoạt tính cao gấp 10 lần gen khởi đầu tac trong vi khuẩn loài hình que.

Gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế có hoạt tính gen khởi đầu trong vi khuẩn loài *Esherichia*, ngoài vi khuẩn loài *Corynebacterium*. Cụ thể là, gen khởi đầu chứa SEQ ID No. 1 thể hiện hoạt tính gen khởi đầu cao gấp hai lần so với gen khởi đầu tac thậm chí trong vi khuẩn loài *Esherichia*.

Tế bào mà trong đó gen khởi đầu theo sáng chế có thể thực hiện chức năng có thể là vi khuẩn loài hình que bất kỳ. Các ví dụ của vi khuẩn loài hình que bao gồm *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) và ATCC 6871, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 và ATCC 13060, và vi khuẩn tương tự. Tuy nhiên, vi khuẩn loài hình que không bị giới hạn ở đó. Các ví dụ của vi khuẩn loài *Esherichia* mà trong đó gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế có thể thực hiện chức năng, bao gồm *E.coli*.

Trình tự của gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế có thể dễ dàng thay đổi bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực thông qua quy trình tạo đột biến đã biết, như sự tiến hoá có định hướng và tạo đột biến điểm định vị. Do đó, axit nucleic, ví dụ, có mức độ tương đồng trình tự là 70% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là, 90% hoặc nhiều hơn, so với trình tự gen khởi đầu phân tách được chứa ít nhất một axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No.: từ 1 đến 7, và có thể hoạt động như gen khởi đầu trong vi khuẩn loài hình que cũng được nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất bằng biểu hiện chứa gen khởi đầu mà liên kết được với trình tự mã hoá. Trình tự mã hoá, ví dụ, có thể là gen nguyên vẹn hoặc trình tự mã hoá mà mã hoá một vùng gen được xác định trước. Ở đây, thuật ngữ "liên kết được" nghĩa là trình tự mã hoá được liên kết về mặt chức năng với gen khởi đầu để trình tự gen khởi đầu có thể khởi đầu hoặc gián tiếp sao chép trình tự mã hoá. Bằng biểu hiện theo một phương án của sáng chế có thể còn bao gồm các trình tự đối chứng 5' và 3' liên kết được với trình tự gen khởi đầu. Trình tự mã hoá có thể là gen có liên quan với sản phẩm chuyển hoá, như IMP, GMP, L-lysine và L-threonine.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa băng biểu hiện theo một phương án của sáng chế. Ở đây, vectơ không bị giới hạn, và có thể là vectơ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Các ví dụ của vectơ theo phương án của sáng chế bao gồm vectơ pCR2.1-TOPO (được sản xuất từ Invitrogen Inc, Mỹ) và pECCG117 (KFCC-10673). Tuy nhiên, vectơ không bị giới hạn ở đó. Các ví dụ của vectơ chứa băng biểu hiện theo một phương án của Sáng chế bao gồm p117-cj1-gfp, p117-cj2-gfp, p117-cj3- gfp, p117-cj4-gfp, p117-cj5-gfp, p117-cj6-gfp và p117-cj7-gfp.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa vectơ theo một phương án của sáng chế. Tế bào chủ có thể là vi khuẩn loài hình que hoặc vi khuẩn loài *Escherichia*, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, tế bào chủ có thể là *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) hoặc *E.coli*.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp biểu hiện gen ngoại sinh bằng cách nuôi cấy tế bào chủ. Tế bào chủ được nuôi cấy trong một trong số nhiều môi trường nuôi cấy đã biết và trong nhiều điều kiện nuôi cấy đã biết tùy theo tế bào chủ được lựa chọn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện kết quả của thí nghiệm điện di hai chiều của mẫu được chiết từ vi khuẩn *Corynebacterium ammoniagenes*, trong đó các kết quả thí nghiệm được nhuộm bạc và được phát hiện để nhận biết.

