



(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

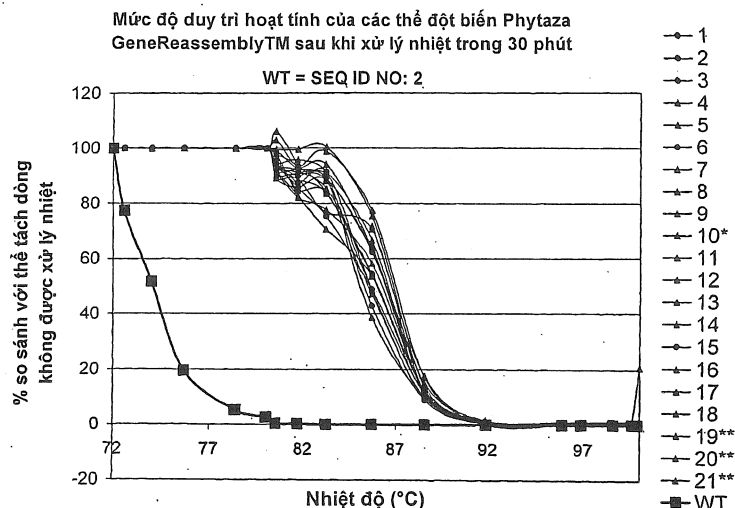
(11) 
1-0022404

(51)⁷ C07H 21/02, A01N 63/00, A61K 48/00, (13) B
C07H 21/04, C12N 5/00, 5/02

- (21) 1-2009-00794 (22) 21.09.2007
(86) PCT/US2007/079187 21.09.2007 (87) WO2008/036916 27.03.2008
(30) 60/846,831 21.09.2006 US
(45) 25.12.2019 381 (43) 26.10.2009 259
(73) BASF ENZYMES LLC (US)
3550 John Hopkins Ct., San Diego, California 92121, United States of America
(72) STEER, Brian (CA), DYCAICO, Mark (US), KLINE, Katie (US), TREFZER, Axel
(DE), TODARO, Tom (US), SOLBAK, Arne (US), EL-FARRAH, Fatima (US),
ALVARADO, Alberto (US), FREY, Gerhard (DE)
(74) Công ty TNHH dịch vụ sở hữu trí tuệ DREWMARKS (DREWMARKS CO.,LTD.)

(54) AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP, TỔNG HỢP HOẶC TÁI TỔ HỢP MÃ HOÁ
ENZYM PHYTAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT

(57) Sáng chế đề cập đến phytaza, polynucleotit mã hoá chúng, sử dụng polynucleotit và polypeptit theo sáng chế, cũng như quá trình sản xuất và phân lập polynucleotit và polypeptit này. Cụ thể là, sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính phytaza ở điều kiện nhiệt độ cao và phytaza vẫn giữ được hoạt tính sau khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Phytaza theo sáng chế có khả năng chịu nhiệt và/hoặc bền nhiệt cả ở nhiệt độ thấp và nhiệt độ cao. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong thực phẩm để cải thiện giá trị của thành phần giàu phytat trong thức ăn gia súc. Phytaza theo sáng chế có thể được chế biến ở dạng thực phẩm hoặc thức ăn gia súc hoặc thực phẩm bổ sung cho người và gia súc, chẳng hạn, để hỗ trợ quá trình tiêu hoá phytat. Thực phẩm hoặc thức ăn gia súc theo sáng chế có thể ở dạng hạt cơm, dạng lỏng, bột và các dạng tương tự. Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là ổn định với quá trình biến tính nhiệt trong khi tạo hạt cơm; và điều này sẽ làm giảm giá thành của sản phẩm phytaza trong khi vẫn giữ được hiệu quả và duy trì hoạt tính trong thức ăn gia súc trong cơ thể.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến enzym phytaza, polynucleotit mã hoá enzym này, việc sử dụng các polynucleotit và polypeptit theo sáng chế, cũng như phương pháp sản xuất và phân lập các polynucleotit và polypeptit. Cụ thể là, sáng chế đề xuất các polypeptit có hoạt tính phytaza ở điều kiện nhiệt độ cao và phytaza vẫn giữ được hoạt tính sau khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Phytaza theo sáng chế không những bền với nhiệt độ cao mà còn có thể có tính chịu nhiệt và/hoặc bền nhiệt ở nhiệt độ thấp. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong thực phẩm để cải thiện giá trị của các thành phần giàu phytat trong chăn nuôi. Phytaza theo sáng chế có thể được sản xuất thành thức ăn hoặc thức ăn gia súc hoặc thức ăn bổ sung, chẳng hạn, để hỗ trợ cho quá trình phân cắt phytat. Thực phẩm hoặc thức ăn gia súc theo sáng chế có thể ở dạng viên, lỏng, bột và các dạng tương tự. Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là ổn định với quá trình biến tính nhiệt trong quá trình đóng viên; và điều này sẽ làm giảm giá thành của sản phẩm phytaza trong khi vẫn giữ được hiệu quả trong cơ thể và hoạt tính trong thức ăn gia súc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khoáng chất là các yếu tố thiết yếu đối với quá trình sinh trưởng của tất cả các sinh vật. Các khoáng chất dinh dưỡng có thể nhận được từ nhiều nguồn nguyên liệu, bao gồm cả thực vật. Chẳng hạn, hạt là một nguồn giàu khoáng chất vì chúng chứa các ion được tạo phức với các nhóm phosphat trong phân tử axit phytic. Các khoáng chất liên kết với phytat có thể, trong một số trường hợp, thoả mãn nhu cầu dinh dưỡng của một số loài gia súc, như động vật nhai lại mà dạ dày có nhiều ngăn. Do đó, trong một số trường hợp, động vật nhai lại thường cần bổ sung dinh dưỡng bằng phosphat vô cơ và khoáng chất ít hơn vì các vi sinh vật trong dạ cỏ sẽ tạo ra các enzym xúc tác quá trình chuyển hoá phytat (myo-inositol-hexaphosphat) thành inositol và phosphat vô cơ. Trong quá trình này, khoáng chất tạo phức với phytat sẽ được giải phóng. Tuy nhiên, phần lớn các loài gia súc không có khả năng sử dụng hiệu quả các khoáng chất liên kết với phytat. Do đó, chẳng hạn, trong quá trình chăn nuôi các loài động vật dạ dày đơn (chẳng hạn, lợn, gia

cầm và cá), thức ăn thường được bổ sung khoáng chất và/hoặc kháng sinh làm thay đổi quần thể sinh vật trong hệ tiêu hoá của động vật nhằm tăng tốc độ sinh trưởng.

Như vậy, có rất nhiều vấn đề khó giải quyết mà liên quan đến chế độ dinh dưỡng, các bước xử lý ngoài cơ thể, sức khoẻ và y tế, bảo vệ môi trường, và quản lý nguồn tài nguyên, đi kèm với quá trình thủy phân phytat không đầy đủ trong nhiều ứng dụng. Sau đây là các ví dụ không hạn chế về các vấn đề trên:

- 1) Việc bổ sung khoáng chất vô cơ vào chế độ ăn là rất tốn kém.
- 2) Sự có mặt của phytat chưa được thủy phân là không mong muốn và khó giải quyết trong nhiều ứng dụng ngoài cơ thể (chẳng hạn, gây cản).
- 3) Việc bổ sung chất kháng sinh vào chế độ ăn sẽ dẫn đến các nguy cơ về sức khoẻ cho người và động vật do làm tăng số lượng mầm bệnh kháng kháng sinh.
- 4) Sự giải phóng các khoáng chất trong phân không được hấp thụ vào môi trường sẽ làm rối loạn và phá huỷ hệ sinh thái của đất, nước nuôi cá, và nước bề mặt xung quanh ở quy mô lớn.
- 5) Việc cung cấp dưỡng chất có giá trị của nhiều loại thực phẩm tiềm năng vẫn chưa được khai thác triệt để và còn lãng phí.

Do đó, thực phẩm chứa phytat cần bổ sung các chất dinh dưỡng ngoại sinh và/hoặc với một nguồn có hoạt tính phytaza để khắc phục khiếm khuyết của việc cung cấp dinh dưỡng trong quá trình tiêu hoá cho một lượng lớn các loài động vật.

Do đó, cần có phương pháp thủy phân với hiệu suất cao và hiệu quả về mặt giá thành phytat trong nhiều ứng dụng khác nhau. Cụ thể là, cần phải có phương pháp để tối ưu hoá quá trình thủy phân phytat trên quy mô thương mại. Theo một khía cạnh cụ thể, cần phải tối ưu hoá các phương pháp xử lý trên quy mô thương mại để cải thiện thành phần dinh dưỡng của thực phẩm chứa phytat để sử dụng cho người và gia súc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính phytaza, polynucleotit mã hoá chúng, việc sử dụng polynucleotit và polypeptit theo sáng chế và phương pháp sản xuất cũng như phân lập các polynucleotit và polypeptit này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất

polypeptit có hoạt tính phytaza ở điều kiện nhiệt độ cao và phytaza vẫn giữ được hoạt tính sau khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong thực phẩm để cải thiện giá trị dinh dưỡng của các thành phần giàu phytat. Phytaza theo sáng chế có thể được sản xuất ở dạng thực phẩm hoặc thức ăn gia súc hoặc thành phần bổ sung để, chẳng hạn, hỗ trợ quá trình phân giải phytat. Thực phẩm hoặc thức ăn gia súc theo sáng chế có thể ở dạng hạt cốm, viên nén, viên tròn, dạng lỏng, bột, dạng xịt và các dạng tương tự. Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế có độ ổn định với quá trình biến tính bằng nhiệt trong quá trình tạo hạt cốm; và điều này sẽ làm giảm giá thành của sản phẩm phytaza trong khi vẫn giữ được hiệu quả trong cơ thể và quá trình phát hiện hoạt tính trong thức ăn.

Sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp, trong đó axit nucleic này bao gồm:

(i) trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95%, 96% 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO:1 và chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm: các nucleotit ở các vị trí 139 đến 141 là TTT hoặc TTC; các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí 406 đến 408 là CAT hoặc CAC; các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 676 đến 678 là GAT hoặc GAC; các nucleotit ở các vị trí 697 đến 699 là TGG; các nucleotit ở các vị trí 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG; các nucleotit ở các vị trí 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và các nucleotit ở các vị trí 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT; hoặc,

(ii) trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 95%, 96% 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO:1 và chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14

cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm: các nucleotit ở các vị trí tương đương 139 đến 141 là TTT hoặc TTC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 406 đến 408 là CAT hoặc CAC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 676 đến 678 là GAT hoặc GAC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 697 đến 699 là TGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và các nucleotit ở các vị trí tương đương 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT; hoặc

(iii) polynucleotit mã hoá polypeptit có trình tự chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm: axit amin alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành phenylalanin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành histidin; axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit aspartic; axit

amin valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tryptophan; axit amin glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành alanin; axit amin threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tyrosin; và axit amin loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành prolin; hoặc,

(iv) polynucleotit mã hoá polypeptit có trình tự chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm: axit amin ở vị trí tương đương alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành phenylalanin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành histidin; axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit aspartic; axit amin ở vị trí tương đương valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tryptophan; axit amin ở vị trí tương đương glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành alanin; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tyrosin; và axit amin ở vị trí tương đương loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành prolin, trong đó axit nucleic mã hoá ít nhất một polypeptit có hoạt tính phytaza và tùy ý, độ tương đồng trình tự được xác định bằng phương pháp so sánh trình tự hoặc bằng phương pháp quang học; hoặc, (b) các trình tự

hoàn toàn bổ sung của các trình tự trên. Tất cả các axit nucleic này đều là “axit nucleic theo sáng chế”, mã hoá “polypeptit theo sáng chế”.

Theo một khía cạnh, phương pháp so sánh trình tự là thuật toán BLAST phiên bản 2.2.2, trong đó điều kiện lọc được cài đặt ở blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, và các điều kiện khác được cài đặt mặc định.

Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza bao gồm: phân cắt phytat (myo-inositol-hexaphosphat) thành inositol và phosphat vô cơ; hoặc, thuỷ phân phytat (myo-inositol-hexaphosphat). Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt, và tuỳ ý, polypeptit này vẫn giữ được hoạt tính phytaza sau khi tiếp xúc với nhiệt độ trong khoảng từ khoảng 40°C đến khoảng 70°C, hoặc từ khoảng 37°C đến khoảng 100°C, hoặc từ trên 37°C đến khoảng 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C hoặc cao hơn. Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza là bền nhiệt, và tuỳ ý, polypeptit này vẫn giữ được hoạt tính phytaza ở nhiệt độ trong khoảng từ khoảng 40°C đến khoảng 70°C, hoặc từ khoảng 37°C đến khoảng 100°C, hoặc từ trên 37°C đến khoảng 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C hoặc cao hơn.

Sáng chế đề xuất catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng (cloning vehicle), vector biểu hiện, vector nhân dòng chứa axit nucleic theo sáng chế, hoặc được biến nạp axit nucleic theo sáng chế (bao gồm axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế), trong đó, tuỳ ý, phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vector virus, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, nhiễm sắc thể thể thực khuẩn hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, và tuỳ ý, vector virus bao gồm vector adenovirus, vector retrovirus hoặc vector virus gắn adeno, và tuỳ ý, catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng chứa hoặc được biến nạp nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (bacterial artificial chromosome - BAC), plasmit, vector thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nấm nhân tạo (YAC), nhiễm sắc động vật có vú nhân tạo (MAC).

Sáng chế đề xuất tế bào biến nạp, tế bào được tải nạp, tế bào chủ và các loại tế bào tương tự chứa axit nucleic theo sáng chế, hoặc được chứa trong đó axit nucleic theo sáng chế (gồm cả axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế), hoặc catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng theo sáng chế, trong đó tuỳ ý

tế bào là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.

Sáng chế đề xuất động vật chuyển gen không phải là người có axit nucleic theo sáng chế, hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo sáng chế (bao gồm axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế), hoặc the catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng theo sáng chế, trong đó tùy ý động vật là chuột nhắt, chuột đồng, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.

Sáng chế đề xuất các thực vật chuyển gen (bao gồm cả các phần của cây, chẳng hạn, lá, thân rễ và quả đã được xử lý hoặc thu hoạch) hoặc hạt chứa axit nucleic theo sáng chế, hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo sáng chế (bao gồm axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế), hoặc catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng theo sáng chế, trong đó tùy ý thực vật là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, cây hạt dầu, cải dầu, đậu nành hoặc thuốc lá, và tùy ý, hạt là hạt ngô, hạt lúa mì, hạt dầu, hạt cải dầu, đậu tương, hạt cò, hướng dương, vừng, lạc hoặc hạt thuốc lá. Theo các phương án khác, cây hoặc hạt được tạo ra từ hạt hoặc cây theo sáng chế, hoặc cây hoặc hạt theo sáng chế, có thể là cây trồng, chẳng hạn, ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu tương, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, lúa đại mạch, lúa gạo, tằm bách, cây họ đậu, chẳng hạn, đậu hà lan, đậu và đậu tương, cây thân củ/rễ củ, chẳng hạn, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa và của cải đường và các loại cây tương tự, hoặc thực vật có thể là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, cây có dầu, cây cải dầu, đậu tương hoặc a thuốc lá, hoặc cỏ và/hoặc cây làm thức ăn cho động vật, hoặc động vật nhai lại, hoặc cây là cỏ hoặc cây làm thức ăn như cỏ khô, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, đại mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ mọc hàng năm (annual grass), lúa miến, cỏ sudan, cỏ Nam phi hoặc cỏ trâu; hoặc, hạt là hạt ngô, hạt lúa mì, hạt dầu, hạt cải dầu, đậu tương, hạt cò, hướng dương, vừng, lạc, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, hạt yến mạch, hạt lúa mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, gạo, hạt đậu hà lan, hoặc hạt thuốc lá, hoặc cây là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu tương, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, bột mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, lúa đại mạch, lúa gạo, tằm bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, chuối hoa hoặc của cải đường.

Sáng chế đề xuất các oligonucleotit đối nghĩa chứa axit nucleic theo sáng chế và ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, trong đó, tùy ý, oligonucleotit đối nghĩa có chiều dài từ khoảng 10 đến 50, khoảng từ 20 đến 60, khoảng từ 30 đến 70, khoảng từ 40 đến 80, khoảng từ 60 đến 100 hoặc khoảng từ 50 đến 150 bazơ. Sáng chế cũng đề xuất ribozym và/hoặc iARN (chẳng hạn, siARN hoặc miARN) chứa các trình tự đối nghĩa theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp ức chế quá trình dịch mã thông tin phytaza trong tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước việc cung cấp cho tế bào hoặc biểu hiện trong tế bào oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp, trong đó polypeptit này bao gồm:

(i) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95%, 96% 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO:2, và được mã hoá bởi polynucleotit chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm: các nucleotit ở các vị trí 139 đến 141 là TTT hoặc TTC; các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí 406 đến 408 là CAT hoặc CAC; các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí 676 đến 678 là GAT hoặc GAC; các nucleotit ở các vị trí 697 đến 699 là TGG; các nucleotit ở các vị trí 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG; các nucleotit ở các vị trí 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và các nucleotit ở các vị trí 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT; hoặc,

(ii) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95%, 96% 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO:2, và được mã hoá bởi polynucleotit chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm: các nucleotit ở các vị trí tương đương 139 đến 141 là TTT hoặc TTC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 406 đến 408 là CAT hoặc CAC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GAA hoặc GAG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 676 đến 678 là GAT hoặc GAC; các nucleotit ở các vị trí tương đương 697 đến 699 là TGG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG; các nucleotit ở các vị trí tương đương 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và các nucleotit ở các vị trí tương đương 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT; hoặc

(iii) trình tự axit amin chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm: axit amin alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành phenylalanin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành histidin; axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit aspartic; axit amin valin ở vị trí axit amin 233

của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tryptophan; axit amin glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành alanin; axit amin threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tyrosin; và axit amin loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành prolin; hoặc

(iv) trình tự axit amin chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm: axit amin ở vị trí tương đương alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành phenylalanin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành histidin; axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit glutamic; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành arginin; axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành axit aspartic; axit amin ở vị trí tương đương valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tryptophan; axit amin ở vị trí tương đương glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành valin; axit amin ở vị trí tương đương arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành alanin; axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành tyrosin; và axit amin ở vị trí tương đương loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được cải biến thành prolin, trong đó axit nucleic mã hoá ít nhất một polypeptit có hoạt tính phytaza và tùy chọn độ tương đồng trình tự được xác định bằng cách phân tích với thuật toán so sánh trình tự hoặc bằng cách kiểm tra trực quan, và polypeptit có hoạt tính phytaza, và

tùy chọn hoạt tính phytaza bao gồm: dị hoá phytat (myo-inositol-hexaphosphat) thành inositol và phosphat vô cơ; hoặc, thủy phân phytat (myo-inositol-hexaphosphat).

Sáng chế đề xuất polypeptit theo sáng chế có hoạt tính phytaza và hoạt tính này là chịu nhiệt, và tùy ý, polypeptit này vẫn giữ được hoạt tính phytaza sau khi tiếp xúc với nhiệt độ trong khoảng từ -100°C đến khoảng -80°C, từ khoảng -80°C đến khoảng -40°C, từ khoảng -40°C đến khoảng -20°C, từ khoảng -20°C đến khoảng 0°C, khoảng 0°C đến khoảng 5°C, khoảng 5°C đến khoảng 15°C, khoảng 15°C đến khoảng 25°C, khoảng 25°C đến khoảng 37°C, khoảng 37°C đến khoảng 45°C, khoảng 45°C đến khoảng 55°C, khoảng 55°C đến khoảng 70°C, khoảng 70°C đến khoảng 75°C, khoảng 75°C đến khoảng 85°C, khoảng 85°C đến khoảng 90°C, khoảng 90°C đến khoảng 95°C, khoảng 95°C đến khoảng 100°C, khoảng 100°C đến khoảng 105°C, khoảng 105°C đến khoảng 110°C, khoảng 110°C đến khoảng 120°C, hoặc 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C hoặc cao hơn. Polypeptit chịu nhiệt theo sáng chế có khả năng giữ được hoạt tính, chẳng hạn hoạt tính phytaza, sau khi tiếp xúc với nhiệt độ trong khoảng từ -100°C đến khoảng -80°C, khoảng -80°C đến khoảng -40°C, khoảng -40°C đến khoảng -20°C, khoảng -20°C đến khoảng 0°C, khoảng 0°C đến khoảng 5°C, khoảng 5°C đến khoảng 15°C, khoảng 15°C đến khoảng 25°C, khoảng 25°C đến khoảng 37°C, khoảng 37°C đến khoảng 45°C, khoảng 45°C đến khoảng 55°C, khoảng 55°C đến khoảng 70°C, khoảng 70°C đến khoảng 75°C, khoảng 75°C đến khoảng 85°C, khoảng 85°C đến khoảng 90°C, khoảng 90°C đến khoảng 95°C, khoảng 95°C đến khoảng 100°C, khoảng 100°C đến khoảng 105°C, khoảng 105°C đến khoảng 110°C, khoảng 110°C đến khoảng 120°C, hoặc 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C hoặc cao hơn. Theo một số phương án, polypeptit chịu nhiệt theo sáng chế vẫn duy trì được hoạt tính, chẳng hạn hoạt tính phytaza, sau khi tiếp xúc với nhiệt độ trong các khoảng nêu trên, ở pH khoảng 3,0, pH khoảng 3,5, pH khoảng 4,0, pH khoảng 4,5, pH khoảng 5,0, pH khoảng 5,5, pH khoảng 6,0, pH khoảng 6,5, pH khoảng 7,0, pH khoảng 7,5, pH khoảng 8,0, pH khoảng 8,5, pH khoảng 9,0, pH khoảng 9,5, pH khoảng 10,0, pH khoảng 10,5, pH khoảng 11,0, pH khoảng 11,5, pH khoảng 12,0 hoặc cao hơn.

Sáng chế đề xuất polypeptit theo sáng chế có hoạt tính phytaza và hoạt tính này là bền nhiệt. Chẳng hạn, polypeptit theo sáng chế có thể bền nhiệt. Polypeptit bền nhiệt theo sáng chế có thể duy trì hoạt tính liên kết và/hoặc enzym, chẳng hạn, hoạt tính phytaza, ở các điều kiện nhiệt độ từ khoảng -100°C đến khoảng -80°C, khoảng -80°C đến khoảng -40°C, khoảng -40°C đến khoảng -20°C, khoảng -20°C đến khoảng 0°C, khoảng 0°C đến khoảng 37°C, khoảng 0°C đến khoảng 5°C, khoảng 5°C đến khoảng 15°C, khoảng 15°C đến khoảng 25°C, khoảng 25°C đến khoảng 37°C, khoảng 37°C đến khoảng 45°C, khoảng 45°C đến khoảng 55°C, khoảng 55°C đến khoảng 70°C, khoảng 70°C đến khoảng 75°C, khoảng 75°C đến khoảng 85°C, khoảng 85°C đến khoảng 90°C, khoảng 90°C đến khoảng 95°C, khoảng 95°C đến khoảng 100°C, khoảng 100°C đến khoảng 105°C, khoảng 105°C đến khoảng 110°C, khoảng 110°C đến khoảng 120°C, hoặc 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C hoặc cao hơn. Polypeptit bền nhiệt theo sáng chế có thể duy trì hoạt tính, chẳng hạn hoạt tính phytaza, ở nhiệt độ trong khoảng từ -100°C đến khoảng -80°C, khoảng -80°C đến khoảng -40°C, khoảng -40°C đến khoảng -20°C, khoảng -20°C đến khoảng 0°C, khoảng 0°C đến khoảng 5°C, khoảng 5°C đến khoảng 15°C, khoảng 15°C đến khoảng 25°C, khoảng 25°C đến khoảng 37°C, khoảng 37°C đến khoảng 45°C, khoảng 45°C đến khoảng 55°C, khoảng 55°C đến khoảng 70°C, khoảng 70°C đến khoảng 75°C, khoảng 75°C đến khoảng 85°C, khoảng 85°C đến khoảng 90°C, khoảng 90°C đến khoảng 95°C, khoảng 95°C đến khoảng 100°C, khoảng 100°C đến khoảng 105°C, khoảng 105°C đến khoảng 110°C, khoảng 110°C đến khoảng 120°C, hoặc 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C hoặc cao hơn. Theo một số phương án, polypeptit bền nhiệt theo sáng chế vẫn duy trì hoạt tính, chẳng hạn, hoạt tính phytaza, ở nhiệt độ trong các khoảng nêu trên, ở pH khoảng 3,0, pH khoảng 3,5, pH khoảng 4,0, pH khoảng 4,5, pH khoảng 5,0, pH khoảng 5,5, pH khoảng 6,0, pH khoảng 6,5, pH khoảng 7,0, pH khoảng 7,5, pH khoảng 8,0, pH khoảng 8,5, pH khoảng 9,0, pH khoảng 9,5, pH khoảng 10,0, pH khoảng 10,5, pH khoảng 11,0, pH khoảng 11,5, pH khoảng 12,0 hoặc cao hơn.

Sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp bao gồm trình tự axit amin theo sáng chế và (a) thiếu trình tự tín hiệu (peptit dẫn đầu); (b) thiếu trình

tự tín hiệu (peptit dẫn đầu) và còn chứa thêm một trình tự tín hiệu khác loại (peptit dẫn đầu); (c) trình tự axit amin của (a) hoặc (b) và còn chứa thêm một trình tự khác loại, trong đó tùy chọn trình tự khác loại chứa một peptit xác định.

Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza của polypeptit bất kỳ theo sáng chế có hoạt tính đặc hiệu: ở khoảng 37°C trong khoảng từ 100 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein; hoặc, từ khoảng 500 đến khoảng 750 đơn vị/mg protein; hoặc, ở 37°C trong khoảng từ 500 đến khoảng 1200 đơn vị/mg protein; hoặc, ở 37°C trong khoảng từ 750 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein. Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza chịu nhiệt có hoạt tính đặc hiệu sau khi tiếp xúc với nhiệt độ ở khoảng 37°C trong khoảng từ 100 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt là hoạt tính đặc hiệu hoạt tính đặc hiệu từ khoảng 500 đến khoảng 750 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu ở 37°C trong khoảng từ 500 đến khoảng 1200 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu ở 37°C trong khoảng từ 750 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein. Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu ở các điều kiện có nhiệt độ khoảng 37°C trong khoảng từ 100 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu từ khoảng 500 đến khoảng 750 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu ở 37°C trong khoảng từ 500 đến khoảng 1200 đơn vị/mg protein; hoặc, hoạt tính phytaza bền nhiệt có hoạt tính đặc hiệu ở 37°C trong khoảng từ 750 đến khoảng 1000 đơn vị/mg protein.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế chứa ít nhất một vị trí glycosyl hoá, trong đó tùy chọn glycosyl hoá là glycosyl hoá liên kết với N, hoặc glycosyl hoá liên kết với O, và tùy chọn polypeptit được glycosyl hoá sau khi được biểu hiện trong nấm men, tùy chọn là *P. pastoris* hoặc *S. pombe*.

Theo một khía cạnh, polypeptit này vẫn giữ được hoạt tính phytaza trong điều kiện pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5, pH 4,0, pH 3,5, pH 3,0 hoặc pH thấp hơn (tính axit cao hơn). Một cách khác, polypeptit theo sáng chế có thể duy trì hoạt tính phytaza ở các điều kiện pH 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10,0, pH 10,5, pH 11,0, pH 11,5, pH 12, pH 12,5 hoặc pH cao hơn (tính bazơ hơn).

Sáng chế đề xuất chế phẩm protein chứa polypeptit theo sáng chế, trong đó chế phẩm protein bao gồm dạng lỏng, dạng hồ, bột, dạng xit, hỗn dịch, chế phẩm/dạng bào chế đông khô, chế phẩm rắn, miếng gel, viên tròn, viên cây, gel; hoặc dược phẩm, thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn.

Sáng chế đề xuất heterodime chứa polypeptit theo sáng chế, và theo một khía cạnh heterodime chứa một phần thứ hai, trong đó tùy ý phần thứ hai này là một polypeptit và heterodime là một protein dung hợp, và tùy ý, phần thứ hai này là một epitop hoặc một tín hiệu tag.

Sáng chế đề xuất polypeptit được cố định chứa polypeptit theo sáng chế, trong đó polypeptit được cố định có thể là homodime hoặc heterodime theo sáng chế, trong đó tùy ý polypeptit được cố định trên hoặc bên trong tế bào, túi, liposom, màng, lớp, kim loại, nhựa, polyme, gốm, thủy tinh, vi điện cực, hạt graphit, hạt, gel, đĩa, mạch, ống mao dẫn, tinh thể, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, khối kết tụ, bề mặt, hoặc cấu trúc lỗ. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất mạch (chẳng hạn, vi mạch) chứa polypeptit được cố định, trong đó polypeptit là polypeptit theo sáng chế, hoặc heterodime theo sáng chế, hoặc axit nucleic theo sáng chế, hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp liên kết đặc hiệu với polypeptit theo sáng chế hoặc với polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo sáng chế, trong đó tùy ý kháng thể là kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng. Sáng chế đề xuất thể lai chứa kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit tái tổ hợp, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp một axit nucleic được liên kết một cách có kiểm soát với một trình tự khởi đầu; trong đó axit nucleic bao gồm trình tự theo sáng chế; và (b) biểu hiện axit nucleic theo bước (a) trong điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit, nhờ đó tạo ra polypeptit tái tổ hợp, và tùy ý, phương pháp này còn bao gồm bước biến nạp axit nucleic trong bước (a) vào một tế bào chủ sau đó biểu hiện axit nucleic trong bước (a), nhờ đó tạo ra polypeptit tái tổ hợp trong tế bào chủ được biến nạp.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp polypeptit theo sáng chế; (b) cung cấp cơ chất phytaza; và (c) cho polypeptit hoặc một đoạn hoặc thể đột biến của nó trong bước (a) phản ứng với cơ chất trong bước (b) và phát hiện sự gia tăng lượng cơ chất hoặc sự giảm lượng sản phẩm phản ứng, trong đó sự giảm lượng cơ chất hoặc sự gia tăng lượng sản phẩm phản ứng có nghĩa là polypeptit có hoạt tính phytaza.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định cơ chất phytaza, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp polypeptit theo sáng chế; (b) cung cấp cơ chất thử nghiệm; và (c) cho polypeptit trong bước (a) phản ứng với cơ chất thử nghiệm trong bước (b) và phát hiện sự gia tăng lượng cơ chất hoặc sự giảm lượng sản phẩm phản ứng, trong đó sự giảm lượng cơ chất hoặc sự gia tăng lượng sản phẩm phản ứng sẽ xác định cơ chất thử nghiệm là cơ chất phytaza.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định khả năng hợp chất liên kết đặc hiệu với polypeptit, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) biểu hiện axit nucleic hoặc vector chứa axit nucleic ở các điều kiện để dịch mã axit nucleic thành polypeptit, trong đó axit nucleic chứa trình tự theo sáng chế; (b) cho polypeptit phản ứng với hợp chất thử nghiệm; và (c) xác định khả năng chất thử nghiệm liên kết đặc hiệu với polypeptit, nhờ đó sẽ xác định được hợp chất liên kết đặc hiệu với polypeptit.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định tác nhân điều biến hoạt tính phytaza, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp polypeptit phytaza theo sáng chế; (b) cung cấp hợp chất thử nghiệm; (c) cho polypeptit trong bước (a) phản ứng với hợp chất thử nghiệm trong bước (b) và đo mức hoạt tính của phytaza, trong đó sự thay đổi hoạt tính phytaza đo được khi có mặt hợp chất thử nghiệm so với hoạt tính khi không có mặt hợp chất thử nghiệm sẽ xác định rằng hợp chất thử nghiệm đã điều chỉnh hoạt tính phytaza, trong đó tùy ý hoạt tính phytaza được đo bằng cách cung cấp cơ chất phytaza và phát hiện lượng cơ chất tăng hoặc sự giảm lượng sản phẩm phản ứng, và tùy ý, sự giảm lượng cơ chất hoặc sự gia tăng lượng sản phẩm phản ứng khi có hợp chất thử nghiệm so với lượng cơ chất hoặc sản phẩm phản ứng khi không có hợp chất thử nghiệm sẽ xác định được hợp chất thử nghiệm là chất hoạt hoá hoạt tính phytaza, và tùy ý, sự tăng lượng cơ chất hoặc sự giảm lượng sản phẩm phản ứng khi có hợp chất thử nghiệm

so với lượng cơ chất hoặc sản phẩm phản ứng khi không có hợp chất thử nghiệm sẽ các định hợp chất thử nghiệm là một chất ức chế hoạt tính phytaza.

Sáng chế đề xuất hệ thống máy tính gồm có bộ vi xử lý và thiết bị lưu trữ dữ liệu trong đó thiết bị lưu trữ dữ liệu này lưu trữ trình tự polypeptit hoặc trình tự axit nucleic, trong đó trình tự polypeptit gồm có trình tự theo sáng chế, và axit nucleic chứa trình tự theo sáng chế, và tùy ý, phương pháp còn bao gồm thuật toán so sánh trình tự và thiết bị lưu trữ dữ liệu có ít nhất một trình tự đối chứng được lưu trữ bên trong, và tùy ý, thuật toán so sánh trình tự là một chương trình máy tính chỉ ra được tính đa hình (polymorphism), và tùy ý, phương pháp còn bao gồm một yếu tố xác định sẽ xác định một hoặc nhiều đặc điểm trong trình tự đã nêu. Sáng chế đề xuất vật ghi có thể đọc được bằng máy tính được chứa trong đó một trình tự polypeptit hoặc trình tự axit nucleic, trong đó trình tự polypeptit là trình tự axit amin theo sáng chế, và axit nucleic là trình tự theo sáng chế. Sáng chế đề xuất các phương pháp xác định đặc điểm trong trình tự bao gồm các bước: (a) đọc trình tự sử dụng chương trình máy tính xác định được một hoặc nhiều đặc điểm trong trình tự, trong đó trình tự chứa trình tự polypeptit hoặc trình tự axit nucleic, trong đó trình tự polypeptit là trình tự axit amin theo sáng chế, và axit nucleic là trình tự theo sáng chế; và, (b) xác định một hoặc nhiều đặc điểm trong trình tự bằng chương trình máy tính. Sáng chế đề xuất phương pháp so sánh trình tự thứ nhất với trình tự thứ hai bao gồm các bước: (a) đọc trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai bằng cách sử dụng chương trình máy tính dùng để so sánh trình tự, trong đó trình tự thứ nhất là trình tự polypeptit hoặc trình tự axit nucleic, trong đó trình tự polypeptit là trình tự axit amin theo sáng chế, và axit nucleic là trình tự theo sáng chế; và, (b) xác định mức độ khác nhau giữa trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai bằng chương trình máy tính, trong đó tùy ý bước xác định mức độ khác nhau giữa trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai còn gồm bước xác định mức độ đa hình, và tùy ý, phương pháp này còn bao gồm một yếu tố xác định có thể xác định một hoặc nhiều đặc điểm trong trình tự, và tùy ý, phương pháp này còn bao gồm việc đọc trình tự thứ nhất sử dụng chương trình máy tính và xác định một hoặc nhiều đặc điểm trong trình tự.

Sáng chế đề xuất phương pháp thủy phân inositol-hexaphosphat thành inositol và phosphat vô cơ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế, hoặc,

polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo sáng chế; (b) cung cấp chế phẩm chứa inositol-hexaphosphat; và (c) cho polypeptit trong bước (a) phản ứng với chế phẩm trong bước (b) trong điều kiện để polypeptit thủy phân inositol-hexaphosphat tạo ra inositol và phosphat vô cơ, trong đó tùy ý điều kiện gồm có nhiệt độ từ khoảng 37°C đến khoảng 70°C, từ khoảng 50°C đến khoảng 80°C, hoặc từ khoảng 60°C đến khoảng 90°C, và tùy ý, chế phẩm này chứa axit phytic.

Sáng chế đề xuất phương pháp khử keo của dầu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cung cấp polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế, hoặc, polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo sáng chế; (b) cung cấp chế phẩm chứa dầu thực vật; và (c) cho polypeptit trong bước (a) và dầu thực vật trong bước (b) phản ứng với nhau trong điều kiện để polypeptit có thể cắt liên kết inositol-phosphat vô cơ, do đó sẽ khử keo dầu thực vật.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn gia súc, hoặc thức ăn gia súc bổ sung hoặc thực phẩm bổ sung, hoặc phụ gia thực phẩm hoặc phụ gia thức ăn gia súc, hoặc thành phần bổ sung dinh dưỡng, hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, gồm các bước sau: (a) biến nạp thực vật, một phần thực vật hoặc tế bào thực vật bằng polynucleotit mã hoá polypeptit enzym phytaza, trong đó phytaza là polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế, hoặc, polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo sáng chế; (b) nuôi cấy thực vật, một phần thực vật hoặc tế bào thực vật trong điều kiện để biểu hiện enzym phytaza; và, (c) cải biến thực vật, phần thực vật hoặc tế bào thực vật thành dạng chế phẩm thích hợp để làm thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, hoặc thêm thực vật, một phần thực vật hoặc tế bào thực vật được nuôi cấy vào thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, nhờ đó sẽ tạo ra thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, trong đó tùy ý polynucleotit được chứa trong một vector biểu hiện, và tùy ý, vector này còn chứa một trình tự kiểm soát quá trình biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic trong tế bào thực vật, và tùy ý, thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung,

thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn dành cho động vật, và tùy ý, trong đó động vật này là động vật có dạ dày một ngăn, và tùy ý, động vật này là động vật nhai lại, và tùy ý, thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, ở dạng ở dạng chất mang để phân phối, hạt cốm, viên nén, gel, dạng lỏng, dạng xịt, hạt nghiền hoặc bột. Theo một khía cạnh, enzym phytaza được glycosyl hoá để tạo ra khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt trong điều kiện tạo hạt cốm, và tùy ý, chất mang để phân phối được tạo ra bằng cách tạo hạt cốm một hỗn hợp gồm mầm hạt và enzym phytaza để tạo ra một tiểu phần, và tùy ý, hạt cốm được sản xuất trong điều kiện sử dụng nồi hơi, tùy ý hạt cốm được sản xuất trong điều kiện mà nhiệt độ lớn hơn 80°C trong khoảng 5 phút, và tùy ý, hạt cốm chứa enzym phytaza có hoạt tính đặc hiệu ít nhất từ khoảng 350 đến khoảng 900 đơn vị/mg enzym.

Sáng chế đề xuất các phương pháp phân phối thành phần bổ sung enzym phytaza cho động vật hoặc người, phương pháp này bao gồm các bước: (a) tạo ra chất mang để phân phối, mà chất mang này ăn được, chứa một chất mang ăn được và enzym phytaza chứa polypeptit có trình tự axit amin theo sáng chế, trong đó chất mang dễ dàng phân tán và giải phóng enzym phytaza khi được cho vào môi trường nước, và, (b) cung cấp chất mang để phân phối enzym này cho động vật hoặc người, trong đó tùy ý trong chất mang để phân phối ăn được này có chất mang dạng hạt ăn được, và tùy ý, chất mang để phân phối ăn được ở dạng hạt cốm, viên nén, gel, dạng lỏng, dạng xịt hoặc bột, và tùy ý, chất mang ăn được là chất mang được chọn từ nhóm bao gồm mầm hạt, cỏ, cỏ linh lăng, cỏ đuôi mèo, vỏ đậu tương, bột hạt hướng dương, bột ngô, bột đậu tương và bột mì, và tùy ý, chất mang ăn được là mầm hạt đã loại hết dầu.

Sáng chế đề xuất thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc thành phần bổ sung vào chế độ ăn, cho động vật hoặc người, chứa polypeptit theo sáng chế, hoặc homodime hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt. Theo một khía cạnh, thực phẩm, thức ăn gia súc, thực phẩm bổ sung, thức ăn gia súc bổ sung, phụ gia thực phẩm, phụ gia thức ăn gia súc, thành phần bổ sung dinh dưỡng hoặc

thành phần bổ sung vào chế độ ăn được sản xuất ở dạng hạt cốm, viên tròn, viên nén, viên nang, gel, miếng gel, dạng xít, bột, chế phẩm đông khô, dược phẩm, dạng lỏng, như hỗn dịch hoặc hồ nhão, hoặc được sản xuất sử dụng các chất phụ trợ được phủ polyme, hoặc được sản xuất ở dạng hạt, hoặc được sản xuất bằng cách sấy phun.

Sáng chế đề xuất chất mang để phân phối enzym ăn được hoặc hấp thu được chứa polypeptit theo sáng chế, hoặc homodime hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt. Theo một khía cạnh, chất mang để phân phối ăn được là hạt cốm, hoặc chất mang để phân phối enzym ăn được hoặc hấp thu được được sản xuất ở dạng hạt cốm, viên tròn, viên nén, viên nang, gel, miếng gel, dạng xít, bột, chế phẩm đông khô, dược phẩm, dạng lỏng như hỗn dịch hoặc hồ nhão, hoặc được sản xuất bằng cách sử dụng chất phụ trợ được phủ polyme, hoặc được sản xuất ở dạng hạt, hoặc được sản xuất bằng cách sấy phun.

Sáng chế đề xuất hạt cốm ăn được hoặc hấp thu được chứa chất mang dạng hạt ăn được hoặc hấp thu được và polypeptit theo sáng chế, hoặc homodime hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt, và tùy ý, hạt cốm được sản xuất ở dạng hạt cốm, hoặc viên tròn, viên nén, viên nang, gel, miếng gel, dạng xít, bột, chế phẩm đông khô, dược phẩm, dạng lỏng, như hỗn dịch hoặc hồ nhão, hoặc được sản xuất bằng cách sử dụng chất phụ trợ được phủ polyme, hoặc được sản xuất ở dạng hạt, hoặc được sản xuất bằng cách sấy phun.

Sáng chế đề xuất các loại bột, chẳng hạn, bột đậu tương, chứa polypeptit theo sáng chế, hoặc homodime hoặc heterodime theo sáng chế, và tùy ý, bột, chẳng hạn, bột đậu tương, được sản xuất ở dạng hạt cốm, viên tròn, viên nén, viên nang, gel, miếng gel, dạng xít, bột, chế phẩm đông khô, hoặc dạng lỏng.

Sáng chế đề xuất phương pháp gia tăng độ bền của polypeptit phytaza đối với quá trình bất hoạt enzym trong hệ tiêu hoá của động vật, phương pháp bao gồm glycosyl hoá polypeptit phytaza chứa polypeptit theo sáng chế, nhờ đó làm tăng độ bền của polypeptit phytaza đối với quá trình bất hoạt enzym trong hệ tiêu hoá của động vật, và tùy ý, quá trình glycosyl hoá là glycosyl hoá ở đầu N, và tùy ý, polypeptit phytaza được

glycosyl hoá là kết quả của quá trình biểu hiện trong cơ thể polynucleotit mã hoá phytaza trong tế bào, và tùy ý, tế bào này là tế bào có nhân, và tùy ý, tế bào này là tế bào bào nấm, tế bào thực vật, hoặc tế bào động vật có vú.

Sáng chế đề xuất phương pháp xử lý hạt ngô và hạt lúa miến gồm các bước sau: (a) cung cấp polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó polypeptit chứa polypeptit theo sáng chế; (b) cung cấp chế phẩm chứa dịch ngâm ngô hoặc dịch ngâm lúa miến; và (c) cho polypeptit trong bước (a) phản ứng với chế phẩm trong bước (b) trong điều kiện mà polypeptit có thể phân cắt liên kết inositol-phosphat vô cơ.

Sáng chế đề xuất được phẩm hoặc thực phẩm chứa polypeptit hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt; và tùy ý, được phẩm hoặc thực phẩm được bào chế ở dạng hạt cơm, viên tròn, viên nén, viên nang, miếng gel, dạng xịt, bột, dạng sữa hoặc dạng lỏng, hoặc được sản xuất bằng cách sử dụng chất phụ trợ được phủ polyme, hoặc ở dạng miếng cây, hoặc được sản xuất ở dạng hạt, hoặc được sản xuất bằng cách sấy phun.

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa polypeptit hoặc heterodime theo sáng chế; và, (b) sản phẩm bất kỳ được nêu trong bảng 2, hoặc chế phẩm bất kỳ được nêu trong bảng 1; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt.

Sáng chế đề xuất suất ăn được chế biến sẵn (self-contained meal Ready-to-Eat unit - MRE), đồ uống hoặc tác nhân hydrat hoá chứa polypeptit hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt.

Sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện (làm chậm quá trình tiến triển, điều trị hoặc phòng ngừa) tình trạng loãng xương bằng cách cho người bệnh cần điều trị sử dụng một lượng có hiệu quả (liều) chế phẩm chứa polypeptit hoặc heterodime theo sáng chế; trong đó tùy ý polypeptit được glycosyl hoá, và tùy ý, hoạt tính phytaza có khả năng chịu nhiệt hoặc bền nhiệt.

Chi tiết của một hoặc nhiều khía cạnh theo sáng chế được nêu trong phần mô tả và hình vẽ đi kèm dưới đây. Các đặc điểm, đối tượng, và ưu điểm của sáng chế sẽ trở lên rõ ràng với phần mô tả và hình vẽ và yêu cầu bảo hộ.

Tất cả các ấn phẩm, bằng độc quyền sáng chế, đơn xin cấp patent, trình tự trong ngân hàng gen (GenBank) và số lưu giữ ATCC, được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ sau dùng để minh họa các khía cạnh của sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế được nêu trong yêu cầu bảo hộ.

Fig. 1 là biểu đồ khối của một hệ thống máy tính, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Fig. 2 là lưu đồ minh họa quá trình 200 để so sánh trình tự nucleotit hoặc protein mới với cơ sở dữ liệu trình tự để xác định mức độ tương đồng giữa trình tự mới và các trình tự trong cơ sở dữ liệu, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Fig. 3 là lưu đồ minh họa một phương án của quá trình trong máy tính để xác định liệu hai trình tự có tương đồng hay không, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Fig. 4 là lưu đồ minh họa một khía cạnh của quy trình xác định để phát hiện sự có mặt đặc điểm trong trình tự, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Fig. 5 mô tả tóm tắt hoạt tính gốc của polypeptit được tinh sạch theo sáng chế, các trình tự thử nghiệm đột biến điểm đơn theo sáng chế, sau khi xử lý nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau trong 30 phút; trong đó hoạt tính phytaza được thử nghiệm với cơ chất phát huỳnh quang, và mức độ phát huỳnh quang được so sánh với mức độ phát huỳnh quang của từng mẫu không được xử lý tương ứng; như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 6 mô tả tóm tắt hoạt tính gốc của polypeptit được tinh sạch theo sáng chế chứa các bột biến gốc đơn “hỗn hợp” (phytaza chứa nhiều đột biến), sau khi xử lý nhiệt trên máy luân nhiệt; tại đó hoạt tính phytaza được thử nghiệm với cơ chất phát huỳnh quang, và mức độ phát huỳnh quang được so sánh với tốc độ phát huỳnh quang của từng mẫu không được xử lý tương ứng; như tóm tắt trong Fig. 6; như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 7 mô tả vắn tắt bằng biểu đồ dữ liệu được sử dụng để tạo ra biểu đồ trong Fig. 6; như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 8 mô tả trình tự của phytaza gốc SEQ ID NO:2 và các cải biến trình tự được tạo ra bằng quá trình gây đột biến bão hoà tại vị trí gen (gene site saturation mutagenesis - GSSM) được chọn để xây dựng thư viện GeneReassembly™; như được mô tả chi tiết dưới đây.

Fig. 9 mô tả phytaza thử nghiệm có các đột biến nhiều gốc so với trình tự gốc SEQ ID NO:2; như được mô tả chi tiết ở đây.

Fig. 10 mô tả phytaza thử nghiệm có các đột biến gốc đơn so với trình tự gốc SEQ ID NO:2; như được mô tả chi tiết ở đây.

Fig. 11 mô tả bằng sơ đồ một thử nghiệm phytaza theo sáng chế sử dụng cơ chất phát huỳnh quang 4-methylumbelliferyl phosphat (MeUMB-phosphat); như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 12 mô tả bằng sơ đồ một thử nghiệm phytaza theo sáng chế sử dụng cơ chất phát huỳnh quang MeUMB-phosphat; như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 13 mô tả bằng sơ đồ quá trình sàng lọc thư viện thử nghiệm, như được mô tả trong Fig. 12, như được mô tả chi tiết trong ví dụ 1, dưới đây.

Fig. 14 mô tả quá trình lên men thử nghiệm có thể kết hợp việc sử dụng phytaza theo sáng chế.

Các biểu tượng tương tự trong các hình vẽ khác nhau đều nhằm chỉ các thành phần giống nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến polypeptit phytaza chứa các đột biến gốc axit amin cụ thể so với SEQ ID NO:2, như đã mô tả ở trên, và polynucleotit mã hoá chúng, (chẳng hạn, chứa các cải biến về cặp bazơ cụ thể so với SEQ ID NO:1, như đã mô tả ở trên), cũng như các phương pháp sử dụng polynucleotit và polypeptit. Fig. 10 mô tả phytaza có các đột biến đơn gốc axit amin so với trình tự gốc SEQ ID NO:2, và Fig. 9 mô tả phytaza thử nghiệm có đột biến nhiều gốc axit amin so với trình tự gốc SEQ ID NO:2.

Hoạt tính phytaza của polypeptit theo sáng chế gồm enzym có hoạt tính phytaza bất kỳ, chẳng hạn, enzym có khả năng xúc tác sự phân giải phytat, chẳng hạn, việc xúc tác phytat (myo-inositol-hexaphosphat) thành inositol và phosphat vô cơ. Phytaza theo sáng chế chứa gốc các enzym chịu nhiệt và bền nhiệt.

Phytaza và polynucleotit mã hoá phytaza theo sáng chế là hữu ích trong một số quá trình, phương pháp và chế phẩm. Chẳng hạn, như đã nêu, phytaza có thể được sử dụng trong thức ăn gia súc, và thức ăn gia súc bổ sung cũng như trong quá trình xử lý để phân huỷ hoặc loại bỏ phytat dư thừa trong môi trường hoặc trong một mẫu cụ thể. Các ứng dụng khác sẽ rõ ràng đối với được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào các chỉ dẫn được đề xuất theo sáng chế, kể cả những vấn đề đã được thảo luận trên đây.

Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế - hoặc độc lập hoặc kết hợp với các chất khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym, như proteaza, amylaza và các chất tương tự) - được sử dụng trong quá trình xử lý thực phẩm, chẳng hạn, để tránh cặn không mong muốn, và trong các ứng dụng khác cần có quá trình thủy phân phytat.

Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế được sử dụng để loại bỏ hoặc giảm sự có mặt của phytat chưa được thủy phân, đặc biệt là khi phytat chưa được thủy phân sẽ dẫn đến các hậu quả khó giải quyết trong các quá trình ngoài cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý thực phẩm. Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế được sử dụng trong các quá trình đã được mô tả trong EP0321004-B1 (Vaara et al.), bao gồm các bước trong quá trình xử lý hạt ngô và lúa miến nhờ đó hạt cứng được ngâm trong nước để làm mềm. Các chất tan trong nước trong quá trình này sẽ thành một phần của rượu làm từ dịch chiết ngô, dịch này sẽ được cô đặc trong quá trình bay hơi. Axit phytic chưa được thủy phân trong rượu dịch chiết ngô, phần lớn ở dạng muối canxi và magie, được liên kết với phospho và đóng thành cặn không mong muốn với các protein và ion kim loại. Loại cặn này là một vấn đề khó giải quyết trong quá trình bay hơi, vận chuyển và bao quản rượu dịch ngâm ngô. Phân tử phytaza theo sáng chế được sử dụng để thủy phân cặn này.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế có thể tạo ra hiệu quả thương mại cao hơn đáng kể so với các phân tử phytaza đã được xác định trước đó, chẳng hạn phân tử phytaza có nguồn gốc từ nấm. Theo một khía cạnh, enzym theo sáng chế có thể ở nồng độ khoảng 4400 U/mg, hoặc lớn hơn khoảng từ 50 đến 100, hoặc từ 50 đến 1000 hoặc từ 100 đến 4000 U/mg protein.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp thay đổi đặc tính của phytaza theo sáng chế bằng cách gây đột biến và các phương pháp khác, được mô tả chi tiết bên dưới.

Tạo và xử lý axit nucleic

Sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá polypeptit phytaza theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất catxet biểu hiện, vector như vector biểu hiện hoặc vector nhân dòng, phương tiện nhân dòng như vector virus, plasmid, thể thực khuẩn, phagemid, cosmid, fosmid, nhiễm sắc thể thể thực khuẩn hoặc nhân tạo, gồm có, hoặc được chứa trong đó, axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp phát hiện các trình tự phytaza mới sử dụng axit nucleic theo sáng chế. Cũng được đề xuất theo sáng chế là các phương pháp cải biến axit nucleic theo sáng chế bằng cách, chẳng hạn, ghép nối tổng hợp, hệ thống tiến hóa được định hướng tối ưu và/hoặc gây đột biến bão hoà.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất một họ axit nucleic là các biến thể được tạo ra bằng cách tổng hợp của trình tự gốc SEQ ID NO:1, trong đó các axit nucleic theo sáng chế có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% so với trình tự “gốc” SEQ ID NO:1, và chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, như đã nêu. Để tham khảo, trình tự gốc SEQ ID NO:1 là:

```
atgaaagcga tcttaatccc atttttatct cttctgattc cgtaacccc gcaatctgca 60
ttcgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tcgtcatggt 120
gtgcgtgctc caaccaaggc cagcgaactg atgcaggatg tcaccccaga cgcattggca 180
acctggccgg taaaactggg tgagctgaca ccgcgcgggtg gtgagctaata cgctatctc 240
ggacattact ggcgtcagcg tctggtagcc gacggattgc tgctaaatg tggctgcccc 300
cagtctggtc aggtcgcatg tattgctgat gtcgacgagc gtaccgtaa aacaggcgaa 360
```

```

gccttcgccg ccgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataccca ggcagatacg 420
tccagtcccc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg 480
aacgtgactg acgcgatcct cgagagggca ggaggggtcaa ttgctgactt taccgggcat 540
tatcaaacgg cgtttcgca actggaacgg gtgcttaatt ttccgcaatc aaacttgtgc 600
cttaaacgtg agaaacagga cgaaagctgt tcattaacgc aggcattacc atcggaactc 660
aaggtgagcg ccgactgtgt ctcatlaacc ggtgcggtaa gcctcgcac aatgctgacg 720
gagatatttc tcctgcaaca agcacaggga atgccggagc cgggggtggg aaggatcacc 780
gattcacacc agtggaaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaatttga tttgctacaa 840
cgcacgccag aggttgcccc cagccgcgcc accccgttat tagatttgat caagacagcg 900
ttgacgcccc atccaccgca aaaacaggcg tatgggtgtga cattaccacac ttcagtgtcg 960
tttatcgccg gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcactgga gctcaactgg 1020
acgcttcccc gtcagccgga taacacgccg ccaggtgggtg aactgggtgt tgaacgctgg 1080
cgtcggctaa gcgataacag ccagtggatt caggtttcgc tggcttcca gactttacag 1140
cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacgccgc ccggagaggt gaaactgacc 1200
ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcattgtgt cgttggcagg ttttacgcaa 1260
atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agtttgtaa 1299

```

Axit nucleic theo sáng chế có thể được tổng hợp, phân lập và/hoặc sao chép bằng cách, chẳng hạn, tách dòng và biểu hiện thư viện cADN, khuếch đại thông tin hoặc hệ gen ADN_i bằng PCR và tương tự. Trong quá trình thực nghiệm phương pháp theo sáng chế, các gen tương đồng có thể được cải biến bằng cách xử lý một axit nucleic khuôn, như đã nêu. Sáng chế có thể được thực hiện cùng với một phương pháp hoặc quá trình hoặc thiết bị bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã được mô tả kỹ trong các tài liệu khoa học và patent.

Kỹ thuật chung

Axit nucleic được sử dụng để thực hiện sáng chế, có thể là ARN, iARN, axit nucleic đối nghĩa, cADN, hệ gen ADN, vector, virus hoặc thể lai của các loại trên, có thể được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, được xử lý kỹ thuật di truyền, khuếch đại và/hoặc biểu hiện/ tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Polypeptit tái tổ hợp được tạo ra từ các axit nucleic này có thể được phân lập hoặc tách dòng riêng rẽ và thử nghiệm một hoạt

tính mong muốn. Một hệ biểu hiện tái tổ hợp bất kỳ có thể sử dụng, gồm có hệ biểu hiện vi khuẩn, động vật có vú, nấm men, côn trùng hoặc tế bào thực vật.

Theo một cách khác, các axit nucleic này có thể được tổng hợp trong ống nghiệm bằng các kỹ thuật tổng hợp hoá học đã biết, như các kỹ thuật được mô tả trong, chẳng hạn, Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859; US 4,458,066.

Các kỹ thuật thao tác axit nucleic, như, chẳng hạn, tách dòng tiếp, gắn đoạn dò (chẳng hạn, kỹ thuật gắn môi ngẫu nhiên sử dụng polymeraza Klenow, dịch mã gián đoạn (nick translation), khuếch đại), đọc trình tự, lai và các kỹ thuật tương tự được mô tả rõ trong các tài liệu khoa học và patent, tham khảo, chẳng hạn, Sambrook, ed., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.)*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY VÀ MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACIDS PROBES*, Part I. Theory and Nucleic Acids Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Các phương pháp thu được và xử lý axit nucleic hữu ích khác được sử dụng để thực hiện các phương pháp theo sáng chế là tách dòng từ một mẫu hệ gen, và nếu cần, sàng lọc và tái tách dòng các đoạn chèn được phân lập hoặc khuếch đại từ, chẳng hạn, các dòng hệ gen hoặc các dòng cADN. Các nguồn axit nucleic được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế gồm có thư viện hệ gen ADN hoặc ADN bổ trợ được chứa trong, chẳng hạn, nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (mammalian artificial chromosome - MAC), tham khảo, chẳng hạn, US 5,721,118; 6,025,155; nhiễm sắc thể nhân tạo của người, tham khảo, chẳng hạn, Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335; nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (yeast artificial chromosomes - YAC); nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (bacterial artificial chromosomes - BAC); nhiễm sắc thể nhân tạo P1, tham khảo, chẳng hạn, Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; vector thu được từ P1 (P1-

derived vectors - PACs), tham khảo, chẳng hạn, Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; cosmit, virus tái tổ hợp, thể thực khuẩn hoặc plasmid.

Theo các khía cạnh khác, thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “trình tự axit nucleic” dùng để chỉ oligonucleotit, nucleotit, polynucleotit, hoặc một đoạn của các phân tử bất kỳ trong số đã nêu trên, ADN hoặc ARN (chẳng hạn, mARN, rARN, tARN) có nguồn gốc hệ gen hoặc tổng hợp có thể là sợi đơn hoặc sợi kép và có thể có sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa, peptit axit nucleic (peptide nucleic acid - PNA), hoặc các phân tử giống ADN hoặc ARN, có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp, bao gồm, chẳng hạn, iARN, ribonucleoprotein (chẳng hạn, iRNP). Thuật ngữ này đề cập đến các axit nucleic, nghĩa là, oligonucleotit, chứa các nucleotit tương tự với nucleotit tự nhiên. Thuật ngữ này cũng đề cập đến các cấu trúc giống axit nucleic với bộ khung được tổng hợp tham khảo, chẳng hạn, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acids Drug Dev* 6:153-156.

Theo một khía cạnh, polynucleotit tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm các trình tự liên kề với một axit nucleic “khung” không liên kề trong môi trường tự nhiên của nó. Theo một khía cạnh, axit nucleic chiếm 5% hoặc cao hơn số lượng các đoạn chèn axit nucleic trong tập hợp “phân tử khung” axit nucleic. “Phân tử khung” theo sáng chế gồm có các axit nucleic như vector biểu hiện, axit nucleic tự sao chép, virus, axit nucleic hợp nhất, và các vector hoặc axit nucleic khác được sử dụng để duy trì hoặc nhân dòng đoạn chèn axit nucleic cần quan tâm. Theo một khía cạnh, axit nucleic chiếm 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc cao hơn số lượng đoạn chèn axit nucleic trong tập hợp phân tử khung tái tổ hợp.

Theo một khía cạnh, axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế được lắp ghép trong một pha thích hợp với trình tự dẫn đầu có khả năng định hướng quá trình tiết polypeptit được dịch mã hoặc đoạn của nó.

Sáng chế đề xuất protein dung hợp và axit nucleic mã hoá chúng. Một polypeptit theo sáng chế có thể được dung hợp với một peptit hoặc polypeptit khác loại, như peptit đồng nhất đầu N sẽ tạo ra những đặc tính mong muốn, như gia tăng độ ổn định hoặc đơn giản hoá quá trình tinh sạch. Peptit và polypeptit theo sáng chế cũng có thể được tổng

hợp và biểu hiện ở dạng các protein dung hợp với một hoặc nhiều vùng hỗ trợ được nối với nó để, chẳng hạn, nhằm tạo ra một peptit có tính sinh miễn dịch mạnh hơn, để phân lập dễ dàng hơn peptit được tổng hợp bằng cách tái tổ hợp, để xác định và phân lập các kháng thể và tế bào B biểu hiện kháng thể, và các mục đích tương tự. Các vùng hỗ trợ cho quá trình phát hiện và tinh sạch bao gồm, chẳng hạn, peptit càng hóa kim loại như bó polyhistidin và môđun histidin-tryptophan cho phép tinh sạch trên các kim loại được cố định, các vùng protein A cho phép tinh sạch trên globulin miễn dịch cố định, và vùng chức năng được sử dụng trong hệ tinh sạch kéo dài/ái lực FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). Việc đưa vào các trình tự liên kết có thể phân cắt được như yếu tố Xa hoặc enterokinaza (Invitrogen, San Diego CA) giữa một vùng tinh sạch và peptit hoặc polypeptit chứa môtip để tạo thuận lợi cho quá trình tinh sạch. Chẳng hạn, vector biểu hiện có thể chứa trình tự axit nucleic mã hoá epitop được nối với 6 gốc histidin sau đó là một thioredoxin và một vị trí cắt của enterokinaza (tham khảo, chẳng hạn, Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414). Các gốc histidin tạo thuận lợi cho quá trình phát hiện và tinh sạch trong khi vị trí cắt của enterokinaza sẽ cung cấp một phương pháp để tinh chế epitop từ các phần còn lại của protein dung hợp. Kỹ thuật gắn liền với vector mã hoá protein dung hợp và ứng dụng của các protein dung hợp được mô tả chi tiết trong các tài liệu khoa học và patent, tham khảo, chẳng hạn, Kroll (1993) *ADN Cell. Biol.*, 12:441-53.

Theo một khía cạnh, thuật ngữ “được phân lập” dùng để chỉ một nguyên liệu được tách từ môi trường ban đầu của nó (chẳng hạn, môi trường tự nhiên nếu chúng có nguồn gốc tự nhiên). Chẳng hạn, một polynucleotit hoặc polypeptit có nguồn gốc tự nhiên có trong một động vật sống thì không được phân lập, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit tương tự, được tách ra từ một số hoặc tất cả các vật liệu cùng tồn tại trong hệ thống tự nhiên, là được phân lập. Các polynucleotit này có thể là một phần của một vector và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của một chế phẩm, và vẫn có thể được phân lập trong vector hoặc chế phẩm không phải là một phần trong môi trường tự nhiên của nó. Theo một khía cạnh, thuật ngữ “được tinh sạch” không có nghĩa là hoàn toàn tinh khiết tuyệt đối; mà, thuật ngữ này dùng để chỉ một định nghĩa tương đối. Các axit nucleic riêng biệt thu được từ thư viện đã được tinh sạch theo cách thông thường đến độ đồng nhất điện di. Các trình tự thu được từ các dòng này không thể thu được trực

tiếp từ thư viện hoặc từ toàn bộ ADN của người. Axit nucleic tinh khiết theo sáng chế đã được tinh sạch từ các phần khác của hệ gen ADN trong sinh vật ít nhất là từ 10^4 đến 10^6 lần. Theo các khía cạnh khác, thuật ngữ “được tinh sạch” cũng dùng để chỉ các axit nucleic được tinh sạch từ hệ gen ADN hoặc từ các trình tự khác trong thư viện hoặc từ môi trường khác bằng ít nhất một bậc (10 lần), hoặc theo một cách khác, hai hoặc ba bậc, hoặc bốn hoặc năm bậc.

Các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã

Sáng chế đề xuất các trình tự axit nucleic (chẳng hạn, ADN) được liên kết một cách có kiểm soát với (các) trình tự kiểm soát quá trình biểu hiện (chẳng hạn, phiên mã hoặc dịch mã), chẳng hạn, trình tự khởi đầu hoặc yếu tố tăng cường, để định hướng hoặc điều chỉnh quá trình tổng hợp/biểu hiện ARN. Trình tự kiểm soát quá trình biểu hiện có thể ở trong một vectơ biểu hiện. Các trình tự khởi đầu của vi khuẩn bao gồm *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda PR*, *PL* và *trp*. Trình tự khởi đầu của động vật nhân thực thử nghiệm bao gồm CMV trung gian sớm, HSV thymidin kinaza, SV40 sớm và muộn, các LTR từ retrovirus và metallothionein I của chuột.

Các trình tự khởi đầu thích hợp để biểu hiện, hoặc biểu hiện quá mức polypeptit trong vi khuẩn bao gồm trình tự khởi đầu *lac* hoặc *trp* của *E. coli*, trình tự khởi đầu *lacI*, trình tự khởi đầu *lacZ*, trình tự khởi đầu T3, trình tự khởi đầu T7, trình tự khởi đầu *gpt*, trình tự khởi đầu *lambda PR*, trình tự khởi đầu *lambda PL*, trình tự khởi đầu trong operon mã hoá enzym phân giải đường như 3-phosphoglycerat kinaza (PGK), và trình tự khởi đầu axit phosphatase. Trình tự khởi đầu trong tế bào nhân thực bao gồm trình tự khởi đầu trung gian sớm CMV, trình tự khởi đầu thymidin kinaza HSV, trình tự khởi đầu sốc nhiệt, trình tự khởi đầu SV40 sớm và muộn, các LTR từ retrovirus, và trình tự khởi đầu metallothionein-I của chuột. Các trình tự khởi đầu khác đã được biết là để kiểm soát quá trình biểu hiện của các gen trong các tế bào chưa có nhân điển hình hoặc nhân thực hoặc virus của chúng cũng có thể được sử dụng.

Vectơ biểu hiện và phương tiện nhân dòng

Sáng chế đề xuất các hệ biểu hiện, chẳng hạn, catxet biểu hiện, vectơ, phương tiện nhân dòng và các loại tương tự, chứa axit nucleic theo sáng chế, chẳng hạn, trình tự mã hoá phytaza theo sáng chế, để biểu hiện, và biểu hiện quá mức polypeptit theo sáng chế

(và axit nucleic, chẳng hạn, đối nghĩa). Vector biểu hiện và phương tiện nhân dòng theo sáng chế có thể là các phần tử virus, baculovirus, thể thực khuẩn, plasmid, phagemid, cosmid, fosmid, nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn, ADN virus (chẳng hạn, vaccinia, adenovirus, virus gây phát ban thời, virus gây bệnh đại giả và dẫn xuất của SV40), nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc P1, plasmid nấm men, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men, và các vector khác đặc hiệu đối với các vật chủ đặc hiệu cần quan tâm (như *Bacillus*, *Aspergillus* và nấm men). Vector theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự ADN nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể và tổng hợp. Một số lượng lớn các vector thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có bán trên thị trường. Các vector thử nghiệm bao gồm: vi khuẩn: vector pQE (Qiagen), plasmid pBluescript, vector pNH, (vector lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); nhân thực: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Tuy nhiên, có thể sử dụng một plasmid hoặc vector khác bất kỳ miễn là chúng có khả năng sao chép và sống sót trong tế bào chủ. Số lượng bản sao ít hoặc số lượng bản sao nhiều có thể được sử dụng trong sáng chế.

Ví dụ về các vector biểu hiện có thể được sử dụng là tiểu phần virus, baculovirus, thể thực khuẩn, plasmid, phagemid, cosmid, fosmid, nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn, ADN virus (chẳng hạn, vaccinia, adenovirus, virus gây phát ban thời, virus gây bệnh đại giả và dẫn xuất của SV40), nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc P1, plasmid nấm men, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men, và các vector khác đặc hiệu đối với các vật chủ đặc hiệu cần quan tâm (như *Bacillus*, *Aspergillus* và nấm men). Do đó, chẳng hạn, ADN có thể được đưa vào một vector bất kỳ trong số các vector biểu hiện để biểu hiện polypeptit. Các vector gồm có các trình tự ADN nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể và tổng hợp. Một số lượng lớn các vector thích hợp đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được bán sẵn trên thị trường. Các vector sau đây có thể được đề xuất; vi khuẩn: vector pQE (Qiagen), plasmid pBluescript, vector pNH, (vector lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); nhân thực: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Tuy nhiên, có thể sử dụng một plasmid hoặc vector khác bất kỳ miễn là chúng có khả năng sao chép và sống trong tế bào chủ. Số lượng bản sao ít hoặc số lượng bản sao nhiều có thể được sử dụng trong sáng chế.

Một vector thử nghiệm để sử dụng trong sáng chế chứa sự sao chép ban đầu yếu tố f (f-factor origin replication). Yếu tố f (hay yếu tố hữu thụ) trong *E. coli* là một plasmid gây ra quá trình chuyển nạp tần suất cao của bản thân nó trong quá trình tiếp hợp và chuyển nạp tần suất thấp hơn của bản thân nhiễm sắc thể vi khuẩn. Một khía cạnh sử dụng vector nhân dòng, được gọi là "fosmit" hoặc vector nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (bacterial artificial chromosome - BAC). Các vector này nhận được từ yếu tố f của *E. coli* có khả năng kết hợp ổn định với các đoạn lớn trong hệ gen ADN. Khi kết hợp với ADN từ một mẫu môi trường không nuôi cấy hỗn hợp, các vector này có thể giúp thu được các đoạn hệ gen ADN lớn ở dạng một "thư viện ADN môi trường" ổn định.

Một loại vector khác để sử dụng theo sáng chế là vector cosmit. Vector cosmit thường được thiết kế một cách đặc biệt để tách dòng và nhân dòng các đoạn hệ gen ADN lớn. Việc tách dòng vào vector cosmit được mô tả chi tiết trong "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (Sambrook et al., 1989).

Trình tự ADN trong vector biểu hiện được liên kết một cách có kiểm soát với (các) trình tự kiểm soát quá trình biểu hiện thích hợp (trình tự khởi đầu) để điều khiển quá trình tổng hợp ARN. Các trình tự khởi đầu ở vi khuẩn được đặt tên cụ thể bao gồm *lacI*, *lacZ*, *T3*, *T7*, *gpt*, *lambda P_R*, *P_L* và *trp*. Các trình tự khởi đầu trong tế bào nhân thực bao gồm CMV trung gian sớm, HSV thymidin kinaza, SV40 sớm và muộn, LTR trong retrovirus, và metallothionein-I của chuột. Quá trình chọn lọc vector và trình tự khởi đầu thích hợp đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vector biểu hiện cũng chứa vị trí liên kết ribosom để khởi đầu quá trình dịch mã và một yếu tố kết thúc phiên mã. Vector cũng có thể chứa các trình tự thích hợp để khuếch đại quá trình biểu hiện. Các vùng trình tự khởi đầu có thể được chọn lọc từ một gen mong muốn bất kỳ sử dụng vector CAT (chloramphenicol transferaza) hoặc các vector khác với các chỉ thị có thể chọn lọc được. Ngoài ra, vector biểu hiện có thể chứa một hoặc nhiều gen chỉ thị có thể chọn lọc được để tạo ra các đặc điểm kiểu hình trong quá trình chọn lọc tế bào chủ được biến nạp như dihydrofolat reductaza hoặc tính kháng neomycin đối với quá trình nuôi cấy tế bào nhân thực, hoặc tính kháng tetracyclin hoặc ampicillin trong *E. coli*.

Theo một khía cạnh, catxet biểu hiện theo sáng chế chứa trình tự theo sáng chế và trình tự nucleotit có khả năng tác động đến quá trình biểu hiện của một gen cấu trúc (nghĩa là, một trình tự mã hoá protein, như phytaza theo sáng chế) trong một tế bào chủ tương hợp với các trình tự này. Catxet biểu hiện bao gồm ít nhất một trình tự khởi đầu được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự mã hoá polypeptit; và tùy ý, với các trình tự khác, chẳng hạn, các trình tự tín hiệu kết thúc phiên mã. Các yếu tố hỗ trợ cần thiết hoặc hữu ích có thể tác động vào quá trình biểu hiện cũng có thể được sử dụng, chẳng hạn, yếu tố tăng cường. Theo một khía cạnh, “được liên kết một cách có kiểm soát” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ liên kết của một trình tự khởi đầu theo hướng ngược dòng so với một trình tự ADN sao cho trình tự khởi đầu sẽ thúc đẩy quá trình phiên mã của trình tự ADN. Do đó, catxet biểu hiện cũng bao gồm plasmit, vector biểu hiện, virus tái tổ hợp, dạng bất kỳ của vector tái tổ hợp “ADN trần”, và các loại tương tự. Theo một khía cạnh, “vector” chứa một axit nucleic có thể lây nhiễm, chuyển nhiễm, cải biến tạm thời hoặc lâu dài một tế bào. Vector có thể là một axit nucleic trần, hoặc một axit nucleic tạo phức với protein hoặc lipid. Vector tùy ý có thể chứa axit nucleic và/hoặc protein của virus hoặc vi khuẩn, và/hoặc màng (chẳng hạn, màng tế bào, vỏ lipid của virus, v.v.). Theo một khía cạnh, vector bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, replicon (chẳng hạn, ARN replicon, thể thực khuẩn) mà các đoạn ADN được gắn vào và sao chép. Theo một khía cạnh, các vector bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ARN, ADN hoặc ARN thẳng hoặc vòng tự sao chép tự động (chẳng hạn, plasmit, virus, và các loại tương tự, tham khảo, chẳng hạn, US 5,217,879), và bao gồm cả các plasmit biểu hiện và không biểu hiện. Khi một vi sinh vật hoặc tế bào tái tổ hợp được gọi là vật chủ chứa “vector biểu hiện” điều này có nghĩa là vector biểu hiện gồm cả ADN thẳng và vòng ngoài nhiễm sắc thể và ADN đã được đưa vào (các) nhiễm sắc thể chủ. Khi một vector được lưu giữ bởi tế bào chủ thì vector đó có thể được tự sao một cách ổn định bởi tế bào trong quá trình nguyên phân như một cấu trúc tự động, hoặc được kết hợp vào trong hệ gen của tế bào chủ.

Vector biểu hiện có thể chứa một trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom để khởi đầu quá trình dịch mã và yếu tố kết thúc phiên mã. Vector cũng có thể bao gồm các trình tự thích hợp để khuếch đại quá trình biểu hiện. Vector biểu hiện của động vật có vú có thể bao gồm điểm khởi đầu phiên mã, bất kỳ vị trí liên kết ribosom cần thiết, vị trí

polyadenyl hoá, vị trí tách intron cho và nhận, các trình tự kết thúc phiên mã, và các t không phiên mã nằm kề đầu 5'. Theo một số khía cạnh, các trình tự ADN nhận được từ các vị trí tách intron và polyadenyl hoá của SV40 có thể được sử dụng để tạo ra các yếu tố di truyền không phiên mã yêu cầu.

Theo một khía cạnh, vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều gen chỉ thị có thể chọn lọc được để chọn lọc các tế bào chủ chứa vector. Các chỉ thị có thể chọn lọc được này gồm có các gen mã hoá dihydrofolat reductaza hoặc gen tạo tính kháng neomycin trong quá trình nuôi cấy tế bào nhân thực, gen tạo tính kháng tetracyclin hoặc ampicilin trong *E. coli*, và gen TRP1 của *S. cerevisiae*. Các trình tự khởi đầu có thể được chọn từ một gen mong muốn bất kỳ sử dụng các vector chloramphenicol transferaza (CAT) hoặc các vector khác với các chỉ thị có thể chọn lọc được.

Vector để biểu hiện polypeptit hoặc đoạn của nó trong các tế bào nhân thực có thể chứa các yếu tố tăng cường để gia tăng mức độ biểu hiện. Các yếu tố tăng cường là các yếu tố tác động theo kiểu *cis* của ADN, thường có chiều dài từ khoảng 10 đến khoảng 300bp tác động lên một trình tự khởi đầu để gia tăng quá trình phiên mã. Các ví dụ bao gồm yếu tố tăng cường của SV40 tại phía bên muộn của điểm khởi đầu phiên mã dài từ 100 đến 270bp, yếu tố tăng cường trình tự khởi đầu sớm của cytomegalovirut, yếu tố tăng cường polyoma tác động vào bên muộn của đơn vị, và các yếu tố tăng cường của adenovirut.

Một trình tự ADN có thể được chèn vào một vector bằng nhiều kỹ thuật khác nhau. Thông thường, các trình tự ADN được gắn vào một vị trí mong muốn trong vector sau khi cắt đoạn chèn và nối vào vector với các endonucleaza giới hạn thích hợp. Theo một cách khác, các đầu tù trong cả đoạn chèn và vector có thể được nối với nhau. Một loạt các kỹ thuật tách dòng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, như được mô tả trong Ausubel và Sambrook. Các kỹ thuật này và các kỹ thuật khác có thể được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector có thể ở dạng plasmit, tiểu phần virut, hoặc thể thực khuẩn. Các vector khác bao gồm các trình tự ADN nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể và tổng hợp, dẫn xuất của SV40; plasmid vi khuẩn, ADN thể thực khuẩn, baculovirut, plasmit nấm men, vector nhận được từ các thể tổ hợp plasmit và ADN thể thực khuẩn, ADN virut như vaccinia,

adenovirut, virut gây sốt, và virut gây bệnh đại giả. Một loạt các vectơ nhân dòng và vectơ biểu hiện để sử dụng trong các tế bào chủ chưa có nhân điển hình và nhân thực được mô tả bởi, chẳng hạn, Sambrook.

Các vectơ vi khuẩn cụ thể có thể được sử dụng bao gồm các plasmit được bán sẵn trên thị trường chứa các yếu tố di truyền của các vectơ nhân dòng đã biết rõ pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 và pCM7. Các vectơ trong tế bào nhân thực cụ thể là pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, và pSVL (Pharmacia). Tuy nhiên, vectơ bất kỳ cũng có thể được sử dụng miễn là chúng có khả năng sao chép và sống sót trong tế bào chủ.

Tế bào chủ và tế bào biến nạp

Sáng chế cũng đề xuất tế bào biến nạp chứa trình tự axit nucleic theo sáng chế, chẳng hạn, một trình tự mã hoá phytaza theo sáng chế, hoặc chứa một catxet biểu hiện, vectơ, phương tiện nhân dòng tách dòng, vectơ biểu hiện, vectơ nhân dòng theo sáng chế. Tế bào chủ có thể là một loại tế bào chủ bất kỳ quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm có các tế bào chưa có nhân điển hình, tế bào nhân thực, như tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, hoặc tế bào thực vật. Các tế bào vi khuẩn thử nghiệm là tế bào vi khuẩn bất kỳ trong các giống *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* và *Staphylococcus*, bao gồm, chẳng hạn, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Tế bào nấm thử nghiệm là loài bất kỳ thuộc giống *Aspergillus*. Các tế bào nấm men thử nghiệm là loài bất kỳ thuộc giống *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, hoặc *Schwanniomyces*, gồm có *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc *Schizosaccharomyces pombe*. Tế bào côn trùng là các loài bất kỳ thuộc giống *Spodoptera* hoặc *Drosophila*, gồm có *Drosophila S2* và *Spodoptera Sf9*. Các tế bào côn trùng thử nghiệm bao gồm *Drosophila S2* và *Spodoptera Sf9*. Các tế bào nấm men thử nghiệm bao gồm *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Schizosaccharomyces*

pombe. Tế bào động vật thử nghiệm bao gồm CHO, COS hoặc tế bào u hắc sắc tố Bowes hoặc dòng tế bào bất kỳ của người hoặc chuột. Việc chọn lọc một tế bào chủ thích hợp nằm trong khả năng của một người có hiểu biết trung bình bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector có thể được đưa vào tế bào chủ sử dụng một loạt các kỹ thuật khác nhau, bao gồm biến nạp, chuyển nhiễm, tải nạp, gây nhiễm virus, sử dụng kỹ thuật súng bắn gen, hoặc chuyển gen qua trung gian Ti. Các phương pháp cụ thể bao gồm chuyển nhiễm canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-Dextran, kỹ thuật lipofection, hoặc biến nạp điện (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Nếu thích hợp, các tế bào chủ được xử lý kỹ thuật di truyền có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến thích hợp để hoạt hoá các trình tự khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp hoặc khuếch đại gen theo sáng chế. Sau khi biến nạp một dòng tế bào chủ thích hợp và nuôi cấy dòng tế bào chủ tới một mật độ tế bào thích hợp, trình tự khởi đầu được chọn lọc có thể được kích thích bằng các phương pháp thích hợp (chẳng hạn, kích thích bằng thay đổi nhiệt độ hoặc hoá học) và các tế bào có thể được nuôi cấy thêm một giai đoạn nữa để tạo ra polypeptit hoặc các đoạn polypeptit mong muốn.

Các tế bào có thể được thu hoạch bằng cách ly tâm, phá vỡ bằng các phương pháp hoá học hoặc vật lý, và dịch chiết thô hình thành được giữ lại để tinh sạch tiếp theo. Các tế bào vi sinh vật được sử dụng để biểu hiện các protein có thể được phá vỡ bằng các phương pháp bất kỳ, bao gồm chu trình kết đông-xả đông, siêu âm, phá vỡ cơ học, hoặc sử dụng các chất phân huỷ tế bào. Các phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polypeptit hoặc đoạn của nó được biểu hiện có thể được thu lại và được tinh sạch từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp như kết tủa bằng amoni sulfat hoặc etanol, chiết axit, sắc ký trao đổi ion dương hoặc âm, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin. Có thể sử dụng các bước làm tan lại protein, nếu cần, trong quá trình ly tâm hoàn toàn polypeptit. Nếu cần, có thể sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC) trong các bước tinh sạch cuối cùng.

Các cấu trúc trong tế bào chủ có thể được sử dụng theo các cách thông thường để tạo ra các sản phẩm gen được mã hoá bởi trình tự tái tổ hợp. Phụ thuộc vào loại tế bào chủ được sử dụng trong quá trình sản xuất tái tổ hợp, polypeptit sẽ được sản xuất bởi các tế bào chủ chứa vector có thể được glycosyl hoá hoặc không glycosyl hoá. Polypeptit theo sáng chế cũng có thể chứa hoặc không chứa gốc axit amino metionin ban đầu.

Các hệ dịch mã vô bào cũng có thể được sử dụng để sản xuất polypeptit theo sáng chế. Hệ dịch mã vô bào có thể sử dụng các mARN được phiên mã từ một cấu trúc ADN chứa một trình tự khởi đầu được liên kết một cách có kiểm soát với một axit nucleic mã hoá polypeptit hoặc đoạn của nó. Theo một vài khía cạnh, cấu trúc ADN có thể được duỗi thẳng trước khi thực hiện phản ứng phiên mã trong ống nghiệm. mARN vừa được phiên mã sau đó sẽ được ủ với dịch chiết vô bào, như dịch chiết tế bào hồng cầu lưới của thỏ, để tạo ra polypeptit hoặc đoạn mong muốn của nó.

Các vector biểu hiện có thể chứa một hoặc nhiều gen chỉ thị có thể chọn lọc để tạo ra các kiểu hình để chọn lọc các tế bào chủ đã được biến nạp như dihydrofolat reductaza hoặc tính kháng neomycin trong quá trình nuôi cấy tế bào nhân thực, hoặc như tính kháng tetracyclin hoặc ampicilin ở *E. coli*.

Axit nucleic theo sáng chế có thể được biểu hiện, hoặc biểu hiện quá mức, trong một hệ biểu hiện trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể bất kỳ. Các hệ nuôi cấy tế bào bất kỳ có thể được sử dụng để biểu hiện, hoặc biểu hiện quá mức protein tái tổ hợp bao gồm hệ nuôi cấy tế bào vi khuẩn, côn trùng, nấm men, nấm hoặc động vật có vú. Quá trình biểu hiện quá mức có thể bị ảnh hưởng bởi việc lựa chọn chính xác trình tự khởi đầu, yếu tố tăng cường biểu hiện, vector (chẳng hạn, việc sử dụng vector tự sao, vector hai cistron (tham khảo, chẳng hạn, Gurtu (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:295-8)), môi trường, hệ nuôi cấy và các yếu tố tương tự. Theo một khía cạnh, quá trình khuếch đại gen sử dụng các chỉ thị chọn lọc, chẳng hạn, glutamin synthetaza (tham khảo, chẳng hạn, Sanders (1987) Dev. Biol. Stand. 66:55-63), trong các hệ tế bào được sử dụng để biểu hiện quá mức polypeptit theo sáng chế.

Các hệ nuôi cấy tế bào động vật có vú khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp, ví dụ về các hệ biểu hiện tế bào động vật có vú gồm có các dòng COS-7 của nguyên bào sợi thận ở khỉ, được mô tả trong "SV40-transformed simian cells

support the replication of early SV40 mutants” (Gluzman, 1981), và các dòng tế bào khác có khả năng biểu hiện một vector tương hợp, chẳng hạn, các dòng tế bào C127, 3T3, CHO, HeLa và BHK. Các vector biểu hiện trong động vật có vú sẽ chứa một điểm khởi đầu phiên mã, trình tự khởi đầu thích hợp và yếu tố tăng cường, cũng như các vị trí liên kết ribosom cần thiết bất kỳ, vị trí polyadenyl hoá, vị trí tách và gắn intron, trình tự kết thúc phiên mã, và trình tự không phiên mã nằm kề đầu 5'. Các trình tự ADN nhận được từ các vị trí tách intron, và các vị trí polyadenyl hoá của SV40 có thể được sử dụng để tạo ra các yếu tố di truyền không phiên mã cần thiết.

Tế bào chủ chứa polynucleotit quan tâm có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến thích hợp để hoạt hoá trình tự khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp hoặc khuếch đại gen. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, pH và các điều kiện tương tự đã được sử dụng trước đó cùng với tế bào chủ được chọn lọc để biểu hiện, và sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các dòng được xác định là có hoạt tính enzym đặc hiệu sau đó có thể được đọc trình tự để xác định trình tự polynucleotit mã hoá enzym có hoạt tính được tăng cường.

Khuếch đại axit nucleic

Trong khi thực hiện sáng chế, axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế, hoặc axit nucleic được cải biến, có thể được tạo ra bằng cách, chẳng hạn, khuếch đại. Sáng chế đề xuất cặp trình tự mỗi khuếch đại để khuếch đại axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza, hoặc các đoạn trình tự của nó, khi cặp mỗi có khả năng khuếch đại các trình tự axit nucleic bao gồm trình tự thử nghiệm SEQ ID NO:1, và ít nhất một trong số các biến thể trình tự đặc hiệu nêu trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế trình tự cặp mỗi khuếch đại đối với một phần bất kỳ hoặc các trình tự có độ dài đủ; chẳng hạn:

Trình tự SEQ ID NO:1 gốc là:

```
ATGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTTATCTCTTCTGATTCCGTTAACCCCGC
AATCTGCATTCGCTCAGAGTGAGCCGGAGCTGAAGCTGGAAAGTGTGGTG
ATTGTCAGTCGTCATGGTGTGCGTGCTCCAACCAAGGCCACGCAACTGATG
CAGGATGTCACCCCAGACGCATGGCCAACCTGGCCGGTAAACTGGGTGA
GCTGACACCGCGCGGTGGTGAGCTAATCGCCTATCTCGGACATTACTGGCG
```

TCAGCGTCTGGTAGCCGACGGATTGCTGCCTAAATGTGGCTGCCCCGACGTC
 TGGTCAGGTCGCGATTATTGCTGATGTGACGAGCGTACCCGTAAAACAGG
 CGAAGCCTTCGCCGCCGGGCTGGCACCTGACTGTGCAATAACCGTACATAC
 CCAGGCAGATACGTCCAGTCCCGATCCGTTATTTAATCCTCTAAAAACTGG
 CGTTTGCCAACTGGATAACGCGAACGTGACTGACGCGATCCTCGAGAGGG
 CAGGAGGGTCAATTGCTGACTTTACCGGGCATTATCAAACGGCGTTTCGCG
 AACTGGAACGGGTGCTTAATTTTCCGCAATCAAACCTTGTGCCTTAAACGTG
 AGAAACAGGACGAAAGCTGTTCATTAACGCAGGCATTACCATCGGAACTC
 AAGGTGAGCGCCGACTGTGTCTCATTAACCGGTGCGGTAAGCCTCGCATCA
 ATGCTGACGGAGATATTTCTCCTGCAACAAGCACAGGGAATGCCGGAGCC
 GGGGTGGGGAAGGATCACCGATTACACACAGTGGAACACCTTGCTAAGTT
 TGCATAACGCGCAATTTGATTTGCTACAACGCACGCCAGAGGTTGCCCGCA
 GCCGCGCCACCCCGTTATTAGATTTGATCAAGACAGCGTTGACGCCCCATC
 CACCGCAAAAACAGGCGTATGGTGTGACATTACCCACTTCAGTGCTGTTTA
 TCGCCGGACACGATACTAATCTGGCAAATCTCGGCGGCGCACTGGAGCTC
 AACTGGACGCTTCCCGGTCAGCCGGATAACACGCCGCCAGGTGGTGAAC
 GGTGTTTGAACGCTGGCGTCGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGATTCAGG
 TTTCGCTGGTCTTCCAGACTTTACAGCAGATGCGTGATAAAACGCCGCTGT
 CATTAAATACGCCGCCCGGAGAGGTGAAACTGACCCTGGCAGGATGTGAA
 GAGCGAAATGCGCAGGGCATGTGTTTCGTTGGCAGGTTTTACGCAAATCGTG
 AATGAAGCACGCATACCGGCGTGCAGTTTGAGATCTCATCTA

Do đó, cặp trình tự mỗi để khuếch đại trình tự gốc này, hoặc một trong số các trình tự thử nghiệm theo sáng chế sẽ có ít nhất một cải biến về trình tự đặc hiệu nêu ở đây, có thể là các gốc từ 1 đến 21 của SEQ ID NO:1 (nghĩa là, ATGAAAGCGATCTTAATCCCA) và sợi bổ sung của 21 gốc cuối cùng trong SEQ ID NO:1 (nghĩa là, sợi bổ sung của TGCAGTTTGAGATCTCATCTA).

Các phản ứng khuếch đại có thể được sử dụng để định lượng lượng axit nucleic trong một mẫu (như lượng thông tin trong mẫu tế bào), axit nucleic gắn nhãn (chẳng hạn, để sử dụng trong một vi mạch hoặc giả thẩm tách), phát hiện axit nucleic, hoặc định lượng lượng axit nucleic đặc hiệu trong một mẫu. Theo một khía cạnh theo sáng chế, lượng thông tin thu được từ một tế bào hoặc thư viện ADN bổ trợ sẽ được khuếch đại.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chọn lọc và thiết kế các đoạn môi khuếch đại oligonucleotit thích hợp. Các phương pháp khuếch đại cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và gồm có, chẳng hạn, phản ứng chuỗi polymeraza, PCR (tham khảo, chẳng hạn, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS và APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) và PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., phản ứng chuỗi ligaza (LCR) (tham khảo, chẳng hạn, Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117); khuếch đại phiên mã (tham khảo, chẳng hạn, Kwoh (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173); và, sao chép trình tự tự duy trì (tham khảo, chẳng hạn, Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874); khuếch đại Q Beta replicaza (tham khảo, chẳng hạn, Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491), automated Q-beta replicase amplification assay (tham khảo, chẳng hạn, Burg (1996) *Mol. Cell. Đọan dòs* 10:257-271) và các kỹ thuật tổng hợp nhờ ARN polymeraza khác (chẳng hạn, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); tham khảo Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:307-316; Sambrook; Ausubel; US 4,683,195 và 4,683,202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13:563-564.

Xác định mức độ tương đồng về trình tự

Sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc cao hơn so với trình tự SEQ ID NO:1, và chứa ít nhất một trong số các biến thể được đánh số đặc hiệu so với SEQ ID NO:1 như đã nêu trên. Theo một khía cạnh, mức độ tương đồng về trình tự (mức độ giống nhau) có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình máy tính bất kỳ và các tham số đi kèm, gồm có các chương trình được nêu ở đây, như BLAST 2.2.2. hoặc FASTA phiên bản 3.0t78, với các tham số mặc định.

Các trình tự tương đồng cũng gồm có các trình tự ARN trong đó uridin thay thế timin trong trình tự axit nucleic. Các trình tự tương đồng có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây hoặc có thể tạo ra từ việc chỉnh sửa lỗi trình tự.

Các chương trình so sánh trình tự khác nhau được xác định ở đây được sử dụng trong khía cạnh này theo sáng chế. Mức độ tương đồng của protein và/hoặc trình tự axit nucleic (mức độ giống nhau) có thể được xác định bằng cách sử dụng một thuật toán bất kỳ trong một loạt các thuật toán và chương trình so sánh trình tự khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thuật toán và chương trình như vậy gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, và CLUSTALW (Pearson và Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Axit nucleic Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993).

Mức độ giống nhau hoặc mức độ tương đồng có thể được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự (chẳng hạn, Gói phần mềm phân tích trình tự của công ty Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Phần mềm này sẽ thu thập các trình tự giống nhau bằng cách gán các cấp độ giống nhau vào các đột biến như mất, thay thế và các đột biến khác. Thuật ngữ “mức độ giống nhau” và “mức độ tương đồng” trong trường hợp hai hoặc nhiều hơn hai trình tự axit nucleic hoặc trình tự polypeptit, dùng để chỉ hai hoặc nhiều hơn hai trình tự hoặc đoạn trình tự là giống nhau hoặc có một tỷ lệ phần trăm cụ thể các gốc axit amin hoặc nucleotit giống nhau khi được so sánh và xếp thẳng hàng để có mức độ tương ứng tối đa trên một ô so sánh hoặc một vùng được chỉ định nào đó khi được xác định bằng cách sử dụng một số bất kỳ các thuật toán so sánh trình tự hoặc bằng cách xếp thẳng hàng bằng tay và xác định bằng mắt thường. Đối với việc so sánh trình tự, một trình tự có thể đóng vai trò là trình tự đối chứng (trình tự thử nghiệm theo sáng chế) dựa vào trình tự này các trình tự kiểm tra được so sánh. Khi sử dụng một thuật toán so sánh trình tự, trình tự kiểm tra và trình tự đối chứng được đưa vào máy tính, các đoạn trình tự tương ứng được chỉ định, nếu cần, và các tham số trong thuật toán phân tích trình tự được chỉ định. Các tham số mặc định trong chương trình có thể được sử dụng, hoặc có thể chỉ định các tham số thay thế. Sau đó, thuật toán so sánh trình tự sẽ tính toán tỷ lệ phần trăm mức độ tương đồng đối với các trình tự kiểm tra so với trình tự đối chứng, dựa trên các tham số trong chương trình.

Một “ô so sánh”, như được sử dụng ở đây, là một đoạn gồm một gốc bất kỳ trong số các gốc liền nhau. Chẳng hạn, theo một khía cạnh khác theo sáng chế, các gốc liền nhau nằm trong phạm vi bất kỳ từ 20 đến toàn bộ chiều dài của trình tự thử nghiệm theo sáng chế sẽ được so sánh với một trình tự đối chứng có cùng số vị trí liền nhau sau khi hai trình tự được xếp thẳng hàng một cách tối ưu. Nếu trình tự đối chứng có mức độ tương đồng về trình tự cần thiết với các trình tự thử nghiệm theo sáng chế, chẳng hạn, mức độ tương đồng về trình tự 98% với SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, và có một trong số các cải biến về trình tự đặc hiệu nêu trên, thì trình tự này nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo các phương án khác, các đoạn trình tự có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến 600, khoảng 50 đến 200, và khoảng 100 đến 150 sẽ được so sánh với một trình tự đối chứng có cùng số vị trí liền kề nhau sau khi hai trình tự được xếp thẳng hàng một cách tối ưu. Các phương pháp xếp thẳng trình tự để so sánh đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc xếp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, chẳng hạn, bằng thuật toán xác định mức độ giống nhau tại chỗ của Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, bằng thuật toán xếp thẳng tương đồng của Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, bằng phương pháp tìm kiếm tương đồng của Person & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, hệ thống xử lý được vi tính hoá của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói phần mềm di truyền Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), hoặc bằng cách xếp thẳng bằng tay và kiểm tra bằng mắt. Các thuật toán để xác định mức độ giống nhau hoặc mức độ tương đồng khác bao gồm, chẳng hạn, ngoài chương trình BLAST (Basic Local Alignment Search Tool tại National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, Smith-Waterman algorithm, DARWIN, Las Vegas algorithm, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence

Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) và WHAT-IF. Các chương trình so sánh trình tự cũng có thể được sử dụng để sàng lọc các cơ sở dữ liệu hệ gen để xác định các trình tự polynucleotit có các trình tự gần như giống nhau hoàn toàn. Một số cơ sở dữ liệu hệ gen là có sẵn, chẳng hạn, một phần lớn hệ gen người đã có sẵn là một phần của dự án đọc trình tự hệ gen người (Gibbs, 1995). Một số hệ gen đã được đọc trình tự, chẳng hạn, *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997), và nấm men (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), và *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). Những tiến triển đáng kể đã được tạo ra trong việc đọc trình tự hệ gen của các sinh vật bậc cao, như chuột, *C. elegans*, và *Arabidopsis sp.* Các cơ sở dữ liệu chứa thông tin về hệ gen được chú thích với một số thông tin về chức năng được lưu trữ bởi một số tổ chức khác nhau và có thể truy cập được qua internet.

Các thuật toán BLAST, BLAST 2.0 và BLAST 2.2.2 cũng có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Các thuật toán này được mô tả, chẳng hạn, trong Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Phần mềm để thực hiện các phân tích BLAST được công bố rộng rãi thông qua trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (Tin Sinh). Thuật toán này bao gồm đầu tiên là xác định các cặp trình tự có điểm số cao (high scoring sequence pairs - HSPs) bằng cách xác định một đoạn ngắn chiều dài W trong trình tự kiểm tra, hoặc phù hợp hoặc thỏa mãn một số điểm giới hạn có giá trị dương T khi được xếp thẳng với một đoạn trình tự có cùng chiều dài trong cơ sở dữ liệu trình tự. T là ngưỡng điểm đoạn trình tự lân cận (neighborhood word score threshold) (Altschul (1990) sách đã dẫn). Các đoạn trình tự lân cận ban đầu đóng vai trò như các đoạn dò (seed) đối với các tìm kiếm ban đầu để tìm ra các HSP dài hơn chứa chúng. Các đoạn trình tự sẽ được kéo dài về cả hai hướng dọc theo mỗi trình tự cho đến khi điểm số xếp thẳng hàng tính lũy có thể tăng lên. Điểm số tích lũy được tính bằng cách sử dụng, đối với các trình tự nucleotit, các tham số M (điểm cộng cho một cặp trình tự bổ sung; luôn luôn >0). Đối với các trình tự axit amin, một ma trận điểm số được sử dụng để tính điểm số tích lũy. Việc kéo dài các đoạn trình tự theo mỗi

hướng được dừng lại khi: điểm số xếp thẳng tích lũy giảm xuống lượng X từ giá trị đạt được tối đa của nó; điểm số tích lũy giảm xuống 0 hoặc thấp hơn, do sự tích lũy một hoặc nhiều xếp thẳng các gốc có điểm số âm; hoặc khi tới đầu của trình tự. Các tham số trong thuật toán BLAST là W, T, và X sẽ xác định mức độ nhảy và tốc độ của quá trình xếp thẳng trình tự. Chương trình BLASTN (đối với các trình tự nucleotit) sử dụng như các mặc chiều dài word (W) là 11, kỳ vọng (E) là 10, $M=5$, $N=-4$ và một quá trình so sánh cả hai sợi. Đối với các trình tự axit amin, chương trình BLASTP sử dụng các mặc định là chiều dài word là 3, và số kỳ vọng (E) là 10, và ma trận điểm số BLOSUM62 (tham khảo Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) số xếp thẳng (B) là 50, kỳ vọng (E) là 10, $M=5$, $N=-4$, và quá trình so sánh cả hai sợi. Thuật toán BLAST cũng thực hiện một phân tích thống kê về mức độ tương đồng giữa hai trình tự (tham khảo, chẳng hạn, Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873). Một phép đo độ tương đồng được cung cấp bởi thuật toán BLAST là xác suất tổng nhỏ nhất ($P(N)$), sẽ cung cấp chỉ báo cho xác suất nhờ đó sự phù hợp giữa hai trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin sẽ xảy ra ngẫu nhiên. Chẳng hạn, axit nucleic được coi là tương đồng với trình tự tham chiếu nếu xác suất tổng nhỏ nhất trong một so sánh của axit nucleic kiểm tra so với axit nucleic tham chiếu nhỏ hơn khoảng 0,2, nhỏ hơn khoảng 0,01, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,001. Theo một khía cạnh, các tương đồng về protein và trình tự axit nucleic được xác định bằng cách sử dụng Basic Local Alignment Search Tool (Basic Local Alignment Search Tool - BLAST). Chẳng hạn, năm chương trình BLAST đặc hiệu có thể được sử dụng để thực hiện yêu cầu sau: (1) BLASTP và BLAST3 sẽ so sánh trình tự truy vấn axit amin với cơ sở dữ liệu trình tự protein; (2) BLASTN sẽ so sánh trình tự truy vấn nucleotit với cơ sở dữ liệu trình tự nucleotit; (3) BLASTX sẽ so sánh các sản phẩm dịch mã 6 khung đọc của một trình tự nucleotit kiểm tra (cả hai sợi) với một cơ sở dữ liệu trình tự protein; (4) TBLASTN sẽ so sánh một trình tự protein kiểm tra với một cơ sở dữ liệu trình tự nucleotit được dịch mã theo tất cả sáu khung đọc (cả hai sợi); và, (5) TBLASTX sẽ so sánh các sản phẩm dịch mã sáu khung đọc của trình tự truy vấn nucleotit với các sản phẩm dịch mã sáu khung của cơ sở dữ liệu trình tự nucleotit. Các chương trình BLAST sẽ xác định các trình tự tương đồng bằng cách xác định các đoạn tương đồng, mà ở đây được gọi là “cặp đoạn trình tự điểm số cao”, giữa một trình tự truy vấn amin hoặc trình tự axit nucleic và một trình tự kiểm

tra có thể thu được từ cơ sở dữ liệu trình tự protein hoặc axit nucleic. Các cặp đoạn trình tự điểm số cao có thể xác định được (nghĩa là, được xếp thẳng) bằng ma trận điểm số, nhiều ma trận đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một ma trận điểm số thử nghiệm được sử dụng là ma trận BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff và Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). Theo một cách khác, các ma trận PAM hoặc PAM250 có thể được sử dụng (tham khảo, chẳng hạn, Schwartz và Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence và Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, để xác định liệu một axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự cần thiết để thuộc phạm vi của sáng chế hay không, chương trình NCBI BLAST 2.2.2 sẽ được sử dụng là một phương án mặc định của blastp. Có khoảng 38 phương án cài đặt trong chương trình BLAST 2.2.2. Theo khía cạnh thử nghiệm theo sáng chế, tất cả các giá trị mặc định được sử dụng trừ cài đặt lọc mặc định (nghĩa là, tất cả các tham số được cài đặt mặc định trừ tham số lọc được cài đặt là tắt (OFF)); tại vị trí của nó cài đặt "-F F" được sử dụng, sẽ làm tắt chức năng lọc. Sử dụng giá trị lọc mặc định thường dẫn đến xâm phạm Karlin-Altschul do chiều dài trình tự ngắn.

Các giá trị mặc định được sử dụng trong khía cạnh thử nghiệm theo sáng chế bao gồm:

"lọc mức độ phức tạp thấp: ON

> Cỡ trình tự Word: 3

> Ma trận: Blosum62

> Số lỗ trống (Gap Costs): tồn tại:11

> Kéo dài:1"

"lọc mức độ phức tạp thấp: ON

Các cài đặt mặc định khác là: lọc mức độ phức tạp thấp OFF, cỡ trình tự word là 3 đối với protein, ma trận BLOSUM62, điểm trừ vì có lỗ trống là -11 và điểm trừ cho việc kéo dài lỗ trống là -1.

Hệ thống máy tính và các sản phẩm chương trình máy tính

Để xác định và nhận biết các tương đồng về trình tự, tương đồng về cấu trúc, các môtip và các cấu trúc tương tự làm việc dựa trên máy tính, trình tự theo sáng chế có thể được lưu trữ, ghi lại, và sao chép trên một vật ghi bất kỳ có thể đọc và truy cập được bằng máy tính. Các môtip có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các chương trình trên chứa các trình tự mã hoá cấu trúc khoá kéo loxin, các cấu trúc xoắn, các vị trí glycosyl hoá, các vị trí ubiquitin hoá, các cấu trúc xoắn alpha, và gấp nếp beta, các trình tự tín hiệu mã hoá peptit tín hiệu điều khiển quá trình tiết các protein được mã hoá, các trình tự tham gia vào quá trình điều hoà phiên mã như các homeobox, các đoạn kéo đuôi có tính axit, vị trí hoạt động của enzym, vị trí gắn cơ chất và vị trí phân cắt enzym.

Do đó, sáng chế đề xuất máy tính, hệ thống máy tính, các vật ghi có thể đọc được bằng máy tính, sản phẩm chương trình máy tính và các loại tương tự được ghi hoặc lưu trữ các trình tự axit nucleic và trình tự polypeptit theo sáng chế, chẳng hạn, các trình tự thử nghiệm theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được ghi lại” và “lưu trữ” dùng để chỉ quá trình lưu trữ thông tin trên một môi trường máy tính. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng phương pháp bất kỳ để ghi lại thông tin trên một vật ghi có thể đọc được bằng máy tính để tạo ra các sản phẩm chứa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic và/hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “máy tính”, “chương trình máy tính” và “bộ vi xử lý” được sử dụng theo nghĩa thông thường và kết hợp tất cả các thiết bị như vậy, như được mô tả theo sáng chế.

Một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật ghi có thể đọc được bằng máy tính ghi lại ít nhất một trình tự axit nucleic và/hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế. Vật ghi có thể đọc được bằng máy tính bao gồm vật ghi có thể đọc được bằng từ tính, vật ghi có thể đọc được bằng quang học, vật ghi có thể đọc được bằng điện tử và thiết bị từ/quang. Chẳng hạn, vật ghi có thể đọc được bằng máy tính có thể là một đĩa cứng, đĩa mềm, băng từ, CD-ROM, đĩa đa năng số (DVD), bộ nhớ truy cập ngẫu nhiên (RAM), hoặc bộ nhớ ghi vĩnh viễn (ROM) cũng như các loại công cụ khác đã được biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các khía cạnh, sáng chế đề xuất các hệ thống (chẳng hạn, các hệ thống dựa trên internet), cụ thể là các hệ thống máy tính, lưu trữ và điều khiển các trình tự và thông

tin trình tự được mô tả ở đây. Một ví dụ về hệ thống máy tính 100 được minh hoạ ở dạng biểu đồ khối trong Fig. 1. Như được sử dụng ở đây, “hệ thống máy tính” dùng để chỉ các phần cứng, phần mềm, và phần lưu trữ dữ liệu được sử dụng để phân tích trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế. Hệ thống máy tính 100 có thể chứa một bộ vi xử lý để xử lý, truy cập và điều khiển dữ liệu trình tự. Bộ vi xử lý 105 có thể là một loại bộ xử lý trung tâm bất kỳ, như, chẳng hạn, Pentium III của tập đoàn Intel, hoặc bộ vi xử lý tương tự của Sun, Motorola, Compaq, AMD hoặc International Business Machines. Hệ thống máy tính 100 là một hệ thống đa mục đích chứa bộ vi xử lý 105 và một hoặc nhiều phần lưu trữ dữ liệu bên trong 110 để lưu trữ dữ liệu, và một hoặc nhiều thiết bị truy xuất dữ liệu để lấy dữ liệu được lưu trữ trong phần lưu trữ dữ liệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng hiểu rằng bất kỳ hệ thống máy tính có sẵn hiện nay đều thích hợp.

Theo một khía cạnh, hệ thống máy tính 100 bao gồm một bộ vi xử lý 105 được nối với bus mà được nối với bộ nhớ chính 115 (có thể được thực thi như RAM) và một hoặc nhiều thiết bị lưu trữ dữ liệu bên trong 110, như ổ cứng và/hoặc vật ghi có thể đọc được bằng máy tính khác có dữ liệu được ghi trên đó. Hệ thống máy tính 100 còn có thể bao gồm một hoặc nhiều thiết bị truy xuất dữ liệu 118 để đọc dữ liệu được lưu trữ trong thiết bị lưu trữ dữ liệu bên trong 110.

Thiết bị truy xuất dữ liệu 118 có thể là, chẳng hạn, ổ đĩa mềm, ổ đĩa compact, ổ băng từ, hoặc bộ điều biến có khả năng kết nối với một hệ thống lưu trữ dữ liệu từ xa (chẳng hạn, qua internet) v.v. Theo một số phương án, thiết bị lưu trữ dữ liệu bên trong 110 là vật ghi có thể đọc được bằng máy tính có thể tháo rời như đĩa mềm, đĩa compact, băng từ, v.v. có dữ liệu và/hoặc logic điều khiển được ghi trên đó. Hệ thống máy tính 100 cũng có thể bao gồm hoặc được đặt chương trình bởi phần mềm thích hợp để đọc logic và/hoặc dữ liệu điều khiển từ thiết bị lưu trữ dữ liệu khi được lắp vào thiết bị truy xuất dữ liệu.

Hệ thống máy tính 100 bao gồm thiết bị hiển thị 120 được sử dụng để hiển thị dữ liệu ra đối với người sử dụng máy tính. Cũng nên chú ý rằng hệ thống máy tính 100 có thể được kết nối với các hệ thống máy tính 125a-c khác trong mạng nội bộ hoặc mạng diện rộng để tạo ra một truy cập tập trung vào hệ thống máy tính 100. Phần mềm để truy

cập và xử lý các trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin theo sáng chế có thể lưu trữ trong bộ nhớ chính 115 trong khi thực thi.

Theo một số khía cạnh, hệ thống máy tính 100 còn có thể bao gồm thuật toán so sánh trình tự để so sánh trình tự axit nucleic theo sáng chế. Thuật toán và (các) trình tự có thể được lưu trữ trên vật ghi có thể đọc được bằng máy tính. “Thuật toán so sánh trình tự” dùng để chỉ một hoặc nhiều chương trình được cài đặt (cục bộ hoặc từ xa) trên hệ thống máy tính 100 để so sánh trình tự nucleotit với các trình tự nucleotit và/hoặc hợp chất khác được lưu trữ trong phương tiện lưu trữ dữ liệu. Chẳng hạn, thuật toán so sánh trình tự có thể so sánh các trình tự nucleotit theo sáng chế với trình tự “gốc” SEQ ID NO:1 và/hoặc SEQ ID NO:2, được lưu trữ trên vật ghi có thể đọc được bằng máy tính với trình tự đối chứng được lưu trữ trên một vật ghi có thể đọc được bằng máy tính để xác định độ tương đồng hoặc các môtip.

Các thông số được sử dụng cùng với các thuật toán trên có thể được lựa chọn phụ thuộc vào độ dài trình tự và mức độ giống nhau được nghiên cứu. Theo một số khía cạnh, các tham số này có thể là tham số mặc định được sử dụng bởi các thuật toán khi không có hướng dẫn từ người sử dụng. Fig. 2 là lưu đồ minh họa một khía cạnh của quá trình 200 để so sánh trình tự nucleotit hoặc protein mới với cơ sở dữ liệu các trình tự để xác định mức độ tương đồng giữa trình tự mới và các trình tự trong cơ sở dữ liệu. Cơ sở dữ liệu các trình tự có thể là một cơ sở dữ liệu riêng được lưu trữ trong hệ thống máy tính 100, hoặc một cơ sở dữ liệu chung như GENBANK có sẵn trên Internet. Quá trình 200 bắt đầu bằng trạng thái khởi động 201 và sau đó chuyển đến trạng thái 202 trong đó trình tự mới cần so sánh sẽ được lưu trữ vào một bộ nhớ trong một hệ thống máy tính 100. Như đã nêu, bộ nhớ này có thể là một loại bộ nhớ bất kỳ, gồm có RAM hoặc một thiết bị lưu trữ nội bộ.

Quá trình 200 sau đó chuyển đến trạng thái 204 trong đó cơ sở dữ liệu các trình tự được mở ra để phân tích và so sánh. Quá trình 200 sau đó sẽ chuyển đến trạng thái 206 trong đó trình tự thứ nhất được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu sẽ được đọc vào một bộ nhớ trên máy tính. Sau đó so sánh được thực hiện tại trạng thái 210 để xác định nếu trình tự thứ nhất là giống như trình tự thứ hai. Quan trọng là phải chú ý rằng bước này là không hạn chế để thực hiện phép so sánh chính xác giữa trình tự mới và trình tự thứ nhất trong

cơ sở dữ liệu. Các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để so sánh hai trình tự nucleotit hoặc protein, ngay cả khi chúng không tương đồng với nhau. Chẳng hạn, các lỗ trống có thể được đưa vào một trình tự để tăng mức độ tương đồng giữa hai trình tự kiểm tra. Các tham số kiểm soát liệu lỗ trống hoặc các đặc điểm khác có được đưa vào một trình tự trong quá trình so sánh hay không thường được nhập vào hệ thống máy tính bởi người sử dụng.

Khi phép so sánh giữa hai trình tự đã được thực hiện ở trạng thái 210, quá trình xác định được thực hiện tại trạng thái quyết định 210 liệu hai trình tự là giống nhau. Tất nhiên là, thuật ngữ “giống nhau” không chỉ giới hạn ở các trình tự hoàn toàn giống nhau. Các trình tự nằm trong các tham số độ tương đồng được nhập bởi người sử dụng sẽ được ghi nhận là “tương đồng” trong quá trình 200. Nếu hai trình tự được xác định là tương đồng, thì quá trình 200 sẽ chuyển đến trạng thái 214 trong đó tên của trình tự trong cơ sở dữ liệu được hiển thị với người sử dụng. Trạng thái này sẽ cho người sử dụng biết rằng trình tự có tên được hiển thị đáp ứng các điều kiện ràng buộc về mức độ giống nhau được nhập vào. Khi tên của trình tự lưu trữ được hiển thị cho người sử dụng, quá trình 200 sẽ chuyển đến trạng thái quyết định 218 trong đó quá trình xác định được thực hiện để xem liệu có còn trình tự nào tồn tại trong cơ sở dữ liệu nữa hay không. Nếu không có trình tự nào tồn tại trong cơ sở dữ liệu nữa, thì sau đó quá trình 200 sẽ kết thúc tại trạng thái cuối cùng 220. Tuy nhiên, nếu còn thêm các trình tự tồn tại trong cơ sở dữ liệu, thì sau đó quá trình 200 sẽ chuyển đến trạng thái 224 trong đó một con trỏ sẽ được chuyển sang trình tự tiếp theo cơ sở dữ liệu sao cho nó có thể được so sánh với trình tự mới. Theo cách này, trình tự mới sẽ được xếp thẳng và so sánh với từng trình tự trong cơ sở dữ liệu.

Cần chú ý rằng nếu quá trình xác định được thực hiện ở trạng thái quyết định 212 thì các trình tự này là không tương đồng, sau đó quá trình 200 sẽ chuyển ngay đến trạng thái quyết định 218 để xác định liệu có trình tự khác bất kỳ trong cơ sở dữ liệu để so sánh hay không. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hệ thống máy tính chứa bộ vi xử lý, thiết bị lưu trữ dữ liệu chứa trình tự axit nucleic theo sáng chế và trình tự so sánh để thực hiện quá trình so sánh trình tự. Bộ so sánh trình tự có thể chỉ ra mức độ tương đồng giữa các trình tự được so sánh hoặc xác định các môtip cấu trúc, hoặc có thể

xác định các môtip cấu trúc trong các trình tự được so sánh với các mã axit nucleic và mã polypeptit.

Fig. 3 là lưu đồ minh hoạ một phương án của quá trình 250 trong máy tính để xác định liệu hai trình tự có tương đồng với nhau hay không. Quá trình 250 bắt đầu ở trạng thái khởi động 252 và sau đó chuyển đến trạng thái 254 trong đó trình tự thứ nhất cần so sánh được lưu trữ vào một bộ nhớ. Trình tự thứ hai cần so sánh sau đó được lưu trữ vào một bộ nhớ ở trạng thái 256. Quá trình 250 sau đó chuyển đến trạng thái 260 trong đó đặc điểm thứ nhất của trình tự thứ nhất được đọc và sau đó chuyển đến trạng thái 262 trong đó đặc điểm thứ nhất của trình tự thứ hai được đọc. Cần hiểu rằng nếu trình tự so sánh là trình tự nucleotit, thì đặc điểm thường là A, T, C, G hoặc U. Nếu trình tự so sánh là trình tự protein, vì đặc điểm có thể là mã axit amin một chữ sao cho trình tự thứ nhất và thứ hai có thể được so sánh với nhau một cách dễ dàng. Sau đó, quá trình xác định được thực hiện ở trạng thái quyết định 264 để xét xem liệu hai đặc điểm này có giống nhau hay không. Nếu chúng là giống nhau, thì sau đó quá trình 250 sẽ chuyển đến trạng thái 268 trong đó các đặc điểm tiếp theo trong các trình tự thứ nhất và thứ hai được đọc. Quá trình xác định sau đó được thực hiện để xét xem liệu các đặc điểm tiếp theo có giống nhau hay không. Nếu có, thì quá trình 250 sẽ tiếp tục vòng này cho đến khi có hai đặc điểm không giống nhau. Nếu được xác định là hai đặc điểm tiếp theo không giống nhau, thì quá trình 250 sẽ chuyển đến trạng thái quyết định 274 để xác định liệu có còn đặc điểm nào trong hai trình tự để so sánh nữa hay không. Nếu không còn đặc điểm nào để so sánh nữa, thì quá trình 250 sẽ chuyển đến trạng thái 276 trong đó mức độ giống nhau giữa trình tự thứ nhất và thứ hai được sẽ được hiển thị cho người sử dụng. Mức độ giống nhau được xác định bằng cách tính tỷ lệ các đặc điểm giống nhau giữa các trình tự so với tổng số trình tự trong trình tự thứ nhất. Do đó, nếu từng đặc điểm trong 100 trình tự nucleotit đầu tiên được xếp thẳng với từng đặc điểm trong trình tự thứ hai, thì mức độ tương đồng là 100%.

Theo một cách khác, chương trình máy tính có thể so sánh một trình tự đối chứng với một trình tự theo sáng chế để xác định liệu các trình tự có khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí hay không. Chương trình có thể ghi lại được chiều dài và mức độ tương đồng của các gốc nucleotit hoặc axit amin được chèn, xóa bỏ hoặc thay thế so với trình tự đối chứng hoặc trình tự theo sáng chế. Chương trình máy tính có thể là chương trình xác

định liệu trình tự đối chứng có chứa đa hình nucleotit đơn (single nucleotide polymorphism - SNP) so với trình tự theo sáng chế, hoặc, liệu trình tự theo sáng chế có chứa SNP của trình tự đã biết. Do đó, theo một số khía cạnh, chương trình máy tính là chương trình có thể xác định các SNP. Phương pháp này có thể được thực hiện bởi các hệ thống máy tính được mô tả ở trên và phương pháp được mô tả trong Fig. 3. Phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách đọc trình tự theo sáng chế và trình tự đối chứng qua việc sử dụng chương trình máy tính và nhận biết sự khác biệt với chương trình máy tính.

Theo các khía cạnh khác, hệ thống dựa trên máy tính sẽ bao gồm bộ nhận biết để nhận biết các đặc điểm trong axit nucleic hoặc polypeptit theo sáng chế. Một “bộ nhận biết” dùng để chỉ một hoặc nhiều chương trình nhận biết các đặc điểm nhất định trong một trình tự axit nucleic. Chẳng hạn, bộ nhận biết có thể chứa chương trình có thể nhận biết một khung đọc mở (open reading frame - ORF) trong trình tự axit nucleic. Fig. 4 là một lưu đồ minh họa một khía cạnh của quá trình xác định 300 để phát hiện sự có mặt của đặc điểm trong trình tự. Quá trình 300 bắt đầu ở trạng thái khởi động 302 và sau đó chuyển đến trạng thái 304 trong đó trình tự thứ nhất cần kiểm tra các đặc điểm được lưu trữ vào một bộ nhớ 115 trong hệ thống máy tính 100. Quá trình 300 sau đó chuyển đến trạng thái 306 trong đó cơ sở dữ liệu các đặc điểm trong trình tự được mở. Cơ sở dữ liệu như vậy sẽ gồm có danh sách các thuộc tính của mỗi đặc điểm cùng với tên của mỗi đặc điểm. Chẳng hạn, tên của một đặc điểm có thể là “Bộ ba mã hóa mở đầu” và thuộc tính sẽ là “ATG”. Một đặc điểm khác có thể có tên “Hộp TAATAA” và thuộc tính của đặc điểm sẽ là “TAATAA”. Ví dụ về cơ sở dữ liệu như vậy được sản xuất bởi công ty di truyền tin học trường đại học Wisconsin. Theo một cách khác, các đặc điểm có thể là các môtip polypeptit cấu trúc như cấu trúc xoắn alpha, gấp nếp beta, hoặc các môtip polypeptit chức năng như các vị trí hoạt động của enzym, cấu trúc vòng xoắn xoay vòng xoắn hoặc các môtip khác đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Khi cơ sở dữ liệu các đặc điểm được mở ra ở trạng thái 306, quá trình 300 sẽ chuyển đến trạng thái 308 trong đó đặc điểm thứ nhất được đọc ra từ cơ sở dữ liệu. Sau đó, một so sánh thuộc tính của đặc điểm thứ nhất với trình tự thứ nhất được thực hiện ở trạng thái 310. Sau đó, quá trình xác định được thực hiện ở trạng thái quyết định 316 để xét xem liệu thuộc tính của đặc điểm có trong trình tự thứ nhất hay không. Nếu

thuộc tính được tìm thấy, thì quá trình 300 sẽ chuyển đến trạng thái 318 trong đó tên của đặc điểm được tìm thấy sẽ được hiển thị cho người sử dụng. Quá trình 300 sau đó chuyển đến trạng thái quyết định 320 trong đó sẽ xác định liệu có còn đặc điểm nào có trong cơ sở dữ liệu hay không. Nếu không có đặc điểm nào tồn tại, thì quá trình 300 sẽ kết thúc ở trạng thái kết thúc 324. Tuy nhiên, nếu còn có các đặc điểm tồn tại trong cơ sở dữ liệu, thì quá trình 300 sẽ đọc đặc điểm trong trình tự tiếp theo ở trạng thái 326 và tiếp tục chuyển lại đến trạng thái 310 trong đó thuộc tính của đặc điểm tiếp theo sẽ được so sánh với trình tự thứ nhất. Nếu thuộc tính của đặc điểm không được tìm thấy trong trình tự thứ nhất ở trạng thái quyết định 316, thì quá trình 300 sẽ chuyển ngay đến trạng thái quyết định 320 để xác định còn có đặc điểm nào có trong cơ sở dữ liệu nữa hay không. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chương trình máy tính có thể xác định được các khung đọc mở (open reading frames - ORF).

Trình tự polypeptit hoặc trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được lưu trữ và điều khiển trong một loạt các chương trình xử lý dữ liệu khác nhau ở nhiều dạng khác nhau. Chẳng hạn, một trình tự có thể được lưu trữ ở dạng văn bản trong chương trình Word, như MicrosoftWORD hoặc WORDPERFECT hoặc ở dạng tệp tin ASCII trong một loạt các chương trình cơ sở dữ liệu quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như DB2, SYBASE, hoặc ORACLE. Ngoài ra, nhiều chương trình máy tính và các cơ sở dữ liệu có thể được sử dụng là thuật toán so sánh trình tự, yếu tố xác định, hoặc các nguồn trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit đối chứng để so sánh với trình tự axit nucleic theo sáng chế. Các chương trình và cơ sở dữ liệu được sử dụng để thực hiện sáng chế gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở: MacPattern (EMBL), DiscoveryBase (Molecular Applications Group), GeneMine (Molecular Applications Group), Look (Molecular Applications Group), MacLook (Molecular Applications Group), BLAST và BLAST2 (NCBI), BLASTN và BLASTX (Altschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403, 1990), FASTA (Pearson và Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), Catalyst (Molecular Simulations Inc.), Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.), Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.), HypoGen (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), Discover (Molecular Simulations Inc.), CHARMM (Molecular Simulations Inc.), Felix

(Molecular Simulations Inc.), DelPhi, (Molecular Simulations Inc.), QuanteMM, (Molecular Simulations Inc.), Homology (Molecular Simulations Inc.), Modeler (Molecular Simulations Inc.), ISIS (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WebLab (Molecular Simulations Inc.), WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), Cơ sở dữ liệu Danh mục Hóa học có sẵn MDL, cơ sở dữ liệu Báo cáo Dữ liệu thuốc MDL, cơ sở dữ liệu Hóa Dược toàn diện, cơ sở dữ liệu chỉ mục thuốc thế giới của Derwent, cơ sở dữ liệu BioByteMasterFile, cơ sở dữ liệu Genbank, và cơ sở dữ liệu Genseqn. Nhiều chương trình và cơ sở dữ liệu khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các môtip có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các chương trình trên bao gồm các trình tự mã hoá khoá kéo loxin, môtip vòng xoắn xoay vòng xoắn, vị trí glycosyl hoá, vị trí ubiquitin hoá, xoắn alpha, và nếp gấp beta, các trình tự tín hiệu mã hoá peptit tín hiệu mà hướng quá trình tiết của các protein được mã hoá, các trình tự có liên quan trong quá trình điều hoà phiên mã như homeobox, trình tự kéo đuôi có tính axit, vị trí hoạt động của enzym, vị trí liên kết cơ chất, và vị trí phân cắt của enzym.

Ức chế quá trình biểu hiện phytaza

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic bổ sung với (chẳng hạn, trình tự đối nghĩa với) trình tự axit nucleic theo sáng chế, gồm có axit nucleic chứa các đoạn đối nghĩa, iARN, ribozym. Trình tự đối nghĩa có khả năng ức chế quá trình vận chuyển, cắt nối intron hoặc phiên mã của các gen mã hoá phytaza. Quá trình ức chế có thể bị tác động bằng cách tác động vào hệ gen ADN hoặc mARN. Quá trình phiên mã hoặc chức năng của axit nucleic bị tác động có thể bị ức chế, chẳng hạn, bằng cách lai và/hoặc phân cắt. Một tập hợp các chất ức chế hữu ích được đề xuất bởi sáng chế gồm có các oligonucleotit có khả năng liên kết với gen hoặc thông tin phytaza, trong trường hợp ngăn ngừa hoặc ức chế quá trình sản xuất hoặc chức năng của enzym phytaza. Mặc dù quá trình liên kết có thể là quá trình lai đặc hiệu trình tự. Một nhóm chất ức chế hữu ích bao gồm các oligonucleotit có thể gây bất hoạt hoặc phân cắt thông tin phytaza. Các oligonucleotit này có thể có hoạt tính enzym có khả năng gây ra quá trình phân cắt, như ribozym. Các oligonucleotit cũng có thể được cải biến về mặt hoá học hoặc liên kết với một enzym

hoặc chế phẩm có khả năng phân cắt axit nucleic bổ sung. Một người có hiểu biết trung bình có thể sàng lọc một tập hợp lớn các oligonucleotit khác nhau như vậy với hoạt tính mong muốn.

Oligonucleotit đối nghĩa

Sáng chế đề xuất các oligonucleotit đối nghĩa bao gồm các cải biến về trình tự phytaza mới theo sáng chế, trong đó các oligonucleotit đối nghĩa này có khả năng liên kết với thông tin phytaza có khả năng ức chế hoạt tính phytaza bằng cách tác động vào mARN. Kỹ thuật thiết kế các oligonucleotit đối nghĩa đã được mô tả trong các tài liệu khoa học và patent, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế các oligonucleotit phytaza này sử dụng các kỹ thuật mới theo sáng chế. Chẳng hạn, phương pháp gene walking/ tạo bản đồ ARN để sàng lọc các oligonucleotit đối nghĩa có hiệu quả đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, đã mô tả một thử nghiệm tạo bản đồ ARN, dựa trên các kỹ thuật phân tử tiêu chuẩn để tạo ra một phương pháp dễ dàng và tin cậy để chọn lọc các trình tự đối nghĩa có khả năng. Tham khảo thêm Smith (2000) *Euro. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

Các axit nucleic có nguồn gốc tự nhiên có thể được sử dụng là oligonucleotit đối nghĩa. Các oligonucleotit đối nghĩa có thể có độ dài bất kỳ; chẳng hạn, theo các khía cạnh khác nhau, các oligonucleotit đối nghĩa có chiều dài từ khoảng 5 đến 100, khoảng từ 10 đến 80, khoảng từ 15 đến 60, từ khoảng 18 đến 40. Chiều dài tối ưu có thể được xác định bằng cách sàng lọc thông thường. Các oligonucleotit đối nghĩa có thể có nồng độ bất kỳ. Nồng độ tối ưu có thể được xác định bằng phương pháp sàng lọc thông thường. Một loạt các phân tử axit nucleotit và dạng tương tự axit nucleic có nguồn gốc tổng hợp đã được biết là có khả năng. Chẳng hạn, peptit axit nucleic (peptide nucleic acid - PNA) có khung không ion, như có thể sử dụng các đơn vị N-(2-aminoethyl) glyxin. Các oligonucleotit đối nghĩa có các liên kết phosphorothioat cũng có thể được sử dụng, như được mô tả trong WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agarwal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Các oligonucleotit đối nghĩa có khung tương đồng với ADN có nguồn gốc tổng hợp được đề xuất theo sáng chế cũng có thể chứa phosphoro-dithioat,

methylphosphonat, phosphoramidat, alkyl phosphotrieste, sulfamat, 3'-thioaxetal, metylen(metylimino), 3'-N-carbamat, và axit nucleic morpholino carbamat, như đã mô tả ở trên.

Các phương pháp kết hợp hoá học có thể được sử dụng để tạo ra một số lượng lớn các oligonucleotit có thể được sàng lọc một cách nhanh chóng để thu được các oligonucleotit đặc hiệu có ái lực liên kết và độ đặc hiệu thích hợp với một đích bất kỳ, như các trình tự phytaza có nghĩa và đối nghĩa theo sáng chế (tham khảo, chẳng hạn, Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

Ribozym ức chế

Sáng chế đề xuất ribozym chứa các cải biến trình tự phytaza mới theo sáng chế, trong đó ribozym theo sáng chế có khả năng liên kết với thông tin phytaza có thể ức chế hoạt tính enzym phytaza bằng cách tác động vào mRNA. Các kỹ thuật thiết kế ribozym và chọn lọc trình tự đối nghĩa đặc hiệu với phytaza để tác động đã được mô tả trong các tài liệu khoa học và patent, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế các ribozym như vậy sử dụng các kỹ thuật mới theo sáng chế. Ribozym hoạt động bằng cách liên kết với một mRNA đích qua phần liên kết với mRNA đích của một ribozym được giữ ở vị trí lân cận với phần có hoạt tính enzym của mRNA phân cắt mRNA đích. Do đó, ribozym sẽ nhận ra và gắn với một mRNA đích bằng liên kết cặp bazơ bổ sung, và khi đã gắn được vào vị trí chính xác, ribozym sẽ hoạt động như enzym để phân cắt và bất hoạt mRNA đích. Việc phân cắt mRNA đích theo cách như vậy sẽ phá huỷ khả năng điều khiển quá trình tổng hợp protein mã hoá của phân tử mRNA nếu quá trình phân cắt xảy ra trong trình tự mã hoá. Sau khi một ribozym đã gắn và phân huỷ mRNA đích, chúng thường tách ra khỏi mRNA đó và do đó có thể gắn và phân cắt các đích mới.

Trong một vài trường hợp, bản chất enzym của ribozym có thể là ưu việt so với các kỹ thuật khác, như kỹ thuật đối nghĩa (khi một phân tử axit nucleic chỉ đơn giản gắn với một đích axit nucleic để chặn quá trình phiên mã, dịch mã hoặc quá trình liên kết với phân tử khác của nó) vì nồng độ hiệu dụng của của ribozym cần thiết để tạo ra một phép điều trị có thể thấp hơn so với nồng độ của oligonucleotit đối nghĩa. Ưu điểm này phản ánh khả năng của ribozym có thể hoạt động như một enzym. Do đó, một phân tử ribozym đơn có thể phân cắt nhiều phân tử mRNA đích. Ngoài ra, một ribozym thường là

một chất ức chế có độ đặc hiệu cao, với độ đặc hiệu ức chế không chỉ phụ thuộc vào cơ chế kết cặp bazơ bổ sung trong quá trình gắn, mà còn phụ thuộc vào cơ chế phân tử này ức chế quá trình biểu hiện của ARN gắn với nó. Nghĩa là, quá trình ức chế gây ra bởi quá trình phân cắt ARN đích và do đó độ đặc hiệu được xác định là tỷ số mức độ phân cắt ARN đích so với mức độ phân cắt ARN không phải là đích. Cơ chế phân cắt này còn phụ thuộc vào các yếu tố ngoài các yếu tố liên quan đến quá trình kết cặp bazơ. Do đó, độ đặc hiệu của quá trình hoạt động của một ribozym có thể là lớn hơn so với độ đặc hiệu của oligonucleotit đối nghĩa liên kết với vị trí ARN tương tự.

Phân tử ARN ribozym có hoạt tính enzym có thể được tạo ra trong môtip “đầu búa”, nhưng cũng có thể được hình thành trong một môtip kẹp tóc, virus gây viêm gan delta, intron nhóm I hoặc ARN giống ARNazaP (liên kết với trình tự ARN dẫn). Ví dụ về các môtip “đầu búa” được mô tả bởi Rossi (1992) trong tài liệu Aids Research and Human Retrovirus 8:183; các môtip kẹp tóc bởi Hampel (1989) Biochemistry 28:4929, và Hampel (1990) Nuc. Acids Res. 18:299; môtip virus gây viêm gan delta bởi Perrotta (1992) Biochemistry 31:16; và môtip ARNazaP bởi Guerrier-Takada (1983) Cell 35:849; và intron nhóm I bởi Cech U.S. Pat. No. 4,987,071. Việc liệt kê các môtip đặc hiệu này không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được rằng một phân tử ARN có hoạt tính enzym theo sáng chế có một vị trí gắn cơ chất đặc hiệu bổ sung với một hoặc nhiều vùng ARN gen đích, và có trình tự nucleotit bên trong hoặc xung quanh vị trí gắn cơ chất tạo ra hoạt tính phân cắt ARN cho phân tử này.

ARN gây nhiễu (ARNi)

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất một phân tử ức chế ARN, được gọi là phân tử “ARNi”, bao gồm trình tự enzym theo sáng chế. Phân tử ARNi chứa phân tử ARN sợi kép (dsARN). Phân tử ARNi, chẳng hạn, siARN và/hoặc miARN, có thể ức chế quá trình biểu hiện của gen enzym phytaza. Theo một khía cạnh, phân tử ARNi, chẳng hạn, siARN và/hoặc miARN, có chiều dài khoảng 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 hoặc nhiều hơn cặp nucleotit.

Khi sáng chế không bị giới hạn bởi một cơ chế hoạt động cụ thể nào, ARNi có thể đi vào tế bào và gây ra quá trình phân huỷ ARN sợi đơn (single-stranded RNA - ssARN)

có trình tự tương đồng hoặc giống, gồm có các mARN nội sinh. Khi một tế bào được phối với một ARN sợi kép (dsARN), mARN từ gen tương đồng được phân huỷ một cách chọn lọc bởi một quá trình được gọi là ARN gây nhiễu (ARNi). Một cơ chế cơ bản khả thi sau ARNi là quá trình phá vỡ ARN sợi kép (double-stranded RNA - dsARN) bổ sung với một trình tự gen đặc hiệu thành các phần nhỏ hơn được gọi là ARN gây nhiễu nhỏ (short interfering RNA - siARN), sẽ gây ra quá trình phân huỷ mARN bổ sung với trình tự của nó. Theo một khía cạnh, ARNi theo sáng chế được sử dụng trong kỹ thuật bất hoạt gen (gene-silencing), tham khảo, chẳng hạn, Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7:1040-1046. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phân huỷ chọn lọc ARN sử dụng các phân tử ARNi, chẳng hạn, siARN và/hoặc miARN. Theo một khía cạnh, ARN ức chế siêu nhỏ (micro-inhibitory RNA - miARN) sẽ ức chế quá trình dịch mã, và siARN sẽ ức chế quá trình phiên mã. Quá trình này có thể thực hiện trong ống nghiệm, ngoài cơ thể hoặc trong cơ thể. Theo một khía cạnh, các phân tử ARNi theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra đột biến gây mất chức năng trong một tế bào, một cơ quan hoặc động vật. Các phương pháp tạo và sử dụng các phân tử ARNi, chẳng hạn, siARN và/hoặc miARN, để phân huỷ chọn lọc ARN đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, US 6,506,559; 6,511,824; 6,515,109; 6,489,127.

Cải biến axit nucleic

Sáng chế đề xuất các phương pháp tạo các biến thể axit nucleic theo sáng chế, chẳng hạn, các nucleotit mã hoá enzym phytaza. Các phương pháp có thể được lặp lại hoặc sử dụng trong các tổ hợp khác nhau để tạo ra enzym phytaza có hoạt tính khác hoặc bị cải biến hoặc độ ổn định khác hoặc bị cải biến so với hoạt tính hoặc độ ổn định của phytaza được mã hoá bởi axit nucleic khuôn. Các phương pháp này cũng có thể được lặp lại hoặc sử dụng trong các tổ hợp khác nhau, chẳng hạn, để tạo ra các đột biến trong gen/tín hiệu biểu hiện, tín hiệu dịch mã hoặc độ ổn định. Theo một khía cạnh khác, thành phần di truyền của một tế bào được cải biến bằng cách, chẳng hạn, cải biến một gen tương đồng ngoài cơ thể, sau đó đưa lại vào trong tế bào.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp để thay đổi các đặc điểm của phytaza theo sáng chế bằng cách gây đột biến và các phương pháp khác, bao gồm gây tiến hoá có định hướng, chẳng hạn, Diversa Corporation's (San Diego, CA) các phương pháp riêng

biệt; chẳng hạn, DirectEvolution; (tham khảo, chẳng hạn, US 5,830,696; Gây đột biến bão hoà tại chỗ trên gen - Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM) (tham khảo, chẳng hạn, US 6,171,820 và US 6,579,258), sự ghép gen thông qua exonucleaza trong gây tiến hoá có định hướng - Exonuclease-Mediated Gene Assembly in Directed Evolution (tham khảo, chẳng hạn, US 6,361,974 và US 6,352,842), chọn lọc kết thúc trong gây tiến hoá có định hướng - End Selection in Directed Evolution (tham khảo, chẳng hạn, US 6,358,709 và US 6,238,884), Recombination-Based Synthesis Shuffling (tham khảo, chẳng hạn, US 5,965,408 và US 6,440,668, và Australian Patent No. AU724521) và Directed Evolution of Thermophilic Enzym (tham khảo, chẳng hạn, US 5,830,696 và US 6,335,179).

Theo một khía cạnh, các đặc điểm của phytaza sẽ được cải biến bằng một quá trình gây tiến hoá có định hướng bao gồm: a) tiến hành gây đột biến một hoặc nhiều khuôn phân tử, chẳng hạn, axit nucleic phytaza theo sáng chế để tạo ra các phân tử mới, và b) chọn lọc trong số các phân tử mới này các phân tử có đặc điểm mong muốn. Hiệu quả của quá trình gây tiến hoá có định hướng phụ thuộc vào việc chọn các khuôn bắt đầu (chẳng hạn, trình tự “gốc” SEQ ID NO:1, hoặc trình tự bất kỳ theo sáng chế), cũng như phụ thuộc vào (các) quá trình gây đột biến được chọn và (các) quy trình sàng lọc được sử dụng. Do đó, sáng chế đề xuất các nguồn phytaza hoạt tính có hoạt tính cao, hiệu quả trong sinh lý, và tiết kiệm, có phytaza mới: a) có hoạt tính siêu việt ở một hoặc nhiều điều kiện ứng dụng cụ thể, như quá trình sản xuất thực phẩm ở nhiệt độ cao, và do đó là hữu ích để tối ưu hoá các ứng dụng cụ thể này; b) là hữu ích như các khuôn để gây tiến hoá có định hướng để tạo ra các phân tử mới được cải thiện hơn nữa; và c) là công cụ hữu ích để nhận biết các phân tử có liên quan bằng các phương pháp trên cơ sở lai.

Axit nucleic theo sáng chế có thể được cải biến bằng các phương pháp bất kỳ. Chẳng hạn, phương pháp ngẫu nhiên, hoặc, không ngẫu nhiên, hoặc phương pháp “gây tiến hoá có định hướng”. Các phương pháp gây đột biến gen ngẫu nhiên đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, US 5,830,696. Chẳng hạn, các tác nhân gây đột biến có thể được sử dụng để gây đột biến ngẫu nhiên gen. Các tác nhân gây đột biến gồm có, chẳng hạn, chiếu xạ bằng ánh sáng tử ngoại hoặc chiếu xạ gamma, hoặc tác nhân gây đột biến hoá học, chẳng hạn, mitomycin, axit nitrous, psoralen được hoạt hoá bằng ánh sáng, độc lập hoặc tổ hợp, để gây ra các phá vỡ ADN có thể sửa chữa

được bằng quá trình tái tổ hợp. Các tác nhân gây đột biến hoá học khác bao gồm, chẳng hạn, natri bisulfit, axit nitrous, hydroxylamin, hydrazin hoặc axit formic. Các tác nhân gây đột biến khác là các chất tương tự với các tiền chất nucleotit, chẳng hạn, nitrosoguanidin, 5-bromouraxil, 2-aminopurin, hoặc acridin. Các chất này có thể được cho vào phản ứng PCR thay cho các tiền chất nucleotit do đó gây đột biến trình tự. Có thể sử dụng các chất thêm vào như proflavin, acriflavin, quinacrin và các chất tương tự.

Có thể sử dụng một kỹ thuật bất kỳ trong sinh học phân tử, chẳng hạn, gây đột biến ngẫu nhiên bằng PCR, tham khảo, chẳng hạn, Rice (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5467-5471; hoặc, gây đột biến catxet nhiều tổ hợp, tham khảo, chẳng hạn, Crameri (1995) *Biotechniques* 18:194-196. Theo một cách khác, axit nucleic, chẳng hạn, gen, có thể được ghép nối sau khi phân cắt một cách ngẫu nhiên, chẳng hạn, US 6,291,242; 6,287,862; 6,287,861; 5,955,358; 5,830,721; 5,824,514; 5,811,238; 5,605,793. Theo các khía cạnh khác, các cải biến, thêm hoặc xóa được đưa vào bằng PCR đọc sửa, gây xáo trộn trong gen, gây đột biến định hướng oligonucleotit, PCR ghép nối, gây đột biến PCR tái tổ hợp trong gen, gây đột biến trong cơ thể, gây đột biến catxet, gây đột biến ngược toàn bộ, gây đột biến hàm mũ toàn bộ, gây đột biến điểm đặc hiệu, ghép nối gen, gây đột biến điểm bão hoà (gene site saturation mutagenesis - GSSM), ghép nối tổng hợp (synthetic ligation reassembly - SLR), tái tổ hợp, tái tổ hợp trình tự ngược, gây đột biến ADN được cải biến bằng phosphothioat, gây đột biến khuôn chứa uraxil, gây đột biến tạo lỗ trống kép, gây đột biến sửa chữa không kết cặp bazơ điểm, gây đột biến dòng tế bào chủ không có cơ chế sửa chữa, gây đột biến bằng hoá học, gây đột biến bằng chiếu xạ, gây đột biến mất trình tự, gây đột biến chọn lọc giới hạn, gây đột biến chọn dòng thuần, tổng hợp gen nhân tạo, gây đột biến toàn bộ, tạo multime axit nucleic khảm, và/hoặc tổ hợp của các phương pháp trên và các phương pháp khác.

Các ấn phẩm sau đề cập đến các phương pháp tái tổ hợp ngược và/hoặc các phương pháp có thể kết hợp với các phương pháp theo sáng chế: Stemmer (1999) "Molecular breeding of virus for targeting and other clinical properties" *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidin kinaza for AZT phosphorylation

using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling," *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptid libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) "Combinatorial multiple catxet gây đột biến creates all the permutations of mutant and wildtype catxets" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; and Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Các phương pháp gây đột biến để tạo tính đa dạng gồm có, chẳng hạn, gây đột biến điểm có định hướng (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; and Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in *Artificial Nucleic & Molecular Biology*

(Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); mutagenesis using uracil containing templates (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; and Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); oligonucleotide-directed mutagenesis (*Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vector: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vector" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; and Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); phosphorothioate-modified DNA mutagenesis (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; and Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); mutagenesis using gapped duplex DNA (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; and Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed

construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999).

Các phương pháp khác được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế gồm có cơ chế sửa chữa kết cặp sai (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" Cell 38:879-887), gây đột biến sử dụng dòng tế bào chủ không có cơ chế sửa chữa (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vector" Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; and Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vector" Methods in Enzymol. 154: 382-403), deletion mutagenesis (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" Nucl. Acids Res. 14: 5115), restriction-selection and restriction-selection and restriction-purification (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423), mutagenesis by total gene synthesis (Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and biểu hiện of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Catxet mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" Gene 34:315-323; and Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), double-strand break repair (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmid of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7177-7181).

Chi tiết thêm về các phương pháp trên có thể tìm thấy trong tài liệu Methods in Enzymology Volume 154, cũng mô tả các chất kiểm soát hữu ích đối với vấn đề sửa lỗi trong các phương pháp gây đột biến khác nhau. Tham khảo thêm US 5,605,793 của Stemmer (Feb. 25, 1997), "Methods for In Vitro Recombination;" US 5,811,238 của Stemmer et al. (Sep. 22, 1998) "Methods for Generating Polynucleotide having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" US 5,830,721 của Stemmer et al. (Nov. 3, 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;"

US 5,834,252 của Stemmer, et al. (Nov. 10, 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction;" US 5,837,458 của Minshull, et al. (Nov. 17, 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 95/22625, Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" WO 96/33207 của Stemmer and Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reactions;" WO 97/20078 của Stemmer và Cramer "Methods for Generating Polynucleotide having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" WO 97/35966 của Minshull và Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 99/41402 của Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vector;" WO 99/41383 của Punnonen et al. "Antigen Library Immunization;" WO 99/41369 của Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering;" WO 99/41368 của Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines;" EP 752008 của Stemmer và Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" EP 0932670 của Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination;" WO 99/23107 của Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling;" WO 99/21979 của Apt et al., "Human Papillomavirus Vector;" WO 98/31837 của del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination;" WO 98/27230 của Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering;" WO 98/27230 của Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection," WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries," WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences," WO 98/42832 by Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequence Using Random or Defined Primers," WO 99/29902 của Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences," WO 98/41653 của Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library," WO 98/41622 của Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling," và WO 98/42727 của Pati và Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination."

Các đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền của Hoa Kỳ sẽ cung cấp thêm chi tiết hoặc các phương pháp khác để cập đến các phương pháp tạo tính đa dạng khác nhau, bao gồm "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" của Patten et al. filed Sep. 28, 1999, (U.S. Ser. No. 09/407,800); "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" của del Cardayre et al., nộp ngày 15/07/1998 (U.S. Ser. No. 09/166,188), và 15/07/1999 (U.S. Ser. No. 09/354,922); "OLIGONUCLOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" của Cramer et al., nộp ngày 28/09/1999 (U.S. Ser. No. 09/408,392), và "OLIGONUCLOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" của Cramer et al., nộp ngày 18/01/2000 (PCT/US00/01203); "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" của Welch et al., nộp ngày 28/09/1999 (U.S. Ser. No. 09/408,393); "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDE & POLYPEPTIDE HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" của Selifonov et al., nộp ngày 18/01/2000, (PCT/US00/01202) và, chẳng hạn "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDE & POLYPEPTIDE HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" của Selifonov et al., nộp ngày 18/07/2000 (U.S. Ser. No. 09/618,579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" của Selifonov và Stemmer, nộp ngày 18/01/2000 (PCT/US00/01138); và "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" của Affholter, nộp ngày 6/09/2000 (U.S. Ser. No. 09/656,549).