FIG. 2 minh họa phương pháp tạo ra vectơ sàng lọc p117-gfp theo một phương án của sáng chế; và

FIG. 3 minh họa phương pháp tạo ra vectơ tái tổ hợp chứa trình tự gen khởi đầu từ pcj1 đến pcj7 từ vectơ sàng lọc p117-gfp theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Gen liên kết được với gen khởi đầu theo sáng chế được biểu hiện hiệu quả trong *E.coli* và *Corynebacterium ammoniagenes*. Gen khởi đầu thích hợp để phát triển chủng bằng cách sử dụng vi khuẩn loài hình que.

Bảng biểu hiện chứa gen khởi đầu theo sáng chế và vectơ chứa bảng biểu hiện theo sáng chế thích hợp để biểu hiện hiệu quả gen ngoại sinh trong *E.coli* và *Corynebacterium ammoniagenes*.

Tế bào chủ theo sáng chế có thể biểu hiện hiệu quả gen ngoại sinh.

Bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện theo sáng chế, gen ngoại sinh có thể được biểu hiện hiệu quả.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và không có ý định giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dịch chiết vi khuẩn được bào chế từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) ở các giai đoạn nuôi cấy khác nhau. Thực hiện điện di hai chiều trên các dịch chiết vi khuẩn để tìm ra protein được biểu hiện quá mức trong đó, mà sau đó được tách ra để phân tích trình tự peptit. Trình tự peptit thu được được sử dụng để nhận biết gen của các protein được biểu hiện quá mức. Sau đó, vùng gen khởi đầu được tách ra, và vectơ được tạo ra bằng cách sử dụng vùng gen khởi đầu. Tiếp theo, đo hoạt tính của gen khởi đầu trong *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) và *E.coli*.

Ví dụ 1 : Nuôi cấy *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) và lựa chọn protein được biểu hiện quá mức theo các giai đoạn nuôi cấy.

(1) Nuôi cấy vi khuẩn

Nuôi cấy *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) trong môi trường có đường mật thô (hỗn hợp chứa 50% glucoza và 50% fructoza). Vào thời điểm này, đo nồng độ tế bào. Thu hoạch các mẫu *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) được nuôi cấy ở giai đoạn đầu pha tĩnh và các pha tĩnh. Các mẫu được quay ly tâm và loại bỏ phần phía trên của dung dịch thu được. Hạt tế bào thu được được làm dung giải trong dung dịch đệm gây phân rã để tạo ra khoảng 100µm dịch chiết vi khuẩn.

(2) Thí nghiệm điện di hai chiều

Dịch chiết vi khuẩn thu được từ phần (1) được pha loãng bằng cách sử dụng 6M urê, 2M thiourê, 4% CHAPS, và 0,4% DTT để thu được hỗn hợp có tổng thể tích là 350µl. Sau đó, thêm 7µl dung dịch đệm IPG và 3µl xanh bromophenol 1% (BPB) vào đó. Dung dịch thu được được đổ vào khay được hydrat hoá lại bằng cách sử dụng dải khô gradien pH cố định. Bao mẫu trên khay được hydrat hoá lại bằng 2 ml dịch lỏng bao để ngăn cản việc bốc hơi mẫu và sự kết tinh urê, và sau đó được hydrat hoá lại ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 24 giờ.

Gel dải được hydrat hoá lại được hội tụ đẳng điện ở 20⁰C ở 0-100V trong 1 giờ, ở 300V trong 1 giờ, ở 600 V trong 1 giờ, và ở 8000 V trong thời gian được xác định trước, mà được điều chỉnh để thực hiện sự hội tụ trong 43-97 kVgiờ (pH 4-7: 43,4 kVgiờ, pH 4,5- 5,5, pH 5,5-6,7: 97 kVgiờ) bằng cách sử dụng thiết bị hội tụ đẳng điện (Multiphor II: được sản xuất bởi Amersham Bioscience, Mỹ.).