Các phương pháp tiến hoá không ngẫu nhiên, hoặc “gây tiến hoá có định hướng”, gồm có, chẳng hạn, gây đột biến bão hoà tại chỗ (GSSM), ghép nối tổng hợp (SLR), hoặc tổ hợp của các phương pháp trên được sử dụng để cải biến axit nucleic theo sáng chế để tạo ra các phytaza có các đặc tính mới hoặc thay đổi (chẳng hạn, hoạt tính ở các điều kiện có tính axit hoặc bazơ cao, nhiệt độ cao hoặc thấp, và các điều kiện tương tự). Polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic được cải biến có thể được sàng lọc đối với hoạt tính trước khi thử nghiệm hoạt tính phytaza hoặc hoạt tính khác. Có thể sử dụng một phương thức hoặc kỹ thuật thử nghiệm bất kỳ, chẳng hạn, sử dụng đường mao dẫn. Tham khảo, chẳng hạn, US 6,361,974; US 6,280,926; US 5,939,250.

Gây đột biến bão hoà, hoặc GSSM

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp để tạo enzyme sử dụng kỹ thuật gây đột biến bão hoà tại chỗ, hoặc, GSSM, như được mô tả ở đây, và cũng như trong US 6,171,820 và US 6,579,258.

Theo một khía cạnh, các trình tự mỗi bộ ba mã hóa chứa một trình tự thoái hoá N,N,G/T được sử dụng để đưa các đột biến điểm vào một polynucleotit, chẳng hạn, enzyme phytaza hoặc kháng thể theo sáng chế, cũng như để tạo ra một tập hợp các polypeptit cùng họ trong đó một khoảng đầy đủ các đột biến thay thế một axit amin có ở từng vị trí axit amin, chẳng hạn, một gốc axit amin trong vị trí hoạt động của enzyme hoặc vị trí liên kết với phối tử cần cải biến. Các oligonucleotit có thể bao gồm một trình tự tương đồng thứ nhất có liên kết, một trình tự thoái hoá N,N,G/T, và tùy ý, một trình tự tương đồng thứ hai. Sản phẩm dịch mã theo hướng xuôi dòng được tạo ra từ việc sử dụng các oligonucleotit này gồm có tất cả các thay đổi về trình tự axit amin có thể có tại mỗi vị trí axit amin dọc theo polypeptit, vì sự thoái hoá của trình tự N,N,G/T bao gồm các bộ ba mã hóa cho tất cả 20 axit amin. Theo một khía cạnh, một oligonucleotit thoái hoá như vậy (bao gồm, chẳng hạn, một catxet thoái hoá N,N,G/T) được sử dụng để tiến hành tất cả các loại đột biến thay thế từng bộ ba mã hóa gốc trong trình tự polynucleotit khuôn ban đầu. Theo một khía cạnh khác, ít nhất hai catxet thoái hoá được sử dụng – trong cùng một oligonucleotit hoặc không, để tiến hành tất cả các loại đột biến thay thế ít nhất hai bộ ba mã hóa trong trình tự polynucleotit khuôn ban đầu. Chẳng hạn, nhiều hơn một trình tự N,N,G/T có thể có trong một oligonucleotit để đưa các đột biến axit amin tại nhiều hơn một vị trí. Phần lớn các trình tự N,N,G/T có thể liên kết nhau một cách trực tiếp, hoặc được tách nhau bởi một hoặc nhiều (các) trình tự nucleotit bổ trợ. Theo một khía cạnh khác, các oligonucleotit hữu ích để đưa các đột biến thêm đoạn và mất đoạn có thể được sử dụng độc lập hoặc tổ hợp với các bộ ba mã hóa chứa trình tự N,N,G/T, để đưa vào một tổ hợp hoặc hoán vị bất kỳ của các đột biến thêm, mất và/hoặc thay thế axit amin.

Theo một khía cạnh, việc gây đột biến đồng thời hai hoặc nhiều hơn hai vị trí axit amin kề nhau được thực hiện bằng cách sử dụng một oligonucleotit chứa các trình tự bộ ba N,N,G/T liên nhau, nghĩa là một trình tự (N,N,G/T)_n thoái hoá. Theo một khía cạnh

khác, catxet thoái hoá có độ thoái hoá thấp hơn so với trình tự N,N,G/T được sử dụng. Chẳng hạn, trong một số trường hợp có thể sử dụng (chẳng hạn trong một oligonucleotit) một trình tự ba thoái hoá chỉ chứa một N, trong đó N có thể ở vị trí thứ nhất, thứ hai hoặc thứ 3 của bộ 3. Các bazơ khác bất kỳ là tổ hợp hoặc hoán vị của các bazơ có thể được sử dụng trong hai vị trí còn lại của trình tự bộ ba. Theo một cách khác, trong một số trường hợp có thể sử dụng (chẳng hạn ở dạng một oligo) một trình tự bộ ba N,N,N thoái hoá.

Theo một khía cạnh, việc sử dụng các trình tự bộ ba thoái hoá (chẳng hạn, các bộ ba N,N,G/T) sẽ cho phép tạo ra một cách có hệ thống và dễ dàng toàn bộ các axit amin tự nhiên có thể có (tổng số là 20 axit amin) vào từng vị trí axit amin trong một polypeptit (theo các khía cạnh khác, các phương pháp này cũng bao gồm việc tạo ra ít hơn các đột biến thay thế có thể có/một gốc axit amin, hoặc bộ ba mã hóa, vị trí). Chẳng hạn, đối với một polypeptit 100 axit amin, có thể tạo ra 2000 kiểu khác nhau (nghĩa là 20 axit amin có thể có/một vị trí X 100 vị trí axit amin). Qua việc sử dụng một oligonucleotit hoặc một nhóm các oligonucleotit chứa trình tự bộ ba N,N,G/T thoái hoá, 32 trình tự riêng lẻ có thể mã hoá tất cả 20 axit amin tự nhiên có thể có. Do đó, trong một mạch phản ứng trong đó một trình tự polynucleotit gốc được tiến hành gây đột biến bão hoà bằng cách sử dụng ít nhất một oligonucleotit như vậy, sẽ có 32 polynucleotit khác nhau được tạo ra mã hoá 20 polypeptit khác nhau. Ngược lại, việc sử dụng một oligonucleotit không thoái hoá trong quá trình gây đột biến tại chỗ có định hướng chỉ tạo ra một sản phẩm polypeptit/lần phản ứng. Các oligonucleotit không thoái hoá có thể tuỳ ý được sử dụng kết hợp với các trình tự mồi thoái hoá đã được đề cập; chẳng hạn, các oligonucleotit không thoái hoá có thể được sử dụng để tạo ra các đột biến điểm đặc hiệu trong polynucleotit đang hoạt động. Điều này sẽ tạo ra một phương pháp gây đột biến điểm bất hoạt đặc hiệu, các đột biến điểm sẽ dẫn đến các thay đổi về axit amin tương ứng, và các đột biến điểm gây ra sự hình thành các bộ ba mã hóa kết thúc và quá trình biểu hiện tương ứng của các đoạn polypeptit.

Theo một khía cạnh, mỗi phản ứng gây đột biến chứa polynucleotit mã hoá ít nhất 20 phân tử polypeptit thế hệ sau (chẳng hạn, enzym phytaza) sao cho tất cả 20 axit amin tự nhiên được thể hiện tại một vị trí axit amin đặc hiệu tương ứng với vị trí bộ ba mã hóa được gây đột biến trong trình tự gốc (các khía cạnh khác sử dụng ít hơn 20 tổ hợp

tự nhiên). Các polypeptit sản phẩm thoái hoá gấp 32 lần từ mỗi phản ứng gây đột biến bão hoà có thể được tiến hành khuếch đại nhân dòng (chẳng hạn được tách dòng vào một tế bào chủ thích hợp, chẳng hạn, tế bào *E. coli*, sử dụng, chẳng hạn, một vector biểu hiện) và tiến hành sàng lọc biểu hiện. Khi một polypeptit sản phẩm riêng rẽ được xác định bằng quá trình sàng lọc để biểu hiện một thay đổi về đặc tính có lợi (khi được so sánh với polypeptit gốc, như hoạt tính thủy phân glucan được gia tăng ở điều kiện có tính axit hoặc kiềm), nó có thể được đọc trình tự để xác định các thay thế axit amin có lợi tương ứng trong đó.

Theo một khía cạnh, trong quá trình gây đột biến từng vị trí axit amin trong trình tự polypeptit gốc sử dụng gây đột biến bão hoà được đề cập ở đây, các thay đổi axit amin có lợi có thể được xác định ở nhiều hơn một vị trí axit amin. Một hoặc nhiều các phân tử sản phẩm mới có thể được tạo ra chứa tổ hợp của tất cả hoặc một phần các thay thế axit amin có lợi này. Chẳng hạn, nếu 2 thay đổi axit amin đặc hiệu có lợi trong mỗi 3 vị trí axit amin trong một polypeptit, các hoán vị bao gồm 3 khả năng tại mỗi vị trí (không thay đổi so với axit amin gốc, và mỗi cặp thay đổi có lợi) và 3 vị trí. Do đó, sẽ có $3 \times 3 \times 3$ hoặc 27 tổng khả năng, gồm có 7 khả năng đã được khảo sát trước đó - 6 đột biến điểm đơn (nghĩa là 2 khả năng tại mỗi vị trí trong ba vị trí) và không có thay đổi nào tại một vị trí bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác nữa, gây đột biến bão hoà tại chỗ có thể được sử dụng cùng với các quá trình gây đột biến như xáo trộn, khảm, tái tổ hợp và các quá trình gây đột biến khác, cùng với sàng lọc. Sáng chế đề xuất việc sử dụng (các) quá trình gây đột biến bất kỳ, gồm có gây đột biến bão hoà, theo kiểu lặp. Ví dụ, việc sử dụng lặp (các) quá trình gây đột biến bất kỳ sẽ được kết hợp với sàng lọc.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các đoạn mồi bộ ba mã hóa riêng biệt (chứa trình tự N,N,N thoái hoá) để đưa các đột biến điểm vào một polynucleotit, để tạo ra một nhóm các polypeptit sản phẩm trong đó một tập hợp các thay thế một axit amin được thể hiện tại từng vị trí axit amin (gây đột biến bão hoà tại chỗ (GSSM)). Các oligo được sử dụng được sắp xếp liền nhau trong trình tự tương đồng thứ nhất, một trình tự N,N,N thoái hoá và theo một khía cạnh nhưng không cần thiết một trình tự tương đồng thứ hai. Các sản phẩm dịch mã xuôi dòng được tạo ra khi sử dụng các oligo này bao gồm tất cả

các thay đổi axit amin có thể có tại mỗi vị trí axit amin dọc theo polypeptit, vị mức độ thoái hoá của trình tự N,N,N bao gồm các bộ ba mã hóa cho tất cả 20 axit amin.

Theo một khía cạnh, một oligo thoái hoá như vậy (chứa một catxet N,N,N thoái hoá) được sử dụng để cải biến từng bộ ba mã hóa gốc trong một khuôn polynucleotit gốc để tạo ra tất cả các đột biến thay thế bộ ba mã hóa. Theo một khía cạnh khác, ít nhất hai catxet N,N,N thoái hoá được sử dụng – hoặc ở trong cùng một oligo hoặc không, để gây đột biến thay thế bộ ba mã hóa ít nhất hai bộ ba mã hóa trong phân tử polynucleotit gốc. Do đó, nhiều hơn một trình tự N,N,N có thể có trong một oligo để đưa các đột biến axit amin vào nhiều hơn một vị trí. Phần lớn các trình tự N,N,G/T có thể liên kế nhau một cách trực tiếp, hoặc được tách nhau bởi một hoặc nhiều (các) trình tự nucleotit bổ trợ. Theo một khía cạnh khác, các oligonucleotit hữu ích để đưa các đột biến thêm đoạn và mất đoạn có thể được sử dụng độc lập hoặc tổ hợp với các bộ ba mã hóa chứa trình tự N,N,N, để đưa vào một tổ hợp hoặc hoán vị bất kỳ của các đột biến thêm, mất và/hoặc thay thế axit amin.

Trong quá trình thực nghiệm cụ thể, có thể gây đột biến đồng thời hai hoặc nhiều hơn các vị trí axit amin liên kế sử dụng một oligo chứa các trình tự bộ ba N,N,N liên nhau, nghĩa là trình tự $(N,N,N)_n$ thoái hoá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng catxet thoái hoá có mức độ thoái hoá thấp hơn so với trình tự N,N,N. Chẳng hạn, trong một số trường hợp có thể mong muốn là sử dụng (chẳng hạn oligo) trình tự bộ ba thoái hoá chỉ chứa một N, trong đó N có thể ở vị trí thứ nhất, thứ hai hoặc thứ 3 của bộ ba. Các bazơ khác bất kỳ là tổ hợp hoặc hoán vị của các bazơ có thể được sử dụng trong hai vị trí còn lại của trình tự bộ ba. Theo một cách khác, trong một số trường hợp có thể sử dụng (chẳng hạn ở dạng một oligo) trình tự bộ ba N,N,N, N,N,G/T, hoặc N,N, G/C thoái hoá.

Tuy nhiên, cần hiểu rằng việc sử dụng trình tự bộ ba thoái hoá (như N,N,G/T hoặc một trình tự bộ ba N,N, G/C) như được đề cập trong sáng chế là ưu việt vì một số lý do. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra một cách có hệ thống và dễ dàng toàn bộ các axit amin tự nhiên có thể có (tổng số là 20 axit amin) vào từng vị trí axit amin trong một polypeptit. Do đó, đối với một polypeptit 100 axit amin, sáng chế đề xuất cách để tạo ra một cách có hệ thống và tương đối dễ dàng 2000 kiểu khác nhau

(nghĩa là 20 axit amin có thể có/một vị trí X 100 vị trí axit amin). Có thể thấy rằng, sáng chế đề xuất, qua việc sử dụng một oligonucleotit hoặc một nhóm các oligonucleotit chứa trình tự bộ ba N,N,G/T thoái hoá, 32 trình tự riêng lẻ có thể mã hoá tất cả 20 axit amin tự nhiên có thể có. Do đó, trong một mạch phản ứng trong đó một trình tự polynucleotit gốc được tiến hành gây đột biến bão hoà bằng cách sử dụng ít nhất một oligonucleotit như vậy, sẽ có 32 polynucleotit khác nhau được tạo ra mã hoá 20 polypeptit khác nhau. Ngược lại, việc sử dụng một oligonucleotit không thoái hoá trong quá trình gây đột biến điểm có định hướng chỉ tạo ra một sản phẩm polypeptit/lần phản ứng.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các oligonucleotit không thoái hoá, có thể tuỳ ý được sử dụng kết hợp với các trình tự môi thoái hoá đã được đề cập. Có thể thấy rằng, trong một vài trường hợp, sẽ là thuận lợi khi sử dụng các oligonucleotit không thoái hoá để tạo ra các đột biến điểm đặc hiệu trong polynucleotit đang hoạt động. Điều này sẽ tạo ra một phương pháp gây đột biến điểm bất hoạt đặc hiệu, các đột biến điểm sẽ dẫn đến các thay đổi về axit amin tương ứng, và các đột biến điểm gây ra sự hình thành các bộ ba mã hóa kết thúc và quá trình biểu hiện tương ứng của các đoạn polypeptit.

Do đó, theo một khía cạnh, mỗi phản ứng gây đột biến chứa polynucleotit mã hoá ít nhất 20 phân tử polypeptit thế hệ sau (chẳng hạn, enzym phytaza) sao cho tất cả 20 axit amin tự nhiên được thể hiện tại một vị trí axit amin đặc hiệu tương ứng với vị trí bộ ba mã hóa được gây đột biến trong trình tự gốc (các khía cạnh khác sử dụng ít hơn 20 tổ hợp tự nhiên). Các polypeptit sản phẩm thoái hoá gấp 32 lần từ mỗi phản ứng gây đột biến bão hoà có thể được tiến hành khuếch đại nhân dòng (chẳng hạn được tách dòng vào một tế bào chủ thích hợp, chẳng hạn, tế bào *E. coli*, sử dụng, chẳng hạn, một vector biểu hiện) và tiến hành sàng lọc biểu hiện. Khi polypeptit sản phẩm riêng rẽ được xác định bằng quá trình sàng lọc để biểu hiện một thay đổi về đặc tính có lợi (khi được so sánh với polypeptit gốc), nó có thể được đọc trình tự để xác định các thay thế axit amin có lợi tương ứng trong đó.

Có thể thấy rằng, trong quá trình gây đột biến từng vị trí axit amin trong trình tự polypeptit gốc sử dụng gây đột biến bão hoà được đề cập ở đây, các thay đổi axit amin có lợi có thể được xác định ở nhiều hơn một vị trí axit amin. Một hoặc nhiều các phân tử sản phẩm mới có thể được tạo ra chứa tổ hợp của tất cả hoặc một phần các thay thế

axit amin có lợi này. Chẳng hạn, nếu 2 thay đổi axit amin đặc hiệu có lợi trong mỗi 3 vị trí axit amin trong một polypeptit, các hoán vị bao gồm 3 khả năng tại mỗi vị trí (không thay đổi so với axit amin gốc, và mỗi cặp thay đổi có lợi) và 3 vị trí. Do đó, sẽ có $3 \times 3 \times 3$ hoặc 27 tổng khả năng, gồm có 7 khả năng đã được khảo sát trước đó - 6 đột biến điểm đơn (nghĩa là 2 khả năng tại mỗi vị trí trong ba vị trí) và không có thay đổi nào tại một vị trí bất kỳ.

Do đó, trong một ví dụ không hạn chế, sáng chế đề xuất việc sử dụng quá trình gây đột biến bảo hoà kết hợp với các quá trình gây đột biến khác, như quá trình trong đó hai hoặc nhiều hơn hai polynucleotit có liên quan được đưa vào một tế bào chủ thích hợp sao cho một polynucleotit lai được tạo ra bằng cách tái tổ hợp và tái sắp xếp loại bỏ.

Ngoài việc gây đột biến dọc theo toàn bộ trình tự của một gen, sáng chế còn đề xuất rằng có thể sử dụng quá trình gây đột biến để thay thế các bazơ trong trình tự polynucleotit, trong đó số lượng bazơ cần gây đột biến, theo một khía cạnh là một số nguyên từ 15 đến 100000. Do đó, thay vì gây đột biến từng vị trí dọc theo phân tử, có thể tiến hành gây đột biến từng bazơ hoặc một số bazơ rời rạc (theo một khía cạnh một tập con từ 15 đến 100.000). Theo một khía cạnh, một nucleotit riêng rẽ sẽ được sử dụng để gây đột biến từng vị trí hoặc một số vị trí dọc theo trình tự polynucleotit. Một nhóm gồm có 3 vị trí cần gây đột biến có thể là một bộ ba mã hóa. Các đột biến có thể được đưa vào bằng cách sử dụng một đoạn môi gây đột biến, chứa một catxet khác loại, còn được gọi là catxet gây đột biến. Các catxet thử nghiệm có thể có từ 1 đến 500 bazơ. Mỗi vị trí nucleotit trong một catxet khác loại như vậy có thể là N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, hoặc E, trong đó E là một bazơ bất kỳ không phải là A, C, G, hoặc T (E có thể được gọi là oligo thiết kế).

Theo nghĩa thông thường, đột biến bảo hoà là gây đột biến một một tập hợp đầu đủ các catxet gây đột biến (trong đó mỗi catxet, theo một khía cạnh có chiều dài khoảng từ 1 đến 500 bazơ) trong một trình tự polynucleotit xác định cần gây đột biến (trong đó trình tự cần gây đột biến, theo một khía cạnh, có chiều dài từ khoảng 15 đến 100.000 bazơ). Do đó, một nhóm các đột biến (thay đổi từ 1 đến 100 đột biến) sẽ được đưa vào mỗi catxet cần gây đột biến. Một nhóm các đột biến cần được đưa vào trong một catxet có thể là khác nhau hoặc tương tự so với nhóm các đột biến thứ hai cần đưa vào catxet

thứ hai trong quá trình tiến hành một vòng gây đột biến bão hoà. Việc phân nhóm như vật đã được minh hoạ bằng các đột biến mất đoạn, thêm đoạn, phân nhóm các bộ ba mã hóa và phân nhóm các catxet nucleotit cụ thể.

Các trình tự được xác định là cần gây đột biến gồm có một gen toàn vẹn, chu trình, cADN, khung đọc mở toàn vẹn (ORF) và trình tự khởi đầu toàn vẹn, yếu tố tăng cường biểu hiện, tác nhân chất ức chế/chuyển hoạt hoá, điểm khởi đầu phiên mã, intron, gen điều khiển, hoặc một nhóm polynucleotit chức năng. Thông thường, một “trình tự được xác định” có thể là một polynucleotit bất kỳ có chiều dài 15 bazơ và các trình tự polynucleotit có chiều dài từ 15 đến 15.000 bazơ (sáng chế đề cập đến các trình tự có chiều dài trong khoảng này). Sự cân nhắc trong việc chọn các nhóm bộ ba mã hóa bao gồm các loại axit amin được mã hoá bởi các catxet gây đột biến thoái hoá.

Theo một phương án thử nghiệm, một nhóm các đột biến có thể được vào một catxet gây đột biến, sáng chế còn đề xuất các đột biến thay thế bộ ba mã hóa thoái hoá (bằng cách sử dụng các oligo thoái hoá) mã hoá 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 và 20 axit amin tại mỗi vị trí và một thư viện các polypeptit được mã hoá.

Phản ứng ghép nối tổng hợp (Synthetic Ligation Reassembly - SLR)

Sáng chế đề xuất một hệ cải biến gen không ngẫu nhiên được gọi là “phản ứng ghép nối tổng hợp”, hoặc chỉ đơn giản là “SLR”, một quá trình “gây tiến hoá có định hướng”, để tạo polypeptit, chẳng hạn, enzym phytaza hoặc kháng thể theo sáng chế, có hoạt tính mới hoặc được thay đổi. SLR là một phương pháp nối các đoạn oligonucleotit với nhau một cách không ngẫu nhiên. Phương pháp này khác với phương pháp ghép oligonucleotit ngẫu nhiên ở chỗ axit nucleic tạo thành các khối không được trộn lẫn với nhau, ghép nối hoặc khảm một cách ngẫu nhiên, thay vào đó được ghép với nhau một cách không ngẫu nhiên. Tham khảo, chẳng hạn, US 6,773,900; US 6,740,506; US 6,713,282; US 6,635,449; US 6,605,449; US 6,537,776.

Theo một khía cạnh, SLR bao gồm các bước sau: (a) tạo ra polynucleotit khuôn, trong đó polynucleotit khuôn chứa trình tự mã hoá một tương đồng; (b) tạo ra một số các polynucleotit tạo khối, trong đó polynucleotit tạo khối được thiết kế để ghép bất chéo với polynucleotit khuôn tại một trình tự đã được xác định trước, và polynucleotit

tạo khối chứa trình tự là một thể đột biến của gen tương đồng và một trình tự tương đồng với polynucleotit khuôn ở vị trí bên của trình tự đột biến; (c) tổ hợp polynucleotit tạo khối với polynucleotit khuôn sao cho polynucleotit tạo khối sẽ ghép bắt chéo với polynucleotit khuôn để tạo ra polynucleotit chứa các biến thể về trình tự của gen tương đồng.

SLR không phụ thuộc vào sự có mặt của độ tương đồng cao giữa các polynucleotit cần được sắp xếp lại. Do đó, phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra một cách không ngẫu nhiên các thư viện (hoặc các tập hợp) các phân tử chứa trên 10^{100} các thể khả khác nhau. SLR có thể được sử dụng để tạo ra các thư viện chứa trên 10^{1000} các thể khả khác nhau. Do đó, sáng chế đề cập đến các phương pháp không ngẫu nhiên để tạo ra một tập hợp các phân tử axit nucleic khả cắt toàn bộ trật tự ghép nối được chọn trong quá trình thiết kế. Phương pháp này bao gồm các bước tạo ra một số các axit nucleic tạo khối đặc hiệu trong quá trình thiết kế có các đầu có thể nối được với nhau tương hợp qua lại có thể dùng được, và ghép nối các axit nucleic tạo khối này, sao cho đạt được trật tự ghép nối toàn phần như thiết kế.

Các đầu có thể ghép với nhau tương hợp qua lại của các axit nucleic tạo khối cần được ghép nối được coi là “có thể dùng được” đối với loại ghép nối có trật tự nếu chúng cho phép các phân tử tạo khối ghép cặp với nhau theo một trật tự đã được xác định trước. Do đó, trật tự ghép nối toàn phần trong đó axit nucleic tạo khối có thể được ghép đôi với nhau được đặc trưng bởi việc thiết kế các đầu có thể nối với nhau được. Nếu nhiều hơn một bước ghép nối được sử dụng, thì trật tự ghép nối toàn phần trong đó axit nucleic tạo khối có thể được ghép cặp với nhau cũng được đặc trưng bởi trật tự nối tiếp của (các) bước ghép nối. Theo một khía cạnh, các mảnh tạo khối được nối với nhau được xử lý bằng một enzym, như ligaza (chẳng hạn T4 ADN ligaza), để tạo được liên kết đồng hoá trị giữa các mảnh tạo khối. Theo một khía cạnh, một phương pháp không ngẫu nhiên được gọi là ghép nối tổng hợp (SLR), phương pháp đó có liên quan đến phương pháp sắp xếp ngẫu nhiên, trừ việc axit nucleic tạo khối không được sắp xếp lại hoặc ghép nối hoặc khả ngẫu nhiên, thay vào đó được ghép nối một cách không ngẫu nhiên có thể được sử dụng để tạo ra các thể đột biến.

Phương pháp SLR không phụ thuộc vào sự có mặt của độ tương đồng cao giữa các polynucleotit cần được sắp xếp lại. Sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra một cách không ngẫu nhiên các thư viện (hoặc các tập hợp) các phân tử chứa trên 10^{100} các thể khả khác nhau. Có thể thấy rằng, SLR có thể được sử dụng để tạo ra các thư viện chứa trên 10^{1000} các thể khả khác nhau..

Do đó, trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phương pháp không ngẫu nhiên để tạo ra một tập hợp các phân tử axit nucleic khả cắt toàn bộ trật tự ghép nối được chọn trong quá trình thiết kế, phương pháp này bao gồm các bước tạo ra một số các axit nucleic tạo khối đặc hiệu trong quá trình thiết kế có các đầu có thể nối được với nhau tương hợp qua lại có thể sửa chữa được, và ghép nối các axit nucleic tạo khối này, sao cho đạt được trật tự ghép nối toàn phần như thiết kế.

Các đầu có thể ghép với nhau tương hợp qua lại của các axit nucleic tạo khối cần được ghép nối được coi là “có thể dùng được” đối với loại ghép nối có trật tự nếu chúng cho phép các phân tử tạo khối ghép cặp với nhau theo một trật tự đã được xác định trước. Do đó, trật tự ghép nối toàn phần trong đó axit nucleic tạo khối có thể được ghép đôi với nhau được đặc trưng bởi việc thiết kế các đầu có thể nối với nhau được, nếu nhiều hơn một bước ghép nối được sử dụng, thì trật tự ghép nối toàn phần trong đó axit nucleic tạo khối có thể được ghép cặp với nhau cũng được đặc trưng bởi trật tự nối tiếp của (các) bước ghép nối. Theo một khía cạnh của sáng chế, các mảnh tạo khối được nối với nhau được xử lý bằng một enzym, như ligaza (chẳng hạn T4 ADN ligaza), để tạo được liên kết đồng hoá trị giữa các mảnh tạo khối.

Theo một khía cạnh khác, việc thiết kế axit nucleic tạo khối đạt được trong quá trình phân tích trình tự của một tập hợp các axit nucleic khuôn gốc là cơ sở để tạo ra một tập hợp gốc các phân tử axit nucleic khả. Các axit nucleic khuôn gốc này do đó sẽ được sử dụng là nguồn thông tin trình tự trợ giúp trong quá trình thiết kế axit nucleic tạo khối cần gây đột biến, nghĩa là được khả hoặc sắp xếp lại.

Theo một phương án thử nghiệm, sáng chế đề xuất phương pháp khả một họ các gen liên quan và và họ các sản phẩm được mã hoá liên quan. Theo một phương án cụ thể, các sản phẩm được mã hoá là enzym. Enzym và polypeptit để sử dụng theo sáng chế có thể được gây đột biến bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự của phần lớn các axit nucleic khuôn gốc được xếp thẳng để chọn một hoặc nhiều điểm ranh giới, các điểm ranh giới này có thể được sắp xếp ở một vùng tương đồng. Các điểm ranh giới có thể được sử dụng để mô tả các ranh giới giữa các axit nucleic tạo khối được tạo ra. Do đó, các điểm ranh giới được xác định và chọn lọc trong các phân tử gốc sẽ được sử dụng như các điểm khả năng tiềm năng trong quá trình ghép nối các phân tử sản phẩm.

Thường một điểm ranh giới có thể sửa chữa được là một vùng tương đồng (chứa ít nhất một bazơ nucleotit tương đồng) chung bởi ít nhất hai phân tử khuôn, điểm ranh giới có thể là một vùng tương đồng chung bởi ít nhất một nửa số phân tử khuôn, ít nhất $\frac{2}{3}$ số phân tử khuôn, ít nhất $\frac{3}{4}$ số phân tử khuôn, hoặc hầu hết các phân tử khuôn. Theo một khía cạnh, một điểm ranh giới có thể dùng được là một vùng tương đồng chung cho tất cả các phân tử khuôn.

Theo một khía cạnh, quá trình ghép nối được thực hiện một cách triệt để để tạo ra một thư viện toàn diện. Theo cách diễn đạt khác, tất cả các tổ hợp có trật tự có thể có của các axit nucleic tạo khối có mặt trong tập hợp các phân tử axit nucleic khả năng. Đồng thời, trật tự ghép nối (nghĩa là trật tự ghép nối của từng phân tử tạo khối theo chiều trình tự từ 5' đến 3' của mỗi axit nucleic khả năng) trong từng tổ hợp tuân theo quá trình thiết kế (hoặc không ngẫu nhiên). Vì bản chất không ngẫu nhiên của phương pháp này, xác suất của các sản phẩm phụ không mong muốn sẽ được giảm đi một cách đáng kể.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp này đề xuất rằng, quá trình ghép nối được thực hiện một cách có hệ thống, chẳng hạn để tạo ra một thư viện có hệ thống được chia thành nhiều ngăn, với các ngăn có thể được sàng lọc một cách có hệ thống, chẳng hạn, từng ngăn một. Nói cách khác, sáng chế đề xuất rằng, qua việc sử dụng chọn lọc và đúng đắn các axit nucleic tạo khối tạo khối, cùng với việc sử dụng chọn lọc và đúng đắn các phản ứng ghép nối theo thứ tự, có thể đạt được thiết kế thử nghiệm trong đó các tập hợp các sản phẩm đặc hiệu được tạo ra trong mỗi lần phản ứng. Điều này sẽ cho phép thực hiện các quá trình sàng lọc và khảo sát một cách có hệ thống. Do đó, phương pháp này sẽ cho phép khảo sát một cách có hệ thống một số lượng lớn các phân tử sản phẩm trong các tập hợp nhỏ hơn.

Vì khả năng thực hiện quá trình khảm của phương pháp này theo cách linh hoạt cao vẫn chưa toàn diện và có hệ thống, đặc biệt khi độ tương đồng giữa các phân tử gốc là thấp, do đó sáng chế đề xuất việc tạo ra một thư viện (hoặc tập hợp) gồm một số lượng lớn các phân tử gốc. Vì bản chất không ngẫu nhiên của quá trình ghép nối, các phân tử gốc được tạo ra có thể chứa một thực viện các axit nucleic được khảm có trật tự ghép nối toàn phần được chọn theo thiết kế. Theo một khía cạnh cụ thể, một thư viện được tạo ra như vậy có thể chứa từ hơn 10^3 đến hơn 10^{1000} các phân tử được tạo ra từ phân tử gốc khác nhau.

Theo một khía cạnh, một tập hợp các phân tử axit nucleic khảm, được sản xuất như được mô tả được tạo bởi một polynucleotit mã hoá polypeptit. Theo một khía cạnh, polynucleotit này là một gen, có thể là một gen nhân tạo. Theo khía cạnh khác, polynucleotit này là một gen trong con đường chuyển hoá, có thể là một gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo. Sáng chế đề xuất một hoặc nhiều gen nhân tạo được tạo ra bởi sáng chế có thể kết hợp được với một gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo, như gen điều khiển con đường chuyển hoá ở sinh vật nhân thực (gồm cả thực vật).

Theo một phương án khác, bản chất tổng hợp của bước trong đó các mảnh tạo khối được tạo ra sẽ cho phép việc thiết kế và đưa vào các nucleotit (chẳng hạn, một hoặc nhiều nucleotit, có thể là, chẳng hạn, các bộ ba mã hóa hoặc intron hoặc các trình tự điều hoà) có thể sau đó tùy ý được loại bỏ trong quá trình trong ống nghiệm (chẳng hạn, bằng cách gây đột biến) hoặc trong một quá trình trong cơ thể (chẳng hạn, bằng cách sử dụng khả năng cắt nối gen của tế bào chủ). Cần hiểu rằng trong nhiều trường hợp việc đưa vào các nucleotit này cũng có thể là cần thiết vì nhiều lý do khác ngoài lợi ích của việc tạo ra các điểm ranh giới có khả năng sửa chữa.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất rằng một axit nucleic tạo khối có thể được sử dụng để đưa vào một intron. Do đó, sáng chế đề xuất các intron chức năng có thể được đưa vào một gen nhân tạo theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất rằng các intron chức năng có thể được đưa vào một gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo theo sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất việc tạo ra một polynucleotit khảm là một gen nhân tạo chứa một (hoặc nhiều) (các) intron được đưa vào một cách nhân tạo.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất việc tạo ra một polynucleotit khảm là một gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo chứa một (hoặc nhiều) intron được đưa vào một cách nhân tạo. Theo một khía cạnh, (các) intron được đưa vào một cách nhân tạo hoạt động trong một hoặc nhiều tế bào chủ để tách intron gần như giống như cơ chế của các intron hình thành tự nhiên thực hiện chức năng trong quá trình tách intron của gen. Sáng chế đề xuất một quá trình sản xuất polynucleotit chứa intron nhân tạo để đưa vào tế bào chủ để thực hiện tái tổ hợp và/hoặc tách intron.

Một gen nhân tạo được sản xuất theo sáng chế cũng có thể đóng vai trò là cơ chất trong quá trình tái tổ hợp với axit nucleic khác. Tương tự, gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo được sản xuất theo sáng chế cũng có thể đóng vai trò là cơ chất để tái tổ hợp với một axit nucleic khác. Theo một khía cạnh, quá trình tái tổ hợp được trợ giúp bởi, hoặc xảy ra tại, các vùng tương đồng giữa các gen chứa intron nhân tạo và một axit nucleic đóng vai trò là đối tác tái tổ hợp. Theo một khía cạnh, đối tác tái tổ hợp cũng có thể là một axit nucleic được tạo ra theo sáng chế, bao gồm gen nhân tạo hoặc gen trong con đường chuyển hoá nhân tạo. Quá trình tái tổ hợp có thể được tạo điều kiện bởi hoặc xảy ra tại các vùng tương đồng tồn tại tại một (hoặc nhiều) (các) intron được đưa vào một cách nhân tạo trong gen nhân tạo.

Phương pháp ghép nối tổng hợp theo sáng chế sẽ sử dụng một số các axit nucleic tạo khối, mỗi phân tử có thể có hai đầu có thể nối với nhau được. Hai đầu nối với nhau trên mỗi axit nucleic tạo khối có thể là hai đầu tù (nghĩa là mỗi đầu không có nucleotit nhô ra), hoặc một đầu tù và một đầu dính hoặc cả hai đầu dính.

Một đầu dính hữu ích đối với mục đích này có thể là đầu dính 3' hoặc đầu dính 5'. Do đó, một axit nucleic tạo khối có thể có đầu dính 3' hoặc theo một cách khác một đầu dính 5' hoặc theo một cách khác hai đầu dính 3' hoặc theo một cách khác hai đầu dính 5'. Trật tự toàn phần trong đó axit nucleic tạo khối được ghép với nhau để tạo ra phân tử axit nucleic khảm được xác định bằng quá trình thiết kế thử nghiệm có mục đích và không ngẫu nhiên.

Theo một khía cạnh, một axit nucleic tạo khối được tạo ra bằng quá trình tổng hợp hoá học hai axit nucleic sợi đơn (còn được gọi là các oligo sợi đơn) và cho chúng phản ứng với nhau để chúng có thể ghép cặp để hình thành axit nucleic tạo khối sợi kép.

Axit nucleic tạo khối sợi kép có thể có kích thước khác nhau. Kích thước của các khối này có thể là nhỏ hoặc lớn. Kích thước thử nghiệm đối với các khối này thay đổi từ 1 cặp bazơ (không bao gồm phần nhô ra) đến 100.000 cặp bazơ (không bao gồm phần nhô ra). Các khoảng dao động về kích thước khác cũng được đề xuất, có các giới hạn thấp hơn từ 1bp đến 10.000 bp (gồm các số nguyên bất kỳ trong khoảng này), và các giới hạn cao hơn từ 2bp đến 100.000bp (gồm các số nguyên bất kỳ trong khoảng này).

Nhiều phương pháp trong đó axit nucleic tạo khối sợi kép có thể được tạo có khả năng sửa chữa được đối với sáng chế; và các phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, axit nucleic tạo khối sợi kép được tạo ra bằng cách đầu tiên tạo ra hai axit nucleic sợi đơn và cho chúng gắn với nhau để tạo thành axit nucleic tạo khối sợi kép. Hai sợi của axit nucleic tạo khối sợi kép có thể bổ sung với nhau tại mỗi vị trí nucleotit tách ra khỏi bất kỳ sợi tạo đầu nhô ra; do đó không có bất kỳ sự ghép cặp sai nào, tách ra khỏi (các) đầu nhô ra bất kỳ. Theo khía cạnh khác, hai sợi của axit nucleic tạo khối sợi kép bổ sung với nhau không ở tất cả các vị trí nucleotit tách ra khỏi bất kỳ sợi tạo đầu nhô ra. Do đó, theo khía cạnh này, axit nucleic tạo khối sợi kép có thể được sử dụng để tạo ra thoái hoá bộ ba mã hóa. Theo một khía cạnh, thoái hoá bộ ba mã hóa được đưa vào bằng cách sử dụng gây đột biến bão hoà tại chỗ được mô tả ở đây, sử dụng một hoặc nhiều catxet N,N,G/T hoặc theo một cách khác sử dụng một hoặc nhiều catxet N,N,N.

Phương pháp tái tổ hợp trong cơ thể theo sáng chế có thể được thực hiện một cách mò mẫm trên một nhóm các phân tử lại hoặc alen của một polynucleotit hoặc trình tự đặc hiệu chưa biết. Tuy nhiên, không cần thiết phải biết trình tự ADN hoặc ARN thực sự của polynucleotit đặc hiệu.

Phương pháp sử dụng tái tổ hợp trong một nhóm hỗn hợp các gen có thể là hữu dụng để tạo ra các protein có ích bất kỳ, chẳng hạn, interleukin I, kháng thể, tPA và hoocmon sinh trưởng. Phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra các protein có hoạt tính hoặc độ đặc hiệu bị thay đổi. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để tạo ra các trình tự axit nucleic lai, chẳng hạn, vùng trình tự khởi đầu, intron, exon, các

yếu tố tăng cường biểu hiện, các vùng 3' không dịch mã hoặc 5' không dịch mã của gen. Do đó, phương pháp này có thể được sử dụng để tạo gen có mức độ biểu hiện được gia tăng. Phương pháp này cũng có thể có ích trong nghiên cứu các trình tự AND lặp. Cuối cùng, phương pháp này có thể được sử dụng để gây đột biến ribozym hoặc aptame.

Theo một khía cạnh, các biến thể của polynucleotit và polypeptit được mô tả ở đây thu được bằng cách sử dụng các chu trình tái sắp xếp khủ, tái tổ hợp và chọn lọc để cho phép gây tiến hoá phân tử có định hướng các trình tự thẳng có độ phức tạp cao, như ADN, ARN hoặc protein trong quá trình tái tổ hợp.

Việc sắp xếp lại trong cơ thể các phân tử là hữu ích trong việc tạo ra các biến thể và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đặc tính tự nhiên của các tế bào để tái tổ hợp các multime. Khi quá trình tái tổ hợp trong cơ thể đã tạo ra một cách tự nhiên chủ yếu để tạo độ đa dạng về phân tử, quá trình tái tổ hợp di truyền vẫn còn là một quá trình tương đối phức tạp gồm có 1) nhận dạng các đoạn tương đồng; 2) các bước cắt sợi, ghép nối, và chuyển hoá sẽ tạo ra các thể bất chéo tái tổ hợp; và cuối cùng 3) quá trình phân giải các thể bất chéo thành các phân tử tái tổ hợp riêng rẽ. Việc hình thành các thể bất chéo đòi hỏi sự nhận biết các trình tự tương đồng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra polynucleotit lai từ ít nhất một polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai. Sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra polynucleotit lai bằng cách đưa vào ít nhất một polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai chung nhau ít nhất một vùng trình tự tương đồng (chẳng hạn, SEQ ID NO:1) vào một tế bào chủ thích hợp. Các vùng trình tự tương đồng một phần sẽ thúc đẩy các quá trình dẫn đến sự tái sắp xếp để tạo ra một polynucleotit lai. Thuật ngữ “polynucleotit lai”, như được sử dụng ở đây, là trình tự nucleotit bất kỳ được tạo ra từ phương pháp theo sáng chế và có trình tự từ ít nhất hai trình tự polynucleotit gốc. Các polynucleotit lai này có thể hình thành từ quá trình tái tổ hợp nội phân tử thúc đẩy quá trình kết hợp giữa các phân tử ADN. Ngoài ra, polynucleotit lai này có thể hình thành từ quá trình tái sắp xếp nội phân tử sử dụng các trình tự lặp lại để cải biến trình tự nucleotit trong một phân tử ADN.

Sáng chế đề xuất các phương pháp để tạo ra polynucleotit lai có thể mã hoá các polypeptit lai có hoạt tính sinh học (chẳng hạn, phytaza lai). Theo một khía cạnh,

polynucleotit gốc mã hoá các polypeptit có hoạt tính sinh học. Phương pháp theo sáng chế sẽ tạo ra các polypeptit lai bằng cách sử dụng các quá trình trong tế bào, các quá trình này sẽ kết hợp các trình tự của polynucleotit sao cho polynucleotit lai tạo ra sẽ mã hoá polypeptit thể hiện các hoạt tính nhận được từ polypeptit có hoạt tính sinh học gốc. Chẳng hạn, polynucleotit gốc có thể mã hoá một enzym cụ thể từ các vi sinh vật khác nhau. Một enzym được mã hoá bởi polynucleotit thứ nhất từ một sinh vật hoặc biến thể có thể, chẳng hạn, hoạt động hiệu quả ở một điều kiện môi trường cụ thể, chẳng hạn, nồng độ muối cao. Một enzym được mã hoá bởi polynucleotit thứ hai từ một sinh vật hoặc biến thể khác có thể hoạt động hiệu quả ở một điều kiện môi trường khác, như nhiệt độ rất cao. Một polynucleotit lai chứa các trình tự từ polynucleotit gốc thứ nhất và thứ hai có thể mã hoá một enzym thể hiện các đặc tính của cả hai enzym được mã hoá bởi các polynucleotit gốc. Do đó, enzym được mã hoá bởi polynucleotit lai có thể hoạt động hiệu quả ở các điều kiện môi trường ở đó mỗi enzym được mã hoá bởi các trình tự polynucleotit gốc thứ nhất và thứ hai có thể hoạt động hiệu quả, chẳng hạn, nồng độ muối cao và nhiệt độ cao.

Ngoài các phương pháp khác nhau được nêu trên đây, các phương pháp khác cũng đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để thu được polynucleotit lai có các đặc tính enzym được tăng cường. Các ví dụ sau đây sẽ mô tả sự sử dụng các quá trình này để thu được enzym bền nhiệt hoặc chịu nhiệt bằng cách gây đột biến polynucleotit mã hoá enzym kiểu đại quan tâm.

Chẳng hạn, theo một khía cạnh, sáng chế sử dụng các phương pháp được mô tả bởi M. Lehmann et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1543:408-415, 2000) đã đề cập một “phương pháp liên ứng” trong đó quá trình so sánh trình tự phytaza tương đồng của nấm được sử dụng để tính toán trình tự axit amin phytaza tương ứng. Sau khi xây dựng gen liên ứng tương ứng, tiến hành biểu hiện tái tổ hợp và tinh sạch, phytaza tái tổ hợp thu được được đưa vào nhiệt duỗi (T_m) cao hơn từ 15 đến 22°C so với nhiệt độ biến tính của tất cả các phytaza gốc được sử dụng trong quá trình thiết kế. Quá trình gây đột biến có định hướng tại chỗ gen mã hoá protein tái tổ hợp được sử dụng để tăng hơn nữa giá trị T_m đến 90.4°C. Tác dụng bền nhiệt được cho là do tổ hợp của nhiều sự thay đổi axit amin được phân bố dọc theo toàn bộ trình tự protein và các gốc được bộc lộ trên bề mặt chính.

Theo một khía cạnh, sáng chế sử dụng các phương pháp để thu được enzym có các đặc tính về nhiệt độ được tăng cường được mô tả bởi L. Jermutus et al. (J. of Biotechnology 85:15-24, 2001). Trong phương pháp này, các tương tác ion và liên kết hydro trên bề mặt của phytaza *Aspergillus terreus* đầu tiên được bảo tồn để phù hợp với các tương tác và liên kết có trong enzym tương đồng nhưng bền nhiệt hơn từ *A. niger*. Sau đó, các yếu tố cấu trúc thứ cấp toàn vẹn được thay thế ở vùng tương đồng và dựa trên cấu trúc tinh thể của phytaza *A. niger*. Việc thay thế một cấu trúc xoắn β trên bề mặt của phytaza *A. terreus* bằng một cấu trúc thẳng của phytaza *A. niger* đã tạo ra một enzym khảm dựa trên cấu trúc (protein dung hợp) có hoạt tính enzym không thay đổi và bền nhiệt.

Theo một khía cạnh, sáng chế sử dụng các được mô tả bởi L. Giver et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:12809-12813, 1998), các tác giả đã mô tả một quá trình trong đó sáu vòng gây đột biến ngẫu nhiên được đưa vào trong phản ứng PCR gây đột biến polynucleotit mã hoá *Bacillus subtilis* *p*-nitrobenzyl esteraza sau khi tái tổ hợp trong ống nghiệm dựa trên phương pháp của Stemmer tạo ra esteraza tái tổ hợp có tính bền nhiệt được gia tăng (tăng hơn 14°C về giá trị T_m) mà không ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác ở các nhiệt độ thấp hơn.

Theo một khía cạnh, sáng chế sử dụng các phương pháp được mô tả bởi C. Vetriani et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:12300-12305, 1998), các tác giả đã mô tả quá trình trong đó mô hình so sánh dựa trên độ tương đồng và so sánh cấu trúc trực tiếp các glutamat dehydrogenaza hexame từ các loài ái nhiệt *Pyrococcus furiosus* và *Thermococcus litoralis*, với nhiệt độ sinh trưởng tối ưu lần lượt là 100°C và 88°C, được sử dụng để xác định các đặc điểm bền nhiệt chủ chốt. Một mạng lưới cặp ion nội dưới đơn vị quan sát được là bị giảm một cách đáng kể trong các enzym kém bền hơn đã bị cải biến bằng cách gây đột biến hai gốc trong đó để bảo tồn các tương tác được tìm thấy trong các enzym bền hơn. Mặc dù gây đột biến điểm đơn cũng có các tác dụng bất lợi lên độ bền nhiệt, nhưng với cả hai đột biến trong cùng một vị trí, đã đạt được sự gia tăng gấp 4 lần về độ bền nhiệt ở 104°C so với enzym loại tự nhiên.

Theo một khía cạnh, sáng chế sử dụng các phương pháp được mô tả bởi A. Tomschy et al. (Protein Science 9:1304-1311, 2000), tác giả đã mô tả một quá trình sử

dụng cấu trúc tinh thể của phytaza *Aspergillus niger* (ở độ phân giải 2,5 angstrom) để xác định cụ thể tất cả các vị trí hoạt động của enzym. Sau đó, một sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự axit amin được sử dụng để xác định các gốc không bảo toàn trong vị trí hoạt động có thể có liên quan với một đặc tính có lợi xác định cần quan tâm. Bằng cách sử dụng phương pháp này, Gln27 của phytaza *A. fumigatus*, khác với Leu27 của *A. niger*, được nhận biết là có khả năng liên quan đến quá trình gắn và/hoặc giải phóng cơ chất và có vai trò trong hoạt tính đặc hiệu thấp của phytaza *A. fumigatus* (26,5 so với 1966U/mg protein ở pH 5,0). Gây đột biến điểm có định hướng Gln27 trong phytaza *A. fumigatus* thành Leu đã làm tăng hoạt tính đặc hiệu của enzym đột biến lên 92,1U/mg protein.

Cây và hạt chuyển gen

Sáng chế đề xuất cây và hạt chuyển gen chứa axit nucleic, polypeptit, catxet biểu hiện, cơ chế hoặc vectơ nhân dòng theo sáng chế, hoặc tế bào biến nạp hoặc được chuyển nhiễm theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất các sản phẩm từ thực vật, chẳng hạn, dầu, hạt, lá, dịch chiết và các sản phẩm tương tự, chứa axit nucleic và/hoặc polypeptit theo sáng chế. Cây chuyển gen có thể là hai lá mầm hoặc một lá mầm. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp tạo và sử dụng cây và hạt chuyển gen. Cây chuyển gen hoặc tế bào thực vật chuyển gen biểu hiện một polypeptit theo sáng chế có thể được cấu trúc theo một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, chẳng hạn, US 6,309,872.

Quá trình biểu hiện, hoặc biểu hiện quá mức tái tổ hợp của phân tử phytaza theo sáng chế có thể đạt được cùng với một hoặc nhiều các phân tử bổ trợ như, chẳng hạn, các enzym khác. Phương pháp này là hữu dụng để tạo ra các sản phẩm tổ hợp, như thực vật hoặc một phần thực vật chứa phân tử phytaza cũng như một hoặc nhiều phân tử bổ trợ. Phân tử phytaza theo sáng chế và các phân tử bổ trợ có thể được sử dụng trong một phương pháp điều trị tổ hợp. Các phân tử được biểu hiện tái tổ hợp hình thành có thể được sử dụng ở dạng hỗn hợp và/hoặc tinh sạch hoặc theo một cách khác ở dạng không được tinh sạch tương đối (chẳng hạn ở dạng phần thực vật ăn được có ích khi được trộn với các thực phẩm khác để xúc tác quá trình phân huỷ phytat).

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất quá trình biểu hiện phytaza trong các cây chuyển gen hoặc cơ quan của cây và phương pháp để sản xuất chúng. Các cấu trúc biểu hiện ADN được đề xuất để biến nạp thực vật với gen mã hoá phytaza dưới sự kiểm soát của các trình tự điều hoà có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện phytaza. Các trình tự điều hoà này có khả năng điều khiển quá trình phiên mã trong thực vật, một cách liên tục, hoặc theo giai đoạn và/hoặc theo các kiểu đặc hiệu mô.

Kiểu biểu hiện phụ thuộc một phần vào việc sử dụng thực vật hoặc các phần của cây. Cây chuyển gen và bộ phận của cây được đề xuất bởi sáng chế có thể được ứng dụng trực tiếp vào một loạt các quá trình công nghiệp khác nhau, chẳng hạn trong thức ăn gia súc hoặc theo một cách khác, phytaza được biểu hiện có thể được tách chiết và nếu muốn, được tinh sạch trước khi sử dụng. Theo một cách khác, tế bào chủ tái tổ hợp hoặc một phần thực vật có thể được sử dụng trực tiếp. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp xúc tác phản ứng thủy phân phytat sử dụng hạt chứa lượng phytaza được gia tăng. Phương pháp này bao gồm bước cho hạt chuyển gen không phải kiểu dại, chẳng hạn, ở dạng xay hoặc nghiền, tiếp xúc với cơ chất chứa phytat và cho enzym trong hạt làm tăng tốc độ phản ứng. Bằng cách cho trực tiếp hạt vào cơ chất chứa phytat, sáng chế đề xuất một cách giải quyết các quá trình tách chiết và tinh sạch khó khăn và đắt đỏ. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp xử lý nhờ đó một sinh vật thiếu sự cung cấp đầy đủ enzym được sử dụng enzym ở dạng hạt chứa lượng enzym được gia tăng. Theo một khía cạnh, thời gian sử dụng enzym cho sinh vật được điều phối với việc ăn thực phẩm chứa phytat.

Quá trình biểu hiện phytaza ở thực vật có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau. Cụ thể là, chẳng hạn, các kỹ thuật có sẵn để thực hiện biến nạp một số lượng lớn các loài thực vật, gồm có các loài hai lá mầm (chẳng hạn thuốc lá, khoai tây, cà chua, *Petunia*, *Brassica*) và các loài một lá mầm. Ngoài ra, chẳng hạn, các kỹ thuật biểu hiện gen ngoại lai trong thực vật cũng có sẵn. Thêm nữa, cá trình tự điều hoà trong các gen của thực vật đã được xác định là có khả năng sửa chữa đối với việc cấu trúc cá gen khả năng có thể được biểu hiện chức năng trong các tế bào thực vật (chẳng hạn Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486; Clark et al. (1990) *Virology* Dec;179(2):640-7; Smith et al. (1990) *Mol. Gen. Genet.* Dec;224(3):477-81.

Việc đưa các cấu trúc gen vào thực vật có thể thực hiện được bằng cách sử dụng một số kỹ thuật khác nhau gồm có biến nạp *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogenes*. Các ví dụ không hạn chế về các loại mô thực vật có thể biến nạp được bao gồm mô nguyên sinh, vi bào tử hoặc hạt phấn, và mô cây ngoài như lá, thân, rễ, trụ dưới lá mầm và lá mầm. Hơn nữa, ADN có thể được đưa một cách trực tiếp vào mô nguyên sinh và tế bào thực vật hoặc mô bằng các phương pháp như vi tiêm, biến nạp điện, bắn tiểu phần gắn gen (particle bombardment), và hấp thụ trực tiếp ADN.

Các protein có thể được sản xuất trong thực vật bằng một loại các hệ thống biểu hiện khác nhau. Chẳng hạn, việc sử dụng trình tự khởi đầu cơ định như trình tự khởi đầu 35S của virut khảm súp lơ (Guilley et al., 1982) là hữu ích đối với việc tích lũy các protein được biểu hiện trong hầu hết các bộ phận của cây chuyển gen. Theo một cách khác, việc sử dụng trình tự khởi đầu có tính đặc hiệu mô và/hoặc đặc hiệu giai đoạn cao cũng có ích đối với sáng chế (Higgins, 1984; Shotwell, 1989) để điều khiển quá trình biểu hiện trong mô mong muốn và/hoặc hướng đến một giai đoạn phát triển mong muốn. Sáng chế cũng sử dụng các phương pháp để biểu hiện trong thực vật phân tử phytaza theo sáng chế như đã được mô tả trong, chẳng hạn, US 5,770,413 (Van Ooijen et al.) và US 5,593,963 (Van Ooijen et al.), đã đề cập đến việc sử dụng phytaza của nấm.

Cải biến trình tự mã hoá và các trình tự liên kề

Việc biểu hiện chuyển gen trong thực vật các gen thu được từ các nguồn ngoại sinh có thể bao gồm quá trình cải biến các gen này để thu được và tối ưu hoá quá trình biểu hiện của chúng trong thực vật. Cụ thể, các ORF của vi khuẩn mã hoá các enzym riêng rẽ nhưng các enzym này được mã hoá bởi cùng một bản sao trong vi khuẩn gốc sẽ được biểu hiện tốt nhất trong thực vật trên các bản sao riêng rẽ. Do đó, theo một khía cạnh, để đạt được điều này, mỗi ORF của vi khuẩn sẽ được phân lập riêng rẽ và tách dòng vào catxet mà cung cấp cho ORF trình tự trình tự khởi đầu của thực vật ở đầu 5' của ORF và trình tự kết thúc phiên mã ở thực vật ở đầu 3' của ORF. Trình tự ORF được phân lập có thể gồm bộ ba mã hóa mở đầu ATG và bộ ba mã hóa kết thúc nhưng còn có thể bao gồm trình tự bổ sung ngoài bộ ba mã hóa mở đầu ATG và bộ ba mã hóa kết thúc. Ngoài ra, ORF có thể được phân cắt, nhưng vẫn duy trì được hoạt tính cần thiết; cụ thể là đối với các ORF dài, các bản được phân cắt vẫn duy trì được hoạt tính có thể là thích hợp

để biểu hiện trong các sinh vật chuyển gen. “Trình tự khởi đầu thực vật” và “yếu tố kết thúc phiên mã ở thực vật” có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế là trình tự khởi đầu và/hoặc yếu tố kết thúc phiên mã bất kỳ hoạt động trong tế bào thực vật, gồm có trình tự khởi đầu và yếu tố kết thúc phiên mã có thể thu được từ các nguồn không thực vật như virus (ví dụ như virus khảm súp lơ).

Trong một số trường hợp, việc cải biến các trình tự mã hoá ORF và trình tự liên kề là không cần thiết. Chỉ cần phân lập đoạn chứa ORF cần quan tâm và chèn theo hướng xuôi dòng vào trình tự khởi đầu của thực vật. Chẳng hạn, Gaffney et. al. (*Science* 261: 754-756 (1993)) đã biểu hiện gen *nahG* của *Pseudomonas* trong cây chuyển gen dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu 35S của CaMV và yếu tố kết thúc phiên mã *tml* của CaMV thành công mà không cần cải biến trình tự mã hoá và với các nucleotit của gen *Pseudomonas* nằm theo hướng ngược dòng của ATG vẫn được nối liền, và các nucleotit theo hướng xuôi dòng của bộ ba mã hóa kết thúc vẫn gắn vào ORF *nahG*. Tốt hơn là, trình tự liên kề của vi khuẩn nhỏ có thể được nối theo hướng ngược dòng so với ATG và xuôi dòng so với bộ ba mã hóa kết thúc. Trong thực nghiệm, việc cấu trúc này có thể phụ thuộc vào sự có sẵn của các vị trí cắt giới hạn.

Trong các trường hợp khác, quá trình biểu hiện các gen thu được từ nguồn vi khuẩn có thể dẫn đến các vấn đề trong quá trình biểu hiện. Các vấn đề này đã được mô tả rõ ràng trong lĩnh vực kỹ thuật này và đặc biệt phổ biến với các gen thu được từ nguồn vi khuẩn. Các vấn đề này có thể áp dụng với trình tự nucleotit theo sáng chế và việc cải biến các gen này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vấn đề sau có thể được tính đến:

Cách sử dụng bộ ba mã hóa

Sáng chế đề xuất axit nucleic có bộ ba mã hóa được cải biến để sử dụng trong thực vật; trong một số trường hợp, cách sử dụng bộ ba mã hóa được ưu tiên trong thực vật sẽ khác so với cách sử dụng bộ ba mã hóa được ưu tiên ở một số vi sinh vật. Việc so sánh sự sử dụng bộ ba mã hóa trong một ORF vi khuẩn được tách dòng với sự sử dụng trong các gen thực vật (và cụ thể là các gen trong thực vật đích) sẽ cho phép xác định các bộ ba mã hóa trong một ORF cần thay đổi. Thông thường, quá trình gây tiến hoá thực vật sẽ hướng đến sự ưu tiên sử dụng các nucleotit C và G ở vị trí bazơ thứ ba của các cặp

một lá mầm, trong khi các cây hai lá mầm thường sử dụng các nucleotit A hoặc T ở vị trí này. Bằng cách cải biến một gen để kết hợp cách sử dụng bộ ba mã hóa được ưu tiên đối với một loài chuyển gen đích cụ thể, nhiều vấn đề sẽ được mô tả dưới đây về hàm lượng GC/AT và việc cắt nối không chính xác sẽ được khắc phục.

Hàm lượng GC/AT

Sáng chế đề xuất axit nucleic có hàm lượng GC được cải biến, chẳng hạn, để sử dụng trong thực vật; các gen thực vật thường có hàm lượng GC lớn hơn 35%. Các trình tự ORF có nhiều nucleotit A và T có thể gây ra một số vấn đề trong thực vật. Đầu tiên, các môtip ATTTA được cho là gây ra quá trình mất tính ổn định của các thông tin và được tìm thấy ở đầu 3' của nhiều mARN có tuổi thọ ngắn. Thứ hai, việc hình thành các tín hiệu polyadenyl hoá như AATAAA ở các vị trí không chính xác trong mARN được cho là gây ra quá trình cắt không hoàn thiện bản sao phiên mã. Ngoài ra, các cây một lá mầm có thể nhận ra các trình tự giàu AT là các vị trí cắt nối intron (tham khảo dưới đây).

Các trình tự liên kết với Metionin khởi đầu

Sáng chế đề xuất axit nucleic có các nucleotit liên kết với ATG được cải biến và/hoặc được thêm vào; thực vật khác với vi sinh vật ở chỗ mARN của chúng không có vị trí gắn với ribosom xác định. Đúng hơn là, được cho rằng ribosom sẽ gắn với đầu 5' của mARN và tìm kiếm ATG có sẵn đầu tiên để bắt đầu dịch mã. Tuy nhiên, còn cho rằng có sự ưu tiên đối với một số nucleotit nhất định liên kết với ATG và quá trình biểu hiện các gen vi khuẩn có thể được tăng cường bằng cách đưa các yếu tố khởi động dịch mã liên ứng của tại vị trí ATG. Clontech (1993/1994 catalog, page 210, incorporated herein by reference) đã đề xuất một trình tự như một yếu tố khởi động dịch mã liên ứng để biểu hiện gen *uidA* *E. coli* trong thực vật. Hơn nữa, Joshi (*N.A.R.* 15: 6643-6653 (1987), incorporated herein by reference) đã so sánh nhiều trình tự trong thực vật kết với ATG và đề xuất một trình tự liên ứng khác. Trong các trường hợp khi có trở ngại trong quá trình biểu hiện các ORF của vi khuẩn trong thực vật, việc đưa vào một trong số các trình tự này tại vị trí ATG khởi đầu có thể tăng cường quá trình dịch mã. Trong các trường hợp như vậy, 3 nucleotit cuối cùng trong trình tự liên ứng có thể là không thích hợp để đưa vào trình tự được cải biến vì sự biến đổi thành gốc AA thứ hai. Theo một số khía cạnh, các trình tự được ưu tiên liên kết với metionin khởi đầu có thể khác nhau giữa

các loài thực vật. Một khảo sát về 14 gen của ngô được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy các kết quả như sau:

Vị trí trước ATG khởi đầu trong 14 gen của cây ngô:

	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
C	3	8	4	6	2	5	6	0	10	7
T	3	0	3	4	3	2	3	7	2	3
A	2	3	1	4	3	2	3	7	2	3
G	6	3	6	0	6	5	4	6	1	5

Phân tích này có thể được thực hiện đối với loài thực vật trong đó trình tự nucleotit được đưa vào, và trình tự liên kề với ATG được cải biến để đưa các nucleotit được ưu tiên vào.

Loại bỏ các vị trí cắt nối intron không chính xác

Sáng chế đề xuất axit nucleic có các vị trí cắt nối intron không chính xác được cải biến hoặc loại bỏ hoặc “loại bỏ” về mặt chức năng; các gen được tách dòng từ các nguồn không phải thực vật và không được tối ưu hoá để biểu hiện trong thực vật cũng có thể chứa các môtip có thể được nhận ra ở thực vật như các vị trí cắt nối intron 5’ hoặc 3’, và sẽ được cắt bỏ, do đó sẽ tạo ra các phân tử mRNA bị bắt bỏ hoặc bị mất. Các vị trí này có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kỹ thuật cải biến trình tự mã hoá và các trình tự liên kề đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong các trường hợp quá trình biểu hiện ban đầu của các ORF vi khuẩn là thấp và thấy rằng có thể tạo ra các thay đổi trong trình tự như đã mô tả ở trên, thì việc cấu trúc các gen tổng hợp có thể thực hiện được theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đó là, chẳng hạn, được mô tả trong các tài liệu patent EP 0 385 962 (của Monsanto), EP 0 359 472 (của Lubrizol) và WO 93/07278 (của Ciba-Geigy), tất cả các tài liệu này đều được đưa vào theo cách viện dẫn. Trong hầu hết các trường hợp tốt hơn là thử nghiệm quá trình biểu hiện các cấu trúc gen sử dụng quá trình thử nghiệm ngắn (đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này) trước khi chuyển vào thực vật chuyển gen.

Trình tự khởi đầu thực vật

Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các trình tự axit nucleic, chẳng hạn, trình tự khởi đầu, để cải biến và biểu hiện trong thực vật. Trình tự axit nucleic có thể có mặt trong các cấu trúc ADN hoặc catxet biểu hiện. Axit nucleic theo sáng chế có thể là, hoặc có thể chứa, "catxet biểu hiện", bao gồm phân tử axit nucleic bất kỳ có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện của một trình tự nucleotit cụ thể trong một tế bào chủ thích hợp chứa một trình tự khởi đầu được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự nucleotit cần quan tâm được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự tín hiệu kết thúc.

Các chế phẩm (chẳng hạn, trình tự axit nucleic) theo sáng chế cũng có thể bao gồm các trình tự cần thiết để tiến hành dịch mã chính xác trình tự nucleotit. Vùng mã hoá thường mã hoá protein cần quan tâm nhưng cũng có thể mã hoá ARN chức năng cần quan tâm, chẳng hạn ARN đối nghĩa hoặc ARN không dịch mã, theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa. Catxet biểu hiện bao gồm trình tự nucleotit cần quan tâm có thể là khảm, có nghĩa là ít nhất một trong số các thành phần của nó là khác loại so với ít nhất một trong số các thành phần còn lại. Catxet biểu hiện cũng có thể là một cấu trúc có nguồn gốc tự nhiên nhưng thu được ở dạng tái tổ hợp là thích hợp để biểu hiện khác loài. Tuy nhiên, thông thường, catxet biểu hiện là khác loại so với tế bào chủ, nghĩa là, trình tự ADN cụ thể của catxet biểu hiện không có nguồn gốc tự nhiên trong tế bào chủ và cần phải được đưa vào tế bào chủ hoặc một tế bào gốc của tế bào chủ bằng cách biến nạp. Quá trình biểu hiện trình tự nucleotit trong catxet biểu hiện có thể được kiểm soát bởi một trình tự khởi đầu cơ định hoặc trình tự khởi đầu có khả năng kích thích sẽ khởi động quá trình phiên mã chỉ khi nào tế bào chủ được phơi với một số yếu tố kích thích ngoại bào đặc biệt. Ngoài ra, trình tự khởi đầu cũng có thể là đặc hiệu với một tổ chức mô hoặc cơ quan hoặc một giai đoạn phát triển cụ thể.

Sáng chế còn đề cập đến quá trình biến nạp thực vật bằng catxet biểu hiện có khả năng biểu hiện polynucleotit. Catxet biểu hiện sẽ chứa theo hướng 5'-3' một bản sao phiên mã, vùng khởi đầu phiên mã và dịch mã (nghĩa là, một trình tự khởi đầu) và polynucleotit cần quan tâm. Catxet biểu hiện có thể tùy ý bao gồm một vùng kết thúc phiên mã và dịch mã (nghĩa là vùng kết thúc) hoạt động trong thực vật. Theo một số phương án, catxet biểu hiện bao gồm một gen chỉ thị có thể chọn lọc được để cho phép

chọn lọc các thể biến nạp ổn định. Các cấu trúc biểu hiện theo sáng chế cũng có thể chứa một trình tự dẫn đầu và/hoặc trình tự cho phép kích thích biểu hiện polynucleotit cần quan tâm. Tham khảo, Guo et. al. (2003) Plant J. 34:383-92 và Chen et. al. (2003) Plant J. 36:731-40 cung cấp ví dụ về các trình tự có khả năng kích thích quá trình biểu hiện.

Các trình tự điều hoà của cấu trúc biểu hiện được liên kết một cách có kiểm soát với polynucleotit cần quan tâm. “Được liên kết một cách có kiểm soát” dùng để chỉ một liên kết hoạt động giữa một trình tự khởi đầu và trình tự thứ hai trong đó trình tự trình tự khởi đầu sẽ khởi động và xúc tác quá trình phiên mã trình tự ADN bổ sung với trình tự thứ hai. Thông thường, được liên kết một cách có kiểm soát có nghĩa là các trình tự nucleotit được liên kết gần nhau.

Trình tự khởi đầu bất kỳ có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện trong thực vật cần quan tâm có thể được sử dụng trong quá trình thực nghiệm sáng chế. Trình tự khởi đầu có thể có nguồn gốc hoặc tương đồng hoặc ngoại lai hoặc khác loại với tế bào chủ thực vật. Thuật ngữ "khác loại" và "ngoại sinh" được sử dụng ở đây dùng để chỉ trình tự axit nucleic (chẳng hạn trình tự ADN hoặc ARN) hoặc một gen, dùng để chỉ một trình tự có nguồn gốc từ một nguồn ngoại lai với tế bào chủ hoặc, nếu từ cùng một nguồn, thì được cải biến so với dạng ban đầu của nó. Do đó, một gen khác loại trong tế bào chủ gồm có gen nội sinh với tế bào chủ nhưng đã được cải biến. Các thuật ngữ này cùng dùng để chỉ các bản sao không có nguồn gốc tự nhiên của một trình tự ADN có nguồn gốc tự nhiên. Do đó, thuật ngữ này dùng để chỉ một đoạn ADN ngoại lai hoặc khác loại với tế bào, hoặc tương đồng với tế bào nhưng ở một vị trí trong axit nucleic của tế bào chủ tại đó yếu tố này thường không được tìm thấy. Các đoạn ADN ngoại sinh được biểu hiện để tạo ra các polypeptit ngoại sinh. Theo các phương án khác, một trình tự axit nucleic "tương đồng" (chẳng hạn ADN) là một trình tự axit nucleic (chẳng hạn ADN hoặc ARN) thường có liên quan một cách tự nhiên với tế bào chủ trong đó trình tự được đưa vào.

Việc lựa chọn các trình tự khởi đầu cần được đưa vào phụ thuộc vào một số yếu tố khác nhau, gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiệu quả, khả năng chọn lọc, khả năng kích thích, mức độ biểu hiện mong muốn, và quá trình biểu hiện ưu tiên tế bào hoặc mô. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thường xuyên cải biến

quá trình biểu hiện của một trình tự bằng cách chọn lọc và xác định vị trí chính xác các trình tự khởi đầu và các vùng điều hoà khác liên quan đến trình tự đó.

Một số trình tự khởi đầu thích hợp sẽ chỉ khởi động quá trình phiên mã, hoặc chủ yếu, trong một số loại tế bào nhất định. Do đó, như được sử dụng ở đây một trình tự khởi đầu ưu tiên loại tế bào hoặc mô là trình tự khởi đầu điều khiển quá trình biểu hiện một cách ưu tiên trong mô đích, nhưng cũng có thể gây ra quá trình biểu hiện trong các loại tế bào hoặc mô khác. Phương pháp để xác định và mô tả các vùng trình tự khởi đầu trong hệ gen ADN của thực vật bao gồm, chẳng hạn, các phương pháp được mô tả trong các tài liệu sau: Jordano, et. al., *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos, et. al., *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green, et. al., *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, et. al., *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); và Zhang, et. al., *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996).

Một số gen và/hoặc trình tự khởi đầu được điều hoà đặc hiệu mô đã được báo cáo ở thực vật. Một số gen đặc hiệu mô đã được báo cáo bao gồm các gen mã hoá protein tích lũy trong hạt (như napin, cruxiferin, beta-conglyxinin, và phaseolin, prolamin, glutelin, globulin, và zein) zein hoặc các thân dầu protein (như oleosin), hoặc các gen có liên quan trong quá trình sinh tổng hợp axit béo (gồm có protein chất mang acyl, stearoyl-ACP desaturaza, và các desaturaza axit béo (fad 2-1)), và các gen khác được biểu hiện trong quá trình phát triển của phôi (như Bce4, tham khảo, chẳng hạn, EP 255378 và Kridl et. al., (1991) *Seed Science Research*, 1:209).

Ví dụ về các trình tự khởi đầu đặc hiệu mô, đã được mô tả, gồm có lectin (Vodkin, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 138:87 (1983); Lindstrom et. al., (1990) *Dev. Genet.*, 11:160), dehydrogenaza rượu ngô 1 (Dennis et. al., *Axit nucleic Res.*, 12:3983 (1984)), phức hợp bắt ánh sáng ở cây ngô (tham khảo, chẳng hạn, Simpson, (1986) *Science*, 233:34; Bansal (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3654), protein sốc nhiệt của ngô (tham khảo, chẳng hạn, Odell et. al., (1985) *Nature*, 313:810; RuBP carboxylaza dưới đơn vị nhỏ của đậu (tham khảo, chẳng hạn, Poulsen et. al., (1986) *Mol. Gen. Genet.*, 205:193-200; Cashmore et. al., (1983) *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, New York, 29-38); Ti plasmit mannopin synthaza (tham khảo, chẳng hạn, Langridge et. al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223), Ti plasmit nopalín synthaza (Langridge et. al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223), chalcon isomeraza thuốc lá (tham khảo,

chẳng hạn, vanTunen (1988) EMBO J. 7:1257); protein giàu glyxin 1 ở đậu phộng (tham khảo, chẳng hạn, Keller (1989) Genes Dev. 3:1639); CaMV 35s bị cắt (tham khảo, chẳng hạn, Odell (1985) Nature 313:810); patatin khoai tây (tham khảo, chẳng hạn, Wenzler (1989) Plant Mol. Biol. 13:347); tế bào rễ (tham khảo, chẳng hạn, Yamamoto (1990) Axit nucleic Res. 18:7449); đạm ngô (tham khảo, chẳng hạn, Reina (1990) Nucleic Acid Res. 18:6425; Lopes et. al. (1995) Mol. Gen. Genet. 247: 603-613; Kriz (1987) Mol. Gen. Genet. 207:90; Wandelt (1989) Nucleic Acid Res., 17:2354; Langridge (1983) Cell, 34:1015; Reina (1990) Nucleic Acid Res., 18:7449), trình tự khởi đầu ADP-gpp (tham khảo, chẳng hạn, US 7,102,057); globulin-1 (tham khảo, chẳng hạn, Belanger (1991) Genetics 129:863); α -globulin (Sunilkumar, et. al. (2002), Transgenic Res. 11 :347-359); α -tubulin; cab (tham khảo, chẳng hạn, Sullivan (1989) Mol. Gen. Genet., 215:431); PEPCaza (tham khảo, chẳng hạn, Hudspeth & Grula, (1989) Plant Molec. Biol., 12:579-589); trình tự khởi đầu liên quan đến phức hệ gen R (Chandler et. al., (1989) Plant Cell, 1:1175); trình tự khởi đầu vicilin ở đậu (Czako et. al., (1992) Mol. Gen. Genet., 235:33; US 5,625,136); trình tự khởi đầu GTL1 (Takaiwa et. al. (1991) Plant Mol. Biol. 16 (1), 49-58); trình tự khởi đầu chalcon synthaza (Franken et. al., (1991) EMBO J., 10:2605); trình tự khởi đầu GY1 (Sims & Goldberg (1989) Nuc. Acid Res. 17(11) 4368) và các trình tự khởi đầu tương tự; tất cả các tài liệu trên đều được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng trình tự khởi đầu đặc hiệu với quả, bao gồm các họ trình tự khởi đầu đặc hiệu với quả bất kỳ, chẳng hạn, như được biểu hiện tại thời điểm hoặc trong quá trình phát triển đối bên trong suốt quá trình phát triển của quả, ít nhất cho đến khi bắt đầu chín, chẳng hạn, như được đề cập trong tài liệu patent Mỹ 4,943,674, tài liệu này được đưa vào đây theo cách viện dẫn. Trình tự khởi đầu cho gen polygalacturonaza hoạt động trong quá trình chín của quả. Sáng chế có thể sử dụng gen polygalacturonaza như đã mô tả, chẳng hạn, trong US 4,535,060, US 4,769,061, US 4,801,590, và US 5,107,065, các tài liệu này được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng trình tự khởi đầu đặc hiệu với quả bất kỳ, gồm có các trình tự khởi đầu điều khiển quá trình biểu hiện trong các tế bào lá sau khi phá hủy lá (chẳng hạn, do côn trùng cắn), trong củ (chẳng hạn, trình tự khởi đầu gen patatin), và

trong các tế bào sợi (ví dụ về protein tế bào sợi được điều hoà trong quá trình phát triển là E6 (John & Crow (1992) PNAS 89:5769-5773). Gen E6 hoạt động mạnh nhất trong các tế bào sợi, mặc dù nồng độ bản sao phiên mã thấp được tìm thấy trong lá, nõn và hoa.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng trình tự khởi đầu hoạt động trong mô quang tổng hợp, chẳng hạn, để điều khiển quá trình phiên mã trong các mô xanh như lá và thân, là thích hợp khi chúng chỉ điều khiển quá trình biểu hiện hoặc chủ yếu kiểm soát quá trình biểu hiện trong các mô này. Theo một cách khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng các trình tự khởi đầu để tạo ra quá trình biểu hiện một cách cơ bản trong toàn bộ thực vật, hoặc phân biệt với các mô xanh, hoặc phân biệt giữa các giai đoạn phát triển của mô xanh trong đó quá trình biểu hiện diễn ra, hoặc đáp ứng với các kích thích bên ngoài.

Các trình tự khởi đầu thử nghiệm được sử dụng để thực hiện sáng chế bao gồm trình tự khởi đầu ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza (RbcS) như trình tự khởi đầu RbcS từ thông rụng lá (*Larix laricina*), trình tự khởi đầu cab6 của cây thông (Yamamoto et. al. (1994) Plant Cell Physiol. 35:773-778), trình tự khởi đầu gen Cab-1 từ lúa mì (Fejes et. al. (1990) Plant Mol. Biol. 15:921-932), trình tự khởi đầu CAB-1 từ rau cải xoăn (Lubberstedt et. al. (1994) Plant Physiol. 104:997-1006), trình tự khởi đầu cab1R từ lúa (Luan et. al. (1992) Plant Cell 4:971-981), trình tự khởi đầu pyruvat orthophosphat dikinaza (PPDK) từ ngô (Matsuoka et. al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:9586-9590), trình tự khởi đầu Lhcb1*2 thuốc lá (Cerdan et. al. (1997) Plant Mol. Biol. 33:245-255), trình tự khởi đầu yếu tố đồng vận chuyển SUC2 sucroza-H⁺ ở *Arabidopsis thaliana* (Truernit et. al. (1995) Planta 196:564-570), và trình tự khởi đầu protein màng thylakoit ở cải xoăn (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS. Các trình tự khởi đầu khác kiểm soát quá trình phiên mã trong thân, lá và mô xanh được mô tả trong công bố US 2007/0006346, được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Theo một số phương án, mức độ đặc hiệu mô của một số trình tự khởi đầu “đặc hiệu mô” không phải là tuyệt đối và có thể được thử nghiệm các gen báo cáo như Gus hoặc protein phát huỳnh quang xanh, protein phát huỳnh quang lục lam, protein phát huỳnh quang vàng hoặc protein phát huỳnh quang đỏ. Một người có hiểu biết trung bình cũng có thể thực hiện được quá trình biểu hiện đặc hiệu mô với quá trình biểu hiện “có

kế hớ” bằng một tổ hợp các trình tự khởi đầu đặc hiệu mô khác nhau. Các trình tự khởi đầu đặc hiệu mô khác có thể phân lập được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (tham khảo U.S. 5,589,379).

Theo một khía cạnh, trình tự khởi đầu thực vật có khả năng kích thích sau khi phơi với hoocmon thực vật, như auxin, được sử dụng để biểu hiện axit nucleic theo sáng chế. Chẳng hạn, sáng chế sử dụng các yếu tố đáp ứng với auxin trình tự khởi đầu E1 (AuxREs) trong đậu tương (*Glyxin max* L.) (Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407); trình tự khởi đầu GST6 đáp ứng với auxin trong *Arabidopsis* (cũng đáp ứng với axit salixylic và hydro peroxit) (Chen (1996) Plant J. 10: 955-966); trình tự khởi đầu parC có khả năng kích thích bằng auxin trong thuốc lá (Sakai (1996) 37:906-913); yếu tố đáp ứng với biotin thực vật (Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937); và, trình tự khởi đầu đáp ứng với axit abscisic (Sheen (1996) Science 274:1900-1902).

Axit nucleic theo sáng chế cũng có thể được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu thực vật có thể kích thích được sau khi phơi với các chất hoá học có thể được sử dụng cho thực vật, như thuốc diệt cỏ hoặc kháng sinh. Chẳng hạn, hệ thống biểu hiện gen được hoạt hoá khi có mặt các phối tử hoá học, gồm có etanol, như có thể được tìm thấy trong WO 96/27673; WO 93/01294; WO 94/03619; WO 02/061102, tất cả các tài liệu trên đều được đưa vào đây theo cách viện dẫn. Trình tự khởi đầu In2-2 của ngô, được hoạt hoá bởi thuốc bảo vệ thực vật benzenesulfonamit, có thể được sử dụng (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577); việc sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật sẽ kích thích các kiểu biểu hiện gen khác nhau, gồm có quá trình biểu hiện ở rễ, thủy không, và mô phân sinh đỉnh chồi. Trình tự mã hoá có thể được kiểm soát bởi, chẳng hạn, trình tự khởi đầu có thể kích thích được bằng tetracyclin, chẳng hạn, như được mô tả cùng với cây thuốc lá chuyển gen chứa gen arginin decarboxylaza của *Avena sativa* L. (oat) (Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473); estrogen, như, thụ thể ecdyson (WO 01/52620) hoặc, yếu tố đáp ứng với axit salixylic (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324). Sử dụng các trình tự khởi đầu được kích thích hoá học (chẳng hạn, hoocmon hoặc thuốc trừ sâu), nghĩa là, trình tự khởi đầu đáp ứng với hợp chất hoá học có thể được ứng dụng trên cây chuyển gen trên cánh đồng, quá trình biểu hiện polypeptit theo sáng chế có thể được kích thích ở một giai đoạn phát triển cụ thể của thực vật.

Các trình tự khởi đầu cơ định thử nghiệm có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và đã được mô tả gồm có actin 1 ở cây lúa (Wang et. al. (1992) Mol. Cell. Biol., 12:3399; US 5,641,876); các đồng phân actin khác (McElroy et. al. (1990) Plant Cell 2: 163-171 và McElroy et. al. (1991) Mol. Gen. Genet. 231: 150-160); CaMV 35S (Odell et. al. (1985) Nature, 313:810); CaMV 19S (Lawton et. al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-324; US 5,639,949); nos (Ebert et. al. (1987) PNAS USA 84:5745-5749); Adh (Walker et. al. (1987) PNAS USA 84:6624-6628), sucroza synthaza (Yang & Russell (1990) PNAS USA 87:4144-4148); và trình tự khởi đầu ubiquitin (chẳng hạn hướng dương - Binet et. al. (1991) Plant Science 79: 87-94; maize - Christensen et. al. (1989) Plant Molec. Biol. 12: 619-632; và Arabidopsis - Callis et. al., J. Biol. Chem. (1990) 265:12486-12493; và Norris et. al., Plant Mol. Biol. (1993) 21:895-906.

Yếu tố kết thúc phiên mã bất kỳ có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, chẳng hạn, có thể được sử dụng trong một vector, catxet biểu hiện và các dạng tương tự. Các yếu tố này có vai trò kết thúc quá trình phiên mã sau khi chuyển gen và polyadenyl hoá mARN chính xác. Vùng kết thúc có thể có cùng nguồn gốc với vùng khởi động phiên mã, có thể cùng nguồn gốc với trình tự ADN được liên kết một cách có kiểm soát cần quan tâm, có thể cùng nguồn gốc với cây chủ, hoặc thu được từ một nguồn khác (nghĩa là, ngoại lai hoặc khác loại với trình tự khởi đầu, trình tự ADN cần quan tâm, cây chủ, hoặc một tổ hợp bất kỳ của nó). Các yếu tố kết thúc phiên mã thích hợp đã được biến là hoạt động trong thực vật gồm có yếu tố kết thúc CAMV 35S, yếu tố kết thúc tml, yếu tố kết thúc nopalin synthaza và yếu tố kết thúc rbcS E9 ở đậu. Các yếu tố này có thể được sử dụng trong cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Ngoài ra, có thể sử dụng yếu tố kết thúc phiên mã có cùng nguồn gốc với gen.

Sáng chế cũng sử dụng một trình tự bất kỳ để tăng cường quá trình biểu hiện của gen trong một đơn vị phiên mã; và các trình tự này có thể được sử dụng liên hợp với các gen theo sáng chế để tăng cường quá trình biểu hiện của chúng trong thực vật chuyển gen. Chẳng hạn, các trình tự intron khác nhau đã được chỉ ra là có thể tăng cường quá trình biểu hiện, đặc biệt trong các cây một lá mầm. Chẳng hạn, các intron của gen Adhl ở ngô đã được phát hiện là làm tăng đáng kể quá trình biểu hiện của gen kiểu đại dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu cùng nguồn gốc khi được đưa vào tế bào cây ngô. Một số các trình tự dẫn đầu không dịch mã thu được từ virus cũng được biến là làm tăng

quá trình biểu hiện, và các trình tự này là đặc biệt hiệu quả trong các tế bào cây hai lá mầm. Cụ thể là, các trình tự dẫn đầu từ virus khảm thuốc lá (TMV, "trình tự W"), Chlorotic Mottle Virus ngô (MCMV), và virus khảm cỏ linh lăng (AMV) đã được chỉ ra là có hiệu quả trong việc tăng cường biểu hiện (chẳng hạn Gallie et. al. Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski et. al. Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)).

Tác động vào sản phẩm gen vào tế bào

Một cơ chế bất kỳ để tác động vào sản phẩm gen, chẳng hạn, trong thực vật, có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và cơ chế này được biết là có ở thực vật và các trình tự kiểm soát quá trình hoạt động của các cơ chế này đã được mô tả một vài chi tiết. Các trình tự đã được mô tả gây ra sự vận chuyển các sản phẩm gen vào các ngăn tế bào. Các trình tự đầu amin có thể có vai trò trong việc vận chuyển protein cần quan tâm vào một ngăn tế bào bất kỳ, như, không bào, ti thể, peroxisom, thể protein, lưới nội chất, lục lạp, hạt tinh bột, bột lạp, vô sắc lạp hoặc thành tế bào thực vật (chẳng hạn Unger et. al. Plant Molec. Biol. 13: 411-418 (1989); Rogers et. al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-651; US 7,102,057; WO 2005/096704, tất cả các tài liệu trên được đưa vào đây theo cách viện dẫn). Tùy ý, trình tự tín hiệu có thể là trình tự tín hiệu đầu N từ *waxy*, trình tự tín hiệu đầu N từ γ -zein, vùng gắn tinh bột, vùng gắn kết với tinh bột đầu C, trình tự hướng lục lạp, thu nhận protein hoàn thiện vào lục lạp (Comai et. al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15104-15109; van den Broeck, et. al. (1985) Nature 313: 358-363; US 5,639,949) hoặc trình tự tín hiệu quá trình tiết từ các tế bào aloron (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769-783 (1990)). Ngoài ra, các trình tự đầu amin kết hợp với các trình tự đầu carboxy có vai trò trong việc hướng các sản phẩm gen vào không bào (Shinshi et. al. (1990) Plant Molec. Biol. 14: 357-368).

Theo một khía cạnh, trình tự tín hiệu được chọn cần chứa các vị trí phân cắt đã biết, và các thể dung hợp được cấu trúc cần tính đến các axit amin bất kỳ sau (các) vị trí phân cắt, là cần thiết cho quá trình phân cắt. Trong một số trường hợp, yêu cầu này có thể được đáp ứng bằng việc thêm một số lượng nhỏ các axit amin giữa vị trí phân cắt và vị trí ATG chuyển gen hoặc, theo một cách khác, thay thế một số axit amin trong trình tự chuyển gen. Các kỹ thuật này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể áp dụng với mọi loại tế bào.

Theo một khía cạnh, các cơ chế được mô tả ở trên để tác động tế bào có thể được sử dụng liên hợp với không chỉ trình tự khởi đầu cùng gốc, mà còn liên hợp với các trình tự khởi đầu khác loại để đạt được mục tích tác động vào tế bào cụ thể dưới sự điều hoà phiên mã của một trình tự khởi đầu có kiểu biểu hiện khác với kiểu biểu hiện của trình tự khởi đầu tạo tín hiệu tác động.

Tóm lại, có một loạt các phương pháp có thể sử dụng để thực hiện sáng chế, gồm có phương pháp bất kỳ để đạt được quá trình biểu hiện tái tổ hợp phytaza trong thực vật, hạt, cơ quan hoặc một phần thực vật chuyển gen bất kỳ. Thực vật và một phần thực vật chuyển gen có thể được sử dụng như các nguồn phytaza được biểu hiện tái tổ hợp, có thể được cho trực tiếp vào các nguồn chứa phytat. Theo một cách khác, phytaza được biểu hiện trong thực vật tái tổ hợp có thể được tách chiết từ nguồn thực vật và, nếu cần, có thể được tinh sạch trước khi cho phản ứng với cơ chất phytaza.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thực vật có thể được chọn từ (được sử dụng để thực hiện sáng chế) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở cây trồng cho hoa ăn được như hoa lơ (*Brassica oleracea*), atisô (*Cynara scolymus*), quả nhàu (Malus, chẳng hạn *domesticus*), chuối (Musa, chẳng hạn *acuminata*), dâu (như nho, Ribes, chẳng hạn *rubrum*), anh đào (như anh đào ngọt, Prunus, chẳng hạn *avium*), dưa chuột (Cucumis, chẳng hạn *sativus*), nho (Vitis, chẳng hạn *vinifera*), chanh (*Citrus limon*), dưa gang (*Cucumis melo*), hạt dẻ (như quả óc chó, Juglans, chẳng hạn *regia*; đậu phộng, *Arachis hypogaeae*), cam (Citrus, chẳng hạn *maxima*), đào (Prunus, chẳng hạn *persica*), lê (Pyra, chẳng hạn *communis*), mận (Prunus, chẳng hạn *domestica*), dâu tây (*Fragaria*, chẳng hạn *moschata*), cà chua (*Lycopersicon*, chẳng hạn *esculentum*), lá, như cỏ linh lăng (*Medicago*, chẳng hạn *sativa*), cải bắp (chẳng hạn *Brassica oleracea*), rau diếp xoăn (*Cichoreum*, chẳng hạn *endivia*), tỏi tây (*Allium*, chẳng hạn *porrum*), rau diếp (*Lactuca*, chẳng hạn *sativa*), cải xoăn (*Spinacia*, chẳng hạn *oleraceae*), thuốc lá (*Nicotiana*, chẳng hạn *tabacum*), rế, như dong (Maranta, chẳng hạn *arundinacea*), củ cải (Beta, chẳng hạn *vulgaris*), cà rốt (*Daucus*, chẳng hạn *carota*), sắn (Manihot, chẳng hạn *esculenta*), cải (Brassica, chẳng hạn *rapa*), củ cải (Raphanus, chẳng hạn *sativus*), khoai mỡ (*Dioscorea*, chẳng hạn *esculenta*), khoai lang (*Ipomoea batatas*) và hạt, như đậu (*Phaseolus*, chẳng hạn *vulgaris*), đậu Hà lan (*Pisum*, chẳng hạn *sativum*), đậu tương (*Glycin*, chẳng hạn *max*), lúa mì (*Triticum*, chẳng hạn *aestivum*), lúa mạch (*Hordeum*, chẳng hạn *vulgare*),

ngô (*Zea*, chẳng hạn *mays*), lúa gạo (*Oryza*, chẳng hạn *sativa*), cải dầu (*Brassica napus*), kê (*Panicum* L.), hướng dương (*Helianthus annuus*), yến mạch (*Avena sativa*), củ, như su hào (*Brassica*, chẳng hạn *oleraceae*), khoai tây (*Solanum*, chẳng hạn *tuberosum*) và các loại tương tự.

Theo một khía cạnh, axit nucleic và polypeptit theo sáng chế được biểu hiện trong hoặc được cài vào một loại thực vật hoặc hạt bất kỳ. Thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể là một lá mầm hoặc hai lá mầm. Ví dụ về thực vật chuyển gen một lá mầm theo sáng chế là cỏ, như cỏ đồng lầy (blue grass, *Poa*), cỏ chăn nuôi như *festuca*, *lolium*, cỏ ôn đới, như *Agrostis*, và ngũ cốc, chẳng hạn, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, đại mạch, lúa gạo, lúa miến, và ngô. Ví dụ thực vật chuyển gen hai lá mầm theo sáng chế là thuốc lá, đậu, như đậu lupin, khoai tây, củ cải đường, đậu hà lan, đậu và đậu tương, và cây họ cải (họ *Brassicaceae*), như hoa lơ, cải dầu, và các sinh vật gần giống *Arabidopsis thaliana*. Do đó, cây và hạt chuyển gen theo sáng chế gồm có nhiều loại cây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loại thuộc các giống *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glyxin*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panieum*, *Pannisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, và *Zea*.

Theo các phương án khác, axit nucleic theo sáng chế được biểu hiện trong thực vật có tế bào sợi, gồm có, chẳng hạn, bông, bông gòn (Kapok, *Ceiba pentandra*), liễu sa mạc, cây creosot, cỏ winterfat, cây balsa, gai, dâm bụt, gai dầu, cây roselle, đay, xizan và lanh. Theo các phương án khác, cây chuyển gen theo sáng chế có thể thuộc giống *Gossypium*, gồm có loài bất kỳ thuộc giống *Gossypium*, như *G. arboreum*; *G. herbaceum*, *G. barbadense*, và *G. hirsutum*.

Các hệ thống biểu hiện trong thực vật cũng như không thực vật bổ trợ có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Việc chọn lựa loài thực vật thường được quyết định chủ

yếu bởi mục đích sử dụng thực vật hoặc phần thực vật và khả năng thích ứng của thực vật với quá trình biến nạp.

Một vài kỹ thuật có sẵn để đưa cấu trúc biểu hiện chứa trình tự ADN mã hoá phytaza vào thực vật đích. Các kỹ thuật biến nạp các loài thực vật bậc cao đã được biết rõ và được mô tả trong các tài liệu khoa học và kỹ thuật. Chẳng hạn, tham khảo Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; US 5,750,870. Các kỹ thuật này cũng có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở biến nạp mô nguyên sinh sử dụng phương pháp canxi/polyetylen glycol, biến nạp điện và vi tiêm hoặc biến nạp các tiểu phần (được phủ) (Potrykus, 1990). Ngoài các phương pháp được gọi là biến nạp ADN trực tiếp trên, các hệ biến nạp bao gồm vectơ cũng được sử dụng rộng rãi, như vectơ virus (chẳng hạn virus khảm súp lơ (CaMV) và vectơ vi khuẩn (chẳng hạn từ giống *Agrobacterium*) (Potrykus, 1990). Sau khi chọn và/hoặc sàng lọc, các mô nguyên sinh, tế bào hoặc một phần thực vật đã được biến nạp có thể được tái sinh thành một cây hoàn chỉnh, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Horsch et al., 1985). Việc lựa chọn kỹ thuật biến nạp và/hoặc tái sinh không phải là then chốt đối với sáng chế.

Các cấu trúc axit nucleic và biểu hiện theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào thực vật bằng phương pháp bất kỳ. Theo các khía cạnh thực hiện sáng chế khác, thuật ngữ “đưa vào” trong ngữ cảnh một polynucleotit, chẳng hạn, một cấu trúc nucleotit cần quan tâm, dùng để chỉ việc đưa vào thực vật polynucleotit theo cách polynucleotit sẽ tăng cường sự liên kết với các thành phần bên trong tế bào thực vật. Khi nhiều hơn một polynucleotit được đưa vào, các polynucleotit này có thể được ghép nối với nhau như một phần của cấu trúc nucleotit đơn nhất, hoặc như các cấu trúc nucleotit riêng rẽ, và có thể được định vị trên cùng một vectơ biến nạp hoặc trên các vectơ biến nạp khác nhau. Do đó, các polynucleotit này có thể được đưa vào tế bào chủ cần quan tâm chỉ trong một lần biến nạp, trong các lần biến nạp riêng rẽ, hoặc, chẳng hạn, vào thực vật, như một phần của quá trình sinh sản. Các phương pháp theo sáng chế không phụ thuộc vào một phương pháp đưa một hoặc nhiều polynucleotit vào thực vật cụ thể nào, chỉ khi (các) polynucleotit gia tăng sự liên kết với bên trong ít nhất một tế bào thực vật. Các phương pháp đưa polynucleotit vào thực vật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp biến nạp tạm thời, phương pháp biến nạp ổn định, và phương pháp qua trung gian virus.

“Biến nạp tạm thời” có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và một số khía cạnh trong ngữ cảnh một polynucleotit dùng để chỉ polynucleotit được đưa vào thực vật và không kết hợp vào hệ gen của thực vật. “Đưa vào một cách ổn định” hoặc “được đưa vào một cách ổn định” trong ngữ cảnh một polynucleotit được đưa vào thực vật có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và theo một số khía cạnh thuật ngữ này dùng để chỉ polynucleotit được đưa vào kết hợp một cách ổn định vào hệ gen thực vật, và do vậy thực vật được biến nạp một cách ổn định polynucleotit.

“Biến nạp ổn định” hoặc “được biến nạp một cách ổn định” dùng để chỉ polynucleotit được đưa vào thực vật có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và theo một số khía cạnh dùng để chỉ một polynucleotit, chẳng hạn, một cấu trúc nucleotit được mô tả ở đây, được đưa vào thực vật sẽ kết hợp vào hệ gen của thực vật và có khả năng di truyền bằng các thế hệ sau của thực vật, cụ thể hơn, bằng sự di truyền của nhiều thế hệ liên tiếp nhau. Việc đưa vào hệ gen của một thực vật mong muốn có thể là một enzym được điều hoà bởi một yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã nội sinh. Các kỹ thuật biến nạp đối với cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Axit nucleic theo sáng chế có thể được dùng để tạo ra các tính trạng mong muốn trên hầu hết các loài thực vật. Theo một phương án, enzym theo sáng chế có thể được biểu hiện theo cách sao cho enzym không tiếp xúc với cơ chất của nó cho đến khi cần. Chẳng hạn, enzym theo sáng chế có thể được tác động và giữ lại trong lưới nội chất của tế bào thực vật. Việc giữ lại enzym, trong lưới nội chất của tế bào sẽ ngăn enzym tiếp xúc với cơ chất của nó. Enzym và cơ chất sau đó có thể được cho tiếp xúc với nhau bằng phương pháp bất kỳ có khả năng phá vỡ cấu trúc dưới tế bào, như, nghiền, xay, gia nhiệt, và các phương pháp tương tự. Tham khảo, WO 98/11235, WO 2003/18766, và WO 2005/096704, tất cả các tài liệu trên được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Gen chỉ thị có thể chọn lọc được có thể được kết hợp cùng với gen cấu trúc để xác định các tế bào thực vật hoặc mô đã được biến nạp thành công gen chuyển. Điều này có thể là cần thiết vì để đạt được quá trình kết hợp và biểu hiện gen trong các tế bào thực vật là một hiện tượng hiếm, chỉ xảy ra trong một vài phần trăm các tế bào hoặc mô được làm đích. Gen chỉ thị có thể chọn lọc được mã hoá protein tạo tính kháng với các hoạt

chất thường độc với thực vật, như kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ. Chỉ có các tế bào thực vật đã được biến nạp gen chỉ thị có thể chọn lọc được sẽ sống khi được nuôi cấy trên môi trường chứa kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ thích hợp. Các chỉ thị chọn lọc thường được sử dụng trong quá trình biến nạp gồm có gen nptII, tạo tính kháng với kanamycin và các kháng sinh liên quan (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et. al., *Nature* 304:184-187 (1983)), gen bar tạo tính kháng với thuốc diệt cỏ phosphinothrixin (White et. al., *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer et. al. *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)), gen hph, tạo tính kháng với kháng sinh hygromycin (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), gen dhfr tạo tính kháng với metotrexat (Bourouis et. al., *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), gen EPSPS tạo tính kháng với glyphosat (US 4,940,935 và 5,188,642),

Theo một cách khác, thực vật chuyển gen có thể được xác định qua một hệ thống chọn lọc dương tính, như, hệ thống sử dụng gen manozơ-6-phosphat isomeraza, tạo ra khả năng chuyển hoá manozơ (US 5,767,378 và 5,994,629).

Theo một khía cạnh, tạo thực vật hoặc hạt chuyển gen chứa các trình tự được đưa vào theo sáng chế và tùy ý, các gen chỉ thị vào một cấu trúc biểu hiện đích (chẳng hạn, plasmid), cùng với việc xác định vị trí của trình tự khởi đầu và yếu tố kết thúc. Điều này có thể bao gồm việc chuyển gen được cải biến vào thực vật bằng một phương pháp thích hợp. Một hoặc nhiều trình tự theo sáng chế có thể được kết hợp với các trình tự tạo tính kháng với côn trùng, bệnh, hạn hán, tăng sản lượng, nâng cao chất lượng dinh dưỡng của hạt, tăng sản lượng rượu và các đặc điểm tương tự.

Chẳng hạn, một cấu trúc có thể được đưa trực tiếp vào hệ gen ADN của tế bào thực vật sử dụng các kỹ thuật như biến nạp điện và vi tiêm vào mô nguyên sinh tế bào thực vật, hoặc các cấu trúc có thể được đưa trực tiếp vào mô thực vật sử dụng các phương pháp bắn, như bắn tiểu phần gắn ADN. Chẳng hạn, tham khảo Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, tài liệu này đề cập việc sử dụng phương pháp bắn tiểu phần để đưa các gen chuyển vào lúa mì; và Adam (1997) sách đã dẫn, đã đề cập việc sử dụng phương pháp bắn tiểu phần để đưa YAC vào tế bào thực vật. Chẳng hạn, Rinehart (1997) sách đã dẫn, đã sử dụng phương pháp bắn tiểu

phần để tạo ra cây bông chuyển gen. Các thiết bị để gia tốc cho các tiểu phần này được mô tả trong US 5,015,580; và, được bán sẵn trên thị trường là công cụ gia tốc tiểu phần BioRad (Biolistics) PDS-2000; tham khảo thêm, John, US 5,608,148; và Ellis, US 5,681,730, mô tả phương pháp biến nạp qua trung gian tiểu phần thực vật hạt trần.

Theo một khía cạnh, mô nguyên sinh có thể được cố định và được tiêm axit nucleic, chẳng hạn, cấu trúc biểu hiện. Mặc dù quá trình tái sinh thực vật từ mô nguyên sinh là không dễ với các cây ngũ cốc, quá trình tái sinh thực vật là có thể ở các cây họ đậu sử dụng phương pháp tạo phôi sinh dưỡng từ mô nguyên sinh thu được từ mô sẹo. Các mô được tổ chức có thể được biến nạp ADN trần sử dụng kỹ thuật súng bắn gen, trong đó ADN được phủ trên một đầu bắn siêu nhỏ bằng vonfram, có kích thước bằng 1/100 kích thước của tế bào, sẽ mang ADN vào sâu bên trong tế bào và các cơ quan tử. Mô được biến nạp sau đó được kích thích để tái sinh, thường bằng quá trình tạo phôi sinh dưỡng. Kỹ thuật này đã thành công ở một số loài ngũ cốc gồm có ngô và lúa.

Axit nucleic, chẳng hạn, các cấu trúc biểu hiện, cũng có thể được đưa vào tế bào thực vật sử dụng virus tái tổ hợp. Tế bào thực vật có thể được biến nạp bằng cách sử dụng vectơ virus, như, chẳng hạn, vectơ thu được từ virus khảm thuốc lá (Rouwendal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999), tham khảo Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants," *Mol. Biotechnol.* 5:209-221.

Theo một cách khác, axit nucleic, chẳng hạn, cấu trúc biểu hiện, có thể được kết hợp với các vùng cạnh T-ADN thích hợp và được đưa vào một vectơ chủ *Agrobacterium tumefaciens* thông thường. Hoạt động gây độc vật chủ *Agrobacterium tumefaciens* sẽ điều khiển quá trình chèn cấu trúc và các gen chỉ thị liền kề vào ADN tế bào thực vật khi tế bào bị nhiễm vi khuẩn. Kỹ thuật biến nạp qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*, bao gồm bất hoạt và sử dụng vectơ nhị phân, đã được mô tả trong các tài liệu khoa học. Tham khảo, chẳng hạn, Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springerlag, Berlin 1995). ADN trong một tế bào *A. tumefaciens* được chứa trong một nhiễm sắc thể vi khuẩn cũng như trong một cấu trúc khác được gọi là plasmid Ti (tumor-inducing). Plasmid Ti chứa một ADN thẳng được gọi là T-ADN (dài ~20kb) được chuyển vào tế bào thực vật trong quá trình gây nhiễm và một chuỗi các gen vir

(gen gây độc) kiểm soát quá trình gây nhiễm. *A. tumefaciens* chỉ có thể xâm nhiễm vào thực vật qua vết thương: khi rễ hoặc thân cây bị thương chúng sẽ tạo ra một số tín hiệu hoá học, để đáp ứng với điều đó, các gen vir của *A. tumefaciens* sẽ trở nên hoạt động và điều khiển một loạt các sự kiện cần thiết để chuyển T-ADN từ plasmit Ti vào nhiễm sắc thể của thực vật. T-ADN sau đó sẽ xâm nhập vào tế bào thực vật qua vết thương. Một suy đoán là T-ADN sẽ đợi cho đến khi ADN thực vật đang được sao chép hoặc phiên mã, sau đó sẽ tự chèn vào ADN của thực vật khi duỗi ra. Để sử dụng *A. tumefaciens* như một vectơ chuyển gen, vùng Ti của T-ADN cần được loại bỏ, trong khi vẫn giữ lại vùng biên T-ADN và các gen vir. Gen chuyển sau đó sẽ được chèn vào giữa các vùng biên T-ADN, khi gen được chuyển vào tế bào thực vật và kết hợp với nhiễm sắc thể của thực vật.

Sáng chế đề xuất quá trình biến nạp cây một lá mầm sử dụng axit nucleic theo sáng chế, gồm có các loại ngũ cốc quan trọng, tham khảo Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35:205-218. Tham khảo, chẳng hạn, Horsch, Science (1984) 233:496; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:4803; Thykjaer (1997) sách đã dẫn; Park (1996) Plant Mol. Biol. 32:1135-1148, đề cập đến quá trình kết hợp của T-ADN vào hệ gen ADN. Tham khảo D'Halluin, US 5,712,135, mô tả quá trình kết hợp ổn định của một phân tử ADN chứa gen hoạt động trong một tế bào ngũ cốc, hoặc các cây một lá mầm khác.

Theo một khía cạnh, bước thứ ba có thể bao gồm việc chọn lọc và tái sinh cây hoàn chỉnh có khả năng truyền gen đích được kết hợp sang thế hệ sau. Các kỹ thuật tái sinh này dựa trên việc điều khiển một số hormone thực vật trong môi trường nuôi cấy mô, thường phụ thuộc vào chỉ thị bioxít và/hoặc chỉ thị diệt cỏ được đưa vào cùng với các trình tự nucleotit mong muốn. Việc tái sinh thực vật từ mô nguyên sinh được nuôi cấy được mô tả trong Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; và Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Quá trình tái sinh có thể được thực hiện từ mô sẹo thực vật, mảnh cây, cơ quan, hoặc một phần thực vật. Các kỹ thuật tái sinh này được mô tả khái quát trong Klee (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486. Để thu được cây hoàn chỉnh từ các mô chuyển gen như phôi chưa hoàn thiện, chúng có thể được nuôi cấy ở các điều kiện môi trường được kiểm soát trong một loạt các môi trường chứa chất dinh dưỡng và hormone, một quá trình

được gọi là nuôi cấy mô. Khi cây hoàn chỉnh được tái sinh và tạo hạt, việc tính toán các thế hệ sau bắt đầu.

Theo một khía cạnh, sau khi catxet biểu hiện được đưa vào một cách ổn định vào thực vật chuyển gen, nó có thể được đưa vào các cây khác bằng cách thụ phấn chéo. Một số lượng không hạn chế các phương pháp sinh sản có thể sử dụng được, phụ thuộc vào loài cần thụ phấn chéo. Tham khảo, chẳng hạn, Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY (1981); Crop Breeding, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Second Edition, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY (1986); và Wricke and Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter và Co., Berlin (1986).

Theo một khía cạnh, vì quá trình biểu hiện chuyển gen axit nucleic theo sáng chế sẽ dẫn đến các thay đổi về kiểu hình, thực vật chứa axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế có thể được thụ phấn chéo với một thực vật thứ hai để thu được sản phẩm thứ hai. Do đó, hạt theo sáng chế có thể thu được từ quá trình thụ phấn chéo giữa hai thực vật chuyển gen theo sáng chế, hoặc từ quá trình thụ phấn chéo giữa thực vật theo sáng chế và một thực vật khác. Các tác dụng mong muốn (chẳng hạn, quá trình biểu hiện polypeptit theo sáng chế để tạo thực vật trong đó tập tính nở hoa đã được cải biến) có thể được tăng cường khi cả hai cây bố mẹ đều biểu hiện polypeptit (chẳng hạn, phytaza) theo sáng chế. Các tác dụng mong muốn có thể được truyền qua các thế hệ thực vật tiếp theo bằng các kỹ thuật nhân giống tiêu chuẩn.

Đối với các cây hai lá mầm, vector nhị phân có thể được sử dụng (Hoekema et al., 1983; EP 0120516 Schilperoort et al.). Chẳng hạn, các chủng *Agrobacterium* có thể được sử dụng chứa plasmid *vir* với các gen gây độc và một plasmid tương hợp chứa cấu trúc gen cần chuyển. Vector này có thể sao chép trong cả *E. coli* và trong *Agrobacterium*, và thu được từ vector nhị phân Bin19 (Bevan, 1984) được cải biến chi tiết không tương quan đối với sáng chế. Vector nhị phân như được sử dụng trong ví dụ này chứa giữa các trình tự biên trái và biên phải cấu trúc T-ADN, một gen NPTII tương đồng mã hoá tính

kháng kanamycin (Bevan, 1984) và một vị trí đa tách dòng trong các cấu trúc gen cần thiết.

Quá trình biến nạp và tái sinh các cây trồng một lá mầm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp hoặc thủ thuật tiêu chuẩn bất kỳ; các cây một lá mầm có thể biến nạp và thực vật chuyển gen hữu thụ có thể được tái sinh từ tế bào biến nạp. Theo một khía cạnh khác, các cây một lá mầm được biến nạp bằng kỹ thuật biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*.

Theo một khía cạnh, lúa chuyển gen có thể thu được bằng cách sử dụng gen hph của vi khuẩn, mã hoá tính kháng hygromycin, như một chỉ thị chọn lọc; gen này có thể được đưa vào bằng phương pháp biến nạp điện. Theo một khía cạnh, ngô chuyển gen có thể thu được bằng cách đưa vào gen bar của *Streptomyces hygroscopicus*, gen này mã hoá phosphinothricin acetyltransferase (enzym bất hoạt thuốc diệt cỏ phosphinothricin), vào các tế bào tạo phôi trong môi trường hỗn dịch nuôi cấy ngô bằng cách biến nạp vi tiểu phần. Theo một khía cạnh, nguyên liệu di truyền có thể được đưa vào mô nguyên sinh aloron của cây một lá mầm như lúa mì và đại mạch. Theo một khía cạnh, lúa mì được tái sinh từ hỗn dịch nuôi cấy tạo phôi bằng cách chỉ chọn lọc mô sẹo khỏi già và mô sẹo tạo phôi có mẫu để thiết lập hỗn dịch nuôi cấy phôi. Theo một khía cạnh, việc kết hợp với các hệ thống biến nạp đối với các thực vật này sẽ cho phép việc ứng dụng sáng chế vào các cây một lá mầm. Các phương pháp này và phương pháp khác cũng có thể được ứng dụng đối với quá trình biến nạp và tái sinh cây hai lá mầm.

Trong quá trình thực hiện sáng chế, việc biểu hiện cấu trúc phytaza bao gồm quá trình phiên mã gen bằng polymerase của thực vật, dịch mã mRNA, v.v. đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Một số chi tiết liên quan với việc thực hiện một số phương án theo sáng chế đã được nêu ở đây. Các trình tự điều hoà được biết hoặc được phát hiện là gây ra quá trình biểu hiện phytaza có thể được sử dụng theo sáng chế. Việc lựa chọn các trình tự điều hoà được sử dụng phụ thuộc vào thực vật đích và/hoặc cơ quan đích cần quan tâm. Các trình tự điều hoà này có thể thu được từ thực vật hoặc virus thực vật, hoặc có thể được tổng hợp hoá học. Các trình tự điều hoà này là các trình tự khởi đầu có hoạt tính trong việc kiểm soát quá trình phiên mã trong thực vật, hoặc liên tục hoặc theo giai đoạn và/hoặc đặc hiệu mô, phụ

thuộc vào việc sử dụng thực vật hoặc phần thực vật. Các trình tự khởi đầu này gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu thể hiện quá trình biểu hiện liên tục, như trình tự khởi đầu 35S của virus khảm súp lơ (CaMV) (Guilley et al., 1982), các trình tự khởi đầu biểu hiện đặc hiệu với lá, như trình tự khởi đầu của gen dưới đơn vị nhỏ ribulosa biphosphat carboxylaza (Coruzzi et al., 1984), trình tự khởi đầu đặc hiệu biểu hiện ở rễ, như trình tự khởi đầu của gen glutamin synthaza (Tingey et al., 1987), trình tự khởi đầu đặc hiệu biểu hiện ở hạt, như trình tự khởi đầu cruciferin của *Brassica napus* (Ryan et al., 1989), trình tự khởi đầu đặc hiệu biểu hiện ở củ, như trình tự khởi đầu patatin cấp 1 ở khoai tây (Koster-Topfer et al., 1989; Wenzler et al., 1989) hoặc trình tự khởi đầu đặc hiệu biểu hiện ở quả, như trình tự khởi đầu polygalacturonaza (PG) của cà chua (Bird et al., 1988).

Các trình tự điều hoà khác như trình tự yếu tố kết thúc và trình tự tín hiệu polyadenyl hoá có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và gồm có trình tự bất kỳ hoạt động trong thực vật, việc lựa chọn các trình tự này đã được biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các trình tự này là vùng bên 3' của gen nopal synthaza (nos) của *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, sách đã dẫn). Các trình tự điều hoà cũng có thể chứa các trình tự yếu tố tăng cường biểu hiện, được tìm thấy trong trình tự khởi đầu 35S của CaMV, và trình tự ổn định mRNA như trình tự dẫn đầu của ARN4 của virus khảm cỏ linh lăng (AIMV) (Brederode et al., 1980) hoặc các trình tự hoạt động theo cách tương tự.

Theo một số phương án, phytaza theo sáng chế được biểu hiện trong môi trường ổn định đối với protein được biểu hiện. Việc lựa chọn các ngăn tế bào, như bào tương, lưới nội chất, không bào, thể protein hoặc khoang chu chất có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra các môi trường ổn định, phụ thuộc vào các tham số sinh lý của phytaza. Các tham số này gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, pH tối ưu, độ nhạy cảm với proteaza hoặc độ nhạy cảm với nồng độ phân tử của ngăn tế bào được ưu tiên.

Theo một số phương án, phytaza theo sáng chế được biểu hiện trong tế bào chất; theo một số khía cạnh, để thu được quá trình biểu hiện trong tế bào chất của tế bào, enzym được biểu hiện không nên chứa peptit tín hiệu tiết hoặc một trình tự đích bất kỳ. Để biểu hiện trong lục lạp và ty thể, enzym được biểu hiện cần chứa một peptit vận

chuyển đặc hiệu để có thể đi vào các cơ quan tử này. Các trình tự đích có thể được gắn vào enzym cần quan tâm để thực hiện điều này đã được biết (Smeekens et al., 1990; van den Broeck et al., 1985; Wolter et al., 1988). Nếu muốn enzym hoạt động trong không bào, một peptit tín hiệu tiết cần có mặt, cũng như một trình tự đích đặc hiệu hướng enzym vào không bào (Tague et al., 1990). Điều tương tự cũng đúng với các thể protein trong hạt. Trình tự ADN mã hoá enzym cần quan tâm cần được cải biến theo cách sao cho enzym có thể hoạt động ở vị trí mong muốn trong tế bào.

Theo một số phương án, để đạt được quá trình biểu hiện phytaza ngoại bào, cấu trúc biểu hiện theo sáng chế sử dụng một trình tự tín hiệu tiết. Mặc dù, các trình tự tín hiệu tương đồng (cùng nguồn gốc) với thực vật có thể được ưu tiên, nhưng các trình tự tín hiệu khác loại, nghĩa là các trình tự có nguồn gốc từ các loài thực vật khác hoặc vi khuẩn cũng có thể sử dụng được. Các trình tự tín hiệu này đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự tín hiệu thích hợp có thể được sử dụng theo sáng chế được đề cập trong Blobel et al., 1979; Von Heijne, 1986; Garcia et al., 1987; Sijmons et al., 1990; Ng et al., 1994; và Powers et al., 1996).

Theo một số phương án, tất cả các phần của cấu trúc ADN tương đương (trình tự khởi đầu, các trình tự điều hoà, tiết, ổn định, hướng, hoặc kết thúc) theo sáng chế sẽ được cải biến, nếu cần, để tác động vào đặc tính kiểm soát bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thực vật chứa phytaza thu được theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo thực vật hoặc cơ quan của thực vật với nồng độ phytaza cao hơn. Chẳng hạn, có thể thu được những thực vật hoặc cơ quan của thực vật bằng cách sử dụng kỹ thuật biến dị nhân dòng sinh dưỡng hoặc bằng kỹ thuật thụ phấn chéo. Các kỹ thuật này đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của các phương pháp này) để thu được các hệ thống biểu hiện vượt mức hiệu quả cao đối với phytaza và các phân tử khác. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của phương pháp) để thu được các hệ thống biểu hiện vượt mức hiệu quả cao đối với phytaza và axit phosphataza pH 2,5 trong *Trichoderma*. Hệ thống này sẽ tạo ra các chế phẩm enzym có các lợi ích đặc biệt trong công nghiệp chế biến thức ăn gia súc. Các chi tiết

thêm về phương pháp này có trong các tài liệu đã công bố và/hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, các tài liệu đã công bố gồm có EP 0659215 (W0 9403612 A1) (Nevalainen et al.), mặc dù tài liệu này không đề cập đến các phân tử mới trong đơn sáng chế này.

Theo một số phương án, sáng chế sử dụng quá trình tái sắp xếp trong cơ thể, có thể được tập trung vào các quá trình “nội phân tử” được gọi chung là “quá trình tái tổ hợp”, trong vi khuẩn có thể là hiện tượng “phụ thuộc RecA”. Sáng chế có thể dựa trên quá trình tái tổ hợp của tế bào chủ để tái tổ hợp và tái sắp xếp các trình tự, hoặc khả năng của các tế bào xúc tác các quá trình để làm giảm mức độ phức tạp của các trình tự gần như lặp lại trong tế bào bằng cách loại bỏ. Quá trình “tái sắp xếp loại bỏ này” xảy ra bằng một quá trình “nội phân tử”, quá trình độc lập RecA.

Do đó, theo một khía cạnh khác theo sáng chế, polynucleotit biến thể có thể được tạo ra bằng quá trình tái sắp xếp loại bỏ. Phương pháp này gồm tạo ra các cấu trúc chứa các trình tự liên tiếp (trình tự mã hoá gốc), chèn vào một vectơ thích hợp, và tiếp theo là đưa vào một tế bào chủ thích hợp. Việc tái sắp xếp các phân tử tương đồng riêng rẽ hình thành bằng các quá trình tổ hợp giữa các trình tự liên nhau trong cấu trúc có các vùng tương đồng, hoặc giữa các đơn vị gần như lặp lại. Quá trình tái sắp xếp sẽ tái tổ hợp và/hoặc làm giảm mức độ phức tạp và quy mô của các trình tự lặp lại, và tạo ra các phân tử mới. Có thể sử dụng các cách xử lý khác nhau để gia tăng mức độ tái sắp xếp. Các cách xử lý này gồm có xử lý bằng ánh sáng tử ngoại, hoặc các chất hóa học phá huỷ ADN, và/hoặc sử dụng các dòng tế bào chủ thực hiện mức độ “bất ổn định di truyền” cao. Do đó, quá trình tái sắp xếp có thể bao gồm việc tái tổ hợp tương đồng hoặc đặc tính tự nhiên của các trình tự gần như lặp lại để thực hiện quá trình tự tiến hoá.

Sáng chế có thể sử dụng các trình tự lặp lại hoặc “gần như lặp lại”; các trình tự này đóng vai trò tạo tính bất ổn định di truyền. Theo sáng chế, các cấu trúc “gần như lặp lại” là các môtip không giới hạn ở đơn vị cấu trúc nguyên gốc. Các đơn vị gần như lặp lại có thể có trong một dãy các trình tự trong một cấu trúc; các đơn vị liên tiếp nhau trong các trình tự tương đồng. Khi đã được nối với nhau, các liên kết giữa các trình tự liên kế trở nên gần như không phân biệt được và đặc tính gần như lặp lại của cấu trúc hình thành trở thành liên tục ở mức độ phân tử. Quá trình loại bỏ mà tế bào thực hiện để

giảm mức độ phức tạp của cấu trúc hình thành hoạt động giữa các trình tự gần như lặp lại. Các đơn vị gần như lặp lại sẽ tạo ra một kho không hạn chế về mặt thực nghiệm các phân tử khuôn để sau đó các hiện tượng slippage có thể xảy ra. Các cấu trúc chứa các đoạn gần như lặp lại do vậy sẽ tạo ra độ đàn hồi phân tử đủ một cách hiệu quả để các hiện tượng loại bỏ (và quá trình chèn đoạn có thể có) có thể xảy ra gần như ở mọi vị trí trong các đơn vị gần như lặp lại.

Theo một số khía cạnh, khi tất cả các trình tự gần như lặp lại được nối với nhau theo cùng một hướng, chẳng hạn từ đầu đến cuối hoặc ngược lại, tế bào không thể phân biệt được các đơn vị riêng rẽ. Do đó, quá trình loại bỏ có thể xảy ra trong toàn bộ các trình tự. Ngược lại, khi chẳng hạn, các đơn vị có ở hai đầu, chứ không phải là từ đầu đến đuôi, quá trình đảo đoạn sẽ xác định các điểm cuối của các đơn vị kề nhau sao cho quá trình loại bỏ sẽ thiên về việc loại bỏ các đơn vị rời rạc. Do đó, theo một khía cạnh theo sáng chế, các trình tự sẽ ở cùng một hướng. Sự sắp xếp ngẫu nhiên của các trình tự gần như lặp lại sẽ làm mất hiệu quả của việc tái sắp xếp, trong khi sự sắp xếp thích hợp các trình tự sẽ tạo ra hiệu quả cao nhất. Tuy nhiên, trong khi có ít hơn các trình tự liên kề trong cùng một hướng sẽ làm giảm hiệu quả, thì sự sắp xếp ngẫu nhiên vẫn có thể tạo ra tính đàn hồi phân tử đủ để tạo ra các phân tử mới một cách hiệu quả. Các cấu trúc có thể được tạo ra với các trình tự gần như lặp lại theo cùng một hướng để tạo ra hiệu quả cao hơn.

Các trình tự có thể được nối với nhau theo hướng từ đầu đến đuôi bằng cách sử dụng các phương pháp bất kỳ, gồm:

(a) Có thể sử dụng các đoạn môi có đầu poly-A và đuôi poly-T ở dạng sợi đơn sẽ tạo ra hướng sắp xếp. Điều này được thực hiện bằng cách tạo một vài bazơ đầu tiên của đoạn môi được tạo từ ARN và do đó có thể dễ dàng được loại bỏ bằng ARNaza H.

(b) Có thể sử dụng các đoạn môi chứa các vị trí cắt giới hạn duy nhất. Nhiều vị trí, một loạt các trình tự duy nhất, và tổng hợp lặp lại và nối là cần thiết.

(c) Một vài bazơ bên trong của đoạn môi có thể được thiol hoá và một enzym exonucleaza sẽ được sử dụng để tạo ra các phân tử có đuôi thích hợp.

Theo một số khía cạnh, việc khôi phục các trình tự được tái sắp xếp phụ thuộc vào quá trình xác định vector nhân dòng với RI bị loại bỏ. Trình tự mã hoá được tái sắp xếp sau đó có thể được khôi phục bằng cách khuếch đại. Các sản phẩm sẽ được tái tách dòng và biểu hiện. Việc khôi phục vector nhân dòng có RI bị loại bỏ có thể được tác động bằng cách:

- 1) Sử dụng vector chỉ được duy trì ổn định khi cấu trúc bị giảm mức độ phức tạp;
- 2) Khôi phục cơ học vector được làm ngắn bằng các phương pháp vật lý. Trong trường hợp này, vector nhân dòng sẽ được khôi phục bằng cách sử dụng các phương pháp phân lập plasmid chuẩn và được phân đoạn theo kích thước trên gel agarosa, hoặc cột với việc loại bỏ các đoạn có trọng lượng phân tử nhỏ sử dụng các phương pháp chuẩn;
- 3) Khôi phục vector chứa các gen bị gián đoạn có thể được chọn lọc khi kích thước đoạn chèn giảm xuống; và
- 4) Sử dụng kỹ thuật chọn lọc có định hướng với vector biểu hiện và quá trình chọn lọc thích hợp.

Các trình tự mã hoá (chẳng hạn, gen) từ các sinh vật có quan hệ với nhau có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế, và chúng có thể có mức độ tương đồng cao và mã hoá các sản phẩm protein hoàn toàn khác nhau. Các kiểu trình tự này đặc biệt hữu ích theo sáng chế làm các cấu trúc gần như lặp lại. Tuy nhiên, trong khi các phương pháp thử nghiệm nêu dưới đây cho thấy sự tái sắp xếp các trình tự mã hoá nguyên gốc gần như tương đồng (gần như lặp lại), thì quá trình này không chỉ bị giới hạn ở các đoạn lặp lại gần như tương đồng này.

Khi đã hình thành, các cấu trúc này có thể hoặc không được phân đoạn kích thước trên gel agarosa theo các phương pháp đã được công bố, chèn vào vector nhân dòng, và chuyển nhiễm vào một tế bào chủ thích hợp. Các tế bào sau đó sẽ được nhân giống và xảy ra tác động “tái sắp xếp loại bỏ”. Tốc độ của quá trình tái sắp xếp loại bỏ có thể được kích thích bằng cách phá huỷ ADN nếu cần. Nếu quá trình loại bỏ trong RI được xúc tác bởi quá trình hình thành các mất đoạn giữa các trình tự lặp lại bởi một cơ chế “nội phân tử”, hoặc được xúc tác bởi các hiện tượng giống tái tổ hợp thông qua các cơ

chế “nội phân tử” là không quan trọng. Kết quả cuối cùng là có thể có sự tái sắp xếp các phân tử vào các tổ hợp.

Theo một khía cạnh, các phương pháp theo sáng chế bao gồm một bước sàng lọc hỗ trợ các thành viên trong thư viện trong bể gen được xáo trộn để xác định các thành viên riêng rẽ có khả năng liên kết hoặc tương tác, hoặc xúc tác một phản ứng cụ thể (chẳng hạn, như xúc tác quá trình thủy phân phytat).

Theo một khía cạnh, polypeptit được xác định từ các thư viện mà có thể được sử dụng nhằm mục đích điều trị, chẩn đoán, nghiên cứu và các mục đích liên quan (chẳng hạn, chất xúc tác, chất tan để gia tăng nồng độ osmol/l của một dung dịch nước và các mục đích tương tự), và/hoặc có thể được tiến hành một hoặc nhiều chu trình xáo trộn và/hoặc chọn lọc.

Theo một khía cạnh khác, trước khi hoặc trong quá trình tái tổ hợp hoặc tái sắp xếp, polynucleotit theo sáng chế hoặc polynucleotit được tạo ra theo phương pháp được mô tả ở đây có thể được tiến hành phản ứng với các hóa chất hoặc các quá trình thúc đẩy việc đưa các đột biến vào polynucleotit nguyên gốc. Việc đưa các đột biến này sẽ làm gia tăng độ đa dạng của polynucleotit lai hình thành và từ đó làm tăng mức độ đa dạng của polypeptit. Các chất hoặc quá trình thúc đẩy quá trình gây đột biến gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở: (+)-CC-1065, hoặc đồng phân tổng hợp như (+)-CC-1065-(N3-Adenin, tham khảo Sun và Hurley, 1992); sản phẩm cộng 4'-flo-4-aminobiphenyl được axetyl hoá hoặc được khử axetyl hoá đầu N có khả năng ức chế quá trình tổng hợp ADN (tham khảo, chẳng hạn, Van de Poll et al., 1992); hoặc sản phẩm cộng 4-aminobiphenyl được axetyl hoá hoặc được khử axetyl hoá đầu N có khả năng ức chế quá trình tổng hợp ADN (tham khảo, Van de Poll et al., 1992, pp. 751-758); crom hóa trị ba, muối crom hóa trị ba, sản phẩm cộng ADN hydrocacbon thơm đa vòng (“PAH”) có khả năng ức chế quá trình sao chép ADN, như 7-brommetyl-benz[*a*]anthracen (“BMA”), tris(2,3--dibrompropyl)phosphat (“Tris-BP”), 1,2-dibrom-3-clopropan (“DBCP”), 2-bromacrolein (2BA), benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9-10-epoxit (“BPDE”), muối halogen platin (II), N-hydroxy-2-amino-3-metylimidazo[4,5-*f*]-quinolin (“N-hydroxy-IQ”), và N-hydroxy-2-amino-1-metyl-6-phenylimidazo[4,5-*f*--pyridin (“N-hydroxy-PhIP”). Một phương pháp thử nghiệm để làm chậm hoặc dừng quá

trình khuếch đại bằng PCR gồm tia UV (+)-CC-1065 và (+)-CC-1065-(N3-Adenin). Các chất được đề xuất cụ thể là các sản phẩm cộng ADN adducts hoặc polynucleotit chứa các sản phẩm cộng ADN từ polynucleotit hoặc bề polynucleotit, có thể được giải phóng hoặc loại bỏ bằng quá trình gia nhiệt dung dịch chứa polynucleotit trước khi tiến hành các quá trình tiếp theo.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp có hoạt tính sinh học bằng cách xử lý mẫu chứa polynucleotit khuôn sợi kép mã hoá protein kiểu đại trong điều kiện theo sáng chế để tạo ra polynucleotit lai hoặc được tái sắp xếp.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các đoạn môi bộ ba mã hóa đặc biệt (chứa trình tự thoái hoá N,N,G/T) để đưa các đột biến điểm vào một polynucleotit, để tạo ra một tập hợp polypeptit trong đó có đầy đủ các thay thế một axit amin tại mỗi vị trí axit amin (gây đột biến bão hoà tại chỗ (GSSM)). Các oligo được sử dụng chứa liên liên tục một trình tự tương đồng thứ nhất, trình tự thoái hoá N,N,G/T, và tùy ý, một trình tự tương đồng thứ hai. Sản phẩm dịch mã theo hướng xuôi dòng hình thành từ việc sử dụng các oligo như vậy bao gồm tất cả các thay đổi axit amin có thể có tại mỗi vị trí axit amin dọc theo polypeptit, vì tính thoái hoá của trình tự N,N,G/T sẽ bao gồm các bộ ba mã hóa cho tất cả 20 axit amin.

Theo một khía cạnh, một oligo thoái hoá như vậy (gồm một catxet N,N,G/T thoái hoá) được sử dụng để gây đột biến từng bộ ba mã hóa nguyên gốc trong phân tử polynucleotit khuôn. Theo một khía cạnh khác, ít nhất hai catxet N,N,G/T thoái hoá được sử dụng – hoặc trong cùng một oligo hoặc không, để gây đột biến thay thế ít nhất hai bộ ba mã hóa gốc trong trình tự polynucleotit khuôn thành tất cả các đột biến thay thế bộ ba mã hóa. Do đó, nhiều hơn một trình tự N,N,G/T có thể có trong một oligo để đưa các đột biến axit amin tại nhiều hơn một vị trí. Đa số các trình tự N,N,G/T này có thể liên kề ngay sát nhau, hoặc được phân tách bởi một hoặc nhiều trình tự nucleotit hỗ trợ. Theo một khía cạnh khác, các oligo có vai trò trong việc tạo ra các đột biến thêm đoạn và mất đoạn có thể được sử dụng độc lập hoặc tổ hợp với các bộ ba mã hóa chứa một trình tự N,N,G/T, để đưa một tổ hợp hoặc hoán vị đột biến thêm, mất, và/hoặc thay thế axit amin bất kỳ vào phân tử.

Theo một khía cạnh, có thể đồng thời gây đột biến hai hoặc nhiều hơn hai vị trí axit amin liên nhau sử dụng oligo chứa các bộ ba N,N,G/T liên nhau, nghĩa là một trình tự $(N,N,G/T)_n$ thoái hoá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng catxet thoái hoá có độ thoái hoá thấp hơn so với trình tự N,N,G/T. Chẳng hạn, trong một số trường hợp có thể sử dụng (chẳng hạn trong một oligo) một trình tự bộ ba thoái hoá chỉ gồm có một N, trong đó N có thể ở vị trí thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của bộ ba. Có thể sử dụng bazo nào trong hai vị trí còn lại của bộ ba. Theo một cách khác, trong một số trường hợp có thể sử dụng (chẳng hạn, trong một oligo) một trình tự bộ ba N,N,N thoái hoá, hoặc một trình tự bộ ba N,N, G/C thoái hoá.

Tuy nhiên, cần biết rằng việc sử dụng trình tự bộ ba thoái hoá (như N,N,G/T hoặc N,N, G/C) như đã nêu là ưu việt vì một số lý do. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra một cách khá dễ dàng và toàn diện các đột biến thay thế tất cả các axit amin có thể (tổng số là 20 axit amin) vào từng vị trí axit amin trong một polypeptit. Do đó, đối với một polypeptit 100 axit amin, có thể tạo ra 2000 kiểu khác nhau (nghĩa là 20 axit amin có thể có/một vị trí $\times$ 100 vị trí axit amin). Qua việc sử dụng một oligonucleotit hoặc một nhóm các oligonucleotit chứa trình tự bộ ba N,N,G/T thoái hoá, 32 trình tự riêng lẻ có thể mã hoá tất cả 20 axit amin tự nhiên có thể có. Do đó, trong một mạch phản ứng trong đó một trình tự polynucleotit gốc được tiến hành gây đột biến bão hoà bằng cách sử dụng ít nhất một oligonucleotit như vậy, sẽ có 32 polynucleotit khác nhau được tạo ra mã hoá 20 polypeptit khác nhau. Ngược lại, việc sử dụng một oligonucleotit không thoái hoá trong quá trình gây đột biến tại chỗ có định hướng chỉ tạo ra một sản phẩm polypeptit/lần phản ứng.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các oligo không thoái hoá, có thể tuỳ ý được sử dụng kết hợp với các đoạn mồi được đề cập. Có thể thấy rằng trong một số trường hợp, là thuận lợi khi sử dụng các oligo không thoái hoá để tạo ra các đột biến điểm đặc hiệu trong polynucleotit hoạt động. Điều này sẽ cung cấp một phương pháp tạo các đột biến điểm bất hoạt đặc hiệu, các đột biến điểm dẫn đến sự thay đổi axit amin tương ứng, và các đột biến điểm tạo các bộ ba mã hóa kết thúc và quá trình biểu hiện tương ứng các đoạn polypeptit.

Do đó, theo một khía cạnh, mỗi phản ứng gây đột biến bão hoà chứa polynucleotit mã hoá ít nhất 20 phân tử polypeptit thể hệ sau sao cho tất cả 20 axit amin tự nhiên được thể hiện tại một vị trí axit amin đặc hiệu tương ứng với vị trí bộ ba mã hóa được gây đột biến trong trình tự gốc. Các polypeptit sản phẩm thoái hoá gấp 32 lần từ mỗi phản ứng gây đột biến bão hoà có thể được tiến hành khuếch đại nhân dòng (chẳng hạn được tách dòng vào một tế bào chủ thích hợp, chẳng hạn, tế bào *E. coli*, sử dụng, chẳng hạn, một vector biểu hiện) và tiến hành sàng lọc biểu hiện. Khi một polypeptit sản phẩm riêng rẽ được xác định bằng quá trình sàng lọc để biểu hiện một thay đổi về đặc tính có lợi (khi được so sánh với polypeptit gốc), nó có thể được đọc trình tự để xác định các thay thế axit amin có lợi tương ứng trong đó.

Có thể nhận thấy rằng trong quá trình gây đột biến từng vị trí axit amin trong trình tự polypeptit gốc sử dụng gây đột biến bão hoà được đề cập ở đây, các thay đổi axit amin có lợi có thể được xác định ở nhiều hơn một vị trí axit amin. Một hoặc nhiều các phân tử sản phẩm mới có thể được tạo ra chứa tổ hợp của tất cả hoặc một phần các thay thế axit amin có lợi này. Chẳng hạn, nếu 2 thay đổi axit amin đặc hiệu có lợi trong mỗi 3 vị trí axit amin trong một polypeptit, các hoán vị bao gồm 3 khả năng tại mỗi vị trí (không thay đổi so với axit amin gốc, và mỗi cặp thay đổi có lợi) và 3 vị trí. Do đó, sẽ có $3 \times 3 \times 3$ hoặc 27 tổng khả năng, gồm có 7 khả năng đã được khảo sát trước đó - 6 đột biến điểm đơn (nghĩa là 2 khả năng tại mỗi vị trí trong ba vị trí) và không có thay đổi nào tại một vị trí bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác nữa, gây đột biến bão hoà tại chỗ có thể được sử dụng cùng với các quá trình gây đột biến như xáo trộn, khám, tái tổ hợp và các quá trình gây đột biến khác, cùng với sàng lọc. Sáng chế đề xuất việc sử dụng (các) quá trình gây đột biến bất kỳ, gồm có gây đột biến bão hoà, theo kiểu lặp. Ví dụ, việc sử dụng lặp (các) quá trình gây đột biến bất kỳ sẽ được kết hợp với sàng lọc.

Do đó, trong một ví dụ không hạn chế, sáng chế đề xuất việc sử dụng quá trình gây đột biến bão hoà kết hợp với các quá trình gây đột biến khác, như quá trình trong đó hai hoặc nhiều hơn hai polynucleotit có liên quan được đưa vào một tế bào chủ thích hợp sao cho một polynucleotit lai được tạo ra bằng cách tái tổ hợp và tái sắp xếp loại bỏ.

Ngoài việc gây đột biến dọc theo toàn bộ trình tự của một gen, còn có thể sử dụng quá trình gây đột biến để thay thế các bazơ trong trình tự polynucleotit, trong đó số lượng bazơ cần gây đột biến, trong đó số lượng các bazơ cần gây đột biến là một số nguyên từ 15 đến 100.000. Do đó, thay vì gây đột biến từng vị trí dọc theo phân tử, có thể tiến hành gây đột biến từng bazơ hoặc một số bazơ rời rạc (theo một khía cạnh một tập con từ 15 đến 100.000). Một nucleotit riêng rẽ sẽ được sử dụng để gây đột biến từng vị trí hoặc một số vị trí dọc theo trình tự polynucleotit. Một nhóm gồm có 3 vị trí cần gây đột biến có thể là một bộ ba mã hóa. Các đột biến có thể được đưa vào bằng cách sử dụng một đoạn mồi gây đột biến, chứa một catxet khác loại, còn được gọi là catxet gây đột biến. Các catxet thử nghiệm có thể có từ 1 đến 500 bazơ. Mỗi vị trí nucleotit trong một catxet khác loại như vậy có thể là N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, hoặc E, trong đó E là một bazơ bất kỳ không phải là A, C, G, hoặc T (E có thể được gọi là oligo thiết kế).

Theo nghĩa thông thường, đột biến bão hoà là gây đột biến một một tập hợp đầy đủ các catxet gây đột biến (trong đó mỗi catxet, theo một khía cạnh có chiều dài khoảng từ 1 đến 500 bazơ) trong một trình tự polynucleotit xác định cần gây đột biến (trong đó trình tự cần gây đột biến, theo một khía cạnh, có chiều dài từ khoảng 15 đến 100.000 bazơ). Do đó, một nhóm các đột biến (thay đổi từ 1 đến 100 đột biến) sẽ được đưa vào mỗi catxet cần gây đột biến. Một nhóm các đột biến cần được đưa vào trong một catxet có thể là khác nhau hoặc tương tự so với nhóm các đột biến thứ hai cần đưa vào catxet thứ hai trong quá trình tiến hành một vòng gây đột biến bão hoà. Việc phân nhóm như vật đã được minh họa bằng các đột biến mất đoạn, thêm đoạn, phân nhóm các bộ ba mã hóa và phân nhóm các catxet nucleotit cụ thể.

Các trình tự được xác định là cần gây đột biến gồm có một gen toàn vẹn, chu trình, ADN bổ trợ, khung đọc mở toàn vẹn (ORF) và trình tự khởi đầu toàn vẹn, yếu tố tăng cường biểu hiện, tác nhân chất ức chế/chuyển hoạt hoá, điểm khởi đầu phiên mã, intron, gen điều khiển, hoặc một nhóm polynucleotit chức năng. Thông thường, một “trình tự được xác định” có thể là một polynucleotit bất kỳ có chiều dài 15 bazơ và các trình tự polynucleotit có chiều dài từ 15 đến 15.000 bazơ (sáng chế đề cập đến các trình tự có chiều dài trong khoảng này). Sự suy xét trong việc chọn các nhóm bộ ba mã hóa bao gồm các loại axit amin được mã hoá bởi các catxet gây đột biến thoái hoá.

Theo một khía cạnh, một nhóm các đột biến có thể được vào một catxet gây đột biến, sáng chế còn đề xuất các đột biến thay thế mã hệ thoái hoá (bằng cách sử dụng các oligo thoái hoá) mã hoá 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 và 20 axit amin tại mỗi vị trí và một thư viện các polypeptit được mã hoá.

Theo các khía cạnh khác axit nucleic theo sáng chế là ADN, bao gồm ADN hỗ trợ, hệ gen ADN, và ADN tổng hợp. ADN có thể là sợi kép hoặc sợi đơn, và nếu là sợi đơn có thể là sợi mã hoá hoặc không mã hoá (đối nghĩa). Theo một cách khác, axit nucleic theo sáng chế có thể là ARN.

Như được đề cập chi tiết dưới đây, các trình tự axit nucleic được phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo polypeptit theo sáng chế.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập mã hoá polypeptit theo sáng chế. Trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự mã hoá hỗ trợ, như trình tự dẫn đầu hoặc các trình tự proprotein và các trình tự không mã hoá, như intron hoặc trình tự không mã hoá 5' và/hoặc 3' của trình tự mã hoá. Do đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit mã hoá polypeptit” bao gồm polynucleotit chỉ chứa trình tự mã hoá polypeptit cũng như polynucleotit chứa các trình tự mã hoá hỗ trợ và/hoặc trình tự không mã hoá.

Theo một cách khác, trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được gây đột biến sử dụng các kỹ thuật thông thường, như gây đột biến có định hướng tại chỗ, hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, để đưa các thay đổi vô hiệu vào polynucleotit theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, “các thay đổi vô hiệu” bao gồm, chẳng hạn, các thay đổi không cải biến trình tự axit amin được mã hoá bởi polynucleotit. Các thay đổi này có thể là mong muốn để làm gia tăng nồng độ của polypeptit được tạo ra bởi tế bào chủ chứa vector mã hoá polypeptit bằng cách đưa các bộ ba mã hóa bộ ba mã hóa hoặc các cặp bộ ba mã hóa có nhiều trong tế bào chủ.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit có các thay đổi về nucleotit tạo ra các đột biến thay thế, thêm, loại bỏ, dung hợp và phân cắt axit amin trong polypeptit theo sáng chế. Nhưng thay đổi về nucleotit này có thể được đưa vào bằng cách sử dụng các kỹ

thuật như gây đột biến có định hướng tại chỗ, gây đột biến hoá học ngẫu nhiên, cắt bằng exonucleaza III, và các kỹ thuật tái tổ hợp ADN khác.

Khi cần, các điều kiện cho phép các đoạn dò lai đặc hiệu với các trình tự bổ sung có thể được xác định bằng cách cho đoạn dò tiếp xúc với các trình tự bổ sung trong các mẫu đã được biết là chứa trình tự bổ sung cũng như các trình tự đối chứng không chứa trình tự bổ sung. Các điều kiện của phản ứng lai, như nồng độ muối của dung dịch đệm lai, nồng độ formamit của dung dịch đệm lai, hoặc nhiệt độ lai, có thể thay đổi để xác định các điều kiện cho phép đoạn dò lai đặc hiệu với axit nucleic bổ sung.

Nếu mẫu chứa sinh vật trong đó axit nucleic được phân lập, phản ứng lai đặc hiệu của đoạn dò sau đó sẽ được phát hiện. Phản ứng lai có thể được phát hiện bằng cách đánh dấu đoạn dò bằng các chất có thể phát hiện được như đồng vị phóng xạ, thuốc nhuộm phát huỳnh quang hoặc enzym có khả năng xúc tác quá trình hình thành một sản phẩm có thể phát hiện được.

Nhiều phương pháp đánh dấu đoạn dò được sử dụng để phát hiện sự có mặt của axit nucleic bổ sung trong mẫu là quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này gồm thấm tách Southern, Northern, kỹ thuật lai khuẩn lạc, và thấm tách điểm. Quá trình của mỗi phương pháp được mô tả trong tài liệu Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 và Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Theo một cách khác, nhiều hơn một đoạn dò (ít nhất một trong số đó có khả năng lai đặc hiệu với một trình tự bổ sung bất kỳ có trong mẫu axit nucleic), có thể được sử dụng trong một phản ứng khuếch đại để xác định liệu mẫu đó có chứa sinh vật chứa trình tự axit nucleic theo sáng chế (chẳng hạn, sinh vật từ đó axit nucleic được phân lập). Thông thường, các đoạn dò bao gồm các oligonucleotit. Theo một khía cạnh, phản ứng khuếch đại có thể là phản ứng PCR. Quá trình PCR được mô tả trong các tài liệu Ausubel và Sambrook, sách đã dẫn. Theo một cách khác, phản ứng khuếch đại có thể là phản ứng chuỗi ligaza, 3SR, hoặc phản ứng di chuyển sợi. (Tham khảo Barany, F., "The Ligase Chain Reaction in a PCR World," *PCR Methods and Applications* 1:5-16, 1991; E. Fahy et al., "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based

Amplification System Alternative to PCR”, PCR Methods and Applications 1:25-33, 1991; và Walker G.T. et al., “Strand Displacement Amplification-an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique”, Nucleic Acid Research 20:1691-1696, 1992). Trong các phương pháp này, axit nucleic trong mẫu được tiếp xúc với đoạn dò, phản ứng khuếch đại được thực hiện, và sản phẩm khuếch đại bất kỳ được phát hiện. Sản phẩm khuếch đại có thể được thực hiện bằng cách tiến hành điện di trên gel các sản phẩm phản ứng và nhuộm gel bằng ethidium bromide. Theo một cách khác, một hoặc nhiều đoạn dò có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ và sự có mặt của sản phẩm khuếch đại phát xạ có thể được phát hiện bằng máy chụp ảnh phóng xạ tự động sau khi điện di trên gel.

Các đoạn dò thu được từ các trình tự gần các đầu của trình tự theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong kỹ thuật walking nhiễm sắc thể để xác định các dòng dòng chứa các trình tự hệ gen có vị trí gần trình tự axit nucleic nêu trên. Các phương pháp này sẽ cho phép phân lập các gen mã hoá các protein hỗ trợ từ sinh vật chủ.

Trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng là đoạn dò để xác định và phân lập các axit nucleic có liên quan. Theo một số khía cạnh, axit nucleic có liên quan có thể là ADN hỗ trợ hoặc hệ gen ADN từ các sinh vật không phải là sinh vật trong đó axit nucleic được phân lập. Chẳng hạn, các sinh vật khác có thể là sinh vật có liên quan. Trong các quá trình này, mẫu axit nucleic sẽ được tiếp xúc với đoạn dò trong điều kiện cho phép đoạn dò lai đặc hiệu với các trình tự có liên quan. Quá trình lai của đoạn dò với axit nucleic trong các sinh vật có liên quan sau đó sẽ được phát hiện sử dụng phương pháp bất kỳ nêu trên.

Trong các phản ứng lai axit nucleic, các điều kiện được sử dụng để đạt được mức độ nghiêm ngặt cụ thể sẽ khác nhau, phụ thuộc vào bản chất của axit nucleic được tiến hành phản ứng lai. Chẳng hạn, độ dài, mức độ bổ sung, thành phần của trình tự nucleotit (chẳng hạn, hàm lượng GC so với AT), và loại axit nucleic (chẳng hạn, ARN so với ADN) của vùng lai trong phân tử axit nucleic có thể được xem xét trong việc chọn các điều kiện lai. Một sự xem xét thêm nữa là liệu axit nucleic có được cố định hay không, chẳng hạn, trên thiết bị lọc.