Khi hoàn thành sự hội tụ đẳng điện, thì các gel dạng dải tương ứng được cân bằng trong dung dịch có độ pH 8,8 chứa 20mM Tris-HCl, 6M urê, 2% SDS, 20% glyxerol, 2,5% acrylamit và 5mM TBP trong 15 phút. Các dải đã cân bằng tương ứng được đổ vào gel hai chiều (gradien nồng độ từ 9 đến 16%) và sau đó được hàn kín bằng dung dịch SDS chứa agarosa 0,5% có điểm sôi thấp và BPB 0,001%. Thực hiện điện di ở 100V trong khoảng 19 giờ.

Sau khi hoàn thành điện di, gel được cố định trong dung dịch metanol 45% và dung dịch axit axetic 5%. Rửa axit axetic trong 1 giờ bằng nước cất. Gel được làm nhạy với natri thiosulfat 0,02% trong 2 phút và rửa bằng nước cất. Sau đó, gel được phản ứng với bạc nitrat 0,1% trong 20 phút và rửa bằng nước cất. Sản phẩm phản ứng được phát hiện bằng dung dịch chứa 2% (trọng lượng/thể tích) natri carbonat và 0,04% (thể tích/thể tích) formaldehyt. Khi xuất hiện vết có độ đậm mong muốn, thì phản ứng được dừng lại bằng axit axetic 1%. Gel được rửa bằng nước cất và bảo quản trong túi nhựa được hàn kín ở 4°C.

Sau khi hoàn thành điện di, nếu dùng nhuộm coomassie, thì cố định gel bằng dung dịch metanol 30% và dung dịch axit axetic 10% trong 1 giờ, rửa bằng nước cất,

nhuộm với chất màu sáng chói coomassie G-250 keo trong 24 giờ, và sau đó tẩy trắng bằng dung dịch metanol 10% và dung dịch axit axetic 7% trong 4 giờ.

(3) Bào chế mẫu peptit để sử dụng cho phép đo phổ khối dựa vào các vết

Peptit được tách ra từ các vết bằng một phiên bản biến đổi của phương pháp đã biết (Shevchenko et al. Anal. Chem., 68(5), 850-8, 1996.)

Đầu tiên, vết protein được tách ra khỏi gel được bào chế từ phần (2), được tẩy trắng trong 120µl của hỗn hợp dung dịch gồm 30mM kali sắt xyanit và 100mM natri thiosulfat với tỷ lệ 1:1, và rửa bằng nước cất và sau đó bằng 120µl axetonitril 50% /amoni bicarbonat 25mM (pH 7,8) trong 10 phút. Sản phẩm thu được phản ứng với 50µl axetonitril 100% cho tới khi xuất hiện màu trắng trong khoảng 5 phút và sau đó làm khô trong chân không.

Thêm 10µl trypsin ở cấp điện di hai chiều (0,02µg/µl) vào các vết đã khô và sau đó được cho phản ứng trong đá trong 45 phút. Sau đó, thêm 50mM dung dịch đệm amoni bicarbonat (pH 7,8) vào sản phẩm phản ứng và cho phản ứng ở 37°C trong từ 12-14 giờ. Sản phẩm thu được được xử lý ba lần bằng sóng siêu âm trong 10 phút trong 10µl TFA 0,5% và axetonitril 50% để chiết peptit.

(4) Phép đo phổ khối

Peptit được chiết như mô tả ở trên được thí nghiệm qua HPLC-MS/MS. Thực hiện HPLC-MS/MS với hệ HPLC loại 1100 (được sản xuất từ Agilent Inc, Mỹ) và thiết bị đo phổ khối bẫy ion Finnigan LCQ DECA (được sản xuất từ ThermoQuest, Mỹ) mà trong đó được lắp đặt nguồn cung cấp ion hoá để xịt dưới dạng nano. HPLC được thực hiện với cột pha ngược dò theo phút C18, axit formic 0,1 % (dung môi A) và dung dịch (dung môi B) của axetonitril 90% (thể tích/thể tích) và axit formic 0,1 % được cung cấp theo mức tuyến tính (tốc độ dòng = 1µl/phút) để phân lập peptit.

Thực hiện việc phát hiện peptit 3 lần bằng cách sử dụng sự ion hoá phun kích thước nano (nano spray ionization - NSI) (điện áp phun: 1,8kV; nhiệt độ ống mao dẫn: 200°C; điện áp ống mao dẫn: 34 V; độ lệch thấu kính ống dẫn: 40V; và máy nhân điện từ: -60 V). Dữ liệu đo thu được trong kiểu trọng tâm. Sau khi thu được toàn bộ việc

chụp phổ khối có khối lượng 400-2000 Da, thì giá trị ngưỡng được đặt ở 1×10^5 số đếm và các ion mạnh nhất được tách ra thông qua máy quét có phòng phân giải cao. Sau đó, thực hiện sự phân ly gây ra do va chạm (collision-induced dissociation - CID) phổ khối/phổ khối. Trình tự của phổ CID không được mã hoá được nhận biết bằng cách sử dụng phần mềm TurboQuest (được sản xuất bởi Thermo Finnigan Inc, Mỹ). Các kết quả của việc tìm kiếm SEQUEST được nhận biết thông qua sự tương quan chéo và ΔC_n (sự tương quan chuẩn hoá delta).

Trình tự của một axit amin của peptit được khẳng định và được nhận biết bằng cách sử dụng thiết bị MS/MS LC Pulsar Q-star (được sản xuất bởi công ty Applied Biosystems Inc, Mỹ).

Kết quả là, đã tìm thấy 50 protein, và đã lựa chọn được 7 protein được biểu hiện quá mức của 50 protein. FIG. 1 thể hiện kết quả của thí nghiệm điện di hai chiều của mẫu được chiết từ *Corynebacterium ammoniagenes*, trong đó các kết quả thí nghiệm được nhuộm bạc và được phát hiện để nhận biết. Trong FIG. 1, 7 vết biểu hiện quá mức được thể hiện từ CJ1 đến CJ7 được nhận biết. Chức năng của 7 protein biểu hiện quá mức được chỉ ra trong Bảng 1. Chức năng của các protein này được nhận biết bằng cách so sánh trình tự của peptit với một trình tự axit amin được chứa trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI.

Bảng 1

Tên vết	Protein	Số truy cập ở ngân hàng gen
	Protein gây sốc do nhiệt hsp60	AE008903.1
	5-carboxyl methyl-2-hydroxy muconat semialdehyt dehydrogenaza	NC-006461.1
	Homoprotocateculat 2,3-dioxygenaza	NC-005835.1
	Tác nhân mở rộng việc dịch mã tạm thời EF-Tu	YP-145957
	Glyceraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza	AAA69094
	Xystein synthaza	AAV89445
	Mangan superoxit dismutaza	NP-940564

Trình tự gen được giả định từ 7 protein biểu hiện quá mức và được phân tích để lựa chọn vùng gen khởi đầu. Kết quả là, nó được giả thuyết là các oligonucleotit của

SEQ.ID No: từ 1 đến 7 được tách ra từ trình tự gen tương ứng với các protein được thể hiện là CJ1 đến CJ7 có hoạt tính gen khởi đầu.

Ví dụ 2: Sản xuất vector tái tổ hợp p117-cj1~7-qfp có trình tự gen khởi đầu và khẳng định hoạt tính gen khởi đầu trong *Corynebacterium ammoniagenes*

(1) Khuyếch đại trình tự gen khởi đầu từ hệ gen của *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

500µg ADN nhiễm sắc thể được tách ra từ 25ml dịch nuôi cấy *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB 100 được ủ trong một ngày, bằng cách sử dụng phương pháp được gợi ý bởi Eikmann et al. (Gen, 102, 93-98, 1991). Sử dụng ADN nhiễm sắc thể phân tách được làm mẫu. Thực hiện các PCR bằng cách sử dụng các bộ mồi (SEQ ID No.: 10 và 11, 12 và 13, 14 và 15, 16 và 17, 18 và 19, 20 và 21, và 22 và 23) để khuyếch đại gen khởi đầu của CJ1 đến CJ7 trong 30 giây ở 94°C, ở 55°C, và ở 72°C, lặp lại 30 lần, tương ứng. Kết quả là, trình tự gen khởi đầu tương ứng từ pcj1 đến pcj7 được khuyếch đại.