Phản ứng lai có thể được tiến hành trong điều kiện nghiêm ngặt thấp, trung bình hoặc cao. Ví dụ về phản ứng lai axit nucleic, màng polyme chứa axit nucleic biến tính

được cố định được lai sơ bộ trong 30 phút ở 45°C trong dung dịch chứa NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0mM, SDS 0,5%, Denhardt's 10X, và axit polyriboadenylic 0,5mg/ml. Khoảng 2×10^7 cpm (hoạt tính đặc hiệu $4-9 \times 10^8$ cpm/ug) đoạn dò oligonucleotit được đánh dấu ³²P ở đầu sau đó được thêm vào dung dịch. Sau từ 12 đến 16 giờ ủ, màng được rửa trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong SET 1X (NaCl 150mM, Tris hydroclorua 20mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1mM) chứa SDS 0,5%, sau đó rửa 30 phút trong 1X SET nguyên chất ở T_m -10°C oois với đoạn dò oligonucleotit. Màng sau đó được phơi với màng chụp ảnh phóng xạ tự động để phát hiện các tín hiệu lai.

Bằng cách thay đổi mức độ nghiêm ngặt của điều kiện lai được sử dụng để xác định axit nucleic, như ADN bổ trợ hoặc hệ gen ADN lai với đoạn dò có thể phát hiện được, axit nucleic có mức độ tương đồng khác nhau so với đoạn dò có thể được xác định và phân lập. Mức độ nghiêm ngặt có thể được thay đổi bằng cách tiến hành phản ứng lai ở các nhiệt độ thay đổi dưới nhiệt độ nóng chảy của đoạn dò. Nhiệt độ nóng chảy, T_m, là nhiệt độ (trong điều kiện lực ion và pH xác định) tại đó 50% trình tự đích lai hoàn toàn với đoạn dò. Các điều kiện rất nghiêm ngặt được chọn là nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn khoảng 5°C so với T_m đối với một đoạn dò đặc biệt. Nhiệt độ nóng chảy của đoạn dò có thể được tính toán bằng cách sử dụng các công thức sau: Đối với các đoạn dò có chiều dài từ 14 đến 70 nucleotit nhiệt độ nóng chảy (T_m) được tính bằng cách sử dụng công thức: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [\text{Na}^+]) + 0,41(\text{phần đoạn G+C}) - (600/N)$, trong đó N là chiều dài của đoạn dò. Nếu phản ứng lai được tiến hành trong một dung dịch chứa formamit, nhiệt độ nóng chảy có thể được tính bằng công thức: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [\text{Na}^+]) + 0,41(\text{phần đoạn G+C}) - (0,63\% \text{ formamit}) - (600/N)$, trong đó N là chiều dài của đoạn dò. Phản ứng lai sơ bộ có thể được tiến hành trong 6X SSC, 5X Denhardt's, SDS 0,5%, 100µg/ml ADN tinh trùng cá hồi được phân đoạn biến tính hoặc 6X SSC, 5X Denhardt's, SDS 0,5%, 100µg/ml ADN tinh trùng cá hồi được phân đoạn biến tính, 50% formamit. Công thức cho các dung dịch SSC và Denhardt có thể được tìm thấy, chẳng hạn, trong Sambrook et al., sách đã dẫn.

Phản ứng lai được tiến hành bằng cách thêm đoạn dò có thể phát hiện được vào dung dịch lai sơ bộ nêu trên. Khi đoạn dò có ADN sợi kép, nó sẽ được biến tính trước khi thêm vào dung dịch lai. Giấy lọc được cho tiếp xúc với dung dịch lai trong một khoảng thời gian đủ để cho đoạn dò lai với ADN bổ trợ hoặc hệ gen ADN chứa các trình

tự bổ sung với đoạn dò hoặc tương đồng với đoạn dò. Đối với các đoạn dò dài hơn 200 nucleotit, phản ứng lai có thể được tiến hành ở nhiệt độ thấp hơn T_m từ 15 đến 25°C. Đối với các đoạn dò ngắn hơn, như đoạn dò oligonucleotit, phản ứng lai có thể được thực hiện ở nhiệt độ thấp hơn T_m từ 5 đến 10°C. Thông thường, đối với các phản ứng lai trong 6X SSC, phản ứng lai được tiến hành ở khoảng 68°C. Thông thường, đối với các phản ứng lai trong dung dịch chứa formamit 50%, phản ứng lai sẽ được thực hiện ở khoảng 42°C. Tất cả các phản ứng lai nêu trên đều được xét trong điều kiện nghiêm ngặt cao.

Sau khi thực hiện phản ứng lai, giấy lọc được rửa để loại bỏ các đoạn dò có thể phát hiện được liên kết không đặc hiệu. Mức độ nghiêm ngặt được sử dụng để rửa giấy lọc cũng có thể được thay đổi phụ thuộc vào bản chất của axit nucleic được lai, chiều dài của axit nucleic được lai, mức độ bổ sung, thành phần của trình tự nucleotit (chẳng hạn, hàm lượng GC so với AT), và loại axit nucleic (chẳng hạn, ARN so với ADN). Ví dụ về các điều kiện rửa nghiêm ngặt tăng dần là như sau: 2X SSC, SDS 0,1% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút (mức độ nghiêm ngặt thấp); 0,1X SSC, SDS 0,5% ở nhiệt độ phòng trong 30 phút đến 1 giờ (mức độ nghiêm ngặt vừa phải); 0,1X SSC, SDS 0,5% trong 15 đến 30 phút ở trong khoảng từ nhiệt độ lai đến 68°C (mức độ nghiêm ngặt cao); và NaCl 0,15M trong 15 phút ở 72°C (nghiêm ngặt rất cao). Lần rửa cuối cùng với mức độ nghiêm ngặt thấp có thể được tiến hành trong 0,1X SSC ở nhiệt độ phòng. Các ví dụ trên chỉ có mục đích minh họa một tập hợp điều kiện có thể được sử dụng để rửa giấy lọc. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng rất nhiều công thức có thể được sử dụng để thực hiện các bước rửa với mức độ nghiêm ngặt khác nhau. Một số ví dụ khác được đưa ra dưới đây.

Axit nucleic đã lai với đoạn dò có thể được xác định bằng phương pháp chụp ảnh phóng xạ tự động hoặc các kỹ thuật thông thường khác.

Phương pháp trên có thể được cải biến để xác định axit nucleic có mức độ tương đồng giảm so với trình tự đoạn dò. Chẳng hạn, để thu được axit nucleic mức độ tương đồng giảm so với đoạn dò có thể phát hiện được, các điều kiện ít nghiêm ngặt hơn có thể được sử dụng. Chẳng hạn, nhiệt độ lai có thể giảm xuống 5°C từ 68°C đến 42°C trong đệm lai có nồng độ Na^+ khoảng 1M. Sau khi lai, giấy lọc có thể được rửa bằng

2X SSC, SDS 0,5% ở nhiệt độ lai. Các điều kiện này được coi là các điều kiện vừa phải trên 50°C và các điều kiện thấp hơn 50°C. Một ví dụ cụ thể là các điều kiện lai “vừa phải” là khi phản ứng lai trên được tiến hành ở 55°C. Một ví dụ về các điều kiện lai có mức độ nghiêm ngặt thấp là khi phản ứng lai trên được tiến hành ở 45°C.

Theo một cách khác, phản ứng lai có thể được thực hiện trong các dung dịch đệm, như 6X SSC, chứa formamit ở nhiệt độ 42°C. Trong trường hợp này, nồng độ của formamit trong dung dịch đệm lai có thể giảm xuống các lượng 5% từ 50% đến 0% để xác định các dòng dòng có mức độ tương đồng giảm so với đoạn dò. Sau khi tiến hành phản ứng lai, giấy lọc được rửa bằng 6X SSC, SDS 0,5% ở 50°C. Các điều kiện này được coi là các điều kiện vừa phải nếu trên 25% formamit và điều kiện thấp nếu dưới 25% formamit. Một ví dụ cụ thể là các điều kiện lai “vừa phải” là khi phản ứng lai trên được tiến hành ở 30% formamit. Một ví dụ về các điều kiện lai có mức độ nghiêm ngặt thấp là khi phản ứng lai trên được tiến hành ở 10% formamit.

Chẳng hạn, các phương pháp trên có thể được sử dụng để phân lập axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 99%, ít nhất 98%, ít nhất 97%, ít nhất 95%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 80% so với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:1, các trình tự gần như tương đồng với nó, hoặc các đoạn chứa ít nhất khoảng 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, hoặc 500 bazơ liên tiếp nhau của trình tự này, và các trình tự bổ sung với các trình tự bất kỳ đã nêu. Mức độ tương đồng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán xếp thẳng hàng. Chẳng hạn, các polynucleotit tương đồng có thể có một trình tự mã hoá là một biến thể alen có nguồn gốc tự nhiên của một trong số các trình tự mã hoá được đề cập ở đây. Các biến thể alen này có thể có một hoặc nhiều nucleotit được thay thế, loại bỏ hoặc thêm vào khi được so sánh với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:1, hoặc các trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, các phương pháp trên có thể được sử dụng để phân lập axit nucleic mã hoá polypeptit có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 99%, ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, hoặc ít nhất 70% với polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, các trình tự gần như tương đồng, hoặc các đoạn chứa ít nhất 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, hoặc 150 axit amin liên tiếp của trình tự này khi được xác định bằng

cách sử dụng thuật toán so sánh trình tự (chẳng hạn, như FASTA phiên bản 3.0t78 với các tham số mặc định).

Một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập hoặc được tinh sạch bao gồm một trình tự được nêu trong SEQ ID NO:1, các trình tự gần như tương đồng, hoặc các đoạn chứa ít nhất khoảng 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 hoặc 150 axit amin liên tiếp của trình tự trên. Như đã thảo luận ở trên, polypeptit như vậy có thể thu được bằng cách xem một axit nucleic mã hoá polypeptit vào vectơ sao cho trình tự mã hoá is được liên kết một cách có kiểm soát với một trình tự có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện của polypeptit được mã hoá trong một tế bào chủ thích hợp. Chẳng hạn, vectơ biểu hiện có thể bao gồm một trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom để khởi động quá trình dịch mã và yếu tố kết thúc phiên mã. Vectơ này cũng có thể bao gồm các trình tự thích hợp để khuếch đại quá trình biểu hiện.

Các trình tự khởi đầu thích hợp để biểu hiện polypeptit hoặc đoạn của nó trong vi khuẩn bao gồm các trình tự khởi đầu *lac* hoặc *trp* trong *E. coli*, trình tự khởi đầu *lacI*, trình tự khởi đầu *lacZ*, trình tự khởi đầu *T3*, trình tự khởi đầu *T7*, trình tự khởi đầu *gpt*, trình tự khởi đầu *lambda P_R*, trình tự khởi đầu *lambda P_L*, trình tự khởi đầu của các operon mã hoá enzym phân huỷ gluco như 3-phosphoglyxerat kinaza (PGK), và trình tự khởi đầu axit phosphataza. Các trình tự khởi đầu chứa trình tự khởi đầu yếu tố ∇ . Các trình tự khởi đầu chứa trình tự khởi đầu trung gian sớm CMV, trình tự khởi đầu thymidin kinaza HSV, trình tự khởi đầu sốc nhiệt, trình tự khởi đầu SV40 sớm và muộn, LTR từ retrovirut, và trình tự khởi đầu metallothionein-I của chuột. Các trình tự khởi đầu khác đã được biết là kiểm soát quá trình biểu hiện của các gen trong tế bào chưa có nhân điển hình hoặc tế bào nhân thực hoặc virut của chúng có thể được sử dụng.

Vectơ biểu hiện trong tế bào động vật có vú cũng có thể chứa điểm khởi đầu phiên mã, vị trí liên kết ribosom cần thiết bất kỳ, vị trí polyadenyl hoá, vị trí tách và gắn intron, trình tự kết thúc phiên mã, và trình tự không phiên mã nằm kề đầu 5'. Theo một số khía cạnh, các trình tự ADN thu được từ vị trí tách và gắn intron và vị trí polyadenyl hoá SV40 có thể được sử dụng để tạo ra các yếu tố di truyền không phiên mã cần thiết.

Vectơ biểu hiện polypeptit hoặc đoạn của nó trong các tế bào nhân thực có thể chứa các yếu tố tăng cường biểu hiện để làm tăng mức độ biểu hiện. Yếu tố tăng cường

biểu hiện là các yếu tố tác động kiểu cis của ADN, thường có độ dài từ khoảng 10 đến khoảng 300bp tác động lên trình tự khởi đầu để làm gia tăng quá trình phiên mã. Ví dụ như yếu tố tăng cường biểu hiện SV40 tác động vào bên muộn của điểm khởi đầu phiên mã có chiều dài từ 100 đến 270bp, yếu tố tăng cường biểu hiện trình tự khởi đầu sớm của xytomegalovirut, yếu tố tăng cường biểu hiện polyoma lên bên muộn của điểm khởi đầu phiên mã và yếu tố tăng cường biểu hiện của denovirut.

Ngoài ra, vector biểu hiện thường chứa một hoặc nhiều gen chỉ thị có thể chọn lọc được để chọn lọc các tế bào chủ chứa vector. Các chỉ thị có thể chọn lọc được này bao gồm các gen mã hoá dihydrofolat reductaza hoặc gen tạo tính kháng neomycin trong nuôi cấy tế bào nhân thực, các gen tạo tính kháng tetracyclin hoặc ampicilin trong *E. coli*, và gen *TRP1* của *S. cerevisiae*.

Đoạn dò ADN được sử dụng để phân lập chọn lọc ADN đích cần quan tâm từ ADN thu được từ ít nhất một vi sinh vật có thể là trình tự mã hoá có độ dài đầy đủ hoặc trình tự mã hoá một phần của ADN đối với một enzym có hoạt tính đã biết. Thư viện ADN gốc có thể được tìm kiếm bằng cách sử dụng một hỗn hợp đoạn dò chứa ít nhất một phần trong trình tự ADN mã hoá enzym có hoạt tính enzym đặc hiệu. Những đoạn dò này hoặc đoạn dò trong các thư viện có thể là ADN sợi đơn và ADN của vi khuẩn được tìm kiếm có thể được cải biến thành dạng sợi đơn. Các đoạn dò thích hợp là các đoạn dò thu được từ ADN mã hoá enzym có hoạt tính tương tự hoặc giống với hoạt tính enzym đặc hiệu được sàng lọc.

Đoạn dò ADN có chiều dài ít nhất khoảng 10 bazơ hoặc ít nhất là 15 bazơ. Theo một khía cạnh, toàn bộ vùng mã hoá có thể được sử dụng là đoạn dò. Các điều kiện lai trong đó ADN đích được phân lập một cách chọn lọc bằng việc sử dụng ít nhất một Đoạn dò ADN sẽ được thiết kế để tạo ra mức độ nghiêm ngặt trong phản ứng lai ít nhất bằng 50% mức độ tương đồng về trình tự, cụ thể hơn là mức độ nghiêm ngặt tạo ra mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là khoảng 70%.

Đoạn dò ADN có thể được “đánh dấu” với một yếu tố cụ thể trong cặp liên kết (nghĩa là một phối tử) và thành phần khác của cặp được liên kết với một chất nền rắn để có thể dễ dàng phân tách phân tử đích với nguồn của nó. Phối tử và thành phần liên kết đặc hiệu có thể được chọn như sau: (1) kháng nguyên hoặc hapten và kháng thể hoặc

đoạn liên kết đặc hiệu của nó; (2) biotin hoặc iminobiotin và avidin hoặc streptavidin; (3) đường và lectin đặc hiệu với phân tử đường; (4) enzym và chất ức chế của nó; (5) apoenzym và đồng yếu tố; (6) các oligonucleotit đồng trùng hợp bổ sung; và (7) hoocmon và thụ thể của nó. Pha rắn có thể được chọn từ: (1) thủy tinh hoặc bề mặt polyme; (2) cột nhồi các hạt polyme; và (3) các tiểu phân có từ tính hoặc nghịch từ.

Trình tự ADN thích hợp có thể được chèn vào vector bằng một loại các phương pháp khác nhau. Nói chung, trình tự ADN sẽ được nối vào một vị trí mong muốn trong vector sau khi cắt đoạn chèn và vector bằng một endonucleaza giới hạn thích hợp. Theo một cách khác, các đầu tù trong cả đoạn chèn và vector có thể được nối với nhau. Một loạt các kỹ thuật tách dòng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, như được mô tả trong Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 và Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Các kỹ thuật này và các kỹ thuật khác có thể được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector có thể ở dạng plasmit, tiểu phần virus, hoặc thể thực khuẩn. Các vector khác bao gồm các trình tự ADN nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể và tổng hợp, dẫn xuất của SV40; plasmid vi khuẩn, ADN thể thực khuẩn, baculovirus, plasmit nấm men, vector nhân được từ các thể tổ hợp plasmit và ADN thể thực khuẩn, ADN virus như vaccinia, adenovirus, virus gây sốt, và virus gây bệnh đại giả. Một loạt các vector nhân dòng và vector biểu hiện để sử dụng trong các tế bào chủ chưa có nhân điển hình và nhân thực được mô tả bởi, chẳng hạn, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

Các vector vi khuẩn có thể được sử dụng bao gồm các plasmit được bán sẵn trên thị trường chứa các yếu tố di truyền của các vector nhân dòng đã biết rõ pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 và pCM7. Các vector trong tế bào nhân thực cụ thể là pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3,

pBPV, pMSG, và pSVL (Pharmacia). Tuy nhiên, các vector bất kỳ khác cũng có thể được sử dụng miễn là chúng có khả năng sao chép và sống sót trong tế bào chủ.

Tế bào chủ có thể là một tế bào chủ bất kỳ quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm có các tế bào chưa có nhân điển hình, tế bào nhân thực, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, hoặc tế bào thực vật. Ví dụ về các tế bào chủ thích hợp, có thể nêu ra: các tế bào vi khuẩn, như *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* và các loài khác thuộc giống *Pseudomonas*, *Streptomyces* và *Staphylococcus*, tế bào nấm, như *Aspergillus*, nấm men như các loài thuộc giống *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, bao gồm *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc *Schizosaccharomyces pombe*, các tế bào côn trùng như *Drosophila S2* và *Spodoptera Sf9*, các tế bào động vật như CHO, COS hoặc u hắc tố Bowes và adenovirus. Việc lựa chọn các tế bào chủ thích hợp nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector có thể được đưa vào tế bào chủ sử dụng một loạt các kỹ thuật khác nhau, bao gồm biến nạp, chuyển nhiễm, tải nạp, gây nhiễm virus, sử dụng kỹ thuật súng bắn gen, hoặc chuyển gen qua trung gian Ti. Các phương pháp cụ thể bao gồm chuyển nhiễm canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-Dextran, kỹ thuật lipofection, hoặc biến nạp điện (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Nếu thích hợp, các tế bào chủ được xử lý kỹ thuật di truyền có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến thích hợp để hoạt hoá trình tự khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp hoặc khuếch đại gen theo sáng chế. Sau khi biến nạp một dòng tế bào chủ thích hợp và nuôi cấy dòng tế bào chủ tới một mật độ tế bào thích hợp, trình tự khởi đầu được chọn lọc có thể được kích thích bằng các phương pháp thích hợp (chẳng hạn, kích thích bằng thay đổi nhiệt độ hoặc hoá học) và các tế bào có thể được nuôi cấy thêm một giai đoạn nữa để tạo ra polypeptit hoặc các đoạn polypeptit mong muốn.

Các tế bào có thể được thu hoạch bằng cách ly tâm, phá vỡ bằng các phương pháp hoá học hoặc vật lý, và dịch chiết thô hình thành được giữ lại để tinh sạch tiếp theo. Các

tế bào vi sinh vật được sử dụng để biểu hiện các protein có thể được phá vỡ bằng các phương pháp bất kỳ, bao gồm chu trình kết đông-xả đông, siêu âm, phá vỡ cơ học, hoặc sử dụng các chất phân huỷ tế bào. Các phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polypeptit hoặc đoạn của nó được biểu hiện có thể được thu lại và được tinh sạch từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp như gây kết tủa bằng amoni sulfat hoặc etanol, chiết axit, sắc ký trao đổi ion dương hoặc âm, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực affinity sắc ký, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin. Có thể sử dụng các bước làm tan lại protein, nếu cần, trong quá trình ly tâm hoàn toàn polypeptit. Nếu cần, có thể sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trong các bước tinh sạch cuối cùng.

Các hệ thống nuôi cấy tế bào động vật có vú khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Ví dụ về các hệ thống biểu hiện động vật có vú gồm có dòng tế bào COS-7 của nguyên bào sợi thận khỉ (được mô tả bởi Gluzman, Cell, 23:175, 1981), và các dòng tế bào khác có khả năng biểu hiện các protein trong một vector tương hợp, như các dòng tế bào C127, 3T3, CHO, HeLa và BHK.

Các cấu trúc trong tế bào chủ có thể được sử dụng theo các thông thường để tạo ra các sản phẩm gen được mã hoá bởi trình tự tái tổ hợp. Phụ thuộc vào tế bào chủ được sử dụng trong quá trình sản xuất tái tổ hợp, polypeptit được sản xuất bởi tế bào chủ chứa vector có thể được glycosyl hoá hoặc không được glycosyl hoá. Polypeptit theo sáng chế có thể hoặc không chứa vị trí axit amin metionin khởi đầu. Các chi tiết liên quan về quá trình biểu hiện tái tổ hợp các protein đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, Protein Expression: A Practical Approach (Practical Approach Series by S. J. Higgins (Editor), B. D. Hames (Editor) (July 1999) Oxford University Press; ISBN: 0199636249 mô tả hướng dẫn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu hiện protein trong nhiều loại sinh vật khác nhau.

Theo một cách khác, polypeptit theo sáng chế có thể được sản xuất tổng hợp bằng các máy tổng hợp peptit. Theo các khía cạnh khác, các đoạn hoặc các phần của polypeptit có thể được sử dụng để sản xuất polypeptit độ dài đầy đủ tương ứng bằng

phương pháp tổng hợp peptit; do đó, các đoạn có thể được sử dụng làm chất trung gian để sản xuất polypeptit độ dài đủ.

Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được tối ưu để biểu hiện trong nhiều sinh vật khác nhau. Theo một khía cạnh, các trình tự theo sáng chế được tối ưu kiểu sử dụng bộ ba mã hóa trong một sinh vật cần quan tâm, chẳng hạn, nấm như *S. cerevisiae* hoặc vi khuẩn như *E. coli*. Quá trình tối ưu trình tự axit nucleic để sử dụng bộ ba mã hóa đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này để chọn lọc một bộ ba mã hóa cụ thể được sử dụng bởi một sinh vật để mã hoá một axit amin cụ thể. Bảng bộ ba mã hóa sử dụng được tối ưu đã được biết ở nhiều sinh vật. Chẳng hạn, tham khảo Transfer RNA in Protein Synthesis by Dolph L. Hatfield, Byeong J. Lee, Robert M. Pirtle (Editor) (July 1992) CRC Press; ISBN: 0849356989. Do đó, sáng chế cùng bao gồm axit nucleic theo sáng chế được làm thích hợp với kiểu sử dụng bộ ba mã hóa của một sinh vật.

Quá trình biểu hiện được tối ưu trình tự axit nucleic theo sáng chế cũng đề cập đến quá trình gây đột biến có định hướng hoặc ngẫu nhiên axit nucleic để tạo ra quá trình biểu hiện được gia tăng của protein được mã hoá. Quá trình gây đột biến axit nucleic theo sáng chế có thể tạo ra một cách trực tiếp hoặc gián tiếp sản lượng được gia tăng của protein được biểu hiện. Ví dụ không hạn chế, có thể sử dụng các kỹ thuật gây đột biến được nêu ở đây để gây đột biến vùng 5' không dịch mã, 3' không dịch mã, hoặc vùng mã hoá của axit nucleic, quá trình đột biến trong đó có thể tạo tính ổn định được gia tăng ở mức độ ARN hoặc protein, nhờ đó tạo ra sản lượng protein được gia tăng.

Các hệ dịch mã không tế bào cũng có thể được sử dụng để sản xuất polypeptit theo sáng chế. Hệ dịch mã không tế bào có thể sử dụng mARN được phiên mã từ một cấu trúc ADN chứa một trình tự khởi đầu được liên kết một cách có kiểm soát với một axit nucleic mã hoá polypeptit hoặc đoạn của nó. Theo một vài khía cạnh, cấu trúc ADN có thể được duỗi thẳng trước khi thực hiện phản ứng phiên mã trong ống nghiệm. mARN vừa được phiên mã sau đó sẽ được ủ với một dịch chiết dịch mã không tế bào, như dịch chiết tế bào hồng cầu lưới của thỏ, để tạo ra polypeptit hoặc đoạn mong muốn của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến các biến thể của polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ “biến thể” gồm có dẫn xuất hoặc đồng phân của các polypeptit này. Cụ thể là, các biến

thể có thể khác nhau về trình tự axit amin so với polypeptit theo sáng chế, và các trình tự gần như tương đồng, bởi một hoặc nhiều các đột biến thay thế, thêm, loại bỏ, dung hợp và cắt axit amin có thể có mặt trong trình tự theo một tổ hợp bất kỳ.

Các biến thể có thể hình thành trong tự nhiên hoặc được tạo ra trong ống nghiệm. Cụ thể là, các biến thể này có thể được tạo bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền như gây đột biến có định hướng tại chỗ, gây đột biến hoá học ngẫu nhiên, cắt bằng exonucleaza III, và các kỹ thuật tách dòng ADN chuẩn khác. Theo một cách khác, các biến thể, đoạn, đồng phân, hoặc dẫn xuất có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp hoá học hoặc phương pháp cải biến.

Các phương pháp tạo biến thể cũng rất quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này bao gồm các phương pháp trong đó trình tự axit nucleic thu được từ các thể phân lập tự nhiên được cải biến để tạo ra axit nucleic mã hoá polypeptit có các đặc điểm làm gia tăng giá trị của chúng trong các ứng dụng công nghiệp hoặc phòng thí nghiệm. Trong các phương pháp này, rất nhiều các trình tự biến thể có một hoặc nhiều sai khác nucleotit so với trình tự thu được từ thể phân lập tự nhiên được tạo ra và đọc trình tự. Thông thường, các sai khác nucleotit này sẽ tạo ra các thay đổi về axit amin so với polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic từ các thể phân lập tự nhiên.

Chẳng hạn, biến thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng PCR đọc sửa. Trong PCR đọc sửa, PCR được thực hiện trong điều kiện trong đó độ chính xác sao chép của ADN polymeraza là thấp, sao cho một tỷ lệ lớn các đột biến điểm thu được dọc theo toàn bộ chiều dài của sản phẩm PCR. PCR đọc sửa được mô tả trong tài liệu Leung, D.W., et al., *Technique*, 1:11-15, 1989) và Caldwell, R. C. and Joyce G.F., *PCR Methods Applic.*, 2:28-33, 1992. Một cách ngắn gọn là, trong các quá trình này, axit nucleic cần gây đột biến sẽ được trộn lẫn với đoạn môi PCR, đệm phản ứng, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Taq polymeraza và một nồng độ thích hợp các dNTP để thu được tỷ lệ cao các đột biến điểm dọc theo toàn bộ chiều dài của sản phẩm PCR. Chẳng hạn, phản ứng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng 20 fmol axit nucleic cần gây đột biến, 30pmol mỗi đoạn môi PCR, đệm phản ứng chứa KCl 50mM, Tris HCl 10mM (pH 8,3) và 0,01% gelatin, $MgCl_2$ 7mM, $MnCl_2$ 0,5mM, 5 đơn vị Taq polymeraza, 0,2mM dGTP, 0,2 mM dATP,

1mM dCTP, và 1mM dTTP. PCR có thể được thực hiện khoảng 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ 94°C trong 1 phút, 45°C trong 1 phút, và 72°C trong 1 phút. Tuy nhiên, cần biết rằng các tham số này có thể được thay đổi tùy theo. Axit nucleic được gây đột biến sẽ được tách dòng vào một vectơ thích hợp và hoạt tính của polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic được gây đột biến sẽ gia tăng.

Biến thể cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến có định hướng oligonucleotit để tạo ra các đột biến điểm đặc hiệu trong một phân tử ADN được tách dòng cần quan tâm. Oligonucleotit gây đột biến được mô tả trong Reidhaar-Olson, J.F. và Sauer, R.T., et al., Science, 241:53-57, 1988. Một cách vắn tắt, trong các phương pháp này một số lượng lớn các oligonucleotit sợi kép mang một hoặc nhiều đột biến được đưa vào ADN tách dòng được tổng hợp và chèn vào ADN tách dòng cần gây đột biến. Các dòng chứa ADN được gây đột biến sẽ được thu lại và hoạt tính của polypeptit chúng mã hoá được đánh giá.

Một phương pháp khác để tạo ra biến thể là PCR ghép nối. PCR ghép nối bao gồm việc ghép nối các sản phẩm PCR trong một hỗn hợp các đoạn ADN nhỏ. Một số lượng lớn các phản ứng PCR khác nhau xảy ra đồng thời trong cùng một máy phản ứng, với các sản phẩm của một phản ứng sẽ làm môi cho các sản phẩm của phản ứng khác. PCR lắp ghép được mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent của Mỹ số 08/677,112 nộp ngày 9/07/1996, có tên là “Method of “DNA Shuffling with Polynucleotit Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process”.

Một phương pháp khác nữa để tạo biến thể là gây đột biến PCR kết cặp. Trong gây đột biến PCR kết cặp, các thể tái tổ hợp tương đồng xảy ra giữa các phân tử ADN của các trình tự ADN khác nhau nhưng có quan hệ gần nhau trong ống nghiệm, là kết quả của quá trình phân đoạn phân tử ADN dựa trên mức độ tương đồng về trình tự, sau đó là quá trình cố định các bắt chéo bằng phương pháp tổng hợp nhờ đoạn môi trong một phản ứng PCR. Gây đột biến PCR kết cặp được mô tả trong tài liệu Stemmer, W.P., PNAS, USA, 91:10747-10751, 1994. Một cách ngắn gọn, trong các quá trình này một lượng lớn các axit nucleic cần được tái tổ hợp sẽ được cắt bằng ADNaza để tạo ra các phân đoạn có kích thước trung bình từ 50 đến 200 nucleotit. Các phân đoạn có kích thước trung bình mong muốn được tinh sạch và tái phân tán trong hỗn hợp PCR. PCR

được tiến hành trong điều kiện giúp cho quá trình tái tổ hợp giữa các phân đoạn axit nucleic. Chẳng hạn, PCR có thể được thực hiện bằng cách tái phân tán các phân đoạn được tinh sạch với nồng độ từ 10 đến 30ng/μl trong dung dịch chứa 0,2mM mỗi loại dNTP, 2,2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris HCl, pH 9,0, và 0,1% Triton X-100. 2,5 đơn vị Taq polymeraza trên 100μl hỗn hợp phản ứng được thêm vào và PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các điều kiện sau: 94°C trong 60 giây, 94°C trong 30 giây, 50 đến 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây (30 đến 45 lần) và 72°C trong 5 phút. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các tham số này có thể được thay đổi tùy theo. Theo một số khía cạnh, các oligonucleotit có thể được đưa vào trong các phản ứng PCR. Theo các khía cạnh khác, các đoạn Klenow của ADN polymeraza I có thể được sử dụng trong một chuỗi các phản ứng PCR đầu tiên và Taq polymeraza có thể được dùng trong chuỗi phản ứng PCR tiếp theo. Các trình tự tái tổ hợp được phân lập và hoạt tính của polypeptit chúng mã hoá được đánh giá.

Biến thể cũng có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến trong cơ thể. Theo một số khía cạnh, các đột biến ngẫu nhiên trong một trình tự cần quan tâm được tạo ra bằng cách nhân bản trình tự cần quan tâm trong một chủng vi khuẩn, như *E. coli*, mang các đột biến trong một hoặc nhiều con đường sửa chữa ADN. Các chủng “đột biến” này có mức độ đột biến ngẫu nhiên cao so với các chủng gốc kiểu dại. Nhân bản ADN trong một trong số các chủng này cuối cùng sẽ tạo ra các đột biến ngẫu nhiên trong ADN. Các chủng đột biến thích hợp để sử dụng trong gây đột biến trong cơ thể được mô tả trong công bố PCT số WO 91/16427, công bố ngày 31/10/1991, có tên là “Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations”.

Biến thể cũng có thể được tạo ra sử dụng catxet gây đột biến. Trong catxet gây đột biến một vùng nhỏ phân tử ADN sợi kép được thay bằng một “catxet” oligonucleotit tổng hợp khác với trình tự gốc. Các oligonucleotit này thường chứa trình tự gốc được gây đột biến ngẫu nhiên hoàn toàn và/hoặc một phần.

Gây đột biến ngược toàn thể cũng có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể. Gây đột biến ngược toàn thể là một thuật toán trong kỹ thuật protein (protein gây đột biến) được phát triển để sản xuất một nhóm đa dạng các thể đột biến kiểu hình có liên quan với nhau trong đó các thành viên khác nhau về trình tự axit amin. Phương pháp này sử

dụng cơ chế điều hoà ngược để kiểm soát các vòng liên tiếp nhau của quá trình gây đột biến catxet tổ hợp. Gây đột biến ngược toàn thể được mô tả trong Arkin, A.P. và Youvan, D.C., PNAS, USA, 89:7811-7815, 1992.

Theo một số khía cạnh, các biến thể được tạo ra bằng cách sử dụng gây đột biến toàn thể theo số mũ. Gây đột biến toàn thể theo số mũ là một quá trình tạo ra các thư viện tổ hợp với tỷ lệ cao các thể đột biến chức năng và duy nhất, trong đó các nhóm nhỏ các gốc được gây đột biến ngẫu nhiên đồng thời để xác định, tại mỗi vị trí được đột biến, các axit amin tạo ra các thay đổi trong chức năng protein. Gây đột biến toàn thể theo số mũ được mô tả trong Delegrave, S. và Youvan, D.C., Biotechnol. Res., 11:1548-1552, 1993. Gây đột biến ngẫu nhiên và gây đột biến có định hướng tại chỗ được mô tả trong Arnold, F.H., Current Opinion in Biotechnology, 4:450-455, 1993.

Theo một số khía cạnh, các biến thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp ghép nối ngẫu nhiên trong đó các phần của nhiều axit nucleic mã hoá các polypeptit khác nhau sẽ được dung hợp với nhau để tạo ra các trình tự axit nucleic khả năng mã hoá polypeptit khả năng như được mô tả trong đơn xin cấp patent US 08/677,112 nộp ngày 9/7/1996, có tên là, "Method of DNA Shuffling with Polynucleotide Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process" và đơn xin cấp patent US 08/651,568 nộp ngày 22/5/1996, có tựa đề là "Combinatorial Enzyme Development."

Các biến thể polypeptit theo sáng chế có thể là các biến thể trong đó một hoặc nhiều các gốc axit amin trong polypeptit theo sáng chế được thế bằng một gốc axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn (chẳng hạn, một gốc axit amin được bảo toàn) và gốc axit amin được thế này có thể hoặc không được mã hoá bởi mã di truyền.

Các thay thế bảo toàn là các thay thế một axit amin xác định trong một polypeptit bằng một axit amin khác có đặc tính tương tự. Thường được gọi là các thay thế bảo toàn là các thay thế axit amin sau: các thay thế một axit amin béo như Ala, Val, Leu và Ile với một axit amin béo khác; thay thế Ser bằng Thr hoặc ngược lại; thay thế một gốc có tính axit như Asp và Glu với một gốc có tính axit khác; thay thế một gốc có nhóm amit, như Asn và Gln, với một gốc có nhóm amit; thay thế một gốc có tính bazơ như Lys và

Arg với một nhóm có tính bazơ khác; và thay thế một gốc thơm như Phe, Tyr với một gốc thơm khác.

Các biến thể khác là các biến thể trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin của polypeptit theo sáng chế chứa nhóm thế.

Các biến thể khác nữa là các biến thể trong đó polypeptit liên kết với một hợp chất khác, như một hợp chất để gia tăng thời gian bán hủy của polypeptit (chẳng hạn, polyetylen glycol).

Các biến thể bổ sung là các biến thể trong đó các axit amin bổ sung được dung hợp với polypeptit, như trình tự dẫn đầu, trình tự tiết, trình tự proprotein hoặc trình tự hỗ trợ quá trình tinh sạch, làm giàu, hoặc ổn định hoá polypeptit. Theo một số khía cạnh, các dẫn xuất và các đồng phân có cùng chức năng sinh học hoặc hoạt tính như các polypeptit theo sáng chế, và có thể là proprotein, sao cho các phân đoạn, dẫn xuất, hoặc đồng phân có thể được hoạt hoá bằng cách phân cắt phần proprotein để tạo ra một polypeptit có hoạt tính.

Tối ưu hoá bộ ba mã hóa để thu được nồng độ protein biểu hiện cao trong tế bào chủ

Sáng chế đề xuất phương pháp cải biến axit nucleic mã hoá phytaza để cải biến kiểu sử dụng bộ ba mã hóa. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để cải biến bộ ba mã hóa trong một axit nucleic mã hoá phytaza để gia tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của nó trong tế bào chủ. Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hoá phytaza được cải biến để gia tăng mức độ biểu hiện của nó trong một tế bào chủ, do đó enzym phytaza cũng được cải biến và phương pháp tạo ra enzym phytaza được cải biến. Phương pháp bao gồm việc xác định một bộ ba mã hóa “không được ưu tiên” hoặc “ít được ưu tiên” trong axit nucleic mã hoá phytaza và thay thế một hoặc nhiều các bộ ba mã hóa không được ưu tiên hoặc ít được ưu tiên bằng một “bộ ba mã hóa được ưu tiên” mã hoá axit amin tương tự như bộ ba mã hóa được thay thế và ít nhất một bộ ba mã hóa không được ưu tiên hoặc ít được ưu tiên trong axit nucleic được thay thế bằng một bộ ba mã hóa được ưu tiên mã hoá axit amin tương tự. Bộ ba mã hóa được ưu tiên là một bộ ba mã hóa có nhiều trong các trình tự mã hoá trong gen trong tế bào chủ và bộ ba mã hóa không được ưu tiên hoặc ít được ưu tiên là bộ ba mã hóa có ít trong trình tự mã hoá trong gen trong tế bào chủ.

Tế bào chủ để biểu hiện axit nucleic, catxet biểu hiện và vectơ theo sáng chế gồm có vi khuẩn, nấm men, nấm, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tối ưu cách sử dụng bộ ba mã hóa trong tất cả các loại tế bào này, axit nucleic được cải biến bộ ba mã hóa và polypeptit được tạo ra bằng axit nucleic được cải biến bộ ba mã hóa. Các tế bào chủ thử nghiệm gồm có vi khuẩn gram âm, như *Escherichia coli* và *Pseudomonas fluorescens*; vi khuẩn gram dương, như *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Tế bào chủ thử nghiệm còn có các tế bào có nhân thực, chẳng hạn, các loại nấm men khác nhau, như *Saccharomyces* sp., gồm có *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, và *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, và tế bào động vật có vú và các dòng tế bào và tế bào côn trùng và các dòng tế bào. Do đó, sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic và polypeptit được tối ưu để biểu hiện trong các sinh vật này.

Chẳng hạn, các bộ ba mã hóa của axit nucleic mã hoá phytaza được phân lập từ tế bào vi khuẩn sẽ được cải biến sao cho axit nucleic được biểu hiện tối ưu trong tế bào vi khuẩn khác với loại vi khuẩn trong đó phytaza được phân lập, tế bào nấm men, nấm, tế bào thực vật, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú. Các phương pháp tối ưu bộ ba mã hóa đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, US 5,795,737; Baca (2000) Int. J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-188; Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253. Tham khảo Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253, mô tả quá trình tối ưu bộ ba mã hóa ở chuột; Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24, mô tả quá trình tối ưu bộ ba mã hóa trong nấm men; Feng (2000) Biochemistry 39:15399-15409, mô tả quá trình tối ưu bộ ba mã hóa trong *E. coli*; Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264, mô tả quá trình tối ưu bộ ba mã hóa ảnh hưởng đến quá trình tiết trong *E. coli*.

Động vật chuyển gen không phải người

Sáng chế đề xuất động vật chuyển gen không phải người chứa axit nucleic, polypeptit, catxet biểu hiện hoặc vectơ hoặc tế bào được chuyển nhiễm hoặc tế bào biến nạp theo sáng chế. Động vật chuyển gen không phải người có thể là, chẳng hạn, dê, thỏ, cừu, lợn, bò, chuột cống và chuột nhắt, chứa axit nucleic theo sáng chế. Các động vật

này có thể được sử dụng, chẳng hạn, là các mẫu hình trong cơ thể để nghiên cứu hoạt tính phytaza, hoặc, là các mẫu hình để sàng lọc các tác nhân điều biến hoạt tính phytaza trong cơ thể. Các trình tự mã hoá polypeptit được biểu hiện trong động vật chuyển gen không phải người có thể được thiết kế để biểu hiện cơ định, hoặc, dưới sự kiểm soát của các yếu tố điều hoà phiên mã đặc hiệu mô, đặc hiệu trong từng giai đoạn phát triển hoặc có thể kích thích được. Động vật chuyển gen không phải người có thể được thiết kế và tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này; tham khảo, chẳng hạn, US 6,211,428; US 6,187,992; US 6,156,952; US 6,118,044; US 6,111,166; US 6,107,541; US 5,959,171; US 5,922,854; US 5,892,070; US 5,880,327; US 5,891,698; US 5,639,940; US 5,573,933; US 5,387,742; US 5,087,571, đề cập việc tạo ra và sử dụng tế bào biến nạp, trứng và chuột nhắt, chuột cống, thỏ, cừu, lợn và bò chuyển gen. Tham khảo thêm, chẳng hạn, Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157, đề cập quá trình sản xuất protein tái tổ hợp trong sữa của động vật lấy sữa chuyển gen; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461, mô tả quá trình sản xuất dê chuyển gen. US 6,211,428, mô tả việc tạo ra và sử dụng động vật chuyển gen không phải người biểu hiện trong não cấu trúc axit nucleic chứa trình tự ADN. US 5,387,742, đề cập đến việc đưa các trình tự ADN tái tổ hợp được tách dòng hoặc tổng hợp vào trứng của chuột đã được thụ tinh, cấy trứng vào con cái mang thai giả, và nuôi dưỡng đến khi tạo ra chuột con chuyển gen có tế bào biểu hiện protein liên quan đến cơ chế bệnh học của bệnh Alzheimer. US 6,187,992, đề cập đến việc tạo ra và sử dụng chuột chuyển gen có hệ gen chứa sự đứt gãy gen mã hoá protein tiền chất amyloid (APP).

“Các động vật ưu việt” cũng có thể được sử dụng để thực hiện các phương pháp theo sáng chế. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, các động vật được cải biến hoặc chuyển gen theo sáng chế là một “động vật ưu việt,” chẳng hạn, “chuột ưu việt,” được xử lý không chỉ để biểu hiện hoặc không thể biểu hiện phytaza.

Theo một khía cạnh khác, động vật chuyển gen không phải người được đề xuất chứa trình tự khác loại mã hoá phytaza theo sáng chế (chẳng hạn, các cải biến về trình tự cụ thể của SEQ ID NO:2). Các phương pháp khác nhau để tạo ra dn chuyển gen theo sáng chế có thể được sử dụng. Nói chung, có 3 phương pháp có thể được sử dụng. Trong một phương pháp, phôi ở giai đoạn chưa tiền phân chia (“phôi một tế bào”) được thu lại từ con cái và gen chuyển được đưa vào trong phôi, trong trường hợp gen chuyển sẽ được

kết hợp vào nhiễm sắc thể vào cả các tế bào sinh dục và tế bào sinh dưỡng của động vật trưởng thành tạo ra. Theo một phương pháp khác, các tế bào gốc phôi được phân lập và gen chuyển được đưa vào tế bào bằng cách biến nạp điện, chuyển nhiễm hoặc vi tiêm plasmit, sau đó là đưa lại các tế bào gốc vào phôi tại đó chúng phân chia và cải biến thành các dòng tế bào sinh dục. Phương pháp biến nạp vi tiêm các động vật có vú được mô tả trong US 4,873,191.

Theo một phương pháp thử nghiệm khác, các tế bào phôi được nhiễm bằng retrovirut chứa gen chuyển nhờ đó các tế bào mầm của phôi sẽ có gen chuyển được kết hợp vào nhiễm sắc thể. Khi động vật được chuyển gen là gai cầm, vì trứng của gia cầm được thụ tinh thường trải qua quá trình phân chia tế bào trong 24 giờ đầu trong ống dẫn trứng, nên quá trình vi tiêm vào tế bào chưa phân chia vào trứng đã thụ tinh là một khó khăn vì không thể đến được tế bào chưa phân chia. Do đó, trong số các phương pháp tạo động vật chuyển gen được mô tả khái quát trên, phương pháp nhiễm retrovirut là được ưu tiên đối với các loài gia cầm, chẳng hạn như được mô tả trong US 5,162,215. Tuy nhiên, nếu sử dụng quá trình vi tiêm với gia cầm, một phương pháp đã được công bố bởi Love et al., (Biotechnol., 12, Jan 1994) có thể được sử dụng nhờ đó phôi thu được từ gà mái sau khoảng 2,5h sau lần đẻ trứng trước, gen chuyển sẽ được vi tiêm vào tế bào chất của đĩa mầm và phôi được nuôi cấy cho đến khi trưởng thành. Khi động vật được chuyển gen là bò hoặc lợn, quá trình vi tiêm có thể bị cản trở bởi vùng đục của trứng do đó sẽ khiến khó xác định nhân bằng kính hiển vi tương phản giao thoa truyền thống. Để khắc phục vấn đề này, trứng đầu tiên cần được ly tâm để tách riêng các tế bào tiền nhân để nhìn tốt hơn.

Theo một khía cạnh, “động vật không phải người” theo sáng chế bao gồm bò, lợn, cừu và gia cầm (chẳng hạn, bò, lợn, cừu, gà). “Động vật chuyển gen không phải người” theo sáng chế được sản xuất bằng cách đưa “các gen chuyển” vào các tế bào dòng mầm của động vật không phải người. Các tế bào đích phôi ở các giai đoạn phát triển khác nhau có thể được sử dụng để đưa gen chuyển. Các phương pháp khác nhau được sử dụng phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của tế bào đích phôi. Hợp tử là đích tốt nhất để thực hiện vi tiêm. Việc sử dụng các hợp tử là đích của quá trình chuyển gen có ưu điểm chính ở chỗ trong hầu hết các trường hợp ADN được đưa vào sẽ kết hợp vào gen của tế bào chủ trước lần phân chia thứ nhất (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-

4442, 1985). Kết quả là, tất cả các tế bào của động vật chuyển gen không phải người sẽ mang gen chuyển được đưa vào. Điều này nói chung sẽ tạo ra quá trình chuyển gen hiệu quả đến các thế hệ sau của động vật chuyển gen vì 50% số tế bào mầm sẽ chứa gen chuyển.

Theo một khía cạnh, Thuật ngữ “chuyển gen” được sử dụng để mô tả một động vật chứa các nguyên liệu di truyền ngoại sinh trong tất cả các tế bào của nó. Một động vật “chuyển gen” có thể được sản xuất bằng cách ghép phôi chéo giữa hai động vật khảm gen chứa nguyên liệu di truyền ngoại sinh trong các tế bào được sử dụng để sinh sản. 25% thế hệ con hình thành sẽ là động vật chuyển gen nghĩa là, các động vật chứa các nguyên liệu di truyền ngoại sinh trong tất cả các tế bào của nó ở cả hai alen, 50% động vật con tạo ra sẽ chứa nguyên liệu di truyền ngoại sinh trong một alen và 25% không chứa nguyên liệu di truyền ngoại lai.

Theo một khía cạnh, phương pháp vi tiêm được sử dụng để thực hiện sáng chế. Gen chuyển được phân cắt và được tinh sạch từ một vector ADN bất kỳ, chẳng hạn, bằng cách điện di trên gel. Theo một khía cạnh, gen chuyển chứa một trình tự khởi đầu được liên kết một cách có kiểm soát tương tác với các protein trong tế bào liên quan đến quá trình phiên mã, đồng thời tạo ra quá trình biểu hiện cơ định. Các trình tự khởi đầu hữu ích trong phương pháp này gồm có các trình tự khởi đầu từ cytomegalovirut (CMV), virut moloney leukemia (MLV), và virut herpes, cũng như các trình tự khởi đầu từ gen mã hoá metallothionin, actin tạo khung tế bào, P-enolpyruvat carboxylaza (PEPCK), phosphoglyxerat (PGK), DHFR, và thymidin kinaza. Trình tự khởi đầu đối với các môtip dài kết thúc của virut (viral long terminal repeats (LTRs) như virut Sarcoma Rous cũng có thể được sử dụng. Khi các động vật được chuyển gen là gia cầm, các trình tự khởi đầu được ưu tiên là các trình tự khởi đầu của gen β -globin của gà, gen lysozym của gà, và virut gây bệnh bạch cầu ở gai cầm. Các cấu trúc hữu ích trong việc biến nạp plasmid các tế bào gốc phôi sẽ sử dụng các yếu tố điều hoà hỗ trợ đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này như yếu tố tăng cường biểu hiện để kích thích quá trình phiên mã, các thụ thể cắt nối intron, tín hiệu kết thúc và polyadenyl hoá, và vị trí liên kết ribosom để khởi động dịch mã.

Quá trình gây nhiễm retrovirus cũng có thể được sử dụng để đưa gen chuyển vào một động vật không phải người, như đã mô tả ở trên. Phôi người đang phát triển có thể được nuôi cấy trong ống nghiệm đến giai đoạn túi phôi. Trong thời gian này, nguyên bào phôi có thể là đích để gây nhiễm retrovirus (Jaenich, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264, 1976). Quá trình gây nhiễm thành công các nguyên bào phôi có thể được thực hiện bằng cách xử lý enzym để loại bỏ vùng trong suốt (Hogan, et al. (1986) trong tài liệu *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Các hệ vector virus được sử dụng để đưa gen chuyển thường là một retrovirus suy giảm sao chép mang gen chuyển (Jahner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927-6931, 1985; Van der Putten, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152, 1985). Quá trình chuyển nhiễm có thể được thực hiện dễ dàng và hiệu quả bằng cách nuôi cấy nguyên bào phôi trên một lớp các tế bào sản xuất virus (Van der Putten, sách đã dẫn; Stewart, et al., EMBO J. 6: 383-388, 1987). Theo một cách khác, quá trình chuyển nhiễm có thể được thực hiện ở các giai đoạn muộn hơn. Virus hoặc tế bào sản xuất virus có thể được đưa vào khoang phôi (D. Jahner et al., Nature 298: 623-628, 1982). Hầu hết các tế bào hình thành sẽ là thể khảm đối với gen chuyển vì quá trình kết hợp chỉ hình thành trong một nhóm nhỏ các tế bào tạo thành các động vật chuyển gen không phải người. Hơn nữa, các tế bào hình thành có thể chứa các đoạn chèn retrovirus khác nhau của gen chuyển tại các vị trí khác nhau trong hệ gen và thường di truyền cho thế hệ sau. Ngoài ra, cũng có thể đưa các gen chuyển vào tế bào mầm, mặc dù với hiệu quả thấp, bằng cách chuyển nhiễm retrovirus trong tử cung của phôi tại giữa thời kỳ thai nghén (D. Jahner et al., sách đã dẫn).

Loại tế bào đích thứ ba để đưa gen chuyển là tế bào gốc phôi (ES). Các tế bào ES thu được từ phôi trước làm tổ được nuôi cấy *in vitro* và được dung hợp với phôi (M. J. Evans et al., Nature 292:154-156, 1981; M. O. Bradley et al., Nature 309:255-258, 1984; Gossler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065-9069, 1986; và Robertson et al., Nature 322:445-448, 1986). Gen chuyển cũng có thể được đưa một cách hiệu quả vào các tế bào ES bằng cách chuyển nhiễm ADN hoặc bằng cách tải nạp qua trung gian retrovirus. Các tế bào ES được biến nạp sau đó có thể được kết hợp với các tế bào túi phôi của một động vật không phải người. Các tế bào ES sau đó sẽ phát triển thành phôi và

tạo tế bào dòng mầm của động vật kảhm gen (Tham khảo Jaenisch, R., Science 240:1468-1474, 1988).

Theo một khía cạnh, thuật ngữ “được biến nạp” dùng để chỉ một tế bào (hoặc tế bào gốc) được đưa vào các phân tử axit nucleic khác loại bằng phương pháp tái tổ hợp axit nucleic. Thuật ngữ “khác loại” dùng để chỉ trình tự axit nucleic có nguồn gốc từ một loại khác hoặc được cải biến từ dạng nguyên gốc của nó hoặc dạng ban đầu được biểu hiện trong tế bào.

Theo một khía cạnh, thuật ngữ “gen chuyển” dùng để chỉ loại ADN bất kỳ được đưa một cách nhân tạo vào tế bào, và trở thành một phần của hệ gen của sinh vật (nghĩa là, được kết hợp một cách ổn định hoặc là một yếu tố ngoài nhiễm sắc thể ổn định) phát triển từ tế bào đó. Gen chuyển như vậy có thể là gen khác loại một phần hoặc toàn bộ (nghĩa là, ngoại lai) với sinh vật chuyển gen, hoặc có thể là một gen tương đồng với một gen nội sinh của sinh vật đó. Thuộc định nghĩa này là gen chuyển được tạo ra bằng cách tạo ra một trình tự ARN được phiên mã thành ADN và sau đó kết hợp vào hệ gen. Các gen chuyển theo sáng chế là các trình tự ADN mã hoá phytaza hoặc polypeptit có hoạt tính phytaza, và là polynucleotit, có thể biểu hiện được trong động vật chuyển gen không phải người. Thuật ngữ “chuyển gen” như được sử dụng ở đây còn để chỉ các sinh vật có hệ gen đã được cải biến bằng cách xử lý trong ống nghiệm phôi sớm hoặc trứng đã được thụ tinh hoặc bằng một kỹ thuật chuyển gen bất kỳ để tạo ra một bất hoạt gen đặc hiệu. Thuật ngữ “bất hoạt gen” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ sự phá vỡ có chủ đích một gen trong cơ thể với ự mất hoàn toàn chức năng được thực hiện bằng một kỹ thuật chuyển gen bất kỳ quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một khía cạnh, các động vật chuyển gen có các bất hoạt gen là các động vật trong đó gen đích đã được làm cho mất chức năng bằng một đoạn chèn tác động đến gen cần cải biến mất chức năng bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng.

Theo một khía cạnh, thuật ngữ “chuyển gen” dùng để chỉ một kỹ thuật chuyển gen bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra một sinh vật mang gen chuyển hoặc một sinh vật trong đó một gen nội sinh đã được cải biến mất chức năng hoặc “bị bất hoạt”.

Gen chuyển được sử dụng để thực hiện sáng chế là trình tự ADN chứa trình tự mã hoá phytaza hoặc polypeptit có hoạt tính phytaza. Theo một khía cạnh, polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc trình tự mã hoá polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 là gen chuyển như được định nghĩa ở đây. Nếu cần, các trình tự ADN mã hoá protein có hoạt tính phytaza nhưng khác trình tự axit nucleic do tính chất thoái hoá mã di truyền cũng có thể được sử dụng ở đây, như ở dạng bị cắt, biến thể alen và các đoạn tương đồng trong loài.

Theo một khía cạnh, sau khi phôi đã được vi tiêm, làm tổ với các tế bào gốc phôi hoặc được gây nhiễm retrovirus chứa gen chuyển (trừ khi thực hiện sáng chế ở gia cầm đã được đề cập ở đây), phôi sẽ được cấy vào vòi trứng của một con cái mang thai giả. Các thế hệ tiếp theo được kiểm tra về sự kết hợp gen chuyển bằng phân tích thẩm tách Southern mẫu máu hoặc mô sử dụng các đoạn dò đặc hiệu với gen chuyển. PCR là đặc biệt hữu ích trong vấn đề này. Các thế hệ sau dương tính (G0) sẽ được cho giao phối chéo để tạo thế hệ tiếp theo (G1) sẽ được phân tích quá trình biểu hiện gen chuyển bằng phân tích thẩm tách Northern mẫu mô.

Theo một khía cạnh, các phương pháp tăng quá trình hấp thụ phospho ở động vật chuyển gen và/hoặc giảm lượng chất ô nhiễm trong phân của các sinh vật chuyển gen khoảng 15%, khoảng 20%, hoặc khoảng 20%, đến khoảng 50% hoặc cao hơn.

Theo một khía cạnh, các động vật được sử dụng để thực hiện sáng chế là các động vật thường được coi là gia súc gồm cả thú cảnh (chẳng hạn, chó, mèo, gia cầm v.v.) và các loại động vật có ích trong chế biến thực phẩm, nghĩa là, gia cầm như gà cho thịt và gà siêu trứng và gà tây, cừu, bò như bò chi thịt và bò sữa, cá và lợn. Theo một khía cạnh, các động vật này được gọi là “chuyển gen” khi chúng có trình tự ADN khác loại, hoặc một hoặc nhiều các trình tự ADN bổ trợ thường có cùng nguồn gốc với động vật (ở đây được gọi chung là “gen chuyển”) được kết hợp vào nhiễm sắc thể trong các tế bào mầm của động vật. Động vật chuyển gen (gồm cả thế hệ con) cũng sẽ có gen chuyển được kết hợp một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của các tế bào sinh dưỡng.

Phương pháp sàng lọc và các thiết bị giám sát “trực tuyến”

Trong quá trình thực hiện sáng chế, một loạt các thiết bị và phương pháp khác nhau có thể được sử dụng kết hợp với các polypeptit và axit nucleic theo sáng chế, chẳng hạn,

để sàng lọc các polypeptit có hoạt tính phytaza, để sàng lọc các hợp chất là tác nhân điều biến có hoạt tính tiềm năng (ví dụ, tăng cường hoặc ức chế hoạt tính enzym), để sàng lọc kháng thể liên kết với polypeptit theo sáng chế, sàng lọc axit nucleic lai với axit nucleic theo sáng chế, và tương tự.

Giá đỡ rắn cố định enzym

Enzym phytaza, các mảnh của nó và axit nucleic mã hoá enzym và mảnh của nó có thể được cố định vào giá đỡ rắn. Việc này thường tiết kiệm và hiệu quả trong việc sử dụng phytaza trong các quy trình công nghiệp. Chẳng hạn, một tổ hợp enzym phytaza được liên kết với nhau (hoặc các mảnh hoạt tính của nó), được sử dụng trong một phản ứng hoá học cụ thể, có thể được gắn vào một giá đỡ rắn và nhúng vào bể phản ứng. Phản ứng enzym có thể xảy ra. Sau đó, giá đỡ rắn có thể được đưa ra ngoài bể phản ứng, cùng với enzym được cố định trên đó, để tái sử dụng. Theo một phương án theo sáng chế, axit nucleic được phân lập theo sáng chế sẽ được cố định vào một giá đỡ rắn. Theo một phương án khác theo sáng chế, giá đỡ rắn được chọn từ một nhóm bao gồm gel, nhựa, polyme, gốm, thuỷ tinh, vi điện cực và một tổ hợp bất kỳ của các loại giá đỡ trên.

Ví dụ, các giá đỡ rắn hữu ích theo sáng chế chứa gel. Một số ví dụ về gel như Sepharose, gelatin, glutaraldehyt, glutaraldehyt được xử lý chitosan, albumin-glutaraldehyt, chitosan-Xanthan, toyopearl gel (polyme gel), alginat, alginat-polylyzin, carrageenan, agaroza, glyoxyl agaroza, agaroza có từ tính, dextran-agaroza, poly(Carbamoyl Sulfonat) hydrogel, BSA-PEG hydrogel, polyvinyl alcohol được phosphoryl hoá (PVA), monoaminoethyl-N-aminoethyl (MANA), amino, hoặc tổ hợp bất kỳ của các loại gel trên.

Một giá đỡ rắn hữu ích khác theo sáng chế là nhựa hoặc polyme. Một số ví dụ về nhựa hoặc polyme gồm có xenluloza, acrylamit, nylon, rayon, polyeste, nhựa trao đổi ion âm, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, polyvinyl, polyacrylic, polymethacrylat, tổ hợp bất kỳ. Một loại giá đỡ rắn khác hữu ích khác theo sáng chế sáng chế là gốm. Ví dụ như gốm không có lỗ, gốm có lỗ, SiO₂, Al₂O₃. Một loại giá đỡ rắn hữu ích khác theo sáng chế là thuỷ tinh. Ví dụ như thuỷ tinh có lỗ rỗng, thuỷ tinh không có lỗ rỗng, thuỷ tinh aminopropyl hoặc tổ hợp bất kỳ. Một loại giá đỡ rắn hữu ích khác theo sáng chế có thể sử dụng là vi

điện cực. Ví dụ như oxit sắt từ được phủ polyetylenimin. Hạt graphit cũng có thể được sử dụng làm giá đỡ rắn. Một ví dụ khác về giá đỡ rắn là tế bào, như tế bào hồng cầu.

Phương pháp cố định

Có nhiều phương pháp đã được biết rõ đối với những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để cố định enzym hoặc mảnh của nó, hoặc axit nucleic, lên một giá đỡ rắn. Ví dụ về phương pháp này là, chẳng hạn, tạo giọt li ti tĩnh điện, phương pháp hoá điện, thông qua quá trình hấp phụ, thông qua liên kết cộng hoá trị, thông qua liên kết chéo, thông qua phản ứng hoặc quy trình hoá học, qua quy trình kết bao, qua quy trình bắt giữ, qua , hoặc qua poly (2-hydroxyethyl methacrylat). Các phương pháp tương tự được mô tả trong tài liệu *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C*. 1987. Academic Press. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Volume 136; và *Immobilization of Enzymes and Cells*. 1997. Humana Press. Edited by G. F. Bickerstaff. Series: *Methods in Biotechnology*, Edited by J. M. Walker.

Mạng mao dẫn

Các mạng mao dẫn, như GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Axit nucleic hoặc polypeptit theo sáng chế có thể được cố định hoặc đưa vào một mạng, gồm có các mạng mao dẫn. Các mạng có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc giám sát các thư viện chế phẩm (chẳng hạn, các phân tử nhỏ, kháng thể, axit nucleic, v.v.) về khả năng có thể liên kết hoặc điều biến hoạt tính của axit nucleic hoặc polypeptit theo sáng chế. Mạng mao dẫn sẽ cung cấp một hệ thống lưu trữ và sàng lọc mẫu mới. Chẳng hạn, một thiết bị sàng lọc mẫu có thể gồm nhiều các ống mao dẫn được kết cấu thành một mạng các ống mao dẫn liên nhau, trong đó mỗi ống mao dẫn chứa ít nhất một màng để tạo thành ngăn lưu mẫu. Thiết bị này có thể chứa một vật liệu kẽ được sắp xếp giữa các ống mao dẫn liên nhau trong mạng, và một hoặc nhiều chỉ dẫn tham chiếu được tạo ra trong vật liệu kẽ. Một ống mao dẫn để sàng lọc mẫu, trong đó ống mao dẫn được làm cho liên kết với nhau trong một mạng mao dẫn, có thể bao gồm một vách ngăn tạo ra một khoang chứa mẫu, và vách ngăn thứ hai tạo ra một khoang lọc, để lọc năng lượng kích thích được cung cấp vào khoang bên trong để kích thích mẫu.

Polypeptit hoặc axit nucleic, chẳng hạn, một phối tử, có thể được đưa vào thành phần thứ nhất của một phần của một ống mao dẫn của mạng mao dẫn. Mỗi ống mao dẫn của mạng mao dẫn có thể chứa ít nhất một vách ngăn tạo khoang để lưu giữ thành phần thứ nhất. Bọt khí có thể được đưa vào ống mao dẫn sau thành phần thứ nhất. Thành phần thứ hai có thể được đưa vào ống mao dẫn, trong đó thành phần thứ hai được ngăn cách với thành phần thứ nhất bởi bọt khí. Một mẫu cần quan tâm có thể đưa vào ở dạng chất lỏng thứ nhất được đánh dấu bằng một tiểu phần có thể phát hiện được vào ống mao dẫn của mạng mao dẫn, trong đó mỗi ống mao dẫn của mạng mao dẫn chứa ít nhất một vách ngăn tạo khoang để lưu giữ chất lỏng thứ nhất và tiểu phần có thể phát hiện được, và trong đó ít nhất một vách ngăn được phủ bằng một vật liệu liên kết để liên kết tiểu phần có thể phát hiện được với ít nhất một vách ngăn. Phương pháp còn bao gồm việc loại bỏ chất lỏng thứ nhất khỏi ống mao dẫn, trong đó tiểu phần có thể phát hiện được liên kết được lưu lại trong ống mao dẫn, và đưa chất lỏng thứ hai vào ống mao dẫn.

Mạng mao dẫn có thể gồm nhiều ống mao dẫn riêng lẻ chứa ít nhất một vách ngoài tạo khoang. Vách ngoài của ống mao dẫn có thể là một hoặc nhiều vách được hợp vào cùng với nhau. Tương tự, vách ngăn có thể tạo một khoang hình trụ, hình vuông, hình lục giác hoặc một dạng hình học bất kỳ miễn sao các vách ngăn sẽ tạo ra một khoang để lưu chất lỏng hoặc mẫu. Các ống mao dẫn trong mạng mao dẫn có thể được giữ gần với nhau để tạo thành một cấu trúc phẳng. Các ống mao dẫn có thể được liên kết với nhau bằng cách nung chảy (chẳng hạn, khi các ống mao dẫn được làm từ thủy tinh), được dính với nhau, liên kết, hoặc kẹp bên cạnh nhau. Mạng mao dẫn có thể được tạo thành từ một số lượng bất kỳ các ống mao dẫn khác nhau, chẳng hạn, từ 100 đến 4000000 ống mao dẫn. Mạng mao dẫn có thể tạo ra một đĩa vi chuẩn độ có khoảng 100000 hoặc cao hơn các ống mao dẫn khác nhau được liên kết với nhau.

Mạng hoặc “chip sinh học”

Các axit nucleic hoặc polypeptit theo sáng chế có thể được cố định hoặc đưa vào một mạng. Các mạng có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc giám sát các thư viện chế phẩm (chẳng hạn, các phân tử nhỏ, kháng thể, axit nucleic, v.v.) về khả năng có thể liên kết hoặc điều biến hoạt tính của axit nucleic hoặc polypeptit theo sáng chế. Chẳng hạn, theo một khía cạnh theo sáng chế, một tham số được giám sát là quá trình biểu hiện

phiên mã của một gen phytaza. Một hoặc nhiều, hoặc, tất cả các bản sao của một tế bào có thể được đo bằng cách lai mẫu chứa các bản sao của tế bào, hoặc, axit nucleic đại diện hoặc bổ sung với các bản sao của tế bào, bằng quá trình lai với axit nucleic được cố định trên một mạng, hoặc “chip sinh học.” Bằng cách sử dụng một “mạng” axit nucleic trên một microchip, một số hoặc tất cả các bản sao của tế bào có thể được định lượng một cách đồng thời. Theo một cách khác, các mạng chứa axit nucleic hệ gen cũng có thể được sử dụng để xác định kiểu gen của một chủng mới được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế. “Các mạng polypeptit” cũng có thể được sử dụng để định lượng đồng thời nhiều protein.

Theo các khía cạnh khác, “mạng” hoặc “vi mạng” hoặc “chip sinh học” hoặc “chip” theo sáng chế chứa nhiều các phần tử đích ngoài axit nucleic và/hoặc polypeptit hoặc peptit theo sáng chế; mỗi phần tử đích chứa một lượng xác định của một hoặc nhiều polypeptit (gồm cả kháng thể) hoặc axit nucleic được cố định trên một vùng xác định bề mặt cơ chất, như được mô tả chi tiết, dưới đây.

Sáng chế cũng có thể được thực hiện với một “mạng” đã biết bất kỳ, còn được gọi là “vi mạng” hoặc “mạng axit nucleic” hoặc “mạng polypeptit” hoặc “mạng kháng thể” hoặc “chip sinh học” hoặc các biến thể của nó. Các mạng thường là một nhóm gồm nhiều “điểm” hoặc “phần tử đích,” mỗi phần tử đích chứa một lượng xác định của một hoặc nhiều các phân tử sinh học, chẳng hạn, oligonucleotit, được cố định trên một vùng xác định bề mặt cơ chất để liên kết đặc hiệu với một phân tử mẫu, chẳng hạn, bản sao mRNA.

Trong quá trình thực hiện sáng chế, một mạng và/hoặc phương pháp tạo và sử dụng các mạng đã biết bất kỳ có thể được đưa vào toàn bộ hoặc một phần, hoặc các biến thể của nó, như được mô tả, chẳng hạn, trong US 6,277,628; US 6,277,489; US 6,261,776; US 6,258,606; US 6,054,270; US 6,048,695; US 6,045,996; US 6,022,963; US 6,013,440; US 5,965,452; US 5,959,098; US 5,856,174; US 5,830,645; US 5,770,456; US 5,632,957; US 5,556,752; US 5,143,854; US 5,807,522; US 5,800,992; US 5,744,305; US 5,700,637; US 5,556,752; US 5,434,049; tham khảo thêm, chẳng hạn, WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; tham khảo thêm, chẳng hạn, Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes*,

Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Supp. 21:25-32.
 Tham khảo thêm công bố đơn yêu cầu cấp patent Hoa Kỳ số: 20010018642;
 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537;
 20010008765.

Polypeptit và peptit

Sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp có độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất 95%, 96% 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO:2, và được mã hoá bởi trình tự polynucleotit chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến về cặp bazơ nucleotit đặc hiệu so với SEQ ID NO:1, nêu trên, hoặc có trình tự axit amin chứa ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc tất cả 14 cải biến gốc axit amin đặc hiệu so với SEQ ID NO:2, nêu trên. Để tham khảo, SEQ ID NO:2 “gốc” được tạo ra theo cách tổng hợp là:

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

```

Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
      180                      185                      190
Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
      195                      200                      205
Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
      210                      215                      220
Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
225                      230                      235                      240
Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
      245                      250                      255
Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
      260                      265                      270
Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
      275                      280                      285
Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
      290                      295                      300
Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
305                      310                      315                      320
Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
      325                      330                      335
Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
      340                      345                      350
Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
      355                      360                      365
Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
      370                      375                      380
Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
385                      390                      395                      400
Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
      405                      410                      415
Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
      420                      425                      430

```

Trình tự của phytaza gốc SEQ ID NO:2, được mã hoá bởi, chẳng hạn, SEQ ID NO:1, thể hiện các cải biến về trình tự được tạo ra bởi quá trình gây đột biến bão hoà tại chỗ (GSSM) được chọn để xây dựng thư viện GeneReassembly™ được nêu trong Fig. 8.

Theo một khía cạnh, polypeptit và các peptit theo sáng chế có hoạt tính phytaza. Theo các khía cạnh khác, chúng cũng có thể hữu ích là, chẳng hạn, đoạn dò đánh dấu, kháng nguyên, yếu tố dung nạp miễn dịch (toleragen), môtip, vị trí có hoạt tính phytaza.

Theo các khía cạnh khác, polypeptit và các peptit theo sáng chế là polypeptit được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc tái tổ hợp. Các peptit và protein có thể được biểu hiện theo cách tái tổ hợp trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể. Các peptit và polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra và phân lập bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các polypeptit và peptit theo sáng chế cũng có thể được tổng hợp, toàn bộ hoặc một phần, sử dụng các phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo chẳng hạn, Caruthers (1980) *Nucleic Acid Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acid Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga, A.K., *Therapeutic Peptit và Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Chẳng hạn, quá trình tổng hợp peptit có thể thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật pha rắn khác nhau (tham khảo, chẳng hạn, Roberge (1995) *Science* 269:202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289:313) và có thể thực hiện quá trình tổng hợp tự động, chẳng hạn, sử dụng máy tổng hợp peptit ABI 431A (Perkin Elmer) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các enzym và polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng được phân lập hoặc được tinh sạch đến khi đồng đều. Polypeptit phytaza theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ. Chẳng hạn, polypeptit phytaza có thể được sản xuất trong hệ thống biểu hiện tái tổ hợp tiêu chuẩn (như được mô tả ở đây), được tổng hợp hoá học (mặc dù bị hạn chế ở các phân đoạn peptit phytaza nhỏ), hoặc được tinh sạch từ các sinh vật trong đó chúng được biểu hiện tự nhiên. Các hệ biểu hiện tái tổ hợp hữu ích gồm có động vật có vú, vi khuẩn, và thực vật.

Theo các khía cạnh khác, các polypeptit và peptit theo sáng chế chứa các “axit amin” hoặc “trình tự axit amin” là các trình tự oligopeptit, peptit, polypeptit hoặc protein, hoặc theo một cách khác, là các phân đoạn, phần hoặc dưới đơn vị của chúng, và các trình tự tổng hợp hoặc có nguồn gốc tự nhiên.

Theo các khía cạnh khác, polypeptit hoặc protein “tái tổ hợp” theo sáng chế gồm có polypeptit hoặc protein được sản xuất bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp; chẳng hạn,

được sản xuất từ các tế bào biến nạp cấu trúc ADN ngoại sinh mã hoá polypeptit hoặc protein mong muốn. Axit nucleic (gồm có các oligonucleotit), polypeptit hoặc protein “tổng hợp” theo sáng chế bao gồm các phân tử được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp hoá học, như được mô tả chi tiết ở đây. Theo các khía cạnh khác, polypeptit hoặc protein theo sáng chế chứa các axit amin được nối với nhau bằng các liên kết peptit hoặc các liên kết peptit cải biến, nghĩa là, các đẳng vị peptit, và có thể chứa các axit amin được cải biến chứ không phải là 20 axit amin được mã hoá bởi gen. Polypeptit cũng có thể được cải biến bằng các quá trình tự nhiên, như xử lý sau dịch mã, hoặc bằng các kỹ thuật cải biến hoá học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cải biến có thể xảy ra ở mọi vị trí trong polypeptit, chứa bộ khung peptit, chuỗi phụ axit amin và đầu amin hoặc carboxyl. Cần hiểu rằng loại cải biến tương tự có thể ở mức độ tương tự hoặc các mức độ khác nhau tại các vị trí khác nhau trong một polypeptit. Tương tự, một polypeptit xác định cũng có thể có nhiều loại cải biến, chẳng hạn, axetyl hoá, axyl hoá, ADP-ribosyl hoá, amit hoá, liên kết cộng hoá trị với flavin, liên kết cộng hoá trị với nhóm hem, liên kết cộng hoá trị với nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, liên kết cộng hoá trị lipid hoặc dẫn xuất lipid, liên kết cộng hoá trị phosphatidylinositol, tạo vòng liên kết chéo, tạo liên kết disulfid, khử methyl hoá, hình thành các liên kết chéo đồng hoá trị, hình thành xystein, hình thành pyroglutamat, formyl hoá, gamma-carboxyl hoá, glycosyl hoá, GPI hình thành liên kết, hydroxyl hoá, iodin hoá, methyl hoá, myristol hoá, oxi hoá, pegyl hoá, thuỷ phân protein, phosphoryl hoá, prenyl hoá, raxemic hoá, selenoyl hoá, sulfat hoá, và thêm axit amin vào protein nhờ ARN vận chuyển như arginyl hoá.

Theo các khía cạnh khác, polypeptit hoặc protein “tổng hợp” là các protein được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp hoá học. Phương pháp tổng hợp peptit hoá học pha rắn có thể được sử dụng để tổng hợp polypeptit hoặc các phân đoạn của nó theo sáng chế. Phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật từ những năm đầu của thập niên 1960 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (tham khảo Stewart, J. M. và Young, J. D., Solid Phase Peptid Synthesis, 2 ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)) và mới đây đã được sử dụng trong thiết kế peptit phòng thí nghiệm để bán trên thị trường và các kit tổng hợp (Cambridge Research Biochemicals). Các kit thí nghiệm bán sẵn trên thị trường thường ứng dụng các mô tả của H. M. Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984) và cung cấp quá trình tổng hợp peptit sau khi đầu mút của “các

thể que” hoặc “thể kim” được nối thành một bản đơn. Khi một hệ thống như vậy được sử dụng, một bản các thể que hoặc thể kim được đảo ngược và chèn vào một bản thứ hai với các giếng hoặc ổ chứa tương ứng, chứa các dung dịch để gắn hoặc tạo liên kết một axit amin thích hợp với đầu mút của thể kim hoặc thể que. Bằng cách lặp lại bước này, nghĩa là, đảo ngược và chèn đầu mút của thể que và thể kim vào một dung dịch thích hợp, các axit amin được cấu trúc thành một peptit mong muốn. Ngoài ra, một số các hệ tổng hợp peptit FMOC có sẵn. Chẳng hạn, việc ghép nối một polypeptit hoặc phân đoạn của nó có thể được tiến hành trên một giá đỡ rắn sử dụng máy tổng hợp peptit tự động của Applied Biosystems, Inc. Model 431A. Thiết bị này sẽ cung cấp một kết nối sẵn sàng với peptit theo sáng chế, hoặc bằng cách tổng hợp trực tiếp hoặc bằng cách tổng hợp một loạt các phân đoạn có thể được liên kết với nhau sử dụng các kỹ thuật đã biết khác.

Theo các khía cạnh khác, các peptit và polypeptit theo sáng chế được glycosyl hoá. Glycosyl hoá có thể được đưa vào sau dịch mã bằng phương pháp hoá học hoặc bằng các cơ chế sinh tổng hợp nội bào, trong đó phương pháp thứ hai này sẽ bao gồm việc sử dụng các cấu trúc glycosyl hoá lặp lại đã biết, có thể có cùng nguồn gốc với trình tự hoặc có thể được đưa vào như một peptit hoặc được đưa vào axit nucleic trình tự mã hoá. Glycosyl hoá có thể là liên kết -O hoặc liên kết -N, hoặc, tổ hợp của các loại trên.

Theo các khía cạnh khác, các peptit và polypeptit theo sáng chế, như được xác định trên đây, chứa các dạng “bắt chước” và “giả peptit - peptidomimetic”, một phần hoặc toàn bộ. Theo một khía cạnh, các thuật ngữ “bắt chước” và “giả peptit - peptidomimetic” chỉ một hợp chất hoá học có nguồn gốc tổng hợp có các đặc điểm cấu trúc và/hoặc chức năng về cơ bản là giống với polypeptit theo sáng chế. Dạng bắt chước có thể hoặc hoàn toàn được tạo bằng cách tổng hợp các chất tương tự không có nguồn gốc từ tự nhiên của axit amin hoặc là một phân tử tập hợp nhiều phần gen của một phân tử là axit amin có peptit có nguồn gốc tự nhiên và một phần là chất tương tự không có trong tự nhiên của axit amin. Dạng bắt chước cũng có thể kết hợp một lượng bất kỳ các thay thế bảo toàn axit amin tự nhiên miễn sao các thay thế này không làm cải biến đáng kể cấu trúc và/hoặc hoạt tính của phân tử bắt chước. Vì đối với polypeptit theo sáng chế là các biến thể bảo toàn, nên quá trình thử nghiệm thông thường sẽ xác định liệu một cấu trúc bắt chước có nằm trong phạm vi của sáng chế hay không, nghĩa là, cấu trúc và/hoặc

chức năng của nó có bị cải biến một cách đáng kể hay không. Do đó, theo một khía cạnh, chế phẩm bất chước sẽ thuộc phạm vi của sáng chế nếu chúng có hoạt tính phytaza.

Theo các khía cạnh khác, peptit và polypeptit theo sáng chế có trình tự chứa cải biến đặc hiệu với SEQ ID NO:2, như được xác định ở trên, cũng như các thay thế bảo toàn có hoặc không cải biến hoạt tính, chẳng hạn, hoạt tính enzym. Theo các khía cạnh khác, các thay thế bảo toàn là các đột biến thay thế một axit amin xác định trong một polypeptit bằng một axit amin khác có cùng đặc điểm. Theo các khía cạnh khác, các thay thế bảo toàn là các thay thế sau đây: các thay thế một axit amin béo như Ala, Val, Leu và Ile với một axit amin béo khác; thay thế Ser bằng Thr hoặc ngược lại; thay thế một gốc có tính axit như Asp và Glu với một gốc có tính axit khác; thay thế một gốc có nhóm amit, như Asn và Gln, với một gốc có nhóm amit; thay thế một gốc có tính bazơ như Lys và Arg với một nhóm có tính bazơ khác; và thay thế một gốc thơm như Phe, Tyr với một gốc thơm khác.

Chế phẩm bất chước polypeptit theo sáng chế có thể chứa một tổ hợp bất kỳ của các thành phần cấu trúc không có nguồn gốc tự nhiên. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm bất chước theo sáng chế có thể gồm một hoặc cả ba nhóm cấu trúc sau đây: a) nhóm liên kết gốc gốc chứ không phải là liên kết amit tự nhiên (“liên kết peptit”); b) các gốc không có nguồn gốc tự nhiên thay vì các gốc axit amin có nguồn gốc tự nhiên; hoặc c) các gốc chứa mức độ bất chước cấu trúc thứ cấp, nghĩa là, để kích thích hoặc ổn định hoá cấu trúc thứ cấp, chẳng hạn, cấu trúc vòng xoắn beta, vòng xoắn gamma, gấp nếp beta, cấu hình xoắn alpha, và các cấu trúc tương tự. Chẳng hạn, polypeptit theo sáng chế có thể được xác định là bất chước khi tất cả hoặc một vài gốc của nó được liên kết với nhau bằng các liên kết hoá học chứ không phải là liên kết peptit tự nhiên. Các gốc peptit bất chước riêng rẽ có thể được nối với nhau bằng các liên kết peptit, các liên kết hoá học khác hoặc các nhóm liên kết, như, chẳng hạn, glutaraldehyt, este N-hydroxysuccinimit, maleimit hai chức năng, N,N'-dicyclohexylcarbodiimit (DCC) hoặc N,N'-diisopropylcarbodiimit (DIC). Các nhóm liên kết có thể khác với liên kết amit thông thường (“liên kết peptit”) gồm có, chẳng hạn, ketometylen (chẳng hạn, $-C(=O)-CH_2-$ for $-C(=O)-NH-$), aminometylen (CH_2-NH), etylen, olefin ($CH=CH$), ete (CH_2-O), thioete (CH_2-S), tetrazol (CN_4-), thiazol, retroamit, thioamit, hoặc este (tham khảo,

chẳng hạn, Spatola (1983) in Chemistry và Biochemistry of Axit amins, Peptit và Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptit Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY).

Polypeptit theo sáng chế cũng có thể được xác định là bất chước vì chứa tất cả hoặc một số gốc không có nguồn gốc tự nhiên thay thế các gốc axit amin tự nhiên. Các gốc không có nguồn gốc tự nhiên đã được biết rõ trong các tài liệu khoa học và patent; một số chế phẩm không có nguồn gốc tự nhiên thử nghiệm hữu ích là chế phẩm bất chước của các gốc axit amin tự nhiên và hướng dẫn được mô tả dưới đây. Dạng bất chước của các axit amin thơm có thể được tạo ra bằng cách thay thế bằng, chẳng hạn, D- hoặc L- naphylalanin; D- hoặc L- phenylglyxin; D- hoặc L-2 thieneylalanin; D- hoặc L-1, -2, 3-, hoặc 4- pyrenylalanin; D- hoặc L-3 thieneylalanin; D- hoặc L-(2-pyridinyl)-alanin; D- hoặc L-(3-pyridinyl)-alanin; D- hoặc L-(2-pyrazinyl)-alanin; D- hoặc L-(4-isopropyl)-phenylglyxin; D-(triflometyl)-phenylglyxin; D-(triflometyl)-phenylalanin; D-p-flo-phenylalanin; D- hoặc L-p-biphenylphenylalanin; K- hoặc L-p-metoxyl-biphenylphenylalanin; D- hoặc L-2-indol(alkyl)alanin; và, D- hoặc L-alkylainin, trong đó alkyl có thể được thế hoặc không được thế metyl, etyl, propyl, hexyl, butyl, pentyl, isopropyl, iso-butyl, sec-isotyl, iso-pentyl, hoặc các axit amin không có tính axit. Các vòng thơm của các axit amin không tự nhiên gồm có, chẳng hạn, thiazolyl, thiophenyl, pyrazolyl, benzimidazolyl, naphthyl, furanyl, pyrolyl, và pyridyl.

Dạng bất chước của axit amin có tính axit có thể được tạo ra bằng cách thay thế bằng, chẳng hạn, các axit amin không carboxylat trong khi vẫn giữ một điện tích âm; (phosphono)alanin; threonin được sulfat hoá. Các nhóm bên carboxyl (chẳng hạn, aspartyl hoặc glutamyl) cũng có thể được cải biến chọn lọc bằng cách phản ứng với carbodiimit ($R'-N-C-N-R'$) như, chẳng hạn, 1-xyclohexyl-3(2-morpholiny)-(4-etyl) carbodiimit hoặc 1-etyl-3(4-azonia- 4,4- dimetholpentyl) carbodiimit. Aspartyl hoặc glutamyl cũng có thể được cải biến thành các gốc asparaginyll và glutaminyll bằng cách phản ứng với các ion amoni. Dạng bất chước của các axit amin có tính bazơ được tạo ra bằng cách thay thế với, chẳng hạn, (ngoài lyzin và arginin) các axit amin ornitin, citrullin, hoặc axit axetic (guanidino), hoặc axit axetic alkyl (guanidino), trong đó alkyl được xác định như trên. Dẫn xuất nitril (chẳng hạn, chứa gốc CN- thay vì COOH) có thể được thay thế cho asparagin hoặc glutamin. Các gốc asparaginyll và glutaminyll có thể được khử amin hoá thành các gốc aspartyl hoặc glutamyl tương ứng. Các dạng bất

chức gốc arginin có thể được tạo ra bằng cách cho arginyl phản ứng với, chẳng hạn, một hoặc nhiều các chất thông thường, gồm có, chẳng hạn, phenylglyoxal, 2,3-butanedion, 1,2-cyclo-hexanedion, hoặc ninhydrin, đối với các chất này có thể ưu tiên sử dụng các điều kiện có tính kiềm. Các dạng bất chức gốc tyrosin có thể được tạo ra bằng cách cho tyrosyl phản ứng với, chẳng hạn, các hợp chất diazoni thơm hoặc tetranitrometan. N-acetylimidizol và tetranitrometan có thể được sử dụng để tạo các gốc O-acetyl tyrosyl và dẫn xuất 3-nitro. Các dạng bất chức gốc xystein có thể được tạo ra bằng cách cho gốc xysteinyll phản ứng với, chẳng hạn, alpha-haloaxetat như 2-cloaxit axetic hoặc cloaxetamit và các amin tương ứng; để tạo ra các dẫn xuất carboxymetyl hoặc carboxyamidometyl. Gốc dạng bất chức xystein cũng có thể được tạo ra bằng cách cho gốc xysteinyll phản ứng với, chẳng hạn, brom-trifloaxeton, axit alpha-brom-beta-(5-imidozoyl) propionic; cloaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfit; metyl 2-pyridyl disulfit; p-clomercuribenzoat; 2-clomercuri-4 nitrophenol; hoặc, clo-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Các dạng bất chức Lyzin có thể được tạo ra (và các gốc đầu amin có thể được cải biến) bằng cách cho lyzinyll phản ứng với, chẳng hạn, succinic hoặc các axit carboxylic anhydrit khác. Lyzin và các dạng bất chức gốc chứa alpha-amino cũng có thể được tạo ra bằng cách cho phản ứng với các imidoeste, như metyl picolinimidat, pyridoxal phosphat, pyridoxal, cloborohydrua, axit trinitro-benzenesulfonic, O-metylisoure, 2,4, pentanedion, và các phản ứng được xúc tác bởi transamidaza với glyoxylat. Các dạng bất chức của metionin có thể được tạo ra các phản ứng với, chẳng hạn, metionin sulfoxit. Các dạng bất chức của prolin gồm, chẳng hạn, axit pipecolic, axit thiazolidin carboxylic, 3- hoặc 4- hydroxy prolin, dehydroprolin, 3- hoặc 4-metylprolin, hoặc 3,3,-dimetylprolin. Các dạng bất chức gốc histidin có thể được tạo ra bằng cách cho histidyl phản ứng với, chẳng hạn, diethylprocacbonat hoặc para-bromphenaxyl bromua. Các dạng bất chức khác bao gồm, chẳng hạn, các dạng bất chức được tạo ra bằng cách hydroxyl hoá prolin và lyzin; phosphoryl hoá các nhóm hydroxyl của seryl hoặc threonyl; metyl hoá các nhóm alpha-amino của lyzin, arginin và histidin; axetyl hoá amin đầu N; metyl hoá các gốc amit mạch chính hoặc thay thế bằng các axit amin N-metyl; hoặc amit hoá nhóm carboxyl đầu C.

Một gốc, chẳng hạn, một axit amin, trong polypeptit theo sáng chế cũng có thể được thay thế bằng một axit amin (hoặc gốc giả peptit) có tính bất đối xứng. Do đó, một

axit amin có nguồn gốc tự nhiên ở cấu hình L (cũng có thể được gọi là R hoặc S, phụ thuộc vào cấu trúc của gốc hoá học) có thể được thay thế bằng axit amin có cùng loại cấu trúc hoá học hoặc giả peptit, nhưng có tính bất đối xứng, được gọi là D- axit amin, nhưng cũng có thể được gọi là dạng R- hoặc S-.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cải biến polypeptit theo sáng chế bằng các quá trình tự nhiên, như xử lý sau dịch mã (ví dụ, photpharyl hóa, axyl hóa), hoặc bằng các cải biến hoá học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và tạo ra các polypeptit được cải biến. Các cải biến có thể hình thành ở mọi vị trí trong polypeptit, gồm có bộ khung peptit, mạch phụ axit amin và đầu amin hoặc carboxyl. Cần hiểu rằng loại cải biến tương tự có thể ở mức độ tương tự hoặc các mức độ khác nhau tại các vị trí khác nhau trong một polypeptit. Tương tự, một polypeptit xác định cũng có thể có nhiều loại cải biến, chẳng hạn, axetyl hoá, axyl hoá, ADP-ribosyl hoá, amit hoá, liên kết cộng hoá trị với flavin, liên kết cộng hoá trị với nhóm hem, liên kết cộng hoá trị với nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, liên kết cộng hoá trị lipid hoặc dẫn xuất lipid, liên kết cộng hoá trị phosphatidylinositol, tạo vòng liên kết chéo, tạo liên kết disulfit, khử methyl hoá, hình thành các liên kết chéo cộng hoá trị, hình thành xystein, hình thành pyroglutamat, formyl hoá, gamma-carboxyl hoá, glycosyl hoá, GPI hình thành liên kết, hydroxyl hoá, iodin hoá, methyl hoá, myristol hoá, oxi hoá, pegyl hoá, thuỷ phân protein, phosphoryl hoá, prenyl hoá, raxemic hoá, selenoyl hoá, sulfat hoá, và thêm axit amin vào protein nhờ ARN vận chuyển như arginyl hoá. Tham khảo, chẳng hạn, Creighton, T.E., *Proteins – Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983).

Phương pháp tổng hợp peptit hoá học pha rắn có thể được sử dụng để tổng hợp polypeptit hoặc các phân đoạn của nó theo sáng chế. Phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này từ những năm đầu của thập niên 1960 (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (tham khảo Stewart, J. M. và Young, J. D., *Solid Phase Peptit Synthesis*, 2 ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)) và mới đây đã được sử dụng trong thiết kế peptit phòng thí nghiệm để bán trên thị trường và các kit tổng hợp (Cambridge Research Biochemicals). Các kit thí nghiệm bán sẵn trên thị trường thường ứng dụng các mô tả của H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998

(1984) và cung cấp quá trình tổng hợp peptit sau khi đầu mút của “các thể que” hoặc “thể kim” được nối với thành một bản đơn. Khi một hệ thống như vậy được sử dụng, một bản các thể que hoặc thể kim được đảo ngược và chèn vào bản thứ hai của các giếng hoặc ổ chứa tương ứng, chứa các dung dịch để liên kết hoặc tạo liên kết một axit amin thích hợp với đầu của thể kim hoặc thể que. Bằng cách lặp lại bước này, nghĩa là, đảo ngược và chèn thể đầu mút của thể que và thể kim vào một dung dịch thích hợp, các axit amin được cấu trúc thành một peptit mong muốn. Ngoài ra, một số các hệ tổng hợp peptit FMOC có sẵn. Chẳng hạn, ghép nối một polypeptit hoặc phân đoạn của nó có thể được tiến hành trên một giá đỡ rắn sử dụng máy tổng hợp peptit tự động của Applied Biosystems, Inc. Model 431A. Công cụ này sẽ cung cấp một kết nối sẵn sàng với peptit theo sáng chế, hoặc bằng cách tổng hợp trực tiếp hoặc bằng cách tổng hợp một loạt các phân đoạn có thể được liên kết với nhau sử dụng các kỹ thuật đã biết khác.

Theo một khía cạnh, peptit và polypeptit theo sáng chế có trình tự chứa cải biến đặc hiệu so với SEQ ID NO:2, như được xác định ở trên, cũng như các trình tự axit amin “gần như tương đồng”, nghĩa là, một trình tự sai khác bởi một hoặc nhiều các thay thế axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn, mất đoạn, hoặc thêm đoạn, đặc biệt khi một đột biến thay thế xảy ra tại một vị trí không phải là vị trí hoạt động của phân tử, và cho rằng polypeptit đó cơ bản vẫn giữ được các đặc tính chức năng của nó. Theo một khía cạnh, peptit và polypeptit theo sáng chế có các trình tự chứa cải biến đặc hiệu so với SEQ ID NO:2, như được xác định ở trên, và các thay thế axit amin bảo toàn thay thế một axit amin bằng một axit amin khác cùng loại, chẳng hạn, quá trình thay thế một axit amin kỵ nước, như isoleuxin, valin, leuxin, hoặc metionin, bằng một axit amin khác, hoặc thay thế một axit amin phân cực bằng một axit amin phân cực khác, như thay thế arginin bằng lyzin, axit glutamic bằng axit aspartic hoặc glutamin bằng asparagin. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều axit amin có thể được loại bỏ, chẳng hạn, từ polypeptit phytaza theo sáng chế để tạo ra các cải biến về cấu trúc của polypeptit mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của nó, hoặc theo một cách khác, để làm thay đổi có mục đích hoạt tính sinh học của nó. Chẳng hạn, các axit amin ở đầu amin- hoặc carboxyl- là cần thiết, hoặc theo một cách khác là không cần thiết, đối với hoạt tính phytaza có thể được loại bỏ và/hoặc thêm vào. Các trình tự polypeptit được cải biến theo sáng chế có thể được thử nghiệm về hoạt tính sinh học phytaza bằng một số phương pháp, gồm cho

trình tự polypeptit được cải biến tiếp xúc với cơ chất phytaza và xác định liệu polypeptit được cải biến có làm giảm lượng cơ chất đặc hiệu trong thử nghiệm hoặc làm tăng lượng sinh phẩm của phản ứng enzym của một polypeptit phytaza hoạt động với cơ chất hay không.

Một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit có độ tương đồng về trình tự khoảng 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc cao hơn so với SEQ ID NO:2 và có một trong nhiều cải biến về trình tự đặc hiệu, như đã nêu.

Các biến thể trình tự axit amin theo sáng chế có thể được xác định bởi bản chất của quá trình gây đột biến được xác định trước, một đặc điểm phân biệt chúng với dạng có nguồn gốc tự nhiên, chẳng hạn, một biến thể alen hoặc trong loài của trình tự phytaza. Theo một khía cạnh, các biến thể theo sáng chế sẽ có cùng hoạt tính sinh học định tính như đồng phân có nguồn gốc tự nhiên. Theo một cách khác, các biến thể có thể được chọn lọc để có các đặc điểm được cải biến. Theo một khía cạnh, khi vị trí hoặc vùng để đưa biến thể trình tự axit amin đã được xác định trước, thì thực chất quá trình gây đột biến lại không cần xác định trước. Chẳng hạn, để tối ưu hiệu quả của quá trình gây đột biến tại một vị trí xác định, quá trình gây đột biến ngẫu nhiên có thể được tạo thực hiện tại một bộ ba mã hóa hoặc vùng đích và các biến thể phytaza biểu hiện sẽ được sàng lọc để có tổ hợp hoạt tính mong muốn tối ưu. Các kỹ thuật để tạo các đột biến thay thế tại các vị trí định sẵn trong ADN có trình tự đã biết đã được biết rõ, như nêu ở đây chẳng hạn, gây đột biến đoạn mồi M13 và gây đột biến PCR. Việc sàng lọc các thể đột biến có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, chẳng hạn, các thử nghiệm dị hoá phytat (myo-inositol-hexaphosphat) thành inositol và phosphat vô cơ; hoặc, thủy phân phytat (myo-inositol-hexaphosphat). Theo các khía cạnh khác, các đột biến thay thế axit amin có thể là các gốc riêng lẻ; các đoạn chèn có thể theo trật tự từ khoảng 1 đến 20 axit amin, mặc dù các đoạn chèn lớn hơn có thể thực hiện được. Các đột biến mất đoạn có thể thay đổi từ khoảng 1 đến khoảng 20, 30, 40, 50, 60, 70 gốc hoặc nhiều hơn. Để thu được dẫn xuất cuối cùng với các đặc tính tối ưu, các phương pháp gây đột biến thay thế, loại bỏ, thêm đoạn hoặc tổ hợp bất kỳ của các phương pháp trên có thể được sử dụng. Thông thường, các cải biến này được thực hiện trên một số ít axit amin để cải biến tối thiểu

phân tử. Tuy nhiên, các thay đổi lớn hơn cũng có thể được thực hiện trong một số trường hợp nhất định.

Polypeptit theo sáng chế có thể thu được bằng phương pháp làm giàu sinh hóa hoặc tinh sạch. Trình tự của polypeptit hoặc các phân đoạn tương đồng tiềm năng có thể được xác định bằng quá trình cắt thủy phân protein, điện di trên gel và/hoặc đọc vi trình tự.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thử nghiệm để xác định các phân đoạn hoặc biến thể của polypeptit theo sáng chế. Polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng để xúc tác các phản ứng hoá sinh để chỉ ra rằng phân đoạn hoặc biến thể này vẫn giữ được hoạt tính enzyme của polypeptit theo sáng chế.

Một thử nghiệm để xác định liệu các phân đoạn của các biến thể vẫn giữ được hoạt tính enzyme của polypeptit theo sáng chế bao gồm các bước: cho phân đoạn hoặc biến thể polypeptit phản ứng với cơ chất trong điều kiện cho phép phân đoạn hoặc biến thể polypeptit hoạt động, và phát hiện sự giảm nồng độ cơ chất hoặc sự gia tăng nồng độ sản phẩm phản ứng đặc hiệu của phản ứng giữa polypeptit và cơ chất.

Polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng để xúc tác các phản ứng hoá sinh. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quá trình sử dụng polypeptit theo sáng chế là phytaza.

Sáng chế đề xuất phytaza không có hoặc có các trình tự tín hiệu được cải biến (còn được gọi là peptit tín hiệu (SP), hoặc peptit dẫn đầu), hoặc trình tự tín hiệu khác loài. Polypeptit theo sáng chế cũng có thể có hoặc không có các vùng prepro và/hoặc vùng xúc tác (CD) được cải biến hoặc khác loài. SP, vùng prepro và/hoặc CD được cải biến hoặc khác loài được đưa vào polypeptit theo sáng chế có thể là một phần của protein dung hợp, chẳng hạn, như là một vùng khác loài trong một protein chứa nhiều phần gen của các cá thể khác nhau, hoặc được đưa vào bằng một chất liên kết hoá học. Chẳng hạn, enzyme theo sáng chế có thể chứa SP và/hoặc prepro khác loài trong một vectơ, chẳng hạn, vectơ chuỗi pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Ngoài ra, polypeptit theo sáng chế còn có thể chứa các trình tự khác loài, hoặc các trình tự từ các phytaza khác, hoặc từ các nguồn không phytaza, hoặc các trình tự hoàn toàn được tổng hợp. Do đó, theo một khía cạnh, axit nucleic theo sáng chế có thể chứa

trình tự mã hoá trình tự tín hiệu (SP), vùng prepro và/hoặc vùng xúc tác (CD) nội sinh, được cải biến hoặc khác loại và trình tự khác loại (nghĩa là, một trình tự không liên kết một cách tự nhiên với một trình tự tín hiệu (SP), vùng prepro và/hoặc vùng xúc tác (CD) theo sáng chế). Trình tự khác loại có thể ở đầu 3', 5', và/hoặc trên cả hai đầu của trình tự mã hoá SP, vùng prepro và/hoặc CD.

Các phương pháp để xác định các trình tự vùng "prepro" và các trình tự tín hiệu đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136. Chẳng hạn, để xác định một trình tự prepro, protein sẽ được tinh sạch từ khoang ngoại bào và trình tự protein đầu N được xác định và so sánh với dạng không được xử lý. Các phương pháp nhận biết trình tự tín hiệu khác nhau đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, peptit tín hiệu để sử dụng cùng với polypeptit theo sáng chế sẽ được xác định bằng một phương pháp gọi là SignalP. SignalP sử dụng một mạng tín hiệu tổ hợp nhận ra cả peptit tín hiệu và các vị trí phân cắt của chúng; tham khảo, chẳng hạn, Nielsen (1997) "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptide and prediction of their cleavage sites" Protein Engineering 10:1-6.

Sáng chế đề xuất enzym phytaza trong đó cấu trúc của bộ khung polypeptit, cấu trúc bậc hai hoặc cấu trúc bậc ba, chẳng hạn, cấu trúc xoắn alpha hoặc gấp nếp beta, được cải biến. Theo một khía cạnh, điện tính hoặc mức độ kỵ nước đã được cải biến. Theo một khía cạnh, độ lớn của mạch phụ đã được cải biến. Các thay đổi đáng kể trong chức năng hoặc mức độ tương đồng miễn dịch được tạo ra bằng cách chọn lọc các đột biến thay thế ít bảo toàn hơn. Chẳng hạn, các đột biến thay thế có thể được tạo ra với tác dụng đáng kể hơn: cấu trúc của bộ khung polypeptit trong vùng cải biến, chẳng hạn cấu trúc xoắn alpha hoặc gấp nếp beta; vị trí tích điện hoặc kỵ nước của phân tử, có thể tại một vị trí hoạt động; hoặc mạch phụ. Sáng chế đề xuất các đột biến thay thế trong polypeptit theo sáng chế trong đó (a) gốc ưa nước, chẳng hạn seryl hoặc threonyl, được thay thế cho (hoặc bằng) một gốc kỵ nước, chẳng hạn loxyl, isoloxyl, phenylalanyl, valyl hoặc alanyl; (b) cystein hoặc prolin được thay thế cho (hoặc bằng) các gốc bất kỳ khác; (c) gốc có mạch phụ tích điện dương, chẳng hạn lyzyl, arginyl, hoặc histidyl, được thay thế cho (hoặc bằng) một gốc tính điện âm, chẳng hạn glutamyl hoặc aspartyl; hoặc (d) gốc có mạch phụ lớn, chẳng hạn phenylalanin, được thay thế cho (hoặc bằng) một gốc

không có mạch phụ, chẳng hạn glyxin. Các biến thể có thể có cùng hoạt tính sinh học định tính (nghĩa là, hoạt tính enzym phytaza) mặc dù các biến thể có thể được chọn lọc để cải biến các đặc tính của phytaza nếu cần.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế chứa các yếu tố quyết định kháng nguyên hoặc đuôi tinh sạch, trình tự tín hiệu hoặc các trình tự dung hợp khác, v.v. Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế có thể được dung hợp với một peptit ngẫu nhiên để tạo một polypeptit dung hợp. Thuật ngữ "được dung hợp" hoặc "được liên kết một cách có kiểm soát" ở đây dùng để chỉ peptit ngẫu nhiên và phytaza được liên kết với nhau, theo cách để giảm thiểu sự phá vỡ tính ổn định của hoạt tính phytaza. Polypeptit dung hợp (hoặc polynucleotit dung hợp mã hoá polypeptit dung hợp) có thể chứa các thành phần khác, gồm có peptit ở các vòng lặp lại.

Theo một khía cạnh, các phytaza theo sáng chế là polypeptit chứa nhiều phần gen của các cá thể khác nhau, chẳng hạn, chứa các SP khác loại, modun liên kết carbohydrat, vùng xúc tác enzym phytaza, vùng liên kết và/hoặc vùng xúc tác không phytaza. Sáng chế đề xuất các cách tạo ra polypeptit chứa nhiều phần gen của các cá thể khác nhau mã hoá polypeptit lai có hoạt tính sinh học (chẳng hạn, enzym phytaza lai). Theo một khía cạnh, polynucleotit gốc mã hoá polypeptit có hoạt tính sinh học. Phương pháp theo sáng chế sẽ tạo ra các polypeptit lai mới bằng cách sử dụng các quá trình tế bào kết hợp trình tự của polynucleotit gốc sao cho polynucleotit lai hình thành sẽ mã hoá polypeptit thể hiện các hoạt tính nhận được từ polypeptit có hoạt tính sinh học gốc. Chẳng hạn, polynucleotit gốc có thể mã hoá một enzym cụ thể từ các vi sinh vật khác nhau. Enzym được mã hoá bởi polynucleotit thứ nhất từ sinh vật hoặc biến thể có thể, chẳng hạn, hoạt động hiệu quả ở một điều kiện môi trường cụ thể, chẳng hạn nồng độ muối cao. Một enzym được mã hoá bởi polynucleotit thứ hai từ một sinh vật hoặc thể đột biến khác có thể hoạt động hiệu quả ở một điều kiện môi trường khác, như nhiệt độ rất cao. Một polynucleotit lai chứa các trình tự từ polynucleotit gốc thứ nhất và thứ hai có thể mã hoá một enzym thể hiện các đặc tính của cả hai enzym được mã hoá bởi các polynucleotit gốc. Do đó, enzym được mã hoá bởi polynucleotit lai có thể hoạt động hiệu quả ở các điều kiện môi trường ở đó mỗi enzym được mã hoá bởi các trình tự polynucleotit gốc thứ nhất và thứ hai có thể hoạt động hiệu quả, chẳng hạn, nồng độ muối cao và nhiệt độ cao.

Do đó, polypeptit lai được tạo ra từ phương pháp này theo sáng chế có thể thể hiện hoạt tính enzym đặc hiệu không được thể hiện trong enzym gốc. Chẳng hạn, sau khi tái tổ hợp và/hoặc tái sắp xếp loại bỏ polynucleotit mã hoá enzym phytaza, polypeptit lai được mã hoá bởi polynucleotit lai có thể được sàng lọc hoạt tính enzym đặc hiệu, chẳng hạn, hydrolaza, peptidaza, phosphorylaza, v.v., thu được từ mỗi enzym gốc. Do đó, chẳng hạn, polypeptit lai có thể được sàng lọc để xác định các chức năng hoá học phân biệt polypeptit lai với polypeptit nguyên gốc, như nhiệt độ, pH hoặc nồng độ muối tại đó polypeptit lai hoạt động.

Polypeptit lai được tạo ra từ phương pháp theo sáng chế có thể có hoạt tính enzym đặc hiệu không có trong enzym gốc. Chẳng hạn, sau khi tái tổ hợp và/hoặc tái sắp xếp loại bỏ polynucleotit mã hoá hoạt tính hydrolaza, polypeptit lai hình thành được mã hoá bởi polynucleotit lai có thể được sàng lọc hoạt tính hydrolaza đặc hiệu thu được từ mỗi enzym nguyên gốc, nghĩa là, loại liên kết hydrolaza tác động và nhiệt độ tại đó hydrolaza hoạt động. Do đó, chẳng hạn, phytaza có thể được sàng lọc để xác định các đặc tính hoá học phân biệt phytaza lai với phytaza nguyên gốc, như: (a) amit (liên kết peptit), nghĩa là, proteaza; (b) liên kết este, nghĩa là, esteraza và lipaza; (c) axetal, nghĩa là, glycosidaza và, chẳng hạn, nhiệt độ, pH hoặc nồng độ muối tạo đó polypeptit lai hoạt động.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit lai có hoạt tính sinh học và sàng lọc polypeptit có hoạt tính được tăng cường bằng cách:

(1) đưa ít nhất một polynucleotit thứ nhất trong liên kết một cách có kiểm soát và polynucleotit trong liên kết linh động, một polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai có ít nhất một vùng có mức độ tương đồng về trình tự một phần, vào tế bào chủ thích hợp;

(2) nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện thúc đẩy quá trình tái sắp xếp trình tự tạo ra polynucleotit lai trong liên kết linh động;

(3) biểu hiện polypeptit lai được mã hoá bởi polynucleotit lai;

(4) sàng lọc polypeptit lai trong điều kiện thúc đẩy quá trình xác định hoạt tính sinh học được gia tăng; và

(5) phân lập polynucleotit mã hoá polypeptit lai.

Phương pháp sàng lọc các hoạt tính enzym khác nhau đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được nêu trong bản mô tả. Các phương pháp này có thể được sử dụng khi phân lập polypeptit và polynucleotit theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của phương pháp) sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định có hoạt tính phytaza có tính kháng với quá trình bất hoạt enzym bằng nhiệt độ được gia tăng và vẫn giữ được hoạt tính phytaza trong quá trình bảo quản lâu dài. Chế phẩm lỏng được ổn định hoá bằng cách thêm ure và/hoặc một polyol như sorbitol và glyxerol là chất ổn định hoá. Cũng được đề xuất là chế phẩm thức ăn gia súc cho gia súc có dạ dày một ngăn và phương pháp sản xuất hình thành từ việc sử dụng các chế phẩm lỏng ổn định này. Chi tiết bổ sung về phương pháp này được công bố trong các tài liệu và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tài liệu đã công bố gồm có EP 0626010 (W0 9316175 A1) (Barendse et al.), mặc dù tài liệu này không mô tả các phân tử mới theo sáng chế.

Kháng thể và phương pháp sàng lọc dựa trên kháng thể

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp liên kết đặc hiệu với phytaza theo sáng chế. Các kháng thể này có thể được sử dụng để phân lập, xác định hoặc định lượng phytaza theo sáng chế hoặc polypeptit có liên quan. Các kháng thể này có thể được sử dụng để ức chế hoạt tính của enzym theo sáng chế. Các kháng thể này có thể được sử dụng để phân lập polypeptit có liên quan với các polypeptit theo sáng chế, chẳng hạn, enzym phytaza có liên quan.

Kháng thể theo sáng chế có thể chứa peptit hoặc polypeptit thu được từ, được tạo mô hình hoặc cơ bản được mã hoá bởi gen globulin miễn dịch hoặc các gen globulin miễn dịch, hoặc các phân đoạn của nó, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc yếu tố quyết định kháng nguyên, tham khảo, chẳng hạn Fundamental Immunology, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97. Thuật ngữ kháng thể bao gồm các phần liên kết kháng nguyên, nghĩa là, “các vị trí liên kết kháng nguyên,” (chẳng hạn, phân đoạn trình tự nhỏ, vùng quyết định bổ thể

(complementarity determining regions - CDRs)) vẫn giữ được khả năng liên kết với kháng nguyên, bao gồm (i) phân đoạn Fab, phân đoạn lưỡng trị gồm có các vùng VL, VH, CL và CH1; (ii) phân đoạn F(ab')₂, phân đoạn lưỡng trị gồm hai phân đoạn Fab được nối với nhau bằng một cầu disulfit tại vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các vùng VH và CH1; (iv) phân đoạn Fv gồm có các vùng VL và VH của một bên của kháng thể, (v) phân đoạn dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), gồm có một vùng VH; và (vi) vùng quyết định bổ thể được phân lập (CDR). Kháng thể đơn chuỗi cũng thuộc phạm vi thuật ngữ "kháng thể."

Các kháng thể có thể được sử dụng trong thử nghiệm kết tủa miễn dịch, nhuộm (chẳng hạn, FACS), các cột ái lực miễn dịch, và tương tự. Nếu cần, trình tự axit nucleic mã hoá các kháng nguyên đặc hiệu có thể được tạo ra bằng quá trình miễn dịch hoá sau khi phân lập polypeptit hoặc axit nucleic, khuếch đại hoặc tách dòng và cố định polypeptit lên một mạch theo sáng chế. Theo một cách khác, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để cải biến cấu trúc của kháng thể được sản xuất bởi một tế bào cần được cải biến, chẳng hạn, ái lực của kháng thể có thể tăng lên hoặc giảm đi. Hơn nữa, khả năng tạo hoặc cải biến kháng thể có thể là một tình trạng được đưa vào tế bào bằng các phương pháp theo sáng chế.

Phương pháp tạo miễn dịch, sản xuất và phân lập kháng thể (đa dòng và đơn dòng) đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong các tài liệu khoa học và patent, tham khảo, chẳng hạn, Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC và CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES and PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Các kháng thể cũng có thể được tạo ra trong ống nghiệm, chẳng hạn, sử dụng vị trí liên kết kháng thể tái tổ hợp biểu hiện thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, ngoài các phương pháp trong cơ thể truyền thống sử dụng động vật. Tham khảo, chẳng hạn, Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45.

Polypeptit có thể được sử dụng để tạo các kháng thể liên kết đặc hiệu với polypeptit theo sáng chế. Kháng thể hình thành có thể được tạo ra trong các quá trình sắc ký ái lực miễn dịch để phân lập hoặc tinh sạch polypeptit hoặc để xác định liệu polypeptit có trong một mẫu sinh học hay không. Trong các quá trình này, chế phẩm protein, như một mẫu tách chiết, hoặc mẫu sinh học được cho phản ứng với kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với một trong số các polypeptit theo sáng chế.

Trong các thử nghiệm ái lực miễn dịch, kháng thể được gắn vào một giá đỡ rắn, như hạt hoặc chất nền cột. Chế phẩm protein được cho phản ứng với kháng thể trong điều kiện để kháng thể liên kết đặc hiệu với một polypeptit theo sáng chế. Sau khi rửa để loại bỏ các protein liên kết không đặc hiệu, polypeptit liên kết đặc hiệu được tách rửa.

Khả năng liên kết với kháng thể của các protein trong một mẫu sinh học có thể được xác định bằng cách sử dụng một loạt các thử nghiệm khác nhau quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, mức độ liên kết có thể được xác định bằng cách đánh dấu kháng thể bằng một chất đánh dấu có khả năng phát hiện như chất phát huỳnh quang, chất đánh dấu có hoạt tính enzym, hoặc đồng vị phóng xạ. Theo một cách khác, mức độ liên kết của kháng thể với mẫu có thể được phát hiện bằng cách sử dụng một kháng thể bậc hai có chất đánh dấu có thể phát hiện trên đó. Các thử nghiệm cụ thể gồm có thử nghiệm ELISA, thử nghiệm sandwich, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, và Western Blot.

Kháng thể đa dòng được tạo ra kháng polypeptit theo sáng chế có thể thu được bằng cách đưa trực tiếp polypeptit vào động vật hoặc bằng cách cho động vật dùng polypeptit, chẳng hạn, một động vật không phải người. Kháng thể thu được theo cách như vậy sau đó sẽ liên kết với chính polypeptit. Theo cách này, ngay cả một trình tự chỉ mã hoá một phân đoạn polypeptit cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể có thể liên kết với toàn bộ polypeptit gốc. Các kháng thể này có thể được sử dụng để phân lập polypeptit từ các tế bào biểu hiện polypeptit đó.

Để điều chế kháng thể đơn dòng, một kỹ thuật bất kỳ tạo ra kháng thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào liên tục có thể được sử dụng. Ví dụ gồm có kỹ thuật lai tế bào, kỹ thuật trioma, kỹ thuật lai tế bào B của người, và kỹ thuật lai tế bào EBV (tham

khảo, chẳng hạn, Cole (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Các kỹ thuật được mô tả để sản xuất kháng thể mạch đơn (tham khảo, chẳng hạn, US 4,946,778) có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể mạch đơn của polypeptit theo sáng chế. Theo một cách khác, chuột chuyển gen có thể được sử dụng để biểu hiện kháng thể được làm cho có tính chất giống người của polypeptit hoặc các phân đoạn của nó.

Các kháng thể được tạo ra kháng polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc sàng lọc polypeptit tương tự từ các sinh vật và mẫu khác. Trong các kỹ thuật này, polypeptit từ sinh vật được cho phản ứng với kháng thể và các polypeptit liên kết đặc hiệu với kháng thể được phát hiện. Có thể sử dụng một thử nghiệm bất kỳ nêu trên để phát hiện kháng thể liên kết.

Kit

Sáng chế đề xuất kit chứa chế phẩm, chẳng hạn, axit nucleic, catxet biểu hiện, vector, tế bào, polypeptit (chẳng hạn, phytaza) và/hoặc kháng thể theo sáng chế. Các kit này cũng có thể chứa hướng dẫn về phương pháp và ứng dụng trong công nghiệp theo sáng chế, như được mô tả ở đây.

Polypeptit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể liên kết đặc hiệu với enzym polypeptit hoặc phân đoạn của nó. Kháng thể hình thành có thể được sử dụng trong các thử nghiệm sắc ký ái lực miễn dịch để phân lập hoặc tinh sạch polypeptit hoặc để xác định liệu một polypeptit có trong một mẫu sinh học hay không. Trong các quá trình này, chế phẩm protein, như một mẫu tách chiết, hoặc mẫu sinh học được cho phản ứng với kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với một trong số các polypeptit có trình tự SEQ ID NO:2, các trình tự gần như tương đồng, hoặc các phân đoạn của các trình tự đã nêu.

Trong các thử nghiệm ái lực miễn dịch, kháng thể được gắn vào một giá đỡ rắn, như hạt hoặc chất nền cột. Chế phẩm protein được cho phản ứng với kháng thể trong điều kiện để kháng thể liên kết đặc hiệu với một trong số các polypeptit có trình tự SEQ ID NO:2, các trình tự gần như tương đồng, hoặc phân đoạn của nó theo sáng

ché. Sau khi rửa để loại bỏ các protein liên kết không đặc hiệu, polypeptit liên kết đặc hiệu được tách rửa.

Trình tự polynucleotit, trình tự polypeptit, biến thể và biến thể được phân lập có thể được xác định về mức độ duy trì các đặc điểm hoạt tính sinh học với enzym theo sáng chế, chẳng hạn, trong thử nghiệm phát hiện hoạt tính phytaza (Food Chemicals Codex, 4th Ed.). Các enzym này gồm có các dạng được cắt của phytaza, và các biến thể như mất đoạn và thêm đoạn của trình tự polypeptit như đã nêu trong SEQ ID NO:2. Các phytaza này có tính chịu nhiệt. Nghĩa là, phytaza có hoạt tính đặc hiệu khoảng 90% sau khi xử lý ở 70 °C trong 30 phút và khoảng 50% sau khi xử lý ở 75 °C trong 30 phút. Khả năng chịu nhiệt của phytaza theo sáng chế là một ưu điểm trong việc sử dụng enzym là phụ gia thức ăn gia súc vì thức ăn gia súc có thể được tạo khuôn, tạo hạt, hoặc tạo hạt cốm ở nhiệt độ cao.

Chẳng hạn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chất nền để phân phối enzym ăn được ở dạng hạt cốm và phương pháp sử dụng để phân phối phytaza cho động vật, chẳng hạn ở dạng thành phần bổ sung dinh dưỡng. Chất nền để phân phối enzym sẽ giải phóng enzym phytaza, như enzym có trình tự axit amin trong SEQ ID NO:2 hoặc ít nhất 30 axit amin liên tiếp của trình tự, trong môi trường nước, như, chẳng hạn, dịch tiêu hóa của động vật. Sáng chế đề xuất chất nền để phân phối enzym được tổng hợp từ chất mang ăn được dạng hạt được chọn từ các thành phần như mầm hạt được tách dầu, cỏ, cỏ linh lăng, cỏ đuôi mèo, vỏ đậu tương, bột hạt hướng dương, bột mì, và các dạng tương tự, có thể dễ dàng phân tán enzym tái tổ hợp chứa trong đó vào môi trường lỏng. Trong quá trình sử dụng, chất nền để phân phối enzym ăn được ở dạng hạt cốm được động vật sử dụng để đưa phytaza vào động vật. Các cơ chất có nguồn gốc từ hạt có thể chứa hoặc thu được từ một loại hạt ăn được bất kỳ, như lúa mì, ngô, đậu tương, lúa miến, cỏ linh lăng, đại mạch, và tương tự. Một cơ chất có nguồn gốc từ hạt thử nghiệm là cơ chất được làm từ hạt ngô. Cơ chất có thể thu được từ một phần bất kỳ của hạt, chẳng hạn, mầm hạt, đã được phê duyệt để sử dụng trong thức ăn gia súc, như mầm hạt ngô thu được trong quá trình xay khô hoặc ướt. Mầm hạt có thể chứa mầm hạt tách dầu là mầm hạt đã được loại dầu, như tách chiết nén hoặc tách chiết bằng dung môi hexan hoặc bằng phương pháp tách chiết dung môi khác. Theo một cách khác, mầm hạt được chiết nén, nghĩa là, dầu được loại bỏ bằng cách nén.

Chất nền để phân phối enzym theo sáng chế ở dạng các tiểu phần riêng rẽ, hạt cốm hoặc hạt. Thuật ngữ "hạt" dùng để chỉ các tiểu phần được nén hoặc kết lại thành hạt, như bằng cách tạo hạt cốm, tạo viên, hoặc các kỹ thuật nén tương tự để loại bỏ nước khỏi chất nền. Kỹ thuật nén hoặc kết hạt như vậy cũng thúc đẩy sự kết dính trong hạt của các tiểu phần. Chẳng hạn, các hạt có thể được tạo ra bằng cách tạo hạt cốm cơ chất có nguồn gốc từ hạt trong máy tạo hạt cốm. Hạt cốm được tạo ra sẽ được nghiền hoặc giã đến kích thước hạt thích hợp để sử dụng là một phụ gia trong thức ăn gia súc. Vì bản thân chất nền đã được phê duyệt để sử dụng trong thức ăn gia súc, nên nó có thể được sử dụng là chất pha loãng để phân phối enzym vào thức ăn gia súc.

Chất nền để phân phối enzym có thể ở dạng hạt có kích thước hạt thay đổi từ khoảng 4 đến khoảng 400 mesh (tiêu chuẩn Mỹ); hoặc khoảng 8 đến khoảng 80 mesh; hoặc khoảng 14 đến khoảng 20 mesh. Nếu mầm hạt được tách dầu qua tách chiết dung môi, thì sử dụng chất bôi trơn như dầu ngô có thể là cần thiết trong máy tạo hạt cốm, nhưng chất bôi trơn này thường là không cần thiết nếu mầm hạt được tách chiết theo cách nén. Theo các khía cạnh khác theo sáng chế, chất nền được tạo ra bằng các quá trình kết hạt hoặc nén khác như, chẳng hạn, bằng cách đùn ép cơ chất có nguồn gốc từ hạt mặc dù khó nghiền khối tạo viên đến kích thước hạt.

Chất nền để phân phối enzym còn có thể chứa thành phần polysaccarit là chất kết dính để tăng độ kết dính của hạt. Chất kết dính được cho là sẽ tạo ra các nhóm hydroxyl bổ trợ, làm tăng mức độ liên kết giữa các protein trong hạt chất nền. Còn cho rằng các nhóm hydroxyl bổ trợ sẽ hoạt động bằng cách tăng mức độ liên kết hydro giữa các protein với tinh bột và các protein khác. Chất kết dính có thể có mặt trong chế phẩm ở một lượng bất kỳ thích hợp để làm tăng mức độ kết dính của hạt trong chất nền để phân phối enzym. Các chất kết dính thích hợp bao gồm một hoặc nhiều dextrin, maltodextrin, tinh bột, như tinh bột ngô, bột, xenlulo, hemixenlulo, và các chất tương tự. Chẳng hạn, tỷ lệ phần trăm mầm hạt và chất kết dính trong chất nền (không tính enzym) là 78% mầm ngô và 20% theo trọng lượng tinh bột ngô.

Vì chất nền giải phóng enzym theo sáng chế được tạo ra từ các nguyên liệu có thể phân huỷ sinh học, nên chất nền có thể bị hỏng, như mốc. Để ngăn ngừa hoặc ức chế quá trình mốc như vậy, chất nền có thể chứa chất ức chế mốc, như muối propionat, có

thể có lượng vừa đủ để ức chế quá trình mọc chất nền giải phóng enzym, do đó sẽ tạo ra chất nền để phân phối trong một chế phẩm ổn định không cần bảo quản lạnh.

Enzym phytaza chứa trong chất nền để phân phối enzym và phương pháp theo sáng chế, theo một khía cạnh, là phytaza chịu nhiệt, như được mô tả ở đây, để chống chịu với quá trình bất hoạt phytaza trong quá trình sản xuất khi nhiệt độ tăng và/hoặc hơi có thể được sử dụng để tạo chất nền để phân phối enzym dạng hạt cốm. Trong quá trình tiêu hoá thức ăn gia súc chứa chất nền để phân phối enzym theo sáng chế, dịch tiêu hoá sẽ gây ra quá trình giải phóng enzym hoạt động. Các loại enzym chịu nhiệt và thành phần bổ sung dinh dưỡng khác có tính chịu nhiệt cũng có thể được đưa vào chất nền để giải phóng ở mọi loại điều kiện lỏng.

Một chất bao có thể được sử dụng lên tiểu phần chất nền enzym theo sáng chế với nhiều mục đích khác nhau, như thêm mùi vị hoặc bổ sung dưỡng chất vào thức ăn gia súc, để làm chậm giải phóng thức ăn gia súc bổ sung và enzym trong các điều kiện trong dạ dày, và các mục đích tương tự, hoặc, chất bao có thể được sử dụng để đạt được các mục đích về chức năng, chẳng hạn, bất cứ khi nào muốn làm chậm quá trình giải phóng enzym từ các tiểu phần chất nền hoặc để giám sát các điều kiện tại đó enzym sẽ được giải phóng. Thành phần của nguyên liệu chất bao có thể sao cho nó sẽ được phá vỡ một cách chọn lọc bởi một yếu tố miễn cảm với chất bao (như nhiệt độ, axit hoặc bazơ, enzym hoặc các chất hoá học khác). Theo một cách khác, hai hoặc nhiều hơn hai chất bao miễn cảm với các yếu tố phá huỷ như trên có thể được sử dụng kế tiếp nhau lên các tiểu phần chất nền.

Sáng chế cũng đề cập đến quá trình ủ bào chế chất nền giải phóng. Theo sáng chế, quá trình này sẽ bao gồm việc tạo ra các tiểu phần có chất có nguồn gốc từ hạt riêng rẽ có kích thước hạt thích hợp để sử dụng là chất nền giải phóng enzym, trong đó các tiểu phần này sẽ chứa enzym phytaza theo sáng chế. Quá trình này có thể bao gồm việc kết hạt hoặc nén các tiểu phần chất nền giải phóng enzym thành hạt, có thể được thực hiện bằng cách tạo hạt cốm. Chất ức chế mọc và chất kết dính, nếu được sử dụng có thể được bổ sung tại một thời điểm thích hợp bất kỳ, và có thể được trộn với cơ chất có nguồn gốc từ hạt với tỷ lệ mong muốn trước khi tiến hành tạo hạt cốm cơ chất có nguồn gốc từ hạt. Hàm lượng ẩm trong máy xay có thể ở trong khoảng được nêu ở trên so với hàm

lượng ẩm trong sản phẩm cuối cùng, hoặc khoảng 14% đến 15%, hoặc khoảng 10% đến 20%. Ẩm có thể được thêm vào nguyên liệu thức ăn gia súc ở dạng một chế phẩm lỏng enzym để cung cấp hàm lượng ẩm cho nguyên liệu thức ăn gia súc. Nhiệt độ trong Máy xay hạt cốm có thể được nâng đến khoảng 82°C bằng hơi. Máy xay hạt cốm có thể được vận hành ở các điều kiện bất kỳ có thể biến nguyên liệu thức ăn gia súc thành hạt cốm. Bản thân quá trình tạo hạt cốm là một quá trình có hiệu quả về giá thành để loại bỏ nước khỏi chế phẩm chứa enzym.

Theo một khía cạnh, máy xay hạt cốm được vận hành với khuôn 1/8 inso đến 2 inso với 100 lb/phút, nén ở 82°C để tạo hạt cốm, các hạt cốm sau đó sẽ được nghiền vụn trong máy nghiền hạt cốm để tạo các tiểu phần riêng rẽ có kích thước hạt có khả năng đi qua sàng 8 mesh nhưng bị giữ lại trên sàng 20 mesh.

Các phytaza chịu nhiệt được đề cập ở đây có thể có nhiệt độ tối ưu cao và có thể có tính chịu nhiệt hoặc bền nhiệt cao. Do đó, phytaza theo sáng chế có thể tiến hành các phản ứng enzym ở các nhiệt độ thường được coi là trên tối ưu. Phytaza theo sáng chế cũng có thể tiến hành các phản ứng enzym sau khi được tiếp xúc với nhiệt độ cao (khả năng chịu nhiệt là khả năng duy trì hoạt tính enzym nhiệt độ trong đó phytaza có trong tự nhiên hoạt động sau khi trước đó đã được tiếp xúc với nhiệt độ cao, ngay cả khi nhiệt độ cao có thể bất hoạt hoặc làm giảm hoạt tính enzym, tham khảo thêm định nghĩa về khả năng chịu nhiệt, ở trên). Gen mã hoá phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong quá trình tổng hợp phytaza (chẳng hạn sử dụng GSSM như được mô tả ở đây) có các đặc điểm khác với các đặc điểm của phytaza có trình tự SEQ ID NO:2 (về pH tối ưu, nhiệt độ tối ưu, khả năng chống chịu nhiệt độ, tính bền với các dung môi, hoạt tính đặc hiệu, ái lực đối với cơ chất, khả năng tiết, tốc độ dịch mã, khả năng giám sát phiên mã và các yếu tố tương tự). Hơn nữa, polynucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng để sàng lọc biến thể phytaza được tạo ra bằng các phương pháp được mô tả ở đây để xác định các enzym này có hoạt tính mong muốn, như độ bền nhiệt hoặc khả năng chịu nhiệt được cải thiện hoặc được cải biến. Chẳng hạn, US 5,830,732, mô tả thử nghiệm sàng lọc để xác định khả năng chịu nhiệt của một loại phytaza.

Một ví dụ trong ống nghiệm về thử nghiệm sàng lọc này là thử nghiệm phát hiện hoạt tính phytaza sau: Hoạt tính phytaza có thể được xác định bằng cách ủ 150µl chế

phẩm enzym với 600µl natri phytat 2mM trong đệm Tris HCl 100mM, pH 7,5, được bổ sung CaCl₂ 1mM trong 30 phút ở 37°C. Sau khi ủ, phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 750µl of axit tricloaxetic 5%. Phosphat giải phóng được xác định với tiêu chuẩn phosphat quang trắc phổ ở bước sóng 700nm sau khi thêm 1500µl chất tạo màu (4 thể tích amoni molybdat 1,5% trong axit sulfuric 5,5% và 1 thể tích sắt sulfat 2,7%; Shimizu, 1992). Một đơn vị hoạt lực enzym được xác định là lượng enzym cần thiết để giải phóng một µmol Pi/phút trong điều kiện thử nghiệm. Hoạt tính đặc hiệu có thể được thể hiện ở dạng đơn vị hoạt lực enzym/mg protein. Enzym theo sáng chế có hoạt tính enzym đối với quá trình thủy phân phytat thành inositol và phosphat tự do.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp thủy phân phytat gồm có việc cho phytat phản ứng với một hoặc nhiều phân tử phytaza mới được đề cập ở đây (chẳng hạn, protein có các cải biến đặc hiệu so với SEQ ID NO:2). Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp để xúc tác phản ứng thủy phân phytat thành inositol và phosphat tự do với việc giải phóng khoáng chất từ phức hợp axit phytic. Phương pháp này bao gồm việc cho cơ chất phytat phản ứng với lượng có hiệu quả phân hủy enzym theo sáng chế. Thuật ngữ lượng “có hiệu quả phân hủy” dùng để chỉ lượng enzym cần thiết để phân hủy ít nhất 50% phytat, so với phytat không được phản ứng với enzym. 80% phytat có thể được phân hủy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp thủy phân các liên kết phospho-mono-este trong phytat. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng một lượng có hiệu quả phân tử phytaza theo sáng chế, để tạo ra inositol và phosphat tự do. Theo một khía cạnh, một lượng “hiệu quả” dùng để chỉ lượng enzym cần thiết để thủy phân ít nhất 50% các liên kết phospho-mono-este, so với phytat không được phản ứng với enzym. Theo một khía cạnh, ít nhất 80% các liên kết được thủy phân.

Theo một khía cạnh cụ thể, nếu muốn, phân tử phytaza có thể được sử dụng kết hợp với các chất khác, như các chất xúc tác khác; để tác động đến các thay đổi hoá học (chẳng hạn quá trình thủy phân) trong các phân tử phytat và/hoặc trong các nguồn phân tử cơ chất. Theo khía cạnh này, phân tử phytaza và (các) chất hoá học bổ trợ sẽ không ức chế nhau. Phân tử phytaza và (các) chất hoá học bổ trợ có thể có tác dụng bổ trợ tổng

thể, hoặc, theo một cách khác, phân tử phytaza và (các) chất hoá học bổ trợ có thể có tác dụng hiệp đồng tổng thể.

Các nguồn cơ chất phytat tương đương gồm thực phẩm, thực phẩm tiềm năng, sản phẩm phụ của thực phẩm (cả sản phẩm phụ trong ống nghiệm và sản phẩm phụ trong cơ thể, chẳng hạn sản phẩm phản ứng ngoài cơ thể và sản phẩm bài tiết của động vật), tiền chất của thực phẩm, và các nguồn nguyên liệu phytat bất kỳ.

Theo một khía cạnh không hạn chế, sinh vật có thể tiêu hoá phytaza tái tổ hợp và phytaza có thể duy trì hoạt tính sau khi tiêu hoá. Theo một ví dụ khác, các phương pháp chuyển gen có thể được sử dụng để biểu hiện phytaza tái tổ hợp – chẳng hạn, theo một kiểu có kiểm soát (phương pháp có sẵn để kiểm soát quá trình biểu hiện các phân tử chuyển gen theo kiểu đặc hiệu mô và đặc hiệu giai đoạn).

Theo một khía cạnh, hoạt tính phytaza trong nguồn nguyên liệu (chẳng hạn nguồn thực vật chuyển gen hoặc tế bào chủ chưa có nhân điển hình tái tổ hợp) có thể được gia tăng sau khi tiêu hoá; sự gia tăng hoạt tính này có thể xảy ra, chẳng hạn, sau khi chuyển hoá một phân tử tiền chất phytaza ở dạng chưa hoàn thiện thành enzym có hoạt tính hơn ở dạng hoàn thiện hơn, trong đó quá trình chuyển hoá trên có thể tạo ra, chẳng hạn, quá trình tiêu hoá và hấp thu nguồn phytaza. Quá trình thủy phân cơ chất phytat có thể xảy ra tại một thời điểm bất kỳ sau khi cho phytaza phản ứng với phytat; chẳng hạn, quá trình này có thể xảy ra trước khi ăn hoặc sau khi ăn hoặc cả trước và sau khi ăn cơ chất hoặc enzym hoặc cả hai. Cần hiểu thêm rằng cơ chất phytat có thể được cho phản ứng với – ngoài phytaza – một hoặc nhiều các chất hoá học bổ trợ, như một enzym khác, cũng có thể được sử dụng trực tiếp hoặc sau khi tinh sạch từ nguồn của chúng.

Cần hiểu rằng (các) nguồn nguyên liệu phytaza có thể được phản ứng trực tiếp với (các) nguồn nguyên liệu phytat; chẳng hạn trong khi nghiền hoặc nhai trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể một trong hai hoặc cả hai (các) nguồn phytat. Theo một cách khác enzym phytaza có thể được tinh sạch từ (các) nguồn nguyên liệu, hoặc cơ chất phytat có thể được tinh sạch từ (các) nguồn nguyên liệu, hoặc cả enzym phytaza và cơ chất phytat có thể được tinh sạch từ (các) nguồn nguyên liệu trước khi cho enzym phytaza phản ứng với cơ chất phytat. Có thể hiểu rằng một hỗn hợp các chất hoá học được tinh sạch và chưa tinh sạch - gồm có (các) enzym hoặc cơ chất hoặc cả hai – có thể được sử dụng.

Cần hiểu rằng nhiều hơn một nguồn nguyên liệu có thể được sử dụng như nguồn có hoạt tính phytaza. Điều này là hữu ích như một cách để đạt được quá trình giải phóng theo thời gian (các) chất từ (các) nguồn nguyên liệu, trong đó quá trình giải phóng các chất hoá học khác nhau từ các nguồn nguyên liệu của chúng có thể diễn ra theo các cách khác nhau, chẳng hạn khi các nguồn nguyên liệu được tiêu hoá trong cơ thể hoặc khi các nguồn nguyên liệu được chế biến trong ống nghiệm. Việc sử dụng nhiều hơn một nguồn nguyên liệu có hoạt tính phytaza cũng hữu ích để thu được hoạt tính phytaza ở các điều kiện khác nhau và sự thay đổi của các điều kiện, có thể kể đến - như khoảng độ pH, nhiệt độ, nồng độ muối, và khoảng thời gian – chẳng hạn trong các bước chế biến khác nhau. Việc sử dụng các nguồn nguyên liệu khác nhau cũng hữu ích để thu được các loại chất phản ứng khác nhau, như một hoặc nhiều dạng hoặc đồng phân của phytaza và/hoặc phytat và/hoặc các nguyên liệu khác.

Cần hiểu rằng một nguồn nguyên liệu riêng lẻ, như thực vật chuyển gen (hoặc các bộ phận của thực vật), có thể là một nguồn nguyên liệu của cả phytaza và phytat; và enzym và cơ chất có thể được chứa trong những phần khác nhau trong một nguồn duy nhất – chẳng hạn được tiết với không được tiết, được biểu hiện khác nhau và/hoặc có mức độ phong phú khác nhau trong các phần thực vật hoặc cơ quan hoặc mô khác nhau hoặc trong các bộ phận nội bào trong cùng một phần thực vật hoặc cơ quan hoặc mô. Quá trình tinh sạch phân tử phytaza có trong đó có thể bao gồm việc phân lập và/hoặc xử lý tiếp theo một hoặc nhiều phần thực vật hoặc cơ quan hoặc mô hoặc dưới mức tế bào của tế bào mong muốn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xúc tác các phản ứng trong cơ thể và/hoặc trong ống nghiệm sử dụng hạt chứa lượng enzym được gia tăng. Phương pháp này bao gồm việc thêm các hạt chuyển gen, không phải kiểu dại, chẳng hạn, ở dạng nghiền, vào hỗn hợp phản ứng và cho enzym trong hạt làm tăng tốc độ của phản ứng. Bằng cách thêm trực tiếp hạt vào hỗn hợp phản ứng, phương pháp này sẽ tạo ra một giải pháp so với một quá trình tách chiết và tinh sạch enzym đắt tiền và không hiệu quả. Các phương pháp điều trị cũng được đề xuất nhờ đó một sinh vật thiếu hụt enzym sẽ được sử dụng enzym ở dạng hạt từ một hoặc nhiều loài thực vật, chẳng hạn, các loài thực vật chuyển gen, chứa lượng enzym được gia tăng. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các tài liệu đã được công bố bao gồm US 5,543,576 (Van Ooijen et al.) và US 5,714,474 (Van Ooijen et al.), mặc dù các tài liệu này không đề cập đến các phân tử mới trong sáng chế này và thay vào đó đề cập đến việc sử dụng phytaza từ nấm.

Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế có thể dùng để tạo ra dạng sống tái tổ hợp trong hệ tiêu hoá (hoặc vi khuẩn hoặc thực vật) và để sử dụng các dạng sống tái tổ hợp trong hệ tiêu hoá với động vật. Việc sử dụng có thể tùy ý được thực hiện độc lập hoặc kết hợp với các enzym và/hoặc với các dạng sống khác có thể tạo ra hoạt tính enzym trong hệ tiêu hoá, trong đó enzym khác và dạng sống khác có thể là tái tổ hợp hoặc dạng khác. Chẳng hạn, quá trình sử dụng có thể được thực hiện cũng với các vi khuẩn phân huỷ xylan.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để ngâm mầm ngô hoặc lúa miến trong nước ấm chứa lưu huỳnh dioxit khi có chế phẩm enzym chứa một hoặc nhiều enzym phân huỷ phytin, chẳng hạn, với lượng phytin có trong ngô hoặc lúa miến được phân huỷ một cách đáng kể. Chế phẩm enzym có thể chứa phytaza và/hoặc axit phosphataza và tùy ý, các enzym phân huỷ nguyên liệu thực vật khác. Thời gian ngâm là từ 12 đến 18h. Quá trình ngâm có thể bị gián đoạn bởi một bước xay trung gian để làm giảm thời gian ngâm. Theo một khía cạnh, mầm ngô hoặc lúa miến được ngâm trong nước ấm chứa lưu huỳnh dioxit khi có chế phẩm enzym chứa một hoặc nhiều enzym phân huỷ phytin, như phytaza và axit phosphataza, để loại bỏ hoặc giảm đáng kể axit phytic và muối của axit phytic. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, US 4,914,029, (Caransa et al.) và EP 0321004 (Vaara et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để thu được bột nhào bánh mì có các đặc tính vật lý mong muốn như không dính và dẻo dai và sản phẩm bánh mì có chất lượng hoàn hảo bằng cách thêm phân tử phytaza vào bột bánh mì. Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế được thêm vào chế phẩm bột nhào bánh mì tiếp theo sẽ được nặn và nướng. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 03076529 (Hara et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất thực phẩm từ đậu tương được cải thiện. Đậu tương được kết hợp với phân tử phytaza theo sáng chế để loại bỏ axit phytic khỏi đậu tương, do đó sẽ tạo ra thực phẩm từ đậu tương được cải thiện trong việc cung cấp các dưỡng chất vi lượng cần cho các sinh vật và trong khả năng tiêu hoá protein. Theo một khía cạnh, trong quá trình sản xuất sữa đậu nành, phân tử phytaza theo sáng chế sẽ được thêm vào hoặc cho phản ứng với đậu tương để làm giảm hàm lượng axit phytic. Ví dụ, quá trình ứng dụng có thể được thúc đẩy bằng cách xử lý sữa đậu nành cùng với enzym trong điều kiện gia nhiệt hoặc bằng cách tiến hành một phản ứng hỗn hợp trong bình trộn sử dụng enzym được cố định. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 59166049 (Kamikubo et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm hỗn hợp nước uống hoặc thức ăn gia súc ở dạng lỏng, và phương pháp này bao gồm việc sử dụng các hỗn hợp khoáng chất và vitamin, cũng như phân tử phytaza mới theo sáng chế. Theo một khía cạnh, cần phải đạt được một hỗn hợp có thành phần và liều lượng chính xác các dưỡng chất cần thiết cho sinh vật tiêu thụ mà không có bất kỳ nguy cơ vào về sự kết tủa và phá huỷ các khoáng chất/vitamin quan trọng, đồng thời tạo ra sự sử dụng tối ưu phosphat liên kết với phytin trong thức ăn gia súc. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, EP 0772978 (Bendixen et al.).

Cần hiểu rằng phân tử phytaza theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo ra các thực phẩm uống được có cồn hoặc không có cồn (hoặc đồ uống) dựa trên việc sử dụng nấm mốc và/hoặc hạt và/hoặc các thực vật khác. Những đồ uống này gồm có rượu, rượu vang, đồ uống có cồn pha trộn (chẳng hạn đồ uống ướp lạnh pha rượu, cà phê có cồn như cà phê Ailen, v.v.), bia, bia có nồng độ cồn thấp, nước ép, dịch chiết, chất đồng chất, và dịch nghiền nhừ. Theo một khía cạnh, phân tử phytaza theo sáng chế được sử dụng để tạo ra các phiên bản chuyển gen của nấm mốc và/hoặc hạt và/hoặc các thực vật khác hữu ích để sản xuất đồ uống trên. Theo một khía cạnh khác, phân tử phytaza theo sáng chế được sử dụng là thành phần bổ trợ trong quá trình sản xuất và/hoặc trong thành phần cuối cùng của đồ uống. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công

bổ và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để thu được rượu sake tinh sạch có lượng phytin giảm và lượng inositol tăng. Loại rượu này có thể có – qua tác động trực tiếp và/hoặc tâm thần – có tác động ngăn ngừa bệnh gan, xơ cứng động mạch, và các bệnh khác. Theo một khía cạnh, rượu sake được sản xuất từ gạo Koji bằng cách nhân giống nấm ở gạo Koji có hoạt tính phytaza cao là nguyên liệu thô. Cần hiểu rằng phân tử phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất loại nấm mốc hữu ích có hoạt tính được gia tăng (chẳng hạn, nấm chuyển gen) và/hoặc được thêm một cách ngoại sinh vào hiệu quả của mốc Koji. Chủng nấm mốc được thêm vào gạo đã được nấu và Koji được sản xuất bằng phương pháp truyền thống. Ví dụ, Koji đã sơ chế được sử dụng, gạo nguyên hạt được chế biến ở hai giai đoạn và rượu sake được sản xuất ở nhiệt độ không đổi là 15°C để tạo ra rượu sake tinh luyện có lượng phytin giảm và lượng inositol tăng. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 06153896 (Soga et al.) và JP 06070749 (Soga et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp thu được chất gây hấp thu có khả năng thúc đẩy quá trình hấp thu khoáng chất gồm có canxi được ăn vào mà không được tiêu hoá bởi dịch dạ dày hoặc dịch ruột với giá thành thấp. Theo một khía cạnh, chất gây hấp thu khoáng chất chứa dịch thuỷ phân một phần axit phytic là hoạt chất. Dịch thuỷ phân một phần axit phytic có thể được sản xuất bằng cách thuỷ phân axit phytic hoặc muối của nó bằng cách sử dụng phân tử phytaza mới theo sáng chế. Quá trình xử lý bằng phân tử phytaza có thể diễn ra độc lập và/hoặc trong một quá trình xử lý hỗn hợp (để ức chế hoặc để tăng thêm tác dụng cuối cùng), và sau đó là ức chế quá trình thuỷ phân một khoảng thời gian sao cho không làm giải phóng tất cả các gốc phosphat. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 04270296 (Hoshino).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm trong phương pháp) để sản xuất chế phẩm enzyme hoạt tính thuỷ phân phytat hỗ trợ hoặc hiệp đồng;

chế phẩm này chứa phân tử phytaza theo sáng chế và một hoặc nhiều hoá chất bổ trợ để thu được chế phẩm hữu ích cho phép điều trị kết hợp. Theo một khía cạnh, phương pháp xử lý kết hợp theo sáng chế được thực hiện với việc sử dụng ít nhất hai phytaza có độ đặc hiệu vị trí khác nhau, nghĩa là hỗn hợp bất kỳ gồm 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, và 6-phytaza. Bằng cách kết hợp các phytaza có mức độ đặc hiệu vị trí khác nhau, có thể đạt được tác dụng bổ trợ hoặc hiệp đồng. Chế phẩm như thực phẩm và thức ăn gia súc hoặc phụ gia thực phẩm và phụ gia thức ăn gia súc chứa phytaza trong hỗn hợp cũng được đề cập trong sáng chế cũng như các quá trình tổng hợp chúng. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, WO 30681 (Ohmann et al.).