(2) Sản xuất vector sàng lọc

Đầu tiên, thực hiện các PCR bằng cách sử dụng vector pGFuv (được sản xuất bởi Clontech Inc, Mỹ) làm mẫu và sử dụng SEQ ID No.: 8 và 9 làm đoạn mồi tương ứng ở 94°C trong 30 giây, ở 55°C trong 30 giây, và ở 72°C trong một phút. Ở mỗi nhiệt độ, PCR được thực hiện 30 lần. Kết quả là, gen chứa protein phát huỳnh quang xanh (Green Fluorescent protein - GFP) mà không chứa vùng gen khởi đầu được khuyếch đại. Sau đó, gen GFP thu được mà không chứa vùng gen khởi đầu được nhân dòng vô tính thành vector pCR2.1-TOPO (được sản xuất từ Invitrogen, Mỹ), mà sau đó được tách PstI và EcoRI ra và đưa vào vị trí PstI và EcoRI của pECCG117 (KFCC-10673/KFCC-10674), mà là vector con thoi và có thể được biểu hiện trong *E.coli* và vi khuẩn dạng hình que. Kết quả được sử dụng làm vector sàng lọc (p117-gfp) để tách ra gen khởi đầu. FIG. 2 minh họa phương pháp sản xuất vector sàng lọc p117-gfp theo một phương án của sáng chế.

(3) Đưa trình tự gen khởi đầu vào vector sàng lọc và nhận biết hoạt tính gen khởi đầu trong *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100.

Vector sàng lọc thu được từ phần (2) được tách ra bằng enzym giới hạn của KpnI/EcoRV và sau đó gắn vào trình tự gen khởi đầu từ pcj1 đến pcj7 mà đã được tách ra bằng cùng một enzym giới hạn để tạo ra các vector tái tổ hợp p117-cj1-7-gfp trong đó có oligonucleotit từ pcj1 đến pcj7, mà được tách ra từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 và được cho là có hoạt tính gen khởi đầu, được gắn với GFP. FIG. 3 minh họa phương pháp tạo ra vector tái tổ hợp chứa SEQ.ID No.: từ pcj1 đến pcj7 từ vector sàng lọc p117-gfp theo một phương án của sáng chế.

Vector tái tổ hợp thu được được đưa vào *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) để dàng để biến đổi thông qua phương pháp được giới thiệu bởi Van der Rest et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 541-545, 1999).

Chủng biến đổi thu được được làm làm kính phết lên trên môi trường CM (1% pepton, 1% canh thang, 0,25% natri clorua, 1% dịch chiết men bia, 100mg/ml adenin, 100mg/ml guanin, 2% thạch (pH 7,2)) chứa 10µg/ml kanamycin và được nuôi cấy ở 32°C trong 3 ngày. Chủng sống được có tăng trưởng được sàng lọc từ các khuẩn lạc. Sau đó, chiếu ánh sáng cực tím trên chủng được sàng lọc và các chủng phát ra huỳnh quang được chọn lọc.

Việc sàng lọc các chủng phát ra huỳnh quang chỉ ra rằng các gen khởi đầu từ pcj1 đến pcj7 thể hiện hoạt tính gen khởi đầu trong loài vi khuẩn dạng hình que.