Theo một khía cạnh khác, phép xử lý kết hợp theo sáng chế đạt được cùng với việc sử dụng axit phosphatase có hoạt tính thủy phân phytat ở pH 2,5, ở tỷ lệ thấp tương ứng với pH 2,5:5,0 hoạt tính từ khoảng 0,1:1,0 đến 10:1, hoặc từ khoảng 0,5:1,0 đến 5:1, hoặc từ khoảng 0,8:1,0 đến 3:1, hoặc từ khoảng 0,8:1,0 đến 2:1. Chế phẩm enzym có thể thể hiện hiệu quả thủy phân phytat hiệp đồng cao hơn qua quá trình xử lý nhiệt. Chế phẩm enzym là hữu ích trong việc chế biến thực phẩm (đồ uống và thực phẩm, thức ăn gia súc và sản phẩm khô) để cải thiện quá trình thủy phân phytat. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, US 5,554,399 (Vanderbeke et al.) và US 5,443,979 (Vanderbeke et al.), đề cập đến việc sử dụng phytaza trong nấm (cụ thể là *Aspergillus*).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của phương pháp) để sản xuất chế phẩm chứa enzym tác động vào phytat theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều enzym bổ trợ tác động vào các polysaccarit. Các polysaccarit có thể được chọn từ nhóm bao gồm arabinan, fructan, fucan, galactan, galacturonan, glucan, mannan, xylan, levan, fucoidan, carrageenan, galactocaroloz, pectin, axit pectic, amyloza, pullulan, glycogen, amylopectin, xenluloza, carboxymetylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, dextran, pustulan, chitin, agaroz, keratan, chondroitin, dermatan, axit hyaluronic, axit alginic, và có polysaccarit chứa ít nhất một aldoza, keto, axit hoặc amin được chọn từ nhóm bao gồm erythroza, threoza, riboza, arabinoza, xyloza, lyxoza, alloza, altroza, glucoza, mannoza, guloza, idoza, galactoza, taloza,

erythruloza, ribuloza, xyluloza, psicoza, fructoza, sorboza, tagatoza, glucuronic acid, axit gluconic, axit glucaric, axit galacturonic, axit mannuronic, glucosamin, galactosamin và axit neuraminic.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của phương pháp) để sản xuất chế phẩm có hoạt tính thủy phân phytat hiệp đồng chứa một hoặc nhiều phân tử phytaza theo sáng chế, xenlulaza (có thể còn chứa xylanaza), tùy ý proteaza, và tùy ý, một hoặc nhiều hoá chất bổ trợ. Theo các khía cạnh khác, các phương pháp xử lý hỗn hợp là hữu ích trong việc xử lý thực phẩm, sản phẩm gỗ, như gỗ làm giấy, và là các chất rắn hoặc dung dịch làm sạch.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là hữu ích trong việc kết hợp với các thành phần xenluloza. Được biết rằng các xenlulaza của nhiều loại vi khuẩn thủy phân xenluloza được đưa vào các phức hợp nhiều enzym riêng rẽ, được gọi là các đoạn xenlulosom. Các dưới đơn vị của xenlulosom được tạo ra bởi nhiều vùng chức năng, tương tác với nhau và tương tác với cơ chất xenluloza. Một trong số các dưới đơn vị bao gồm một lớp polypeptit xoắn không có hoạt tính xúc tác hoàn toàn mới, các dưới đơn vị này sẽ kết hợp có chọn lọc các dưới đơn vị xenlulaza và xylanaza thành một phức hợp dính. Việc ứng dụng thông minh các thể lai xenlulosom và các cấu trúc khảm của các vùng chức năng xenlulosom sẽ tạo ra sự sử dụng sinh khối xenluloza tốt hơn và có thể tạo ra một loạt các ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu, y học và công nghiệp.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là hữu ích – trong các phương pháp xử lý độc lập hoặc trong các phương pháp xử lý kết hợp – trong các lĩnh vực làm bột giấy sinh học và tẩy màu sinh học trong đó cần phải giảm việc sử dụng các hoá chất độc hại đối với môi trường thường được sử dụng trong công nghiệp chế biến bột giấy và giấy. Việc xử lý nước thải là một lĩnh vực ứng dụng to lớn khác khi các enzym sinh học đã được chỉ ra là hiệu quả không những trong việc tẩy màu mà còn trong việc chuyển hoá sinh học các cơ chất độc tiềm năng thành các sản phẩm sinh học hữu ích.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là hữu ích để tạo ra các dạng sống có thể cung cấp ít nhất một hoạt tính enzym – hoặc độc lập hoặc trong các phương pháp xử lý kết hợp – trong quá trình xử lý hệ tiêu hoá của sinh vật. Các sinh vật có liên quan cụ thể cần được xử lý gồm các sinh vật không nhai lại, mặc dù các động vật nhai lại cũng

có thể hưởng lợi từ phép điều trị như vậy. Cụ thể là, cần hiểu rằng phương pháp này có thể được thực hiện riêng rẽ hoặc kết hợp với các phân tử sinh học khác (chẳng hạn, xylanaza) để tạo ra một vật chủ tái tổ hợp biểu hiện nhiều phân tử sinh học. Cần hiểu rằng việc sử dụng phân tử phytaza và/hoặc vật chủ tái tổ hợp theo sáng chế biểu hiện phân tử phytaza theo sáng chế có thể được thực hiện riêng rẽ hoặc kết hợp với các phân tử sinh học khác, và/hoặc các dạng sống có thể tạo ra hoạt tính enzym trong hệ tiêu hoá – trong đó các enzym khác và dạng sống nói trên có thể là tái tổ hợp hoặc một dạng khác. Chẳng hạn, có thể sử dụng cùng với vi khuẩn phân huỷ xylan.

Chẳng hạn, ngoài phytat, nhiều sinh vật cũng không thể tiêu hoá được một cách đầy đủ hemixenluloza. Hemixenluloza hoặc xylan là thành phần chính (35%) của thực vật. Đối với các động vật nhai lại, khoảng 50% xylan trong chế độ ăn được phân huỷ, nhưng chỉ có một lượng nhỏ xylan được phân huỷ ở phần ruột thấp của động vật không nhai lại và người. Trong dạ cỏ, các loại vi sinh vật phân huỷ xylan chính là *Butyrivibrio fibrisolvens* và *Bacteroides ruminicola*. Trong ruột kết của người, các *Bacteroides ovatus* và *Bacteroides fragilis* phân loài “a” là các vi khuẩn phân huỷ xylan chính. Xylan là một phức hợp hoá học, và quá trình phân huỷ chúng cần nhiều enzym. Quá trình biểu hiện các enzym này bởi các vi khuẩn đường ruột rất khác giữa các loài khác nhau. *Butyrivibrio fibrisolvens* tạo ra xylanaza ngoại bào nhưng các loài *Bacteroides* có hoạt tính xylanaza liên kết với tế bào. Quá trình xác định đặc điểm hoá sinh của các enzym phân huỷ xylan của vi khuẩn đường ruột đã không được thực hiện đầy đủ. Một gen xylosidaza đã được tách dòng từ *B. fibrosolvens*. Số liệu từ việc lai ADN sử dụng gen xylanaza được tách dòng từ *B. fibrisolvens* đã chỉ ra rằng gen này có thể có trong các chủng *B. fibrisolvens* khác. Một xylanaza được tách dòng từ *Bact. ruminicola* được biến nạp và biểu hiện ở mức độ cao trong *Bact. fragilis* và *Bact. uniformis*. Các gen arabinosidaza và xylosidaza từ *Bact. ovatus* đã được tách dòng và cả hai hoạt tính đường như được xúc tác bởi một enzym mới hai chức năng đơn nhất.

Theo một khía cạnh, phytaza theo sáng chế là hữu ích để 1) biến nạp vào một tế bào chủ thích hợp (như *Bact. fragilis* hoặc *Bact. uniformis*); 2) đạt được mức độ biểu hiện đầy đủ trong tế bào chủ tái tổ hợp hình thành; và 3) sử dụng tế bào chủ tái tổ hợp để cải thiện khả năng phân huỷ phytat của sinh vật. Các nghiên cứu tiếp theo về di truyền

và hoá sinh sẽ cung cấp các hiểu biết về quá trình tiêu hoá ở ruột và nâng cao hiểu biết về quá trình tiêu hoá chất xơ ở ruột.

Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, sáng chế có thể kết hợp các quá trình được mô tả trong US 5,624,678 (Bedford et al.), US 5,683,911 (Bodie et al.), US 5,720,971 (Beauchemin et al.), US 5,759,840 (Sung et al.), US 5,770,012 (Cooper), US 5,786,316 (Baeck et al.), US 5,817,500 (Hansen et al.).

Sáng chế giải thích rằng phân tử phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các chất khác được mô tả để thu được chế phẩm có hoạt tính phytaza bổ trợ. Theo một khía cạnh, phân tử phytaza bổ trợ và (các) chất hoá học sẽ không ức chế nhau. Theo một khía cạnh, phân tử phytaza và (các) chất hoá học bổ trợ có thể có tác dụng bổ trợ tổng thể. Theo một cách khác, phân tử phytaza và (các) chất hoá học bổ trợ có thể có tác dụng hiệp đồng tổng thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm của phương pháp) để tăng cường sử dụng phospho trong phytat và điều trị và ngăn ngừa chứng loạn sản sụn xương chày ở động vật, đặc biệt là gia cầm, bằng cách cho động vật sử dụng chế phẩm thức ăn gia súc chứa dẫn xuất vitamin D₃ được hydroxyl hoá. Dẫn xuất vitamin D₃ có thể được dùng cho động vật trong thức ăn gia súc chứa nồng độ canxi và phospho giảm để tăng mức độ sử dụng phospho trong phytat. Do đó, dẫn xuất vitamin D₃ có thể được sử dụng kết hợp với phân tử phytaza theo sáng chế để tăng cường hơn nữa sự sử dụng phospho trong phytat. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, US 5,516,525 (Edwards et al.) và US 5,366,736 (Edwards et al.), US 5,316,770 (Edwards et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm trong phương pháp) để thu được thực phẩm 1) chứa phytin được hấp thu và sử dụng dễ dàng ở dạng inositol trong cơ thể sinh vật; 2) có khả năng giảm lượng phospho bài tiết; và 3) do đó là hữu ích để cải thiện tình trạng ô nhiễm môi trường. Thực phẩm này gồm một hỗn hợp hạt chứa phytin, vi sinh vật sản xuất axit lactic, và phân tử phytaza theo sáng chế. Theo một khía cạnh, thực phẩm như vậy được sản xuất bằng cách kết hợp một loại hạt chứa

phytin (chẳng hạn cám gạo) với một nhóm vi khuẩn hiệu quả có đặc tính ưa axit, sản xuất axit lactic, mà không sản xuất axit butyric, không có mầm bệnh, và phytaza. Ví dụ về các nhóm vi sinh vật hiệu quả bao gồm chẳng hạn *Streptomyces sp.* (Bộ sưu tập giống kiểu Mỹ số. ATCC 3004) thuộc nhóm nấm tia và *Lactobacillus sp.* (IFO 3070) thuộc nhóm lactobacillus.

Lượng vi khuẩn bổ sung thử nghiệm là 0,2% theo trọng lượng vi khuẩn trên trọng lượng nguyên liệu. Theo một khía cạnh, lượng phytaza bổ sung là khoảng từ 1 đến 2% theo trọng lượng dựa trên lượng phytin trong nguyên liệu. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 08205785 (Akahori et al.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gia tăng tính tan của các protein thực vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp hòa tan protein trong các nguồn protein thực vật, phương pháp này bao gồm việc xử lý nguồn protein thực vật với một lượng hiệu quả một hoặc nhiều enzym phytaza theo sáng chế và xử lý nguồn protein thực vật với một lượng hiệu quả gồm một hoặc nhiều enzym phân huỷ protein. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phụ gia thức ăn gia súc chứa phytaza theo sáng chế và một hoặc nhiều enzym phân huỷ protein. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, EP 0756457 (WO 9528850 A1) (Nielsen và Knap).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm protein thực vật chứa các nguồn nguyên liệu protein thực vật phân tán trong nước ở pH trong khoảng từ 2 đến 6 và trộn phân tử phytaza theo sáng chế vào chế phẩm đó. Dịch chiết axit chứa protein tan được phân tách và làm khô để tạo ra protein rắn có đặc tính mong muốn. Một hoặc nhiều proteaza cũng có thể được sử dụng để cải thiện đặc tính của protein. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, US 3,966,971.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp (và sản phẩm trong phương pháp) để hoạt hoá phospho trơ trong đất và/hoặc phân trộn, để tăng mức độ sử dụng hợp chất nitơ, và để ức chế sự sinh sôi nảy nở của nấm mốc gây bệnh bằng cách thêm 3 loại hoá chất phytaza, saponin và chitosan, vào phân trộn.

Theo một khía cạnh, phương pháp có thể bao gồm việc xử lý phân trộn bằng cách 1) thêm các vi sinh vật chứa phytaza vào môi trường, chẳng hạn, tế bào chủ tái tổ hợp biểu hiện quá mức phân tử phytaza theo sáng chế, chẳng hạn, ở mức 100ml môi trường/100 kg phân ướt; 2) theo một cách khác cũng thêm nguồn thực vật chứa phytaza - như vỏ lúa mì - chẳng hạn với tỷ lệ 0,2 đến 1kg/100kg phân ướt; 3) thêm nguồn chứa saponin - như cây rêu, cây ngải cứu và cây ngọc giá – chẳng hạn từ 0,5 đến 3,0g/kg ; 4) bổ sung các vật liệu chứa chitosan – như bột vỏ tôm, cua, v.v. – chẳng hạn từ 100 đến 300g/kg phân ướt.

Theo một khía cạnh, các nguồn tái tổ hợp của ba hoá chất phytaza, saponin, và chitosan, được sử dụng. Chi tiết thêm về phương pháp này có trong tài liệu đã công bố và/hoặc đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, JP 07277865 (Toya Taisuke).

Trong một số trường hợp, có thể là ưu việt khi phân phối và biểu hiện trình tự phytaza theo sáng chế tại chỗ (chẳng hạn, trong vùng một loại mô hoặc tế bào). Chẳng hạn, quá trình biểu hiện tại chỗ phytaza hoặc enzym phân huỷ trong ruột động vật sẽ có tác dụng hỗ trợ quá trình phân huỷ và hấp thu, chẳng hạn, phytat và phospho. Trình tự nucleic có thể được phân phối trực tiếp vào tuyến nước bọt, mô và tế bào và/hoặc vào tế bào biểu mô đường ruột, chẳng hạn. Các phương pháp phân phối như vậy đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm biến nạp điện, vectơ virus và hấp thụ ADN trực tiếp. Polypeptit có hoạt tính phytaza bất kỳ có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế (chẳng hạn, các phương pháp được mô tả cụ thể trong mục 6.3.18, cũng như các phương pháp được mô tả trong các mục khác theo sáng chế).

Chẳng hạn, các cấu trúc axit nucleic theo sáng chế gồm có các phân tử axit nucleic ở dạng thích hợp để hấp thụ vào các tế bào đích trong một mô chủ. Axit nucleic có thể ở dạng ADN hoặc ARN trần, trong đó các phân tử này có thể bao gồm một hoặc nhiều gen cấu trúc, một hoặc nhiều gen điều hoà, sợi đối mã, sợi có khả năng hình thành cấu trúc bậc ba, hoặc các thành phần tương tự. Thông thường, cấu trúc axit nucleic sẽ bao gồm ít nhất một gen cấu trúc dưới sự kiểm soát phiên mã và dịch mã của một vùng điều hoà thích hợp. Hơn nữa, các cấu trúc axit nucleic theo sáng chế sẽ bao gồm axit nucleic được đưa vào trong một phương tiện phân phối để tăng hiệu quả biến nạp, trong đó

phương tiện phân phối sẽ được phân tán trong các tiểu phần lớn hơn chứa một tá được ưa nước được làm khô.

Một phương tiện phân phối gồm vector virus, như retrovirus, adenovirus, và virus gắn adeno, đã được bất hoạt để ngăn quá trình tự sao nhưng vẫn duy trì khả năng liên kết với tế bào chủ của virus nguyên bản, vật liệu phân phối di truyền vào tế bào chất của tế bào chủ, và thúc đẩy quá trình biểu hiện gen cấu trúc hoặc các gen khác đã được đưa vào trong tiểu phần. Các vector retrovirus để làm trung gian chuyển gen được mô tả trong tài liệu Kahn et al. (1992) *Circ. Res.* 71:1508-1517. Một adenovirus phân phối gen được mô tả trong Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434. cả hai hệ phân phối retrovirus và adenovirus được mô tả trong Friedman (1989) *Science* 244:1275-1281.

Một loại phương tiện phân phối axit nucleic thứ hai gồm có liposom biến nạp, gồm cả các cấu trúc liposom ion âm và ion dương. Việc sử dụng các liposom đòi hỏi rằng axit nucleic được đưa vào liposom. Các liposom ion dương không đòi hỏi việc đưa axit nucleic vào trong và thay vào đó có thể được tạo ra đơn giản bằng cách trộn axit nucleic và liposom với nhau. Các liposom ion dương sẽ liên kết mạnh mẽ với các phân tử axit nucleic tích điện âm, gồm cả ADN và ARN, để tạo ra các phức hợp tạo ra hiệu quả biến nạp đáng kể trong nhiều loại tế bào. Tham khảo, Farhood et al. (1992) *Biochem. Biophys. Acta.* 1111:239-246. Một nguyên liệu thử nghiệm để tạo liposom là lipofectin được tạo bởi một hỗn hợp cân bằng tỷ lệ mol của dioleoylphosphatidyl ethanolamin (DOPE) và dioleoyloxypropyl-triethylamoni (DOTMA), như được mô tả trong Felgner và Ringold (1989) *Nature* 337:387-388.

Cũng có thể kết hợp hai loại hệ thống phân phối này. Chẳng hạn, Kahn et al. (1992), sách đã dẫn., đã giải thích rằng vector retrovirus có thể được đưa vào trong liposom DEAE-dextran ion dương để làm tăng hơn nữa hiệu quả biến nạp. Cũng có thể kết hợp các protein nhân vào hệ thống phân phối virus và/hoặc liposom để thậm chí còn cải thiện hơn nữa hiệu quả biến nạp. Tham khảo, Kaneda et al. (1989) *Science* 243:375-378.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một chế phẩm hỗ trợ tiêu hoá chứa enzym hoặc ở dạng hoạt chất đơn nhất hoặc kết hợp với một hoặc nhiều các chất khác và/hoặc enzym. Việc sử dụng enzym và các chất khác trong các chế phẩm hỗ trợ tiêu hoá của động vật nuôi hoặc động vật trong nhà không chỉ làm tăng sức khoẻ và tuổi thọ

của động vật mà còn hỗ trợ trong việc gia tăng sức khoẻ của vật nuôi và trong quá trình sản xuất thực phẩm từ vật nuôi.

Sáng chế cũng sử dụng thức ăn gia súc cho vật nuôi (chẳng hạn, một số thức ăn gia súc cho gia cầm) được bổ sung nhiều khoáng chất với hàm lượng cao (chẳng hạn, phospho vô cơ), enzym, yếu tố sinh trưởng, thuốc, và các chất khác để cũng cấp cho vật nuôi. Các thành phần bổ sung này sẽ thay thế nhiều calo và dưỡng chất tự nhiên có trong hạt, chẳng hạn. Bằng cách giảm hoặc loại bỏ thành phần bổ sung phospho vô cơ và các thành phần bổ sung khác (chẳng hạn, muối khoáng vi lượng, yếu tố sinh trưởng, enzym, kháng sinh) từ chính thức ăn gia súc, thức ăn gia súc có thể mang nhiều dưỡng chất và năng lượng hơn. Do đó, chế độ ăn còn lại sẽ chứa nhiều năng lượng có thể sử dụng được hơn. Chẳng hạn, chế độ ăn hạt chứa dầu thường chứa khoảng 3200 kcal năng lượng chuyển hoá /kg chế độ ăn, và các muối khoáng không cung cấp năng lượng. Việc loại bỏ các khoáng chất không cần thiết và thay thế bằng hạt do đó sẽ làm tăng năng lượng có thể sử dụng được trong chế độ ăn. Do đó, sáng chế được phân biệt so với các thức ăn gia súc chứa phytaza thường được sử dụng. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, một vật liệu tương hợp sinh học là vật liệu được sử dụng bền vững với quá trình tiêu hoá trong đường tiêu hoá của một động vật.

Ở nhiều loại động vật, gồm có, chẳng hạn, gia cầm hoặc chim như gà, gà tây, ngỗng, vịt, vẹt, công, đà điểu, gà lôi đỏ, chim cú, bò câu, đà điểu sa mạc, chim kiwi, chim lặn, vẹt xám Úc, vẹt mào, hoàng yến, cánh cụt, chim hồng hạc, và bò câu, đường tiêu hoá bao gồm dạ dày cơ là nơi chứa và sử dụng các vật liệu tương hợp sinh học cứng (chẳng hạn, đá và vỏ sò) để giúp cho quá trình tiêu hoá hạt hoặc các thức ăn gia súc khác do chim ăn. Một đường tiêu hoá thống thường của loại sinh vật này thường có thực quản chứa túi, được gọi là điều, trong đó thức ăn được chứa trong một khoảng thời gian ngắn. Từ điều, thực phẩm sẽ chuyển xuống dạ dày thực sự, hoặc dạ dày tuyến, trong đó axit hydrochloric và pepsin bắt đầu quá trình tiêu hoá. Tiếp theo, thức ăn sẽ chuyển xuống dạ dày cơ, có hình oval và thành dày với cơ khoẻ. Chức năng chính của dạ dày cơ là nghiền hoặc lán nát thức ăn – một quá trình được hỗ trợ bởi lượng nhỏ sỏi và sạn chim ăn vào. Từ dạ dày cơ, thức ăn sẽ chuyển xuống tá tràng. Ruột non của chim tương tự với động vật có vú. Có hai đoạn tịt hoặc manh tràng, dài khoảng từ 4 đến 6 in ở tại đoạn nối

của ruột non và ruột già. Ruột già ngắn, gồm chủ yếu trực tràng có chiều dài từ 3 đến 4 inơ. Trực tràng sẽ đổ vào ổ nhóp và phân được bài tiết ra ngoài qua lỗ thoát.

Các hạt tương hợp sinh học được ăn vào (hoặc theo một cách khác được đưa vào) và chuyển xuống dạ dày cơ sẽ tạo ra một vectơ hữu ích để phân phối các hoạt chất enzym, hoá học, điều trị và kháng sinh khác nhau. Các cơ chất cứng có thời gian duy trì trong dạ dày là từ vài giờ đến vài ngày và được tổng ra ngoài sau một khoảng thời gian. Do đó, sáng chế đề xuất chế phẩm hỗ trợ tiêu hoá được cải biến, được phủ, làm bão hoà (chẳng hạn, cơ chất và màng bão hoà) để phân phối các hoạt chất trị liệu hoặc có ích trong quá trình tiêu hoá vào sinh vật. Các chế phẩm hỗ trợ tiêu hoá gồm các vật thường được ăn bởi động vật để giúp cho quá trình tiêu hoá trong dạ dày cơ (chẳng hạn, đá hoặc sỏi). Sáng chế đề xuất các vật tương hợp sinh học được phủ ở trên hoặc được làm bão hoà hoạt chất có tác dụng như một chất hỗ trợ tiêu hoá cho động vật hoặc để phân phối hoạt chất điều trị hoặc thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng, có thành phần tương hợp sinh học được thiết kế để giải phóng hoạt chất hỗ trợ quá trình tiêu hoá, trong đó thành phần tương hợp sinh học được thiết kế để sử dụng qua đường miệng và giải phóng trong đường tiêu hoá (chẳng hạn, dạ dày cơ) của động vật. “Tương hợp sinh học” có nghĩa là cơ chất, trong quá trình tiếp xúc với một động vật chủ (chẳng hạn, chim), sẽ không gây ra đáp ứng có hại đủ để gây ra sự đào thải cơ chất hoặc làm cho cơ chất không thể hoạt động được nữa. Quá trình gây bất hoạt này có thể xảy ra, chẳng hạn, bằng cách tạo thành cấu trúc xơ quanh cơ chất làm hạn chế sự khuếch tán của hoạt chất vào động vật chủ hoặc cơ chất dẫn đến tăng nguy cơ mắc bệnh hoặc tử vong trong sinh vật do gây độc hoặc truyền nhiễm. Một cơ chất tương hợp sinh học có thể phân huỷ sinh học hoặc không thể phân huỷ sinh học được. Theo một khía cạnh, thành phần tương hợp sinh học kháng với quá trình phân huỷ hoặc tiêu hoá bởi hệ tiêu hoá. Theo một khía cạnh khác, thành phần tương hợp sinh học có độ bền như đá hoặc sỏi.

Vật liệu không thể phân huỷ sinh học hữu ích theo sáng chế là vật liệu cho phép gắn hoặc làm bão hoà chất hỗ trợ dinh dưỡng. Các vật liệu không thể phân huỷ sinh học gồm có, chẳng hạn, nhựa dẻo chịu nhiệt, như acrylic, modacrylic, polyamit, polycarbonat, polyeste, polyetylen, polypropylen, polystyren, polysulfon,

polyetesulfon, và polyvinyliden florua. Các chất đàn hồi cũng là các nguyên liệu hữu ích và gồm có, chẳng hạn, polyamit, polyeste, polyetylen, polypropylen, polystyren, polyuretan, polyvinyl ancol và silicon (chẳng hạn, silica chứa hoặc có nguồn gốc từ silicon). Sáng chế đề xuất thành phần tương hợp sinh học có thể chứa nhiều nguyên liệu trên, có thể, chẳng hạn, được trộn với nhau hoặc được tạo lớp để tạo hỗn hợp, copolyme hoặc hỗn hợp của nó.

Theo một khía cạnh, một vật liệu “có thể phân huỷ sinh học” là chế phẩm sẽ bị ăn mòn hoặc bị phân huỷ trong cơ thể để tạo thành các chất hoá học nhỏ hơn. Quá trình phân huỷ có thể xảy ra, chẳng hạn, bằng các quá trình enzym, hoá học hoặc vật lý. Các vật liệu có thể phân huỷ sinh học thích hợp được đề xuất để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(lactit), poly(glycolit), poly(axit lactic), poly(axit glycolic), polyanhydrua, polyorthoeste, polyeteeste, polycaprolacton, polyesteamit, polycacbonat, polycyanoacrylat, polyuretan, polyacrylat, và các chất tương tự. Các vật liệu này có thể được trộn hoặc tạo lớp để tạo thành hỗn hợp, copolyme hoặc hỗn hợp của các dạng trên.

Theo một khía cạnh, một số cơ chất tương hợp sinh học khác nhau theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật và tiếp theo được tiêu hoá, hoặc theo cách khác được cung cấp cho động vật một cách đồng thời, hoặc trong các hỗn hợp khác nhau (chẳng hạn, một nguyên liệu trước một nguyên liệu khác). Ngoài ra, các cơ chất tương hợp sinh học theo sáng chế có thể được thiết kế để đi qua đường tiêu hoá chậm. Chẳng hạn, các cơ chất lớn hoặc béo thường có xu hướng di chuyển chậm hơn qua đường tiêu hoá, do đó, một vật liệu tương hợp sinh học có kích thước lớn có thể được sử dụng để ngăn quá trình di chuyển quá nhanh trong đường tiêu hoá. Các cơ chất lớn như vậy có thể là một hỗn hợp của các chất không thể phân huỷ sinh học và có thể phân huỷ sinh học. Chẳng hạn, một chất không thể phân huỷ sinh học nhỏ có thể được bao bởi một chất không thể phân huỷ sinh học theo sáng chế sao cho trong một khoảng thời gian phần có thể phân huỷ sinh học sẽ được phân huỷ để cho phần không thể phân huỷ sinh học đi vào đường tiêu hoá. Ngoài ra, có thể nhận ra rằng một số lượng bất kỳ các chất tạo hương vị có thể được đưa vào cơ chất tương hợp sinh học theo sáng chế để tạo cảm giác dễ ăn.

Một số lượng bất kỳ các hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với các hoạt chất khác có thể được phủ lên cơ chất tương hợp sinh học theo sáng chế, gồm có polypeptit (chẳng hạn, enzym, kháng thể, xytokin hoặc các phân tử trị liệu nhỏ), và kháng sinh, chẳng hạn. Ví dụ về các hoạt chất cụ thể hữu ích được nêu trong bảng 1 và 2, dưới đây. Cũng được đề xuất rằng các tế bào có thể được nang hoá vào vật liệu tương hợp sinh học theo sáng chế và được sử dụng để phân phối enzym hoặc trị liệu. Chẳng hạn, các cơ chất có lỗ có thể được thiết kế có các lỗ đủ lớn để các tế bào sinh trưởng và các vật liệu có lỗ này sau đó có thể được đưa vào đường tiêu hoá. Chẳng hạn, cơ chất tương hợp sinh học theo sáng chế có thể chứa nhiều môi trường sinh trưởng nhỏ (chẳng hạn, mật độ lỗ khác nhau, pH, v.v.) tạo ra giá đỡ cho nhiều loại tế bào khác nhau. Các tế bào có thể xử lý kỹ thuật di truyền để phân phối một loại dược chất, enzym hoặc hoá chất cụ thể cho động vật. Các tế bào có thể là tế bào nhân thực hoặc chưa có nhân điển hình.

Bảng 1

Tác dụng điều trị	Hoá chất	Mô tả
Kháng sinh	Amoxycillin và hỗn hợp dung dịch tiêm Mastox của nó (Amoxycillin và Cloxacillin)	Điều trị kháng các bệnh vi khuẩn gây ra do vi khuẩn Gram + và Gram –.
	Ampixilin và hỗn hợp tiêm BioloX (Ampixilin và Cloxacillin)	Điều trị kháng các bệnh vi khuẩn gây ra do vi khuẩn Gram + và Gram –.
	Nitrofurazon + Ure viên Nefrea	Điều trị bệnh truyền nhiễm đường sinh dục
	Trimethoprim + Sulphamethoxazol Trizol viên	Điều trị bệnh truyền nhiễm đường hô hấp, đường tiêu hoá, và niệu sinh dục
	Metronidazol và Furazolidon Metofur Viên	Điều trị bệnh do vi khuẩn và động vật nguyên sinh.
	Phthalylsulphathiazol, Pectin và Kaolin Pectolin Viên Hỗn dịch	Điều trị tiêu chảy do vi khuẩn và tiêu chảy không đặc hiệu, lị do trực khuẩn và Calf Scours.
Thuốc giun	Điều trị kháng ký sinh ngoài thuốc mỡ Germex (Gamma	Điều trị kháng ký sinh ngoài và kháng khuẩn

Tác dụng điều trị	Hoá chất	Mô tả
	Benzen Hexaclorua, Proflavin Hemisulphat và Cetrimit)	
	Các chất kháng ký dinh trong > Albendazol và hỗn hợp Alben (Albendazol) Hỗn dịch (Albendazol 2,5%) Hỗn dịch (Albendazol 5%) Forte Viên (Albendazol 1,5 Gm.) Viên nén (Albendazol 600 Mg.) Bột (Albendazol 5%, 15%)	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa, sán dây và sán lá
	Alpraz (Albendazol và Praziquantel) Viên nén	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa và sán dây ở chó và mèo.
	Oxyclozanit và hỗn hợp Clozan (Oxyclozanit) Viên, Hỗn dịch	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm sán lá
	Tetzan (Oxyclozanit và Tetramisol HCl) Viên, Hỗn dịch	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa và sán lá
	Fluzan (Oxyclozanit và Levamisol HCl) Viên, Hỗn dịch	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa và tăng cường miễn dịch
	Levamisol dung dịch tiêm Nemasol Wormnil Bột	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa và tăng cường miễn dịch.
	Fenbendazol Fenzol Viên nén (Fenbendazol 150 Mg.) Viên (Fenbendazol 1,5Gm.) Bột (Fenbendazol 2,5% theo trọng lượng)	Ngăn ngừa và điều trị nhiễm giun đũa và sán dây
Thuốc bổ	Hỗn hợp Vitamin B, dịch chiết axit amin và gan dung dịch tiêm Heptogen	Điều trị biếng ăn, viêm gan, yếu ớt, co giật thần kinh, gầy mòn và còi cọc.
	Canxi Levulinat với Vit.B ₁₂ và Vit D ₃ dung dịch tiêm Hylactin	Ngăn ngừa và điều trị hạ canxi huyết, điều trị bổ trợ trong các tình trạng ốm yếu (đặc biệt là giảm thân nhiệt hypothermia) và điều trị giai đoạn sớm còi xương.

Tác dụng điều trị	Hoá chất	Mô tả
thành phần bổ sung thức ăn gia súc	Khoáng chất cần thiết, selen và vitamin E Gynolactin viên	Điều trị chứng không động dục gây vô sinh và sinh sản lặp lại ở gia súc cho sữa và ngựa.
	Khoáng chất cần thiết, vitamin E, và iodin Hylactin bột	Điều trị vô sinh, tiết sữa không đúng lúc, giảm miễn dịch, sinh trưởng còi cọc và yếu ớt.
	Các chất điện giải cần thiết với vitamin C Bột Electra – C	Điều trị tiêu chảy, mất nước, trước và sau khi vận chuyển, nhiệt độ quá ngưỡng (cao hoặc thấp và và các tình trạng căng thẳng khác.
	Pyrenox Plus (Diclofenac Natri + Paraxetamol) Viên, dung dịch tiêm.	Điều trị viêm vú, sốt sau phẫu thuật, đau và viêm, sa dạ con, què quặt và viêm khớp.

Bảng 2. Dược phẩm

Sản phẩm	Mô tả
Acutrim® (phenylpropanolamin)	viên nén ức chế tính thèm ăn dùng một lần/ngày.
The Baxter® Infusor	Truyền tĩnh mạch có kiểm soát các thuốc chống đông, kháng sinh, hoá trị liệu, và các thuốc đang được sử dụng rộng rãi.
Catapres-TTS® (hệ thống điều trị qua da clonidin)	Hệ thống qua da dùng 1 lần/tuần để điều trị tăng huyết áp.
Covera HS3 (verapamil hydroclorua)	Viên nén giải phóng kéo dài có kiểm soát (Controlled-Onset Extended-Release (COER-24)) để điều trị tăng huyết áp và đau thắt ngực.
DynaCirc CR® (isradipin)	Viên nén giải phóng kéo dài để điều trị tăng huyết áp dùng một lần/ngày.
Efidac 24® (clopheniramin maleat)	Viên nén giải phóng kéo dài dùng 1 lần/ngày để làm giảm các triệu chứng dị ứng.
Estraderm® (hệ phân phối qua da estradiol)	Hệ phân phối qua da dùng hai lần/tuần để điều trị một số triệu chứng sau mãn kinh và ngăn ngừa loãng xương

Sản phẩm	Mô tả
Glucotrol XL [®] (glipizide)	Viên nén giải phóng kéo dài dùng một lần/ngày được sử dụng là thực phẩm bổ sung để kiểm soát hạ đường huyết ở bệnh nhân bị đái tháo đường không phụ thuộc insulin.
IVOMEC SR [®] Viên (ivermectin)	Hệ phân phối ở động vật nhai lại để kiểm soát lâu dài các kí sinh ngoài và trong chính ở trâu bò.
Minipress XL [®] (prazosin)	Viên nén giải phóng kéo dài dùng 1 lần/ngày để điều trị tăng huyết áp.
NicoDerm [®] CQ [™] (hệ phân phối qua da nicotin)	Hệ phân phối qua da được sử dụng 1 lần/ngày để hỗ trợ điều trị ngừng hút thuốc để làm giảm các triệu chứng của tình trạng giảm nicotin.
Procardia XL [®] (nifedipin)	Viên nén giải phóng kéo dài dùng 1 lần/ngày để điều trị đau thắt ngực và tăng huyết áp.
Sudafed [®] 24 Hour (pseudoephedrin)	Thuốc xịt mũi dùng 1 lần/ngày để làm giảm cảm cúm, viêm xoang, cảm mạo và các dị ứng đường hô hấp khác.
Transderm-Nitro [®] (hệ phân phối qua da nitroglycerin)	hệ phân phối qua da dùng 1 lần/ngày để ngăn ngừa đau thắt ngực do bệnh động mạch vành.
Transderm Scop [®] (hệ phân phối qua da scopolamin)	Hệ phân phối qua da để ngăn ngừa buồn nôn và nôn mửa do ốm yếu tinh thần.
Volmax (albuterol)	Viên nén giải phóng kéo dài để làm giảm co thắt phế quản ở các bệnh nhân bị bệnh tắc nghẽn đường hô hấp thuận nghịch.
Actisite [®]	(tetracyclin hydroclorua) sợi nha chu được sử dụng là thành phần bổ trợ để lấy cao răng và nhổ chân răng để làm giảm độ sâu của hố răng và chảy máu ở bệnh nhân bị viêm nha chu trưởng thành.
ALZET [®]	Bơm thẩm thấu dùng trong phòng thí nghiệm.
Amphotec [®] (amphotericin B cholesteryl sulfat complex for injection)	AMPHOTEC [®] là một thuốc diệt nấm Aspergillus xâm nhập ở các bệnh nhân bị suy thận hoặc không chấp nhận tính độc loại trừ sử dụng amphotericin B với liều có hiệu quả và ở các bệnh nhân bị nấm Aspergillus xâm nhập mà phép điều trị bằng amphotericin B đã thất bại.
BiCitra [®] (natri xitrat và axit xitric)	Chất kiềm hoá được sử dụng trong các tình trạng trong đó mong muốn duy trì lâu dài nước tiểu kiềm.
Ditropan [®] (oxybutynin clorua)	Làm giảm các triệu chứng bàng quang không ổn định liên quan đến rối loạn bàng quang do thần kinh không bị ức chế hoặc rối loạn bàng quang do phạm xạ thần kinh (nghĩa là,

Sản phẩm	Mô tả
	tiểu dắt, tiểu thường xuyên, dò đường niệu, không tự chủ tiểu tiện, tiểu tiện khó).
Ditropan® XL (oxybutynin clorua)	Viên nén giải phóng có kiểm soát dùng 1 lần/ngày đã được chỉ định điều trị tăng động bàng quang với các triệu chứng không tự chủ tiểu tiện, đi tiểu thường xuyên và tiểu dắt.
DOXIL® (doxorubicin HCl liposom tiêm)	
Duragesic® (hệ phân phối qua da fentanyl) CII	Hệ phân phối qua da 72h để kiểm soát đau mạn tính ở các bệnh nhân cần giảm đau gây nghiện liên tục không thể kiểm soát được bằng các phương pháp nhẹ hơn như hỗn hợp gây nghiện acetaminophen, thuốc giảm đau không steroid, hoặc chia liều PRN với thuốc gây nghiện tác dụng ngắn.
Elmiron® (pentosan polysulfat natri)	Được chỉ định để làm giảm đau bàng quang hoặc khó chịu do viêm bàng quang kẽ.
ENACT AirWatch™	Hệ thống kiểm soát và theo dõi hen.
Ethyol® (amifostine)	Được chỉ định để làm giảm tính độc thận tích lũy do dùng lặp lại cisplatin ở các bệnh nhân bị ung thư buồng trứng tiến triển hoặc ung thư tế bào không nhỏ ở phổi. Được chỉ định để làm giảm tỷ lệ bệnh khô miệng trung bình đến nặng ở các bệnh nhân trải qua phép xạ trị sau phẫu thuật để điều trị ung thư đầu và cổ, trong đó vùng chiếu xạ gồm một phần lớn của tuyến mang tai.
Mycelex® Troche (clotrimazol)	Để điều trị tại chỗ nấm Candida miệng. Cũng được chỉ định dự phòng để làm giảm tỷ lệ mắc candida miệng ở các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch do các tình trạng bao gồm hoá trị liệu, xạ trị, hoặc trị liệu bằng steroid được sử dụng trong các phép điều trị ung thư bạch cầu, u đặc, hoặc cấy ghép thận.
Neutra-Phos® (kali và natri phosphat)	thành phần bổ sung dinh dưỡng/chế độ ăn
Dung dịch dùng qua đường miệng PolyCitra® -K và tinh thể PolyCitra® -K (kali xitrat và axit xitric)	Chất kiềm hoá được sử dụng trong các tình trạng trong đó mong muốn duy trì lâu dài nước tiểu kiềm, như ở các bệnh nhân bị sỏi axit uric và sỏi xystin trong đường niệu, đặc biệt khi việc sử dụng các muối natri là không mong muốn hoặc cấm dùng.
PolyCitra® -K Syrup và LC (tricitrates)	Chất kiềm hoá được sử dụng trong các tình trạng trong đó mong muốn duy trì lâu dài nước tiểu kiềm, như ở các bệnh nhân bị sỏi axit uric và sỏi xystin trong đường niệu.
Progestasert® (progesteron)	Thuốc tránh thai phân phối progesteron trong tử cung

Sản phẩm	Mô tả
Testoderm® Testoderm® với chất dính và Testoderm® TTS CIII	Hệ phân phối qua da testosterone Các sản phẩm Testoderm® được chỉ định để điều trị thay thế ở nam giới các tình trạng liên quan đến sự thiếu hụt hoặc không có testosterone nội sinh: (1) giảm năng tuyến sinh dục nguyên phát (bẩm sinh hoặc mắc phải) hoặc (2) giảm năng tuyến sinh dục do thiếu kích thích (bẩm sinh hoặc mắc phải).
Viadur™ (viên cấy leuprolit axetat)	Viên cấy dùng một lần/năm để điều trị tạm thời ung thư tuyến tiền liệt

Một số hoạt chất có thể được thiết kế để trở lên hoạt động hoặc bị bất hoạt ở một số điều kiện nhất định (chẳng hạn, tại một số độ pH, khi có mặt chất hoạt hoá, v.v.). Ngoài ra, có thể có những ưu điểm khi sử dụng các tiền enzym theo các chế phẩm của sáng chế. Chẳng hạn, tiền enzym có thể được hoạt hoá bằng một proteaza (chẳng hạn, một proteaza tuyến nước bọt có trong đường tiêu hoá hoặc được đưa vào đường tiêu hoá của một sinh vật theo cách nhân tạo). Được dự tính là các hoạt chất được phân phối bởi các chế phẩm tương hợp sinh học theo sáng chế được hoạt hoá hoặc bất hoạt bằng cách thêm các chất hoạt hoá có thể được tiêu hoá, hoặc theo một cách khác được phân phối vào sinh vật. Một cơ chế khác để kiểm soát hoạt chất trong đường tiêu hoá là một chất nhạy cảm với môi trường được hoạt hoá trong một khoang tiêu hoá phù hợp. Chẳng hạn, một hoạt chất có thể là bất hoạt ở pH thấp nhưng lại hoạt động ở pH trung tính. Do đó, hoạt chất này sẽ bất hoạt trong dạ dày nhưng lại hoạt động trong ruột. Theo một cách khác, hoạt chất có thể trở lên hoạt hoá khi đáp ứng với sự có mặt của yếu tố đặc hiệu vi sinh vật (chẳng hạn, vi sinh vật có trong ruột non).

Theo một khía cạnh, các lợi ích tiềm năng theo sáng chế gồm có, chẳng hạn, (1) giảm hoặc loại bỏ sự cần thiết phải bổ sung khoáng chất (chẳng hạn, bổ sung phospho vô cơ), enzym, hoặc các thuốc điều trị cho động vật (gồm cả cá) từ thức ăn gia súc hoặc hạt hàng ngày nhờ đó sẽ làm tăng lượng calo và dưỡng chất có trong thức ăn gia súc, và (2) tăng sức khoẻ và tốc độ sinh trưởng của các động vật nuôi trong nhà và gia súc gồm có, chẳng hạn, gia cầm, lợn, bò, ngựa, chó, và mèo.

Một số lượng lớn enzym có thể được sử dụng trong phương pháp và chế phẩm theo sáng chế cùng với phytaza theo sáng chế. Các enzym là các enzym cần thiết cho quá

trình tiêu hoá thực phẩm ăn được, hoặc quá trình chuyển hoá, hoạt hoá hoặc tạo dẫn xuất chính xác các hoá chất, tiền được chất hoặc các hoạt chất khác hoặc hợp chất được phân phối cho động vật theo đường tiêu hoá. Ví dụ về các enzym có thể được phân phối hoặc kết hợp vào các chế phẩm theo sáng chế, gồm có, chẳng hạn, enzym tăng cường thức ăn gia súc được chọn từ nhóm bao gồm β -galactosidaza, β -galactosidaza, cụ thể là các lactaza, phytaza, β -glucanaza, cụ thể là endo- β -1,4-glucanaza và endo- β -1,3(4)-glucanaza, xenlulaza, xylosidaza, galactanaza, cụ thể là arabinogalactan endo-1,4- β -galactosidaza và arabinogalactan endo-1,3- β -galactosidaza, endoglucanaza, cụ thể là endo-1,2- β -glucanaza, endo-1,3- β -glucanaza, và endo-1,3- β -glucanaza, enzym phân huỷ pectin, cụ thể là pectinaza, pectinesteraza, pectin lyaza, polygalacturonaza, arabinanaza, rhamnogalacturonaza, rhamnogalacturonan axetyl esteraza, rhamnogalacturonan- β -rhamnosidaza, pectat lyaza, và β -galacturonisidaza, mannanaza, β -mannosidaza, mannan axetyl esteraza, xylan axetyl esteraza, proteaza, xylanaza, arabinoxylanaza và enzym thuỷ phân lipid như lipaza, phytaza và cutinaza. Phytaza ngoài phytaza có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 có thể được sử dụng trong các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, enzym được sử dụng trong các chế phẩm (chẳng hạn, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng) theo sáng chế là enzym phytaza bền nhiệt và kháng nhiệt và xúc tác quá trình thuỷ phân bằng enzym phytat, nghĩa là, enzym có khả năng lấy lại hoạt tính và tăng hoạt tính sau một khoảng thời gian ngắn (nghĩa là, từ 5 đến 30 giây), hoặc khoảng thời gian dài hơn, chẳng hạn, phút hoặc giờ, tiếp xúc với nhiệt độ trên 50°C.

Các thuật ngữ “thức ăn gia súc” và “thực phẩm,” dùng để chỉ chế độ, bữa ăn hoặc tương tự tự nhiên hoặc nhân tạo bất kỳ hoặc các thành phần của bữa ăn dùng để hoặc thích hợp để ăn, hấp thu, tiêu hoá, bởi động vật và người. Thuật ngữ “hỗ trợ dinh dưỡng” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ, chẳng hạn, chế phẩm chứa các hoạt chất cung cấp hoạt chất điều trị hoặc tiêu hoá cho động vật hoặc sinh vật. Một chế phẩm “hỗ trợ dinh dưỡng,” thường không phải là một nguồn cung cấp calo cho một sinh vật, theo một cách diễn đạt khác, một chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng thường không phải là một nguồn cung cấp năng lượng cho sinh vật, mà là một chế phẩm được ăn cùng với “thức ăn gia súc” hoặc “thực phẩm” thông thường.

Theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế, chế phẩm thức ăn gia súc được đề xuất chứa protein phytaza tái tổ hợp có ít nhất 30 axit amin liên tiếp nhau của protein có trình tự axit amin trong SEQ ID NO:2; và thực phẩm chứa phytat. Đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là các chế phẩm như vậy có thể được sản xuất theo một số cách, gồm có nhưng không chỉ giới hạn ở, ở dạng hạt cốm có hoặc không có chất phụ gia được phủ polyme, ở dạng hạt, và bằng cách sấy phun. Ví dụ, các tài liệu trong lĩnh vực kỹ thuật này đề cập đến quá trình sản xuất thức ăn gia súc gồm có các số công bố quốc tế WO 0070034 A1, WO 0100042 A1, WO 0104279 A1, WO 0125411 A1, WO 0125412 A1 và EP 1073342A.

Một hoạt chất hoặc enzym (chẳng hạn, phytaza) có thể có tác dụng trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể, nghĩa là trước khi ăn hoặc trong dạ dày hoặc dạ dày cơ của động vật. Cũng có thể có tác động hiệp đồng.

Mặc dù, một enzym bất kỳ có thể được đưa vào trong chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng, liên quan đến phytaza như quá trình thử nghiệm các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Một chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế gồm có enzym (chẳng hạn, phytaza). Nói chung, một chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng chứa thành phần phytaza ở dạng lỏng hoặc khô.

Các chế phẩm dạng lỏng không cần phải chứa thêm một enzym bất kỳ nào (chẳng hạn phytaza), tốt hơn là ở dạng được tinh sạch cao. Tuy nhiên, thông thường, một chất ổn định như glyxerol, sorbitol hoặc mono propylen glycol cũng được bổ sung vào chế phẩm. Chế phẩm dạng lỏng cũng có thể chứa các chất phụ gia khác, như muối, đường, chất bảo quản, chất điều chỉnh pH, protein, phytat (cơ chất của phytaza). Các chế phẩm dạng lỏng thường ở dạng hồ nhão chứa nước hoặc chứa dầu. Chế phẩm dạng lỏng cũng có thể được bổ sung một thành phần tương hợp sinh học để làm chậm giải phóng. Tốt hơn là, enzym được bổ sung vào một chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng là một vật liệu tương hợp sinh học (chẳng hạn, có thể phân huỷ sinh học hoặc không thể phân huỷ sinh học) và chứa các tế bào tái tổ hợp được bổ sung vào, chẳng hạn, các vi hạt có lỗ rỗng.

Các chế phẩm khô có thể ở dạng chế phẩm xít khô, trong trường hợp chế phẩm không cần chứa thêm một enzym bất kỳ ở dạng khô. Tuy nhiên, thông thường, các chế phẩm khô còn được gọi là hạt có thể được trộn lẫn cùng với các thành phần thực phẩm

hoặc thức ăn gia súc, hoặc tốt hơn nữa là, tạo thành một thành phần trước hỗn hợp. Kích thích hạt của hạt enzym tốt hơn là tương thích với kích thích hạt của các thành phần khác trong hỗn hợp. Điều này sẽ tạo ra một phương pháp tiện lợi và an toàn để kết hợp enzym vào thức ăn gia súc. Hạt theo sáng chế có thể là tương hợp sinh học, hoặc chúng có thể là hạt tương hợp sinh học không thể phân huỷ sinh học.

Hạt kết tụ theo sáng chế được phủ bằng enzym có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật kết tụ trong máy trộn có lực kéo cao. Hạt hấp thụ được điều chế bằng cách có lõi chất mang để hấp thụ/được phủ bằng enzym. Theo một khía cạnh, vật liệu chất mang là một vật liệu tương hợp sinh học không thể phân huỷ sinh học đóng vai trò như sỏi hoặc sạn trong dạ dày cơ của động vật. Các chất độn thường được sử dụng trong các kỹ thuật kết tụ gồm có muối, như dinatri sulphat. Các chất độn khác là cao lanh, talc, magie nhôm silicat và sợi xenluloza. Tuy ý, các chất liên kết như dextrin cũng được cho vào hạt kết tụ. Các chất mang có thể là một chất mang tương hợp sinh học bất kỳ gồm có các vật liệu có thể phân huỷ sinh học và không thể phân huỷ sinh học (chẳng hạn, đá, sỏi, gốm, và các loại polyme khác nhau). Theo một khía cạnh, hạt được phủ bằng một hỗn hợp chất bao. Hỗn hợp này chứa các chất bao, chẳng hạn, chất bao kỵ nước, như dầu cọ và mỡ bò được hydro hoá, và nếu cần các chất phụ gia khác, như canxi cacbonat hoặc cao lanh.

Theo một khía cạnh, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng (chẳng hạn, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng phytaza) có thể chứa các chất khác như chất tạo màu, chất thơm, chất ổn định, vitamin, khoáng chất, enzym tăng cường thức ăn gia súc hoặc thực phẩm khác v.v. Theo một khía cạnh, một chất phụ gia được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều hợp chất khác như vitamin, khoáng chất hoặc enzym tăng cường thức ăn gia súc và các chất mang và/hoặc tá dược thích hợp.

Theo một khía cạnh, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế thường chứa thêm một lượng có hiệu quả một hoặc nhiều enzym tăng cường thức ăn gia súc, cụ thể là enzym tăng cường thức ăn gia súc được chọn từ nhóm bao gồm β -galactosidaza, β -galactosidaza, cụ thể là lactaza, các loại phytaza khác, β -glucanaza, cụ thể là endo- β -1,4-glucanaza và endo- β -1,3(4)-glucanaza, xenlulaza, xylosidaza, galactanaza, cụ thể là arabinogalactan endo-1,4- β -galactosidaza và arabinogalactan endo-1,3- β -galactosidaza,

endoglucanaza, cụ thể là endo-1,2- β -glucanaza, endo-1,3- β -glucanaza, và endo-1,3- β -glucanaza, enzym phân huỷ pectin, cụ thể là pectinaza, pectinesteraza, pectin lyaza, polygalacturonaza, arabinanaza, rhamnogalacturonaza, rhamnogalacturonan axetyl esteraza, rhamnogalacturonan- β -rhamnosidaza, pectat lyaza, và β -galacturonisidaza, mannanaza, β -mannosidaza, mannan axetyl esteraza, xylan axetyl esteraza, proteaza, xylanaza, arabinoxylanaza và enzym thuỷ phân lipid như lipaza, phytaza và cutinaza.

Chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng dành cho động vật theo sáng chế được bổ sung vào trước hoặc đồng thời cùng với chế độ ăn của động vật dạ dày đơn. Theo một khía cạnh, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế được bổ sung đồng thời vào chế độ ăn của động vật dạ dày đơn. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng được thêm vào chế độ ăn ở dạng hạt hoặc dạng lỏng ổn định.

Một lượng có hiệu quả enzym trong chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế là từ khoảng 10 đến 20.000; từ khoảng 10 đến 15.000, từ khoảng 10 đến 10.000, từ khoảng 100 đến 5.000, hoặc từ khoảng 100 đến khoảng 2.000 FYT/kg chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng.

Các ví dụ không hạn chế về các ứng dụng cụ thể của phytaza theo sáng chế là trong quá trình chế biến đậu tương và trong quá trình sản xuất inositol hoặc các dẫn xuất của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm giảm nồng độ phytat trong phân động vật, trong đó động vật được cho ăn chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng chứa một lượng có hiệu quả phytaza theo sáng chế. Như được khẳng định từ đầu của sáng chế này, một tác dụng quan trọng của sáng chế là làm giảm mức độ ô nhiễm phosphat trong môi trường.

Theo một khía cạnh khác, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng là một chất mang có từ tính. Chẳng hạn, chất mang có từ tính chứa enzym (chẳng hạn, phytaza) được phân phối vào trong, trên hoặc qua chất mang có từ tính (chẳng hạn, hạt từ tính có lỗ rỗng), có thể được phân phối vào các vùng có nồng độ phytat cao và được thu lại bằng nam châm sau một khoảng thời gian. Sự phân khối và thu lại các hạt có từ tính này sẽ làm giảm mức độ ô nhiễm và cho phép tái sử dụng các hạt này. Thêm vào đó, việc sử dụng các hạt có từ tính trong cơ thể sẽ cho phép việc định vị chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng tại một điểm trong đường tiêu hoá tại đó, chẳng hạn, hoạt tính phytaza có thể được thực hiện.

Chẳng hạn, chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế chứa enzym tiêu hoá (chẳng hạn, phytaza) có thể được định vị trong dạ dày cơ của động vật bằng cách đặt một nam châm cạnh dạ dày cơ của động vật sau khi động vật ăn chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng chứa chất mang có từ tính. Nam châm có thể được loại bỏ sau một khoảng thời gian để cho chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng vượt qua đường tiêu hoá. Ngoài ra, chất mang có từ tính là thích hợp để loại bỏ khỏi sinh vật sau khi giết hoặc để hỗ trợ quá trình thu thập.

Khi chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng là các hạt có lỗ rỗng, các hạt nào thường được làm bão hoà bằng một cơ chất mong muốn được giải phóng chậm để tạo thành hạt giải phóng chậm. Các hạt giải phóng chậm này có thể được tạo ra không chỉ bằng cách làm bão hoà các hạt có lỗ rỗng với cơ chất cần giải phóng, mà còn bằng cách đầu tiên hoà tan cơ chất mong muốn trong pha phân tán thứ nhất. Trong trường hợp này, các hạt giải phóng chậm được tạo ra bằng phương pháp trong đó cơ chất cần giải phóng trước hết được hoà tan trong pha phân tán thứ nhất cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các hạt có lỗ rỗng có thể, chẳng hạn, được làm bão hoà bằng một cơ chất giải phóng chậm như thuốc, hoá chất nông nghiệp hoặc enzym. Cụ thể là, khi các hạt có lỗ rỗng được làm bão hoà bằng một enzym được tạo ra bằng các polyme có thể phân huỷ sinh học, thì bản thân các hạt có thể được sử dụng như một hoá chất nông nghiệp hoặc phân bón, và chúng không có tác dụng có hại nào đối với môi trường. Theo một khía cạnh, các hạt có lỗ rỗng có từ tính tự nhiên.

Các hạt có lỗ rỗng có thể được sử dụng như một giá đỡ trong bình phản ứng, cụ thể là một giá đỡ enzym. Do đó, ưu điểm là tạo ra chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng sử dụng phương pháp làm chậm giải phóng, chẳng hạn bằng cách nang hoá enzym trong các vi nang, như liposom, từ đó liều lượng được giải phóng trong một vài ngày, tốt hơn là từ khoảng 3 đến 20 ngày. Theo một cách khác, hoạt chất (chẳng hạn, một enzym) có thể được bào chế để chậm giải phóng, như kết hợp vào một polyme chậm giải phóng từ đó liều hoạt chất (chẳng hạn, enzym) được giải phóng chậm trong một vài ngày, chẳng hạn từ 2 đến 30 ngày và có thể kéo dài toàn bộ cuộc đời của động vật.

Theo một khía cạnh, liposom theo sáng chế thu được từ các phospholipit hoặc các cơ chất lipit khác. Liposom được tạo bởi các tinh thể lỏng được hydrat hoá dạng một tấm hoặc nhiều tấm được phân tán trong môi trường nước. Một loại lipit có khả năng

chuyển hoá, có thể sử dụng trong sinh lý, không độc bất kỳ có khả năng tạo liposom có thể được sử dụng. Các chế phẩm theo sáng chế trong liposom có thể chứa chất ổn định, chất bảo quản, tá dược và các chất tương tự ngoài hoạt chất. Một số lipid thử nghiệm là phospholipit và phosphatidyl cholin (lexithin), cả dạng tự nhiên và tổng hợp. Phương pháp tạo liposom đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, chẳng hạn, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq.

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là việc sử dụng phytaza theo sáng chế trong quá trình sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn gia súc hoặc thành phần bổ sung, nghĩa là, phytaza sẽ thể hiện hoạt tính phytaza chỉ trong quá trình sản xuất và không hoạt động trong thực phẩm hoặc thức ăn gia súc thành phẩm. Khía cạnh này có liên quan đến chế biến và nướng bột nhào. Do đó, phytaza hoặc nấm men tái tổ hợp biểu hiện phytaza có thể được đưa vào trong, hoặc trên hoặc qua chất mang có từ tính, được đưa vào bột nhào hoặc thực phẩm, và thu lại bằng nam châm.

Chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng trên động vật một cách riêng rẽ trong một chất mang tương hợp sinh học (chẳng hạn, có thể phân huỷ sinh học hoặc không thể phân huỷ sinh học) hoặc cùng với các hoạt chất hỗ trợ tiêu hoá khác. Chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng theo sáng chế có thể dễ dàng được sử dụng bằng cách rắc lên trên hoặc bằng cách trộn trực tiếp vào thức ăn gia súc hoặc được cung cấp riêng rẽ với thức ăn gia súc, bằng các liều dùng qua đường miệng riêng rẽ, bằng cách tiêm hoặc bằng cách qua da hoặc kết hợp với các hợp chất tăng trưởng ăn được khác, tỷ lệ của mỗi hợp chất trong hỗn hợp phụ thuộc vào loài sinh vật cụ thể hoặc vấn đề cần quan tâm và mức độ đáp ứng mong muốn. Cần hiểu rằng khẩu phần ăn cụ thể được sử dụng trong một số trường hợp nhất định sẽ được điều chỉnh theo các hợp chất cụ thể được sử dụng, vấn đề cần điều trị, tình trạng của đối tượng và các thực tế có liên quan khác có thể cải biến hoạt tính của hoạt chất hoặc mức độ đáp ứng của đối tượng, như được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói chung, một liều đơn hàng ngày hoặc liều chia nhỏ dùng hàng ngày có thể được sử dụng, như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Nếu được sử dụng riêng rẽ với thức ăn gia súc, dạng của chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng có thể được điều chế bằng cách trộn chúng với các chất mang ăn được được dùng không độc để tạo ra các dạng bào chế giải phóng tức thì hoặc chậm giải phóng như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất mang ăn được có thể dạng rắn hoặc dạng lỏng như, chẳng hạn, tinh bột ngô, lactoza, sucroza, đậu tương, dầu lạc, dầu oliu, dầu vừng và propylen glycol. Nếu một chất mang rắn được sử dụng thì dạng liều của hợp chất có thể là viên nén, viên nang, bột, viên thuốc hình thoi hoặc viên ngậm hoặc bột rắc như dạng vi phân tán. Nếu chất mang dạng lỏng được sử dụng, các dạng liều có thể là viên nang gelatin, hoặc xirô hoặc hỗn dịch lỏng, nhũ tương hoặc dung dịch. Các dạng liều cũng có thể chứa các tá dược, như chất ổn định, chất bảo quản, chất tạo ẩm hoặc chất nhũ hoá, chất tạo dung dịch, v.v. Chúng cũng có thể chứa các cơ chất có giá trị trị liệu khác. Quá trình bào chế chất mang dạng hạt ăn được ở nhiệt độ cao để giải phóng enzym khi được ăn vào được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Hoa Kỳ đang chờ xét duyệt số 09/910,579, nộp ngày 20/07/2001.

Theo các phương án khác, các ưu điểm quan trọng của sáng chế có thể là 1) sản xuất dễ dàng các chế phẩm tương hợp sinh học chứa hoạt chất; 2) tính linh hoạt vì liên quan đến lớp polyme và/hoặc hoạt chất có thể được sử dụng; 3) năng suất cao hơn và hiệu quả mang; và 4) cung cấp các chế phẩm giải phóng duy trì giải phóng các hoạt chất nguyên vẹn trong cơ thể, do đó sẽ tạo ra quá trình giải phóng có kiểm soát hoạt chất trong một giai đoạn dài. Theo một phương án, một ưu điểm có thể là do sự phân phối tại chỗ hoạt chất trong đường tiêu hoá (chẳng hạn, dạ dày cơ) của sinh vật. Theo một khía cạnh, thuật ngữ “được chứa trong” dùng để chỉ phương pháp để bào chế một hoạt chất trong chế phẩm để giải phóng có kiểm soát, trong một giai đoạn kéo dài.

Theo các phương án khác, các chế phẩm giải phóng duy trì hoặc giải phóng chậm theo sáng chế chứa một lượng hiệu quả hoạt chất (chẳng hạn, enzym hoặc kháng sinh) được sử dụng. Theo một khía cạnh, giải phóng duy trì hoặc giải phóng chậm dùng để chỉ quá trình giải phóng dần dần hoạt chất từ vật liệu tương hợp sinh học, trong một giai đoạn kéo dài. Dạng giải phóng duy trì có thể là liên tục hoặc gián đoạn, tuyến tính hoặc phi tuyến, và điều này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng một hoặc nhiều thành phần có thể phân huỷ sinh học hoặc không thể phân huỷ sinh học, chất mang thuốc, lựa chọn tá dược, hoặc các cách cải biến khác. Tuy nhiên, cần thấy rằng có thể tạo ra một

chế phẩm giải phóng “nhanh” tạo ra quá trình giải phóng nhanh khi được hấp thu bởi sinh vật. Cũng có thể hiểu rằng, “giải phóng” không nhất thiết có nghĩa là hoạt chất được giải phóng từ chất mang tương hợp sinh học. Theo một khía cạnh, quá trình giải phóng chậm có nghĩa là quá trình hoạt động chậm hoặc hoạt động liên tục của hoạt chất có trong chế phẩm tương hợp sinh học. Chẳng hạn, phytaza không cần phải được giải phóng từ chế phẩm tương hợp sinh học để có hiệu quả. Theo khía cạnh này, phytaza được cố định trên chế phẩm tương hợp sinh học.

Thức ăn gia súc có thể là bữa ăn hữu cơ chứa protein thường được sử dụng để thảo mãn nhu cầu dinh dưỡng của động vật. Nhiều trong số các bữa ăn chứa protein này thường được làm từ ngô, bột đậu tương hoặc hỗn hợp ngô/bột đậu tương. Chẳng hạn, các sản phẩm có bán sẵn để cho gia cầm ăn gồm Egg Maker Complete, sản phẩm thức ăn gia cầm của Land O'Lakes AG Services, cũng như Country Game và Turkey Grower một sản phẩm của Agwa, Inc. (tham khảo The Emu Farmer's Handbook by Phillip Minnaar và Maria Minnaar). Cả hai sản phẩm có bán sẵn trên thị trường này thường được lấy làm ví dụ về thức ăn gia súc có thể kết hợp với chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng và/hoặc enzym phytaza theo sáng chế để giảm hoặc loại bỏ việc bổ sung phospho, kẽm, mangan và sắt cần thiết trong các chế phẩm này.

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phụ gia khác, và phương pháp để bổ sung vào một số chế độ ăn, chẳng hạn, chế độ ăn của Atkins, chế độ ăn chay, chế độ ăn sinh vật lớn, chế độ ăn chay hoàn toàn hoặc chế độ ăn theo vùng, chẳng hạn, chế độ ăn của các nước đang phát triển. Thực phẩm đi kèm với các chế độ ăn chọn lọc, như Atkin, chế độ ăn chay, chế độ ăn sinh vật lớn, chế độ ăn chay hoàn toàn hoặc chế độ ăn theo vùng (chẳng hạn chế độ ăn của các nước đang phát triển) thường tập trung vào một số nhóm thực phẩm nhất định, như protein và béo, đậu nành, v.v., hoặc dựa vào các loại cây trồng nội địa, chẳng hạn, ngũ cốc, gạo, đậu, và các loại tương tự như thành phần cung cấp dinh dưỡng chủ yếu hoặc duy nhất vào chế độ dinh dưỡng của một cá thể. Rất nhiều trong số các loại cây ngũ cốc có nồng độ axit phytic tăng lên (từ 3 đến 10 lần). Thực phẩm chế biến như dịch thủy phân protein đậu nành và các loại khác có thể duy trì các nồng độ axit phytic tăng và việc đưa chúng vào như nguồn protein vào các loại bánh dinh dưỡng, bột và các loại thực phẩm hoặc thực phẩm

bổ sung khác và các thành phần làm tăng mức độ hấp thu axit phytic ở các cá thể ăn những bữa ăn như vậy.

Ngăn ngừa và điều trị chứng mất xương

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm và chế độ ăn mới được sử dụng như thực phẩm bổ sung và chất bổ trợ, và phương pháp bổ sung vào chế độ ăn, chứa phytaza, chẳng hạn, một phytaza bất kỳ, gồm có phytaza theo sáng chế, cho các bệnh nhân được chẩn đoán là bị mất xương, các bệnh nhân bị mất xương, và các bệnh nhân bị các tình trạng y tế nhất định, chẳng hạn, loãng xương, suy mòn, và các phương pháp điều trị y tế, như hoá trị liệu, các phương pháp này có thể tạo ra quá trình hấp thu hoặc sử dụng chính xác các dưỡng chất cần thiết. Phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với các thành phần bổ sung hoặc chế độ điều trị khác, gồm có thuốc và các loại tương tự. Chẳng hạn, chế phẩm, thành phần bổ sung vào chế độ ăn và các phương pháp để bổ sung dinh dưỡng có thể được sử dụng cùng với các thành phần bổ sung vào chế độ ăn hoặc thuốc khác để điều trị hoặc ngăn ngừa loãng xương, chẳng hạn, với vitamin D3 và/hoặc canxi (đã được chứng minh là ngăn ngừa mất xương). Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza, chẳng hạn, một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế, và vitamin D3 và/hoặc canxi. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một loại phytaza, chẳng hạn, một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế, để ngăn ngừa mất xương.

Chế phẩm có thể ở dạng dược phẩm, hoặc, có thể là một thành phần bổ trợ của dược phẩm, có thể ở dạng lỏng, rắn, bột, lotion, dạng xịt hoặc sol khí. Dược phẩm và chế phẩm theo sáng chế để sử dụng qua đường miệng có thể được bào chế sử dụng các chất mang dược dụng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này theo các liều chính xác và thích hợp. Các chất mang này sẽ cho phép bào chế dược phẩm thành dạng liều đơn vị như viên nén, viên tròn, bột, viên bao đường, viên nang, dạng lỏng, viên ngậm, gel, xirô, bột nhão, hỗn dịch, v.v., thích hợp để dùng qua đường tiêu hoá của bệnh nhân. Dược phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể được bào chế ở dạng rắn, tuỳ ý bằng cách nghiền một hỗn hợp, và xử lý hỗn hợp hạt cốm, sau khi thêm các thành phần bổ trợ, nếu cần, để thu được viên nén hoặc lõi viên bao đường. Các tá dược rắn thích hợp là chất độn carbohydrat hoặc protein bao gồm, chẳng hạn, đường, gồm có lactoza,

sucroza, manitol, hoặc sorbitol; tinh bột ngô, lúa mì, lúa gạo, khoai tây, hoặc các cây khác; xenluloza như metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, hoặc natri carboxy-metylxenluloza; và gồm gồm arabic và tragacanth; và protein, chẳng hạn, gelatin và collagen. Các chất rắn hoặc hoà tan có thể được thêm vào, như polyvinylpyrrolidon, agar, axit alginic, hoặc muối của nó, như natri alginat.

Sáng chế đề xuất hỗn dịch lỏng chứa phytaza, chẳng hạn, phytaza theo sáng chế, trong hỗn hợp với các tá dược thích hợp để sản xuất các hỗn dịch lỏng. Các tá dược này bao gồm tá dược lơ lửng, như natri carboxymetylxenluloza, metylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrrolidon, gồm tragacanth và gồm acacia, và tá dược phân tán hoặc tá dược tạo ẩm như phosphatit có nguồn gốc tự nhiên (chẳng hạn, lecithin), một sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (chẳng hạn, polyoxyetylen stearat), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (chẳng hạn, heptadecaetylen oxyxetanol), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với một este một phần thu được từ axit béo và hexitol (chẳng hạn, polyoxyetylen sorbitol mono-oleat), hoặc sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este một phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit (chẳng hạn, polyoxyetylen sorbitan mono-oleat). Hỗn dịch lỏng cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản như etyl hoặc n-propyl p-hydroxybenzoat, một hoặc nhiều chất tạo màu, một hoặc nhiều chất tạo hương vị và một hoặc nhiều chất điều vị, như sucroza, aspartam hoặc sacarin. Các chế phẩm có thể được điều chỉnh theo nồng độ mol.

Chế độ liều cũng tính đến việc xem xét các tham số dược động lực học đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, nghĩa là, tốc độ hấp thu, độ sinh khả dụng, tốc độ chuyển hoá, độ thanh thải, và các tham số tương tự của hoạt chất (tham khảo, chẳng hạn, Hidalgo-Aragones (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611-617; Groning (1996) *Pharmazie* 51:337-341; Fotherby (1996) *Contraception* 54:59-69; Johnson (1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146; Rohatagi (1995) *Pharmazie* 50:610-613; Brophy (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108; the latest edition of Remington, *The Science và Practice of Pharmacy* 20th Ed. Lippincott Williams & Wilkins). Các hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể cho phép nhà lâm sàng học xác định chế độ liều đối với từng bệnh nhân riêng lẻ, hoạt chất và bệnh hoặc tình trạng được điều trị. Các hướng dẫn được cung cấp đối với các chế phẩm tương tự được làm được phẩm có thể được sử dụng là hướng dẫn

để xác định chế độ liều, nghĩa là, lịch trình dùng liều và liều lượng, được sử dụng để thực hiện các phương pháp theo sáng chế (chẳng hạn, điều trị mất xương, hoặc, ngăn ngừa mất xương) là thích hợp và chính xác.

Các thành phần bổ sung trong luyện tập thể lực

Sáng chế cũng đề xuất các thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phụ gia thực phẩm mới, và phương pháp sử dụng chúng, chứa phytaza, chẳng hạn, một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế, cho các đối tượng trải qua quá trình luyện tập thể thao hoặc các hoạt động luyện tập thể lực cường độ cao khác, chẳng hạn, luyện tập binh sĩ. Luyện tập thể thao và sự gắng sức có thể làm cạn kiệt các dưỡng chất cần thiết và cần quá trình bổ sung các thành phần dinh dưỡng vào chế độ ăn. Các chế độ ăn và các tình trạng thường có chung một đặc điểm là thiếu các vi chất cần thiết như kim loại (K, Ca, Fe, Zn, Mn, Se) và ion (PO_4) cần thiết đối với quá trình dinh dưỡng tối ưu. Các chế độ ăn giàu axit phytic sẽ làm tăng vấn đề này lên và có thể gây ra cả các tình trạng mạn tính và cấp tính hình thành do sự phụ thuộc theo ý chí hoặc do kinh tế vào các chế độ ăn giàu thực phẩm có hàm lượng axit phytic cao.

Chẳng hạn, các đối tượng theo chế độ ăn ít carbohydrat (“low carb”) thường bị chuột rút cơ, chẳng hạn, cơ chân, co cứng cơ. Khuyến cáo chung cho vấn đề này là bổ sung kali, canxi và các dưỡng chất khác vào chế độ ăn. Sáng chế đề xuất chế phẩm để bổ sung vào chế độ ăn, thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phương pháp để thành phần bổ sung dinh dưỡng tăng quá trình dinh dưỡng bị ảnh hưởng qua việc chuyển hoá các dưỡng chất đa lượng và dưỡng chất vi lượng sử dụng thành phần bổ sung phytaza vào chế độ ăn (bao gồm việc sử dụng một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, việc sử dụng phytaza (chẳng hạn, sử dụng một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế) được tối ưu để thể hiện các đặc tính không bền nhiệt hoặc độ ổn định với pH sẽ làm cho chế phẩm này trở lên thích hợp để bổ sung trực tiếp vào thực phẩm và quá trình bổ sung và/hoặc chứng minh hoạt tính và độ ổn định được gia tăng trong đường tiêu hoá của người hoặc động vật.

Sáng chế cũng đề xuất thành phần bổ sung vào chế độ ăn mới, và phương pháp sử dụng chúng, chứa phytaza, chẳng hạn, một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế, cho các bệnh nhân cần bổ sung khoáng chất. Chế phẩm bổ sung khoáng chất cho

người trên các thực phẩm có hàm lượng axit phytic cao có thể làm tăng các vấn đề đối với chất dinh dưỡng có sẵn. Các tài liệu tham khảo đã đề xuất rằng các phức hợp của axit phytic, canxi và kẽm càng khó tan hơn so với các phức hợp của axit phytic và canxi. Con người thường uống nhiều loại bổ sung khoáng chất. Việc thêm phytaza vào trong chế độ ăn được chia đều để kết hợp các chế phẩm bổ sung khoáng chất khi có các thực phẩm có hàm lượng axit phytic cao có thể làm cho các chế phẩm bổ sung này hiệu quả hơn.

Theo các khía cạnh khác, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế (chứa một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế) được sử dụng là các chế phẩm bổ sung hoặc phụ trợ trong:

- Các chương trình luyện tập giảm cân hạn chế việc ăn các nhóm thực phẩm cụ thể, người ăn chay, chế độ ăn thực dưỡng hoặc chế độ ăn chay hoàn toàn hạn chế hoặc không được ăn thịt, cây kỳ nhám, bánh mì, v.v. và các chế độ ăn khác tập trung vào việc ăn các loại đậu,
- Các thành phần bổ sung đặc hiệu cho các cá thể có chế độ ăn đạm thấp có nhiều thực phẩm có hàm lượng axit phytic cao để làm giảm các triệu chứng sinh lý do sự hấp thu chất khoáng giảm,
- Chế độ luyện tập thể thao cần tăng hiệu quả luyện tập qua chế độ dinh dưỡng, gồm cả chế độ luyện tập quân ngũ,
- Chế độ ăn của bệnh viện được thiết kế để đáp ứng các nhu cầu cụ thể của bệnh nhân bị làm giảm quá trình hấp thụ hoặc bị hạn chế đối với một số nhóm thực phẩm
- Chế độ ăn ngũ cốc có hàm lượng vi chất thấp và chế độ ăn đậu ở các nước đang phát triển,
- Chế độ ăn trưa ở trường học.