Trong khi, hoạt tính gen khởi đầu được đo định lượng. Thì vector tái tổ hợp p117-cj1-7-gfp được đưa vào *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) và được nuôi cấy theo cách tương tự như mô tả ở trên. Dịch nuôi cấy được ly tâm để thu được hạt vi khuẩn. Sau đó, hạt vi khuẩn được tạo huyền phù trong dung dịch đệm chiết protein (EDTA 1mM PBS, 3% glyxerol, dung dịch 1% triton-X-100, pH-7,5) và được phân giải bằng sóng siêu âm. Chất dung giải được ly tâm và dung dịch phần phía trên thu được chứa dịch chiết vi khuẩn được tách ra. Lượng protein chứa trong dịch chiết vi khuẩn đo được thông qua phương pháp thử nghiệm Bradford. Sau đó, chiếu ánh sáng 488nm trên dịch chiết vi khuẩn với lượng ngang bằng với dịch

chiết vi khuẩn được mô tả ở trên bằng cách sử dụng phương pháp được giới thiệu bởi Laure Gory et al. (FEMS Microbiology Letters 194, 127-133, 2001) và ánh sáng phát ra được đo bằng cách sử dụng máy đo ảnh phổ LS-50B (Perkin-Elmer) để tìm ra mức độ biểu hiện gen GFP và đã tìm thấy có bước sóng 511nm.

Kết quả được trình bày trong Bảng 2. Như được trình bày trong Bảng 2, gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế biểu hiện hiệu quả gen GFP. Đặc biệt hơn, gen khởi đầu pcj1 và pcj4 đã biểu hiện hiệu quả cao nhất so với gen khởi đầu khác.

Bảng 2

Gen khởi đầu	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7
	12309	437	479	11790	1363	5651	2493

Ví dụ 3: So sánh hoạt tính của gen khởi đầu tac và gen khởi đầu theo phương án của sáng chế trong *Corynebacterium ammoniagenes*

Trong thí nghiệm này, hoạt tính của gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế và gen khởi đầu tac mà thông thường được sử dụng trong *Corynebacterium ammoniagenes* được so sánh.

(1) Sản xuất vector chứa trình tự gen khởi đầu tac và gen GFP được kết hợp

Đầu tiên, thực hiện PCR bằng cách sử dụng vector pKK223-2 (được sản xuất bởi Pharmacia Biotech, Mỹ) làm mẫu và sử dụng SEQ ID No.: 24 và 25 làm đoạn mồi theo cách tương tự như trong Ví dụ 1 để khuếch đại trình tự gen khởi đầu tac. Sản phẩm khuếch đại được nhân dòng vô tính thành vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Mỹ). Tiếp theo, trình tự gen khởi đầu tac thu được được tách ra bằng enzym giới hạn *KpnI* và *EcoRV* và gắn vào p117-gfp mà đã được tách ra bằng cùng một enzym giới hạn để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp (p117-tac-gfp.)

Vector tái tổ hợp được sử dụng để biến đổi *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 theo cách tương tự như trong Ví dụ 1, và hoạt tính của gen GFP được đo. Hoạt tính của gen GFP do có gen khởi đầu tac được so sánh với hoạt tính của gen GFP do có gen khởi đầu được chọn theo Ví dụ 2. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3

Gen khởi đầu	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7	Ptac
	1140%	40%	44%	1092%	126%	523%	231%	100%

Như được trình bày trong Bảng 3, đã tìm thấy rằng gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế biểu hiện hiệu quả gen GFP. Ngoài ra, khi hoạt tính của gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế trong *Corynebacterium ammoniagenes* được so sánh với hoạt tính của gen khởi đầu tac trong *Corynebacterium ammoniagenes*, thì các gen khởi đầu pcj1, pcj4, pcj5, pcj6 và pcj7 thể hiện cường độ cao hơn gen khởi đầu tac. Cụ thể là, các gen khởi đầu pcj1 và pcj4 thể hiện hoạt tính gấp 10 lần của gen khởi đầu tac.

Ví dụ 4: Khẳng định hoạt tính của gen khởi đầu theo sáng chế trong *E.coli*

Đã khẳng định rằng gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế thể hiện hoạt tính trong *E.coli* ngoài vi khuẩn dạng hình que. *E.coli* được biến đổi bằng vector biểu hiện tái tổ hợp được sử dụng trong Ví dụ 1 và 2.

Đã xác định rằng gen khởi đầu theo phương án của sáng chế có thể biểu hiện hiệu quả gen GFP trong *E.coli* bằng cách đo hoạt tính của gen GFP theo cách tương tự như trong Ví dụ 1. Vector đối chiếu là vector tái tổ hợp chứa gen khởi đầu tac p117-tac-gfp. Bảng 4 trình bày hoạt tính gen khởi đầu của các gen khởi đầu theo các phương án của sáng chế trong *E.coli*.

Bảng 4

Gen khởi đầu	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7	Ptac
	296%	15%	20%	17%	19%	24%	24%	100%

Như được trình bày trong Bảng 4, đã tìm ra rằng gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế biểu hiện hiệu quả gen GFP trong *E.coli*. Cụ thể hơn, gen khởi đầu pcj1 thể hiện hoạt tính cao trong cả vi khuẩn dạng hình que và *E.coli*.

Ví dụ 5: Tác dụng của IPTG trên hoạt tính của gen khởi đầu theo sáng chế

Đã được biết đến là gen khởi đầu tac là gen khởi đầu đại diện mà biểu hiện gen cảm ứng bởi IPTG (isopropylthio- β -D-galactosit) trong *E.coli*. Theo cách nói khác, trong *E.coli*, lượng gen được biểu hiện bằng gen khởi đầu tac thay đổi theo sự có mặt hoặc vắng mặt IPTG.

Trong thí nghiệm này, tác dụng của IPTG trên biểu hiện gen GFP bằng gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế đã được đo. Để có kết quả này, vector tái tổ hợp chứa gen khởi đầu pcj1 mà có hoạt tính cao hơn các gen khởi đầu khác của p117-cj1-gfp được đưa vào *E.coli* và *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) theo cách giống như nêu trong Ví dụ 1 và 2, và do đó, lượng gen GFP được biểu hiện được đo. Vector tham khảo là vector tái tổ hợp chứa gen khởi đầu tac p117-tac-gfp.

Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5

Tế bào chủ	Corynebacterium ammoniagenes CJHB100				E.coli			
Sự cảm ứng	Sự cảm ứng bằng IPTG		Không gây cảm ứng		Sự cảm ứng bằng IPTG		Không gây cảm ứng	
Gen khởi đầu	ptac	Pcj1	ptac	pcj1	ptac	pcj1	ptac	
Cường độ huỳnh quang	2089	5530	1959	5048	6480	7165	2314	

Như được trình bày trong Bảng 5, gen khởi đầu theo một phương án của sáng chế đã biểu hiện hiệu quả hơn gen GFP trong *E.coli* và *Corynebacterium ammoniagenes* so với gen khởi đầu tac, bất kể sự có mặt của IPTG.

Các gen khởi đầu pCJ1, pCJ2, pCJ3, pCJ4, pCJ5, pCJ6 và pCJ7 thu được trong các Ví dụ được mô tả ở trên được đưa vào pECCG117. Vector thu được được sử dụng để biến đổi *E.coli* DH5. Các biến thể thu được được lưu giữ ở trung tâm nuôi cấy vi sinh vật của Hàn quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM), là một tổ chức lưu giữ quốc tế tuân theo Hiệp ước Budapest, lưu giữ vào ngày 11 tháng 6 năm 2004 (số truy nhập vào nơi lưu giữ: KCCM-10611, KCCM-10612, KCCM-10613, KCCM-10614, KCCM-10615, KCCM-10616, và KCCM-10617).

Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:
--	-----------------

CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10611
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền
Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10612
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận ☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế Người có thẩm quyền Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế ☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào: Người có thẩm quyền Số đơn quốc tế:
--	--

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10613
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền
Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10614
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền
Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10615
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền
Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10616
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền
Tài liệu tham khảo của chủ đơn hoặc cơ quan đại diện	Số đơn quốc tế:

**CÁC CHỈ DẪN LIÊN QUAN TỚI VI SINH VẬT HOẶC NGUYÊN LIỆU SINH
HỌC KHÁC ĐƯỢC LƯU GIỮ**

(Quy tắc PCT 13bis)

A. Các chỉ dẫn bên dưới liên quan đến vi sinh vật hoặc nguyên liệu sinh học khác được lưu giữ được đề cập đến trong bản mô tả ở đoạn số: 77	
B. NHẬN BIẾT NƠI LƯU GIỮ Các nơi lưu giữ khác được nhận biết ở một tờ khác ☐	
Tên viện lưu giữ Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc - KCCM (Korea Culture Center of Microorganisms)	
Địa chỉ viện lưu giữ (bao gồm mã bưu điện và tên nước) 361-221, Yurim B/D, Honje 1, Sudaemun, Seoul, 120-091, Cộng hòa Hàn quốc	
Ngày lưu giữ: 16 tháng 11 năm 2004	Số truy nhập: KCCM-10617
C. CÁC CHỈ DẪN KHÁC (bỏ trống nếu không cần) Thông tin này được tiếp tục ở một tờ khác ☐	
D. CÁC NƯỚC ĐƯỢC CHỈ ĐỊNH DÙNG CÁC CHỈ DẪN NÀY (nếu các chỉ dẫn này không dành cho tất cả các nước được chỉ định)	
E. CUNG CẤP CÁC CHỈ DẪN RIÊNG BIỆT (bỏ trống nếu không cần)	
Chỉ dẫn được liệt kê bên dưới sẽ được đệ trình tới Ủy ban quốc tế sau (cụ thể là bản chất chung của các chỉ dẫn, ví dụ “số truy nhập vào nơi lưu giữ”)	

Chỉ sử dụng cho cơ quan nhận	Chỉ sử dụng cho Ủy ban quốc tế
☐ Giấy này được nhận với đơn yêu cầu cấp patent quốc tế	☐ Giấy này được nhận bởi Ủy ban quốc tế vào:
Người có thẩm quyền	Người có thẩm quyền

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Gen khởi đầu chứa ít nhất một polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No.: từ 1 đến 7.
2. Bảng biểu hiện, trong đó bảng này chứa gen khởi đầu theo điểm 1 và liên kết được với trình tự mã hoá.
3. Vector chứa bảng biểu hiện theo điểm 2.
4. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 3.
5. Tế bào chủ theo điểm 4, trong đó tế bào chủ này là tế bào vi khuẩn thuộc loài *Corynebacterium* hoặc loài *Esherichia*.
6. Phương pháp biểu hiện gen ngoại sinh bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 4 hoặc điểm 5.

FIG. 1

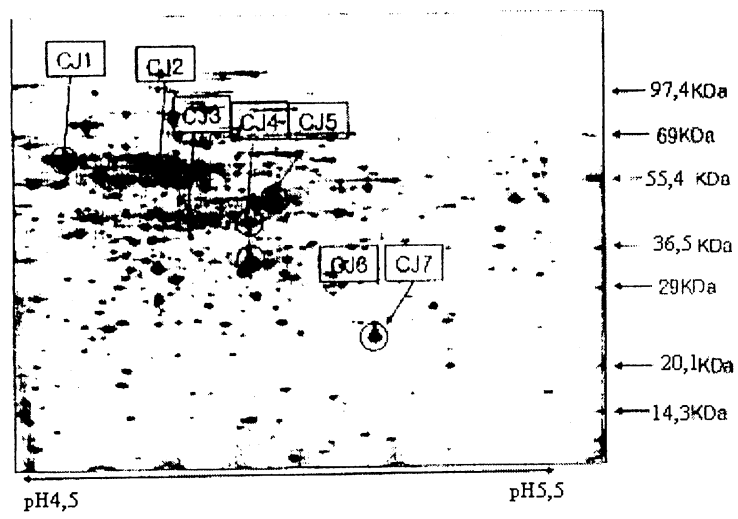


FIG. 2