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit chứa chế phẩm theo sáng chế (chứa một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế) và hướng dẫn về việc kết hợp chế phẩm hoặc phương pháp theo sáng chế vào các chế độ ăn này. Kit này còn chứa các thành phần như bao bì, nhãn, và tờ rơi sản phẩm và tương tự.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phytaza có nguồn gốc tự nhiên hoặc phytaza được tối ưu theo sáng chế, được bào chế để hoặc tối ưu để (chẳng hạn, được tối ưu trình tự) sản xuất, xử lý hoặc chuyển qua các hệ thống của người hoặc động vật chẳng hạn, đường tiêu hoá. Enzym phytaza có thể được tối ưu bằng cách sử dụng các phương pháp bào chế khác nhau.

Theo một cách khác, enzym phytaza theo sáng chế, hoặc, phytaza bất kỳ, có thể được tối ưu bằng cách xử lý trình tự gen của nó, chẳng hạn, sử dụng phương pháp gây tiến hoá có định hướng, PCR đọc sửa, ghép nối, gây đột biến tại chỗ oligonucleotit, PCR ghép nối, gây đột biến kết cặp PCR, gây đột biến trong cơ thể, gây đột biến catxet, gây đột biến ngược toàn thể, gây đột biến toàn thể theo số mũ, gây đột biến đặc hiệu tại chỗ, ghép nối ligaza, GSSM™ và một tổ hợp bất kỳ của các phương pháp trên, để duy trì hoạt tính trong quá trình xử lý, tiêu hoá và trong ruột người.

Các chế phẩm (chẳng hạn, chế phẩm ăn kiêng chứa enzym phytaza bất kỳ, hoặc enzym phytaza theo sáng chế) có thể được phân phối theo một số cách để đạt được hiệu quả dinh dưỡng. Chẳng hạn, sáng chế đề xuất chế phẩm (chẳng hạn, chế phẩm ăn kiêng hoặc phụ gia chứa enzym phytaza bất kỳ, hoặc enzym phytaza theo sáng chế) và phương pháp gồm có việc sử dụng:

- Trong thực phẩm bổ sung được đóng gói như viên nén nhai được hoặc bánh dinh dưỡng,
- Một sản phẩm đông khô để pha với nước trước khi ăn,
- Được đóng gói cùng với các sản phẩm ăn kiêng, ví dụ, sản phẩm đậu nành đã qua chế biến hoặc được bán ở dạng chế phẩm với sản phẩm thuỷ phân protein đậu nành và các phân đoạn chế biến khác từ thực phẩm nguyên vẹn được đưa ra thị trường ở dạng các thành phần đối với công nghiệp thực phẩm chế biến,
- Sản phẩm nướng,
- Ngũ cốc ăn sáng dạng xít,
- Các chế phẩm dùng đường xông hít (chẳng hạn, dạng xít mũi),
- Sản phẩm chuyển gen được biểu hiện trong các loại cây trồng bản địa, nghĩa là, ngũ cốc và đậu (chẳng hạn, sản phẩm chuyển gen của một vi sinh vật, như vi khuẩn)

- Sinh vật chuyển gen, chẳng hạn, vi sinh vật; chẳng hạn, người hoặc động vật được cho ăn vi khuẩn hoặc các vi sinh vật khác có khả năng tạo ra (và, theo một phương án khác, có khả năng tiết) phytaza tái tổ hợp, như phytaza theo sáng chế, sau khi ăn hoặc cấy, chẳng hạn, vào ruột của người hoặc động vật.

Các sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế có thể được coi là chế phẩm gia tăng dinh dưỡng, chế phẩm tương hợp dinh dưỡng hoặc theo một cách khác được chú thích về khả năng gia tăng hiệu quả dinh dưỡng và làm giảm nhiều triệu chứng khác nhau liên quan đến tình trạng thiếu dinh dưỡng.

Các sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế được sử dụng để làm giảm các tác động kháng dinh dưỡng của phytat, phytat là chất cang hóa với các khoáng chất dinh dưỡng quan trọng như kẽm, đồng, sắt, magie, thiếc, và canxi. Do đó, sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế được sử dụng là thành phần bổ sung vào chế độ ăn để ngăn quá trình kết tủa của enzym và protein liên kết với kim loại trong các thực phẩm ăn được. Theo một khía cạnh, sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế được sử dụng để làm giảm các tác động kháng dinh dưỡng của phytat trong chế độ ăn của người, cụ thể là các chế độ ăn nhiều đậu và ngũ cốc, để làm tăng độ sinh khả dụng của các khoáng chất. Theo một khía cạnh, phytaza trong thành phần bổ sung vào chế độ ăn theo sáng chế sẽ xúc tác thủy phân loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn orthophosphat trong phytat, trong đó quá trình thủy phân hoàn toàn phytat sẽ tạo ra 1 phân tử inositol và 6 phân tử phosphat vô cơ.

Sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế có thể sử dụng vào chế độ ăn của người và nhiều động vật, gồm cả gia cầm và cá. Chẳng hạn, sản phẩm thành phần bổ sung vào chế độ ăn chứa phytaza và các phương pháp tạo thành phần bổ sung vào chế độ ăn theo sáng chế có thể thực hiện được với các loài có giá trị thương mại, chẳng hạn, lợn, bò, cừu, dê, thú gặm nhấm trong phòng thí nghiệm (chuột đồng, chuột nhắt, chuột lang và chuột nhảy), động vật cho lông như chồn vizon và cáo, và động vật vườn bách thú như khỉ và đười ươi, cũng như thú nuôi trong nhà như mèo và chó. Các loài gia cầm có giá trị thương mại điển hình gồm có gà, gà quay, vịt, ngỗng, gà lôi, đà điểu sa mạc, đà điểu châu Phi, chim lặn gavia, kiwi, bồ câu, vịt, vịt xám Úc, vịt mào, hoàng yến, cánh cụt, hồng hạc, và chim cú. Các loại cá nuôi thương mại như cá hồi cũng có

thể sử dụng các loại chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng được đề cập ở đây. Các loại cá khác cũng có thể sử dụng được chế phẩm gồm, chẳng hạn, cá (đặc biệt trong môi trường bể nuôi hoặc nuôi trồng, chẳng hạn, cá nhiệt đới), cá vàng và các loại cá cảnh, cá da trơn, cá hồi di cư, cá hồi không di cư, cá mập, cá đuối, cá bơn, tilapia, medaka, cá nước ngọt, molly, cá đĩa, các đuôi kiếm, cá ngựa, và cá chạch.

Sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế cũng được sử dụng trong các loại agar, gel, môi trường, và dung dịch khác nhau trong nuôi cấy mô và/hoặc tế bào. Dịch thủy phân đậu nành không đồng nhất có thể là một trở ngại gặp phải khi sử dụng trong nuôi cấy mô và/hoặc tế bào. Theo một khía cạnh, sản phẩm chứa phytaza và phương pháp theo sáng chế được sử dụng là chất bổ trợ môi trường nuôi cấy mô hoặc là các chất xử lý để, chẳng hạn, tăng sản lượng nuôi cấy tế bào và tính ổn định hiệu năng. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dịch thủy phân để nuôi cấy tế bào chứa phytaza, chẳng hạn, phytaza theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, để tạo ra một sản phẩm ổn định, sáng chế đề xuất phương pháp tạo dịch thủy phân, chế phẩm bổ sung hoặc phụ gia cho nuôi cấy tế bào chứa phytaza bằng cách sử dụng các chỉ thị sinh học của phytaza. Chẳng hạn, phương pháp này sẽ bao gồm việc “tìm ra” hoặc “tạo ra” một số phân tử phytaza khác nhau trong các mẻ dịch thủy phân, chất bổ sung hoặc phụ gia khác, và sau đó trộn lẫn các mẻ đó vào dịch thủy phân, chất bổ sung hoặc phụ gia khác để thu được một mẫu chỉ thị sinh học ổn định. Theo một khía cạnh, việc thực hiện nuôi cấy bằng mỗi mẻ được đo trong một máy đo phản ứng sinh học nhỏ và quá trình thực hiện với từng chỉ thị sinh học và mẻ được xác định tương quan. Theo một khía cạnh, một hỗn hợp được tạo ra để đạt được các sản phẩm có hiệu quả cao hơn ổn định hoặc tốt hơn so với mức trung bình. Theo một khía cạnh, thioredoxin (TRX) được bổ sung vào để tăng mức độ sinh khả dụng của nhiều protein bằng cách loại bỏ cấu trúc thứ cấp tạo ra bởi các liên kết disulfit. Theo một khía cạnh, các proteaza cũng được cho vào dịch thủy phân, chất bổ sung hoặc phụ gia theo sáng chế. Các proteaza có thể được “kiểm soát” hoặc kiểm tra chất lượng với các chỉ thị sinh học khác (như với phytaza, như đã nêu) để điều khiển quá trình trộn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bổ sung phytaza vào hạt để tạo ra sản phẩm ổn định sử dụng chỉ thị sinh học “phát hiện” hoặc kiểm soát chất lượng

tương tự như đã nêu đối với các dịch thuỷ phân, chất bổ sung hoặc phụ gia theo sáng chế.

Các chế độ ăn được tăng cường enzym để tăng ý chí và sức chiến đấu của quân nhân

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phụ gia và phương pháp mới để bổ sung chế độ ăn chứa phytaza, chẳng hạn, một loại phytaza bất kỳ hoặc phytaza theo sáng chế, để tạo ra các chế độ ăn được tăng cường enzym để tăng ý chí và sức chiến đấu của quân nhân. Theo một khía cạnh, các thành phần bổ sung vào chế độ ăn chế phẩm theo sáng chế sẽ hoạt động, tại chỗ, để tăng năng lượng, sức bền và ý chí ở dạng mong muốn, sử dụng dễ dàng, và ổn định trong khi hạn chế sự lãng phí thực phẩm.

Theo một khía cạnh, các chế phẩm thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phương pháp theo sáng chế hướng đến hoạt động luyện tập quân sự gồm có việc cung cấp hiệu quả các chất dinh dưỡng và sức khoẻ, ý chí chiến đấu và hiệu quả chiến đấu của binh sĩ. Sáng chế đề xuất enzym được tối ưu để hoạt động hiệu quả trong ruột người. Các enzym này có thể tăng việc hấp thu chất dinh dưỡng và tạo ra năng lượng cũng như kéo dài sự duy trì lượng chất dinh dưỡng đầy đủ và cảm giác no của chiến sĩ.

Ngoài phytaza, các enzym khác, chẳng hạn, amylaza, xylanaza, proteaza, lipaza, được sử dụng để sản xuất chế phẩm thành phần bổ sung vào chế độ ăn và thực hiện phương pháp theo sáng chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chế phẩm, thực phẩm bổ sung, thực phẩm, suất ăn sẵn (self-contained meal Ready-to-Eat units - MRE), đồ uống, chất hydrat hoá và các chất tương tự, chứa phytaza, chẳng hạn, phytaza theo sáng chế, và một enzym khác, chẳng hạn, amylaza, xylanaza, proteaza, lipaza hoặc tổ hợp của các enzym trên. Khi được hấp thu cùng thực phẩm, các enzym này đã cho thấy làm tăng mức độ giải phóng các chất dinh dưỡng thiết yếu, chẳng hạn, phospho, các kim loại và ion cần thiết, axit amin, và đường. Hơn nữa, việc đồng hấp thu các enzym này sẽ làm tăng mức độ cơ học và hấp thu bằng cách khử polyme hoá xenluloza, hemixenluloza và tinh bột từ thực vật. Điều này đề xuất việc phát triển các enzym này là thành phần bổ sung vào chế độ ăn của quân đội để tăng cường hiệu quả sử dụng chất dinh dưỡng đối với quân nhân.

Theo một khía cạnh, thực phẩm bổ sung theo sáng chế sẽ tạo ra quá trình giải phóng phosphat cần thiết từ phytat thu được từ thực vật và thường không có giá trị dinh dưỡng để làm tăng hiệu suất năng lượng của thực phẩm và sự tích lũy CaPO_4 vào xương. Theo một khía cạnh, phytaza và enzym trong các thành phần bổ sung dinh dưỡng có thể chịu được pH trong ruột và hoạt động của các proteaza ngoại sinh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chế phẩm bổ sung enzym vào khẩu phần, đồ uống, thực phẩm, MRE, chất hydrat hoá và các chế phẩm tương tự để tăng cường đáng kể giá trị dinh dưỡng, khả năng hấp thu và hàm lượng năng lượng của chế độ ăn quân đội (hoặc một chế độ ăn bất kỳ, gồm có chế độ ăn của người bình thường và các sản phẩm bổ sung chế độ ăn) được dùng cho quân nhân trong luyện tập, chiến đấu hoặc bất kỳ tình huống căng thẳng nào. Chế phẩm bổ sung có thể được bào chế để có thể dễ dàng sử dụng và vận chuyển (trong hoặc cùng với MREs, chất hydrat hoá, v.v.). Theo một khía cạnh, chế phẩm bổ sung enzym sẽ không làm hỏng cảm quan, mùi vị và/hoặc tính ổn định của thực phẩm. Theo một khía cạnh, sản phẩm sẽ cải thiện sức khỏe và gia tăng sức bền của quân nhân.

Theo các khía cạnh khác, chế phẩm bổ sung enzym được phân phối theo một số cách để tạo ra hiệu quả dinh dưỡng; chẳng hạn, sáng chế đề xuất phytaza, gồm có phytaza theo sáng chế, và theo một số khía cạnh, các enzym bổ sung, trong:

- chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bổ sung được đóng gói như MREs, khẩu phần, bữa ăn cứu hộ, chất hydrat hoá, viên nén nhai được hoặc bánh dinh dưỡng;
- ở dạng sản phẩm đông khô (chẳng hạn, bột) sẵn sàng pha với nước trước khi ăn;
- được đóng gói cùng với các sản phẩm dinh dưỡng, thực phẩm, đồ uống, chẳng hạn, sản phẩm đậu tương đã chế biến hoặc chế phẩm có dịch thủy phân protein đậu nành và các phân đoạn chế biến khác từ thực phẩm được bán là nguyên liệu cho công nghiệp chế biến thực phẩm;
- trong các sản phẩm nướng;
- Dạng xịt lên ngũ cốc;
- chế phẩm như viên nén, miếng gel, viên nang, dạng xịt và các chế phẩm tương tự.

Theo một khía cạnh, các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế sẽ tạo ra quá trình bổ sung dinh dưỡng giải phóng nhanh calo và các đa dưỡng chất và vi dưỡng chất từ bữa ăn. Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế sẽ cung cấp năng lượng và sức khoẻ cho các cá thể trong các tình huống căng thẳng, chẳng hạn, bao gồm sự gắng sức và các giai đoạn suy kiệt không liên tục. Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế sẽ cung cấp enzym được tối ưu và được bào chế để hoạt động hiệu quả trong ruột người trong khi vẫn duy trì độ ổn định, thời hạn sử dụng và khả năng vận chuyển trong môi trường mong muốn, chẳng hạn, quân đội.

Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế sẽ tạo ra các chế phẩm để gia tăng đặc điểm mùi vị, độ hoà tan, khả năng nhai và hiệu quả vận chuyển của sản phẩm. Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế còn chứa các thành phần khác, như kali, glucoza, CaCl_2 . CaCl_2 trong quá trình bào chế có thể kết hợp với phosphat được giải phóng, và do đó, sẽ làm tăng sự lắng đọng xương và tăng trọng lượng. Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế còn chứa các chế phẩm của các enzym khác, như proteaza, xenlulaza, hemixenlulaza, để phân huỷ protein, xenluloza và hemixenluloza. Các enzym này có thể tăng khả năng cung cấp protein và tinh bột và còn làm tăng sự hấp thu sắt từ các thực phẩm giàu sắt.

Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế còn chứa enzym để thuỷ phân thực phẩm thu được từ nguyên liệu thực vật, có hàm lượng cao glucoza và polyme dựa trên xyloza, xenluloza, hemixenluloza và tinh bột, cũng như polyme axit amin, protein. Theo một khía cạnh, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế còn hỗ trợ quá trình thuỷ phân các nguyên liệu polyme trong thực phẩm; nghĩa là, hỗ trợ quá trình phân huỷ hoàn toàn các polyme thành monome, chẳng hạn, polysaccarit thành các đường đơn, hoặc protein thành các gốc axit amin. Do đó, theo khía cạnh này, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể làm cho thực phẩm, đồ uống hoặc khẩu phần ăn giải phóng giá trị calo và dinh dưỡng đầy đủ. Theo một khía cạnh, quá trình bổ sung enzym bao gồm việc sử dụng một enzym ổn định, chẳng hạn, các loại hydrolaza khác nhau, xenlulaza, hemixenlulaza, amylaza, lipaza, amidaza, proteaza và các enzym khác. Theo một khía cạnh, enzym được sử dụng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể chịu được các điều kiện trong ruột, nghĩa là, ổn định ở pH thấp và khi có mặt các proteaza trong dạ dày.

Sử dụng phytaza trong công nghiệp

Ngoài các ứng dụng được mô tả ở trên, sáng chế đề xuất các ứng dụng trong công nghiệp mới của phytaza, bao gồm việc sử dụng phytaza mới theo sáng chế.

Giảm ô nhiễm phosphat trong môi trường

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza (bao gồm phytaza theo sáng chế) để đưa vào rác thải hoặc phân bón để chuyển hoá axit phytic “trong môi trường”. Theo một khía cạnh, điều này sẽ phục vụ có các mục đích làm giảm ô nhiễm và gia tăng sự có sẵn chất dinh dưỡng. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm và phương pháp để bổ sung phytaza vào đất, hồ nước tự nhiên hoặc nhân tạo (chẳng hạn, hồ, ao, giếng, ao phân bón, và các loại tương tự), cống rãnh, chất thải cống rãnh, và các loại tương tự. Như đã mô tả ở trên, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp làm giảm nồng độ phytat trong rác thải hoặc cống rãnh, chẳng hạn, phân súc vật, trong đó động vật được cho ăn chế phẩm hỗ trợ dinh dưỡng chứa một lượng hiệu quả phytaza, chẳng hạn, phytaza theo sáng chế. Một ứng dụng thử nghiệm của chế phẩm và phương pháp theo sáng chế làm giảm tình trạng ô nhiễm phosphat trong môi trường. Do đó, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong ứng dụng bất kỳ để làm giảm ô nhiễm bằng cách phân hủy axit phytic.

Các ứng dụng trong nuôi trồng thực vật

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza (bao gồm phytaza theo sáng chế) và phương pháp để ứng dụng trong làm vườn hoặc nuôi trồng cây, chẳng hạn, thêm phytaza vào phân bón hoặc chế phẩm bổ sung dinh dưỡng thực vật (chẳng hạn, MIRACLEGROW™) cho thực vật, chẳng hạn, cây trồng trong nhà. Trong quá trình sử dụng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế để ứng dụng trong làm vườn, người sử dụng gồm có công nhân nông nghiệp. Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để bổ sung phytaza vào đất thiếu phospho hoặc cần bổ sung phospho cho một loại cây trồng hoặc ứng dụng cụ thể. Vì quá trình giải phóng phospho sẽ giúp cho quá trình sinh trưởng của thực vật, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để bổ sung phytaza vào môi trường chứa tảo hoặc nguyên liệu thực vật.

Các sản phẩm của trọng quá trình sản xuất

Sáng chế đề xuất một loạt các sản phẩm trong quá trình sản xuất chứa một hoặc nhiều phytaza theo sáng chế. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza (bao gồm phytaza theo sáng chế) và phương pháp để ứng dụng trong mỹ phẩm, chẳng hạn, dầu gội đầu, lotion hoặc xà bông chứa các sản phẩm từ thực vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza (bao gồm phytaza theo sáng chế) và phương pháp để cố định phytaza. Theo một khía cạnh, phytaza được cố định sẽ hoạt động như cơ chế giải phóng có kiểm soát. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chế phẩm phytaza giải phóng có kiểm soát (giải phóng theo thời gian) để sử dụng trong đất, chẳng hạn, đất sét, sử dụng cho cây trồng, v.v. Theo một khía cạnh, phytaza được cố định vào các hạt, chẳng hạn, hạt polysorb. Các hạt này sẽ được đưa vào đất, chẳng hạn, để trồng cây trong nhà hoặc cây nông nghiệp. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm phytaza giải phóng có kiểm soát (giải phóng theo thời gian) theo sáng chế được sử dụng trong thành phần bổ sung vào chế độ ăn và phụ gia thực phẩm.

Chuyển hoá sinh khối và nhiên liệu sinh học

Sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất nhiên liệu, chẳng hạn, nhiên liệu sinh học, bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều phytaza theo sáng chế; gồm tạo ra các nhiên liệu, chẳng hạn, nhiên liệu sinh học, chứa một hoặc nhiều phytaza theo sáng chế. Sáng chế đề xuất phương pháp để chuyển hoá sinh khối bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều phytaza theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa phytaza (bao gồm phytaza theo sáng chế) và phương pháp để sử dụng phytaza trong quá trình lên men hoặc quá trình sản xuất rượu, chẳng hạn sản xuất etanol. Chẳng hạn, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm thay thế hoặc chất phụ trợ hiệu quả và bền vững cho việc sử dụng các sản phẩm gốc dầu mỏ, chẳng hạn, như dạng một hỗn hợp của etanol sinh học và dầu hoá.

Sáng chế đề xuất các sinh vật biểu hiện enzym theo sáng chế để tham gia vào các chu trình hoá học liên quan đến quá trình chuyển hoá sinh khối. Ngoài ra, hỗn hợp của

phytaza (chẳng hạn, enzym theo sáng chế) với một hoặc nhiều enzym phân huỷ tinh bột, như amylaza hoặc glucoamylaza, sẽ làm gia tăng quá trình sản xuất etanol từ tinh bột. Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện và bổ sung enzym hiệu quả nhất để thực hiện các quá trình “chuyển hoá sinh khối” quan trọng và các quá trình thay thế trong công nghiệp năng lượng.

Chuyển hoá sinh khối và quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học sạch

Sáng chế đề xuất polypeptit, gồm có enzym (phytaza theo sáng chế) và kháng thể, và phương pháp xử lý sinh khối hoặc bất kỳ loại nguyên liệu lignoxenluloza nào (chẳng hạn, chế phẩm bất kỳ chứa xenluloza, hemixenluloza và lignin), thành nhiên liệu (chẳng hạn, etanol sinh học, propanol sinh học, butanol sinh học, propanol sinh học, metanol sinh học, diesel sinh học), ngoài thức ăn gia súc, thực phẩm và hoá chất. Chẳng hạn, theo một khía cạnh, enzym theo sáng chế sẽ phân huỷ axit phytic (phytat) không thể tiêu hoá được trong sinh khối (chẳng hạn, nguyên liệu lignoxenluloza, hạt hoặc hoặc hạt có dầu) để giải phóng photpho có thể tiêu hoá được; do đó, theo một phương án, phytaza theo sáng chế được sử dụng để xử lý hoặc xử lý sơ bộ sinh khối.

Do đó, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong quá trình sản xuất và/hoặc xử lý nhiên liệu sinh học, chẳng hạn, để tạo ra nguyên liệu thay thế và/hoặc phụ gia có hiệu quả và bền vững cho việc sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc dầu mỏ; chẳng hạn, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với một hỗn hợp enzym để sản xuất nhiên liệu sinh học – như metanol sinh học, etanol sinh học, propanol sinh học, butanol sinh học, diesel sinh học và các loại tương tự; có thể được thêm vào nhiên liệu diesel, dầu lửa, dầu hoá và các loại tương tự. Sáng chế đề xuất các sinh vật biểu hiện enzym để tham gia vào các chu trình hoá học liên quan đến quá trình chuyển hoá sinh khối tự nhiên. Theo một khía cạnh, enzym và phương pháp để chuyển hoá được sử dụng trong các hỗn hợp enzym để xử lý hiệu quả sinh khối cùng với quá trình khử polyme hoá các polysaccarit, các polyme xenluloza và/hoặc hemixenluloza thành các gốc cacbon có thể chuyển hoá được (chẳng hạn, có thể lên men). Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện và bổ sung enzym hiệu quả nhất để thực hiện các quá trình “chuyển hoá sinh khối” quan trọng và các quá trình thay thế trong công nghiệp năng lượng.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra nguyên liệu thay thế và/hoặc phụ gia có hiệu quả và bền vững cho việc sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc dầu mỏ; chẳng hạn, ở dạng hỗn hợp metanol sinh học, etanol sinh học, propanol sinh học, butanol sinh học, diesel sinh học dầu hoả. Sáng chế đề xuất các sinh vật biểu hiện enzym để tham gia vào các chu trình hoá học liên quan đến quá trình chuyển hoá sinh khối tự nhiên. Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện và bổ sung enzym hiệu quả nhất để thực hiện các quá trình “chuyển hoá sinh khối” quan trọng và các quá trình thay thế trong công nghiệp năng lượng.

Sáng chế đề xuất phương pháp, enzym và hỗn hợp enzym hoặc “cocktail” theo sáng chế, để xử lý nguyên liệu, chẳng hạn sinh khối, chẳng hạn, chế phẩm chứa xenooligsaccarit, arabinoxylan oligome, lignin, lignoxenluloza, xylan, glucan, xenluloza và/hoặc đường có thể lên men; chẳng hạn, bao gồm các phương pháp cho chế phẩm phản ứng với polypeptit theo sáng chế, hoặc polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo sáng chế, trong đó tùy ý nguyên liệu này thu được từ cây nông nghiệp (chẳng hạn, lúa mì, lúa mạch, khoai tây, cỏ switchgrass, gỗ bạch dương), là một sản phẩm phụ của quá trình sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn gia súc, là một sản phẩm phế thải lignoxenluloza, hoặc là phần dư thực vật hoặc giấy vụn hoặc sản phẩm giấy phế thải, và tùy ý, phần dư thực vật là thân, lá, vỏ, vỏ trấu, ngô hoặc lõi ngô, thân ngô, sợi ngô, cỏ, rơm (chẳng hạn rơm lúa hoặc rơm lúa mì), bã mía, thịt củ cải đường, thịt cam quýt, và vỏ cam quýt, gỗ, vỏ bào gỗ, bào gỗ, gỗ, phế phẩm gỗ, bào gỗ và mùn gỗ, phế thải xây dựng và/hoặc phá huỷ và mảnh vụn (chẳng hạn gỗ, vỏ bào gỗ và mùn), và tùy ý, giấy phế thải là giấy photo loại bỏ hoặc đã sử dụng, giấy in máy tính, giấy vụn, giấy ghi chú, giấy viết, giấy báo, tạp chí, giấy bảng và bao bì làm từ giấy, và giấy tái sử dụng. Ngoài ra, rác thải đô thị, chẳng hạn giấy của chất thải rắn đô thị, rác thải gỗ, và rác thải xanh, cùng với các vật liệu khác chứa đường, tinh bột, và/hoặc xenluloza có thể được sử dụng. Theo các phương án khác, việc xử lý vật liệu, chẳng hạn sinh khối, sẽ tạo ra rượu sinh học, chẳng hạn, diesel sinh học, etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học.

Theo một cách khác, polypeptit theo sáng chế có thể được biểu hiện trong sinh khối nguyên liệu thực vật hoặc thức ăn gia súc.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc thu gom nguyên liệu lignoxenluloza đã được chuyển hoá (được xử lý bằng enzym theo sáng chế) và biến chúng thành nhiên liệu (chẳng hạn rượu sinh học, như, etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) bằng quá trình lên men và/hoặc bằng phương pháp tổng hợp hoá học. Theo một khía cạnh, đường được tạo ra sẽ được lên men và/hoặc các sản phẩm không lên men được sẽ được khí hoá.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc cải biến tảo, dầu thực vật chưa sử dụng, dầu thực vật phế thải, mỡ động vật và dầu máy (chẳng hạn mỡ, mỡ lợn, và dầu vàng), hoặc rác công, sử dụng enzym theo sáng chế, và biến chúng thành nhiên liệu (chẳng hạn rượu sinh học, như, etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) bằng quá trình lên men và/hoặc tổng hợp hoá học hoặc cải biến.

Enzym theo sáng chế (gồm có, chẳng hạn các sinh vật, như vi sinh vật, chẳng hạn, nấm, nấm men hoặc vi khuẩn, tạo và theo một số khía cạnh tiết enzym tái tổ hợp theo sáng chế) có thể được sử dụng trong hoặc được đưa vào một giai đoạn bất kỳ của quá trình chuyển hoá sinh khối, chẳng hạn, ở một bước bất kỳ, một số bước khác nhau hoặc được đưa vào tất cả các bước, hoặc tất cả các phương pháp chuyển hoá sinh khối sau, hoặc tất cả các nguồn thay thế nhiên liệu sinh học:

- đốt cháy trực tiếp: việc đốt nguyên liệu bằng lửa và là kỹ thuật chuyển hoá sinh khối đơn giản nhất; có thể rất kinh tế nếu có nguồn sinh khối gần kề.

- nhiệt phân: là quá trình phân huỷ bằng nhiệt sinh khối khi không có oxy. Theo một khía cạnh, sinh khối được gia nhiệt đến nhiệt độ từ khoảng 800 đến 1400 độ Fahrenheit, nhưng không có oxy được đưa vào để tạo ra quá trình cháy tạo khí, dầu nhiên liệu và than.

- Khí hoá: sinh khối có thể được sử dụng để tạo metan bằng quá trình gia nhiệt hoặc phân huỷ yếm khí. Khí hỗn hợp, hỗn hợp gồm có cacbon monoxit và hydro, có thể thu được từ sinh khối.

- Khí đất: được tạo ra bởi quá trình thối rữa (phân huỷ yếm khí) rác chôn trong đất. Khi các rác thải hữu cơ phân rã, nó sẽ tạo ra khí gồm khoảng 50% metan, thành phần chính của khí tự nhiên.

- phân huỷ yếm khí: cải biến các nguyên liệu hữu cơ thành hỗn hợp metan, thành phần chính của khí tự nhiên, và cacbon dioxit. Theo một khía cạnh, sinh khối như nước thải (nước cống), phân, hoặc rác thải trong quá trình chế biến thực phẩm, sẽ được trộn với nước và cho vào bình phân huỷ mà không có không khí.

- Lên men

- Lên men rượu: rượu nhiên liệu được sản xuất bằng cách cải biến sinh khối xenluloza và/hoặc tinh bột thành đường, lên men đường thành rượu, sau đó tách hỗn hợp rượu nước bằng cách chưng cất. Nguyên liệu thức ăn gia súc như cây trồng chuyên dụng (chẳng hạn, ngô, lúa mì, lúa mạch, khoai tây, switchgrass, *Miscanthus*, gỗ bạch dương), rác thải và phần thừa nông nghiệp (chẳng hạn vỏ trấu, thân ngô, vỏ trấu lúa mì, bã mía, vỏ gạo, sợi ngô, thịt củ cải đường, thịt cam quýt, và vỏ cam quýt), rác thải lâm nghiệp (chẳng hạn vỏ gỗ cứng và gỗ mềm, phần dư gỗ cứng và gỗ mềm từ quá trình chế biến gỗ, bào gỗ, và mùn cưa), rác thải đô thị (chẳng hạn giấy của chất thải rắn đô thị, rác thải gỗ, và rác thải xanh, rác thải gỗ (chẳng hạn mùn xay gỗ, phế thải trong quá trình xay gỗ, rác thải xây dựng, rác thải phá huỷ, bào cưa, và mùn cưa), và giấy phế thải hoặc các vật liệu khác chứa đường, tinh bột, và/hoặc xenluloza có thể được cải biến thành đường và sau đó thành rượu bằng cách lên men với nấm men. Theo một cách khác, các nguyên liệu chứa đường có thể được cải biến một cách trực tiếp thành rượu bằng cách lên men.

- Chuyển este hoá: một phản ứng thử nghiệm để chuyển hoá dầu thành diesel sinh học được gọi là chuyển este hoá. Quá trình chuyển este hoá sẽ cho rượu (như metanol) phản ứng với triglyxerit có trong dầu thực vật, mỡ động vật, hoặc dầu tái chế, tạo thành các este alkyl axit béo (diesel sinh học) và glyxerin. Phản ứng này cần nhiệt độ và chất xúc tác bazơ mạnh, như natri hydroxit hoặc kali hydroxit.

- Diesel sinh học: Diesel sinh học là hỗn hợp este alkyl axit béo được làm từ dầu thực vật, mỡ động vật hoặc dầu tái chế. Diesel sinh học có thể được sử dụng là nhiên liệu cho phương tiện đi lại ở dạng tinh khiết, nhưng nó thường được sử dụng như phụ

gia diesel dầu mỏ để làm giảm nồng độ của các tiểu phần, cacbon monoxit, hydrocacbon và khí độc từ các phương tiện chạy bằng diesel.

- Thủy phân: gồm có quá trình thủy phân hợp chất, chẳng hạn, sinh khối, như lignoxenluloza, được xúc tác bằng cách sử dụng enzym theo sáng chế.

- Đồng sinh: là quá trình sản xuất đồng thời nhiều hơn một dạng năng lượng sử dụng một loại nhiên liệu và điều kiện đơn nhất. Theo một khía cạnh, quá trình đồng sinh sinh khối có khả năng sinh trưởng lớn hơn quá trình tạo sinh khối riêng rẽ vì các sản phẩm đồng sinh sẽ tạo ra cả nhiệt và điện.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp các enzym khác, chẳng hạn, hydrolaza hoặc enzym có hoạt tính phân huỷ xenluloza, chẳng hạn, glucanaza, endoglucanaza, mannaza và/hoặc các enzym khác, để tạo ra nhiên liệu như rượu sinh học, chẳng hạn, etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học, từ một vật liệu hữu cơ bất kỳ, chẳng hạn, sinh khối, như các chế phẩm thu được từ thực vật và động vật, bao gồm một loại cây nông nghiệp bất kỳ hoặc nguyên liệu thức ăn gia súc có thể tái tạo khác, sản phẩm nông nghiệp dư thừa hoặc chất thải động vật, các thành phần hữu cơ của rác thải công nghiệp và rác thải sinh hoạt, hoặc rác thải xây dựng hoặc rác thải phá huỷ, hoặc các vi sinh vật như tảo hoặc nấm men.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế được sử dụng trong các quá trình chuyển hoá sinh khối lignoxenluloza thành nhiên liệu (chẳng hạn rượu sinh học, như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học), hoặc theo một cách khác được sử dụng trong các quá trình thủy phân hoặc tiêu huỷ nguyên liệu sinh học sao cho chúng có thể được sử dụng như một loại nhiên liệu (chẳng hạn rượu sinh học, như, etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học), hoặc để hỗ trợ trong các quá trình chuyển hoá sinh khối thành nhiên liệu.

Theo một khía cạnh khác, polypeptit theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, được sử dụng trong các quá trình để chuyển este hoá cho một loại rượu (như etanol, propanol, butanol, propanol, metanol) phản ứng với một triglyxerit có trong dầu thực vật, mỡ động vật hoặc dầu tái chế, tạo các este alkyl axit

béo (diezel sinh học) và glycerin. Theo một khía cạnh, diezel sinh học được tạo ra từ dầu đậu nành hoặc dầu ăn tái chế. Mỡ động vật, dầu thực vật, và dầu tái chế khác cũng có thể được sử dụng để tạo ra diezel sinh học, phụ thuộc vào giá thành và sự sẵn có của các nguyên liệu này. Theo một khía cạnh khác, hỗn hợp của tất cả các loại mỡ và dầu được sử dụng để tạo ra nhiên liệu diezel sinh học theo sáng chế.

Enzym theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, cũng có thể được sử dụng trong quá trình tinh luyện glycerin. Sản phẩm phụ glycerin gồm có chất xúc tác chưa được phản ứng và xà phòng được trung hòa bằng axit. Nước và rượu được loại bỏ để tạo ra từ 50% đến 80% glycerin thô. Tạp chất còn lại bao gồm mỡ và dầu chưa được phản ứng, có thể được xử lý bằng cách sử dụng polypeptit theo sáng chế. Trong các nhà máy diezel sinh học lớn theo sáng chế, glycerin còn có thể được tinh sạch thêm, chẳng hạn, đến độ tinh khiết 99% hoặc cao hơn nữa, để sử dụng trong công nghiệp mỹ phẩm và dược phẩm.

Nhiên liệu (gồm các loại rượu sinh học như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diezel sinh học) được tạo ra bằng cách sử dụng polypeptit theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, có thể được sử dụng cùng với chất oxy hoá nhiên liệu để cải thiện đặc tính cháy. Việc thêm oxy sẽ tạo ra sự cháy hoàn toàn, sẽ làm giảm nồng độ cacbon monoxit thoát ra. Đây là một lợi ích nữa đối với môi trường của việc thay thế các nhiên liệu có nguồn gốc dầu mỏ bằng các nhiên liệu sinh học (chẳng hạn, nhiên liệu theo sáng chế). Nhiên liệu sinh học được tạo ra bằng cách sử dụng chế phẩm và/hoặc phương pháp theo sáng chế có thể được trộn với dầu lửa để tạo thành hỗn hợp E10 (khoảng từ 5% đến 10% etanol và khoảng 90% đến 95% dầu lửa), nhưng nó cũng có thể được sử dụng ở các nồng độ cao hơn như E85 hoặc ở dạng tinh khiết. Nhiên liệu sinh học được tạo ra sử dụng chế phẩm và/hoặc phương pháp theo sáng chế có thể được trộn với diezel dầu mỏ để tạo thành hỗn hợp B20 (20% diezel sinh học và 80% diezel dầu mỏ), mặc dù các nồng độ hỗn hợp khác có thể được sử dụng cho đến B100 (diezel sinh học tinh khiết).

Sáng chế cũng đề xuất các quá trình sử dụng enzym theo sáng chế để tạo ra nhiên liệu sinh học (gồm có các loại rượu sinh học như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diezel sinh học) từ các thành phần chứa

sinh khối, chẳng hạn, nguồn thu được từ thực vật, như sinh khối lignoxenluloza. Sinh khối có thể thu được từ cây nông nghiệp, như sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn gia súc, hoặc như sản phẩm phế thải, gồm có lignoxenluloza phế thải, như phần thừa thực vật, giấy phế thải hoặc rác thải xây dựng. Ví dụ về các nguồn nguyên liệu thực vật hoặc phần dư của thực vật thích hợp để xử lý bằng polypeptit theo sáng chế gồm có tảo bẹ, tảo, hạt ngũ cốc, hạt, thân, lá, vỏ quả, vỏ trấu, lõi ngô, thân ngô, rom, mía, bã mía, cỏ (chẳng hạn, cỏ ấn độ, như *Sorghastrum nutans*; hoặc, cỏ switch, chẳng hạn, các loài *Panicum*, như *Panicum virgatum*), và các loại tương tự, cũng như gỗ, gỗ bào, gỗ thịt, và mùn cưa. Ví dụ về giấy phế thải paper thích hợp để xử lý bằng polypeptit theo sáng chế gồm có giấy photocopy, giấy in, giấy vờ, giấy viết, và các loại tương tự, cũng như giấy báo, tạp chí, và giấy gói. Ví dụ về rác thải xây dựng là gỗ, gỗ vụn, gỗ bào và mùn cưa.

Theo một phương án, enzym, gồm có hỗn hợp enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với các phương pháp “truyền thống” hơn để làm etanol, metanol, propanol, butanol, propanol và/hoặc diesel từ sinh khối, chẳng hạn, như các phương pháp thủy phân lignoxenluloza bằng cách xử lý lignoxenluloza khô trong bình phản ứng bằng một chất xúc tác gồm có dung dịch loãng của một axit mạnh và một muối kim loại; điều này có thể làm giảm năng lượng hoạt hoá, hoặc nhiệt độ, của quá trình thủy phân xenluloza để đạt được sản lượng đường cao hơn; tham khảo, chẳng hạn, US 6,660,506 và US 6,423,145.

Một phương pháp thử nghiệm khác kết hợp với việc sử dụng enzym theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp các enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, là quá trình thủy phân sinh khối, gồm có các vật liệu lignoxenluloza bất kỳ, chẳng hạn, chứa hemixenluloza, xenluloza và lignin, hoặc polysaccarit bất kỳ có thể thủy phân được, bằng cách xử lý nguyên liệu ở giai đoạn đầu của quá trình thủy phân trong môi trường lỏng ở nhiệt độ và áp suất được chọn để tác động chủ yếu vào quá trình khử polyme hoá hemixenluloza mà không tác động vào quá trình khử polyme hoá xenluloza thành glucoza. Bước này sẽ tạo ra một loại hồ nhão trong đó pha lỏng chứa nước gồm các monosaccarit hoà tan tạo ra từ quá trình khử polyme hoá hemixenluloza và pha rắn chứa xenluloza và lignin. Giai đoạn thứ hai trong quá trình thủy phân có thể bao gồm các điều kiện sao cho ít nhất một phần lớn xenluloza được khử polyme hoá, bước này tạo ra pha lỏng chứa các sản

phẩm khử polyme hóa được hoà tan/ tan của xenluloza. Tham khảo, chẳng hạn, US 5,536,325. Enzym theo sáng chế (gồm “hỗn hợp” enzym) có thể được bổ sung ở một giai đoạn bất kỳ trong quá trình thử nghiệm.

Một phương pháp thử nghiệm khác kết hợp với việc sử dụng enzym theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp các enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, bao gồm việc xử lý sinh khối chứa lignoxenluloza bằng nhiều giai đoạn thuỷ phân bằng axit loãng cùng với khoảng từ 0,4% đến 2% axit mạnh; và xử lý thành phần lignoxenluloza rắn không phản ứng trong sinh khối được thuỷ phân axit bằng cách khử lignin hoá bằng kiềm để tạo ra tiền chất đối với nhựa chịu nhiệt có thể phân huỷ sinh học được và dẫn xuất của nó. Tham khảo, chẳng hạn, US 6,409,841. Enzym theo sáng chế có thể được bổ sung ở một giai đoạn bất kỳ trong quá trình thử nghiệm.

Một phương pháp thử nghiệm khác kết hợp với việc sử dụng enzym theo sáng chế, gồm có một hỗn hợp các enzym hoặc “hỗn hợp” theo sáng chế, là quá trình thuỷ phân sơ bộ lignoxenluloza trong bình thuỷ phân sơ bộ; thêm dịch lỏng axit vào lignoxenluloza rắn để tạo ra một hỗn hợp; gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ phản ứng; duy trì nhiệt độ phản ứng trong thời gian đủ để phân đoạn lignoxenluloza thành phần hoà tan chứa ít nhất khoảng 20% lignin từ lignoxenluloza và một phân đoạn rắn chứa xenluloza; tách phần hoà tan ra khỏi phân đoạn rắn ở nhiệt độ phản ứng hoặc gần nhiệt độ phản ứng trong đó xenluloza trong phân đoạn rắn được cải biến để hỗ trợ cho quá trình thuỷ phân bằng enzym; và thu lại phần hoà tan. Tham khảo, chẳng hạn, US 5,705,369. Enzym theo sáng chế có thể được bổ sung ở một giai đoạn bất kỳ trong quá trình thử nghiệm.

Sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất chế phẩm nhiên liệu cho động cơ (chẳng hạn, cho động cơ đốt trong) dựa trên các hydrocacbon lỏng được trộn với nhiên liệu còn bằng cách sử dụng enzym hoặc phương pháp theo sáng chế. Theo một khía cạnh, nhiên liệu được tạo ra bằng cách sử dụng enzym theo sáng chế gồm có, chẳng hạn, hỗn hợp khí than dạng lỏng- hoặc khí tự nhiên dạng lỏng-etanol. Theo một khía cạnh, đồng dung môi là sinh khối thu được từ 2-metyltetrahydrofuran (MTHF). Tham khảo, chẳng hạn, US 6,712,866.

Theo một khía cạnh, phương pháp theo sáng chế để phân huỷ bằng enzym lignoxenluloza, chẳng hạn, để sản xuất nhiên liệu sinh học (gồm có rượu sinh học như

etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) từ nguyên liệu lignoxenluloza, cũng có thể bao gồm việc sử dụng phương pháp xử lý bằng siêu âm sinh khối; than khảo, chẳng hạn, US 6,333,181.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp theo sáng chế để sản xuất nhiên liệu sinh học (gồm có các loại rượu sinh học như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) từ cơ chất xenluloza gồm việc tạo ra một hỗn hợp phản ứng ở dạng hồ nhão chứa cơ chất xenluloza, enzym theo sáng chế và chất lên men (chẳng hạn, trong cùng một bình phản ứng, như bình phản ứng sinh học được sử dụng chất rắn bán liên tục), và hỗn hợp phản ứng được phản ứng trong điều kiện đủ để khởi động và duy trì phản ứng lên men (như được mô tả, chẳng hạn, trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền Mỹ số 20060014260). Theo một khía cạnh, các tính toán thực nghiệm hoặc lý thuyết có thể xác định tần suất bổ sung cơ chất tối ưu. Theo một khía cạnh, các lượng cơ chất xenluloza và enzym bổ sung được đưa vào trong bình phản ứng ở (các) giai đoạn theo tần suất bổ sung cơ chất tối ưu.

Một quá trình thử nghiệm để sản xuất nhiên liệu sinh học (gồm có các loại rượu sinh học như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) theo sáng chế được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền Mỹ số 20050069998; 20020164730; và theo một khía cạnh gồm các giai đoạn nghiền sinh khối lignoxenluloza (chẳng hạn, đến kích thước từ 15 đến 30mm), xử lý sơ bộ sản phẩm thu được bằng hơi (chẳng hạn, ở nhiệt độ từ 190 đến 230°C) trong từ 1 đến 10 phút trong bình phản ứng; thu các nguyên liệu đã được xử lý sơ bộ ở dạng xyclon hoặc các sản phẩm liên quan trong quá trình sản xuất; và tách các phân đoạn lỏng và rắn bằng cách lọc trong máy lọc nén, đưa vào phân đoạn rắn vào trong một bình lên men và thêm một hoặc nhiều enzym theo sáng chế, chẳng hạn, enzym xenlulaza và/hoặc beta-glucosidaza (chẳng hạn, được hoà tan trong đệm xitrat pH 4,8).

Một quá trình thử nghiệm khác để sản xuất nhiên liệu sinh học (gồm có các loại rượu sinh học như etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học, hoặc diesel sinh học) theo sáng chế gồm có etanol sinh học, metanol sinh học, butanol sinh học hoặc propanol sinh học sử dụng enzym theo sáng chế bao gồm việc xử lý sơ bộ nguyên liệu chứa lignoxenluloza trong thức ăn gia súc chứa ít nhất

hemixenluloza và xenluloza. Theo một khía cạnh, nguyên liệu gồm có khoai tây, đậu tương (cải dầu), lúa mạch, lúa mạch đen, ngô, yến mạch, lúa mì, củ cải hoặc mía hoặc một thành phần hoặc phế thải hoặc sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất thực phẩm hoặc thức ăn gia súc. Nguyên liệu (“thức ăn gia súc”) được tiến hành phản ứng ở các điều kiện làm phá vỡ cấu trúc sợi của thực vật để tạo ra quá trình thủy phân ít nhất một phần hemixenluloza và xenluloza. Các điều kiện phá huỷ có thể bao gồm, chẳng hạn, xử lý nguyên liệu ở nhiệt độ trung bình từ 180°C đến 270°C ở pH 0,5 đến 2,5 trong giai đoạn từ khoảng 5 giây đến 60 phút; hoặc, nhiệt độ từ 220°C đến 270°C, ở pH từ 0,5 đến 2,5 trong một khoảng thời gian từ 5 giây đến 120 giây, hoặc các điều kiện tương đương. Điều này sẽ tạo ra nguyên liệu thức ăn gia súc với khả năng phân hủy bằng enzym tăng lên, chẳng hạn, enzym xenlulaza theo sáng chế US 6,090,595.

Các điều kiện thử nghiệm để sử dụng enzym theo sáng chế trong quá trình thủy phân lignoxenluloza gồm các phản ứng ở nhiệt độ từ khoảng 30°C đến 48°C, và/hoặc pH từ khoảng 4,0 đến 6,0. Các điều kiện thử nghiệm khác bao gồm nhiệt độ từ khoảng 30°C đến 60°C và pH từ khoảng 4,0 đến 8,0.

Các enzym glucanaza, (hoặc xenlulaza), mannanaza, xylanaza, amylaza, xanthanaza và/hoặc glycosidaza, chẳng hạn, xenlobiohydrolaza, mannanaza và/hoặc beta-glucosidaza có thể được sử dụng trong quá trình chuyển hoá sinh khối thành nhiên liệu, và trong quá trình sản xuất etanol, chẳng hạn, như được mô tả trong đơn PCT số WO0043496 và WO8100857. Glucanaza (hoặc xenlulaza), mannanaza, xylanaza, amylaza, xanthanaza và/hoặc glycosidaza, chẳng hạn, xenlobiohydrolaza, mannanaza và/hoặc beta-glucosidaza, có thể được sử dụng kết hợp với phytaza (chẳng hạn, enzym theo sáng chế) để tạo ra các loại đường có khả năng lên men và sinh khối chứa glucan có thể được cải biến thành nhiên liệu etanol. Amylaza, glucoamylaza, pullanaza, glucoisomeraza, alpha-glucosidaza, và các enzym tương tự có thể được sử dụng cùng với phytaza (chẳng hạn, enzym theo sáng chế) để cải biến tinh bột thành các loại đường có khả năng lên men hoặc etanol. Hãy tham khảo đơn PCT số WO2005/096804.

Xử lý bã rượu khô

Theo một khía cạnh khác, enzym theo sáng chế có thể được sử dụng để xử lý/ chế biến “chất tan khô trong quá trình cất rượu (DDS)”, “bã rượu khô (DDS)”, “chất tan

ngưng tụ trong quá trình cất rượu (CDS)”, “bã rượu ướt (DWG)”, và “bã rượu khô với các chất tan (DDGS)”; bã rượu khô có thể là sản phẩm phụ ngũ cốc trong quá trình chưng cất rượu, và có thể chứa chất tan. Các quá trình này có thể chứa các sản phẩm phụ do thực vật được xay khô, chẳng hạn trong quá trình sử dụng thức ăn gia súc, chẳng hạn, cho gia cầm, bò, lợn và các loại gia súc khác. Do đó, enzym theo sáng chế có thể được sử dụng để xử lý/chế biến bã, chẳng hạn, ngũ cốc, là sản phẩm phụ trong quá trình chưng cất bất kỳ, gồm các quá trình sử dụng nguồn hạt bất kỳ, chẳng hạn, các nguồn truyền thống từ quá trình ủ bia, hoặc theo một cách khác, từ các nhà máy sản xuất etanol (xưởng, nhà máy). Enzym theo sáng chế có thể được sử dụng để xử lý/chế biến bã rượu từ nôi cất, nước ủ rượu có thể được sử dụng tiếp theo cho nhiều mục đích khác nhau, chẳng hạn, như thức ăn cho vật nuôi, đặc biệt là động vật nhai lại; do đó sáng chế đề xuất phương pháp xử lý cỏ khô cho gia súc như động vật nhai lại, và cỏ khô được xử lý enzym chứa phytaza theo sáng chế.

Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc cùng với các enzym khác để xử lý “các chất tan được làm khô trong quá trình cất rượu (DDS)”, “bã rượu khô (DDS)”, “chất tan trong quá trình cất rượu ngưng tụ (CDS)”, “bã rượu ướt (DWG)”, và “bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS)”. Chẳng hạn, phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong một bước bất kỳ trong quá trình sản xuất rượu như được mô tả trên Fig. 14. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng để gia tăng độ sinh khả dụng của phospho trong một loại nhiên liệu sinh học bất kỳ, hoặc nhiên liệu sinh học tiềm năng, gồm có phospho có trong “chất tan khô trong quá trình cất rượu (DDS)”, “bã rượu khô (DDS)”, chất tan trong quá trình cất rượu ngưng tụ (CDS)”, “bã rượu ướt (DWG)”, và “bã rượu khô cùng với các chất tan (DDGS)” (tham khảo, chẳng hạn, C. Martinez Amezcua, 2004 Poultry Science 83:971-976).

Sản xuất đồ uống có cồn, rượu mạnh

Phytaza theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong quá trình xử lý bã rượu khô trong quá trình sản xuất rượu – rượu như trong “rượu mạnh”, chẳng hạn, sản xuất bia hoặc whiskey (ngoài sử dụng trong quá trình xử lý sinh khối để sản xuất nhiên liệu sinh học). Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng trong các nhà máy etanol, chẳng hạn để xử lý hạt như ngô. Bã rượu khô có thể được tạo ra bằng cách xay hạt (chẳng hạn,

ngô) đến kích thước to và cho vào nước nóng. Sau khi làm lạnh, nấm men được thêm vào và hỗn hợp lên men trong một vài ngày đến 1 tuần. Chất rắn còn lại sau lên men là bã rượu. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng ở một bước bất kỳ trong quá trình này.

Chế phẩm

Sáng chế đề xuất các chế phẩm mới chứa phytaza, chẳng hạn, như các chế phẩm được sử dụng ở đây, và các chế phẩm phytaza, bao gồm các chế phẩm chứa phytaza mới theo sáng chế. Phytaza theo sáng chế có thể được sử dụng hoặc được bào chế riêng rẽ hoặc như một hỗn hợp của phytaza hoặc phytaza và các enzym khác như xylanaza, xenlulaza, proteaza, lipaza, amylaza, hoặc enzym như oxi hoá khử khác laccaza, peroxidaza, catalaza, oxidaza, hoặc reductaza. Chúng có thể được bào chế ở dạng rắn như bột, đông khô, hạt, viên nén, thanh, tinh thể, viên nang, viên tròn, hạt cốm, hoặc ở dạng lỏng như dung dịch, sol khí, gel, paste, hồ nhão, nhũ tương nước/dầu, kem, viên nang, hoặc trong một nang hỗn dịch vesicular hoặc hỗn dịch mixen. Các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hỗn hợp bất kỳ các thành phần sau: các rượu đa chức như polyetylen glycol, polyvinylancol, glyxerol, đường như sucroza, sorbitol, trehaloza, glucoza, fructoza, maltoza, mannoza, chất tạo gel như gôm guar, carageenan, alginat, dextran, dẫn xuất xenluloza, pectin, muối như natri clorua, natri sulfat, amoni sulfat, canxi clorua, magie clorua, kẽm clorua, kẽm sulfat, muối của một axit béo và một dẫn xuất axit béo, chất càng hóa kim loại như EDTA, EGTA, natri xitrat, chất chống vi sinh vật như axit béo hoặc dẫn xuất axit béo, paraben, sorbat, benzoat, chất điều biến hỗ trợ để ngăn ảnh hưởng của enzym như proteaza, protein tạo khối như BSA, dịch thủy phân lúa mì, hợp chất borat, axit amin hoặc peptit, chất điều biến pH hoặc nhiệt độ thích hợp, chất nhũ hoá như chất tẩy rửa không ion và/hoặc ion, chất oxi hoá khử như xystin/xystein, glutathion, glutathion được oxi hoá, chất khử hoặc chống oxi hoá như axit ascorbic, sáp hoặc dầu, hoặc chất phân tán. Các cải biến như liên kết chéo và cải biến protein như pegyl hoá, cải biến axit béo, glycosyl hoá cũng có thể được sử dụng để tăng tính ổn định của enzym.

Đo tham số chuyển hoá

Các phương pháp theo sáng chế liên quan đến quá trình gây tiến hóa toàn bộ tế bào, hoặc xử lý kỹ thuật di truyền toàn bộ tế bào, để tạo ra một dòng tế bào mới có kiểu hình mới bằng cách cải biến thành phần di truyền của tế bào, khi thành phần di truyền được cải biến bằng cách bổ sung vào tế bào axit nucleic theo sáng chế. Để phát hiện kiểu hình mới, ít nhất một tham số chuyển hóa của tế bào được cải biến được theo dõi trong tế bào trong một khung thời gian “thời gian thực” hoặc “trực tuyến”. Theo một khía cạnh, rất nhiều tế bào, như giống nuôi cấy tế bào, được theo dõi trong “thời gian thực” hoặc “trực tuyến”. Theo một khía cạnh, nhiều tham số chuyển hóa được theo dõi trong “thời gian thực” hoặc “trực tuyến”.

Phân tích dòng chuyển hóa (Metabolic flux analysis - MFA) dựa trên một khung hóa sinh đã biết. Một ma trận chuyển hóa độc lập tuyến tính được xây dựng dựa trên luật chuyển hóa khối và dựa trên giả thiết trạng thái ổn định giả (pseudo-steady state hypothesis - PSSH) trên các sản phẩm chuyển hóa nội bào. Trong quá trình thực hiện các phương pháp theo sáng chế, các mạng chuyển hóa được thiết lập, gồm có:

- mức độ tương đồng của tất cả các cơ chất, sản phẩm và sản phẩm chuyển hóa trung gian trong đường chuyển hóa
- mức độ tương đồng của tất cả các phản ứng hóa học chuyển đổi qua lại các sản phẩm chuyển hóa trong đường chuyển hóa, tính hợp thức của các phản ứng trong đường phản ứng,
- mức độ tương đồng của tất cả các enzym xúc tác các phản ứng, động học phản ứng enzym,
- các tương tác điều hoà giữa các thành phần trong đường chuyển hóa, chẳng hạn các tương tác theo cơ chế dị lập thể (allosteric interaction), các tương tác enzym-enzym v.v.,
- quá trình phân ngăn nội bào các enzym hoặc quá trình sắp xếp siêu phân tử của các enzym, và,
- sự có mặt của các gradien nồng độ bất kỳ của các sản phẩm chuyển hóa, enzym hoặc các phân tử tác động hoặc hàng rào khuếch tán đối với sự chuyển động của chúng.

Khi mạng chuyển hoá đối với một dòng tế bào nhất định đã được xây dựng, các phép tính toán bằng khái niệm ma trận có thể được đưa vào để ước lượng các dòng chuyển hoá nội bào nếu số liệu chuyển hoá trực tuyến có sẵn.

Kiểu hình chuyển hoá phụ thuộc vào các thay đổi trong toàn bộ mạng chuyển hoá trong một tế bào. Kiểu hình chuyển hoá phụ thuộc vào sự thay đổi của quá trình sử dụng con đường chuyển hoá về các điều kiện môi trường, quá trình điều hoà di truyền, giai đoạn phát triển và kiểu gen, v.v. Theo một khía cạnh các phương pháp theo sáng chế, sau khi tính toán MFA trực tuyến, tập tính động lực của tế bào, kiểu hình và các đặc tính khác được phân tích bằng cách khảo sát quá trình sử dụng con đường. Chẳng hạn, nếu sự cung cấp glucoza được tăng lên và oxy giảm đi trong quá trình lên men bằng nấm men, thì sự sử dụng các đường hô hấp sẽ giảm đi và/hoặc dừng lại, và việc sử dụng các con đường lên men sẽ chiếm ưu thế. Có thể kiểm soát trạng thái sinh lý của môi trường nuôi cấy tế bào sau khi phân tích con đường chuyển hoá. Các phương pháp theo sáng chế có thể giúp xác định làm thế nào để tác động vào quá trình lên men bằng cách xác định làm cách nào để thay đổi sự cung cấp cơ chất, nhiệt độ, và việc sử dụng các chất kích thích, v.v. để kiểm soát trạng thái sinh lý của các tế bào để đi theo các hướng mong muốn. Trong khi thực hiện các phương pháp theo sáng chế, các kết quả của MFA cũng có thể được so sánh với số liệu tất cả các phân tử ARN được mã hoá bởi hệ gen (transcriptome) và protein được mã hoá bởi các ARN này (proteome) để thiết kế các thử nghiệm và quá trình để xử lý chuyển hoá hoặc xáo trộn gen, v.v.

Trong khi thực hiện các phương pháp theo sáng chế, một kiểu hình mới hoặc được cải biến bất kỳ có thể được tạo ra và phát hiện, gồm có các đặc tính mới hoặc được cải thiện trong tế bào. Có thể theo dõi một khía cạnh bất kỳ trong quá trình chuyển hoá và sinh trưởng.

Theo dõi quá trình biểu hiện mARN

Theo một khía cạnh theo sáng chế, kiểu hình được xử lý kỹ thuật di truyền có thể bao gồm quá trình biểu hiện tăng hoặc giảm của một mARN hoặc tạo ra các bản sao mới trong tế bào. Bản sao mARN, hoặc các thông tin có thể được phát hiện và định lượng bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm có, chẳng hạn, Northern blot, các phản ứng khuếch đại định lượng, phản ứng lai với các mạng, và các

phương pháp tương tự. Các phản ứng khuếch đại định lượng bao gồm, chẳng hạn, PCR định lượng, gồm có, chẳng hạn, phản ứng mạch polymeraza phiên mã ngược định lượng, hoặc RT-PCR; RT-PCR thời gian thực định lượng, hoặc “RT-PCR động lực học thời gian thực” (tham khảo, chẳng hạn, Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, kiểu hình được xử lý kỹ thuật di truyền được tạo ra bằng cách ngăn quá trình biểu hiện của một gen tương đồng. Trình tự mã hoá của gen hoặc một hoặc nhiều các yếu tố kiểm soát phiên mã có thể bị ngăn chặn, chẳng hạn, các trình tự khởi đầu hoặc yếu tố tăng cường biểu hiện. Do đó, quá trình biểu hiện một bản sao phiên mã có thể bị loại bỏ hoàn toàn hoặc chỉ bị giảm xuống.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, kiểu hình được xử lý kỹ thuật di truyền bao gồm việc gia tăng quá trình biểu hiện của một gen tương đồng. Điều này có thể được tác động bằng cách loại bỏ yếu tố kiểm soát âm tính, gồm có yếu tố điều hoà phiên mã tác động theo kiểu *cis*- hoặc *trans*-, hoặc, gây đột biến một yếu tố kiểm soát dương tính.

Như được thảo luận chi tiết dưới đây, một hoặc nhiều, hoặc, tất cả các bản sao của một tế bào có thể được xác định bằng phản ứng lai một mẫu chứa tất cả các bản sao của tế bào, hoặc, axit nucleic đại diện hoặc bổ sung với các bản sao của tế bào, bằng phản ứng lai với axit nucleic được cố định trên một mạng.

Kiểm soát quá trình biểu hiện polypeptit, peptit và axit amin

Theo một khía cạnh theo sáng chế, kiểu hình được xử lý kỹ thuật di truyền bao gồm việc gia tăng hoặc giảm quá trình biểu hiện polypeptit hoặc tạo ra các polypeptit mới trong tế bào. Polypeptit, peptit và axit amin có thể được phát hiện và định lượng bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm có, chẳng hạn, cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), đo quang phổ, tạo ảnh phóng xạ (đánh dấu phóng xạ protein), điện di, điện di mao dẫn, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký tăng khuếch tán, các phương pháp miễn dịch khác nhau, chẳng hạn kết tủa miễn dịch, khuếch tán miễn dịch, điện di miễn dịch, các thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, điện di gel (chẳng hạn, SDS-PAGE), nhuộm bằng kháng thể, phân loại tế bào được hoạt hoá bằng huỳnh quang (FACS), quang phổ khối nhiệt phân, quang phổ

hồng ngoại chuyển dạng Fourier, quang phổ Raman, GC-MS, và quang phổ khối phun điện LC và quang phổ khối phun điện mũ LC, và các phương pháp tương tự. Các hoạt tính sinh học mới cũng có thể được sàng lọc sử dụng các phương pháp, hoặc biến thể của nó, được mô tả trong US 6,057,103. Hơn nữa, như được mô tả chi tiết dưới đây, một hoặc nhiều, hoặc, tất cả các polypeptit trong một tế bào có thể được đo bằng cách sử dụng vi mạch protein.

Việc đánh dấu ^{13}C phân đoạn được định hướng tổng hợp sinh học các axit amin tạo ra từ protein có thể được theo dõi bằng cách bổ sung một hỗn hợp các hợp chất là nguồn cacbon được đánh dấu ^{13}C và không được đánh dấu vào một mạng phản ứng sinh học. Phân tích các kiểu đánh dấu hình thành có thể cho phép xác định đặc điểm toàn diện của định khu mạng và đánh giá tốc độ dòng chuyển hoá của các axit amin; tham khảo chẳng hạn, Szyperski (1999) *Metab. Eng.* 1:189-197.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chỉ để minh hoạ, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Trong khi các phương pháp được mô tả trong ví dụ là thông thường đối với các phương pháp có thể được sử dụng để tiến hành một số phương án theo sáng chế, các phương pháp khác cũng đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ 1: Xác định hoạt tính của phytaza theo sáng chế

Ví dụ này mô tả quá trình xác định hoạt tính phytaza của polypeptit theo sáng chế, các polynucleotit này là các biến thể trình tự (được gọi là phytaza “được gây tiến hoá”) của trình tự phytaza gốc SEQ ID NO:2, và một thử nghiệm hoạt tính phytaza. Thử nghiệm hoạt tính phytaza này có thể được sử dụng để xác định liệu một polypeptit có đủ hoạt tính để được đưa vào trong phạm vi của sáng chế được bảo hộ hay không.

Sau khi tạo ra polypeptit theo sáng chế bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic được cải biến GSSM theo sáng chế, polypeptit phytaza “được tiến hoá” – chỉ có các đột biến điểm đơn trong nghiên cứu này – được tinh sạch và sau đó xử lý nhiệt (pH 7,0, Tween 0,01%) ở các nhiệt độ khác nhau trong 30 phút. Sau bước xử lý nhiệt, các mẫu (20 uL) được thử nghiệm với cơ chất phát huỳnh quang (180uL) 4mM DiFMUP ở pH

5,5. Tốc độ phản ứng được so sánh với tốc độ của các mẫu không được xử lý tương ứng. Kết quả được nêu trong Fig. 5.

Trong một nghiên cứu khác, phytaza “được gây tiến hoá” theo sáng chế chứa các đột biến đơn “hỗn hợp”, nghĩa là phytaza chứa nhiều đột biến, được nuôi cấy qua đêm trong LBCARB100™ (LBcarb100) ở 30°C. 100uL mỗi môi trường nuôi cấy (thể đột biến hỗn hợp) được xử lý nhiệt trên máy gia nhiệt từ 72°C đến 100°C. 20uL môi trường nuôi cấy được xử lý nhiệt được trộn lẫn với 180uL 4mM DiFMUP ở pH 5,5. Tốc độ phản ứng được so sánh với tốc độ phản ứng của từng mẫu không được xử lý nhiệt; như được tóm tắt trong Fig. 6. Bảng được nêu trong Fig. 7 mô tả bằng biểu đồ số liệu (được làm tròn đến số thập phân gần nhất) được sử dụng để vẽ biểu đồ trong Fig. 6.

Mẫu từ số 1 đến số 21 tương ứng với các đột biến đơn “hỗn hợp” của trình tự gốc SEQ ID NO:2, như được mô tả trong bảng của Fig. 9; cho thấy phytaza “được gây tiến hoá” số 10 có một cải biến trình tự (so với SEQ ID NO:2) không được gây ra bởi GSSM; đột biến này được đưa vào một cách ngẫu nhiên và có thể hoặc không có liên quan gì đến độ bền nhiệt của phytaza thử nghiệm theo sáng chế. Tương tự, kí hiệu ** chỉ các phytaza thử nghiệm 19, 20 và 21 có đuôi histidin (6xHis) ở đầu C (-RSHHHHHH). Fig. 9 mô tả phytaza thử nghiệm có nhiều cải biến nhiều gốc trong trình tự so với trình tự gốc SEQ ID NO:2; như được mô tả chi tiết ở đây. Fig. 10 mô tả phytaza thử nghiệm có các cải biến đơn gốc trong trình tự so với thủ thuật gốc SEQ ID NO:2; như được mô tả chi tiết ở đây.

Fig. 11 mô tả bằng sơ đồ một thử nghiệm phytaza theo sáng chế sử dụng cơ chất phát huỳnh quang 4-metylbelloferyl phosphat (MeUMB-phosphat, cấu trúc của chất này cũng được nêu ở đây): (i) phytaza được xử lý nhiệt trong 20 phút, 72°C, pH 4,5; và, ở 80°C ở pH sinh lý (pH 7,4); và (ii) hoạt tính dư được thử nghiệm ở 37°C, pH 4,5:

- Đo hoạt tính dư ở cả pH cao và thấp,
- Tính toán hoạt tính dư so với phytaza kiểu đại sau khi xử lý nhiệt.

Fig. 12 mô tả bằng sơ đồ một thử nghiệm phytaza khác theo sáng chế cũng sử dụng cơ chất phát huỳnh quang MeUMB-phosphat: (i) phytaza được xử lý nhiệt trong 30 phút, 86°C, pH 5,5; và (ii) hoạt tính dư được thử nghiệm ở 37°C, pH 4,5:

- Đo hoạt tính dư so với đối chứng biến thể 6X,
- Chọn đỉnh và tái thử nghiệm ở độ nghiêm ngặt cao hơn để chọn các biến thể cao nhất.

Thử nghiệm này được sử dụng để sàng lọc thư viện các biến thể GSSM (của trình tự SEQ ID NO:1), bằng các thử nghiệm hoạt tính phytaza của polypeptit chúng mã hoá. Fig. 13 mô tả bằng sơ đồ quá trình sàng lọc thư viện này (như được mô tả trong Fig. 12), trong đó kích cỡ thư viện được sàng lọc là 24576 biến thể.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Axit nucleic được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp, trong đó axit nucleic này bao gồm:

(a) (i) trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza và có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO:1, và ít nhất một trong số các cải biến trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm:

các nucleotit ở các vị trí 139 đến 141 là TTT hoặc TTC;
 các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí 406 đến 408 là CAT hoặc CAC;
 các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 676 đến 678 là GAT hoặc GAC;
 các nucleotit ở các vị trí 697 đến 699 là TGG;
 các nucleotit ở các vị trí 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG;
 các nucleotit ở các vị trí 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và
 các nucleotit ở các vị trí 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT;

(ii) trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza và có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO:1 và chứa ít nhất một trong số các cải biến trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm:

các nucleotit ở các vị trí tương đương 139 đến 141 là TTT hoặc TTC;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 406 đến 408 là CAT hoặc CAC;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;

các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 676 đến 678 là GAT hoặc GAC;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 697 đến 699 là TGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT;

(iii) polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza và có trình tự chứa ít nhất một trong số các cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm:

axit amin alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được thay bằng phenylalanin;
 axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;
 axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;
 axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được thay bằng histidin;
 axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;
 axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;
 axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit aspartic;

axit amin valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tryptophan;

axit amin glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được thay bằng alanin;

axit amin threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tyrosin;

và

axit amin loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được thay bằng prolin;

(iv) polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza và có trình tự chứa ít nhất một trong số các cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm:

axit amin ở vị trí tương đương alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được thay bằng phenylalanin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được thay bằng histidin;

axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2

được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit aspartic;

axit amin ở vị trí tương đương valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tryptophan;

axit amin ở vị trí tương đương glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được thay bằng alanin;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tyrosin; và

axit amin ở vị trí tương đương loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được thay bằng prolin;

(b) trình tự axit nucleic (polynucleotit) theo (a) mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza nhưng thiếu: trình tự tín hiệu hoặc trình tự proprotein, hoặc một trình tự khởi đầu cùng loài;

(c) axit nucleic (polynucleotit) theo (a) hoặc (b) mã hoá polypeptit có hoạt tính phytaza và còn chứa trình tự axit amin khác loài, hoặc axit nucleic (polynucleotit) theo (a) hoặc (b) chứa trình tự nucleotit khác loài;

(d) axit nucleic (polynucleotit) theo (c), trong đó trình tự axit amin khác loài chứa, hoặc gồm có trình tự mã hoá trình tự tín hiệu (dẫn đầu) khác loài, hoặc một trình tự đuôi hoặc yếu tố quyết định kháng nguyên, hoặc trình tự nucleotit khác loài chứa trình tự khởi đầu khác loài; hoặc

(e) trình tự axit nucleic bổ sung hoàn toàn với trình tự axit nucleic (polynucleotit) theo mục bất kỳ từ (a) đến (d).

2. Catxet biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 1 hoặc được làm cho chứa axit nucleic

theo điểm 1.

3. Catxet biểu hiện theo điểm 2, trong đó phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vector virut, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, thực khuẩn thể hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, trong đó vector virut chứa vector adenovirut, vector retrovirut hoặc vector virut gắn adeno, trong đó catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng chứa hoặc được chứa trong một nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), plasmit, vector thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC).

4. Vector chứa axit nucleic theo điểm 1 hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo điểm 1.

5. Vector theo điểm 4, trong đó phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vector virut, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, thực khuẩn thể hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, trong đó vector virut chứa vector adenovirut, vector retrovirut hoặc vector virut gắn adeno, trong đó catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng chứa hoặc được chứa trong một nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), plasmit, vector thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC).

6. Phương tiện nhân dòng chứa axit nucleic theo điểm 1, hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo điểm 1.

7. Phương tiện nhân dòng theo điểm 6, trong đó phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vector virut, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, thực khuẩn thể hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, trong đó vector virut chứa vector adenovirut, vector retrovirut hoặc vector virut gắn adeno, trong đó catxet biểu hiện, vector, phương tiện nhân dòng, vector biểu hiện, vector nhân dòng chứa hoặc được chứa trong một nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), plasmit, vector thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC).

8. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 1 hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo điểm 1.

9. Vector biểu hiện theo điểm 8, trong đó phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vector

virut, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, thực khuẩn thể hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, trong đó vectơ virut chứa vectơ adenovirut, vectơ retrovirut hoặc vectơ virut gắn adeno, trong đó catxet biểu hiện, vectơ, phương tiện nhân dòng, vectơ biểu hiện, vectơ nhân dòng chứa hoặc được làm cho chứa trong một nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), plasmit, vectơ thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC).

10. Vectơ nhân dòng chứa axit nucleic theo điểm 1 hoặc được làm cho chứa axit nucleic theo điểm 1.

11. Vectơ nhân dòng theo điểm 10, trong đó phương tiện nhân dòng chứa hoặc là vectơ virut, plasmit, thể thực khuẩn, phagemit, cosmit, fosmit, thực khuẩn thể hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo, trong đó vectơ virut chứa vectơ adenovirut, vectơ retrovirut hoặc vectơ virut gắn adeno, trong đó catxet biểu hiện, vectơ, phương tiện nhân dòng, vectơ biểu hiện, vectơ nhân dòng chứa hoặc được làm cho chứa trong một nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), plasmit, vectơ thu được từ thể thực khuẩn P1 (PAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC).

12. Tế bào biến nạp chứa axit nucleic theo điểm 1.

13. Tế bào biến nạp theo điểm 12, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.

14. Tế bào biến nạp theo điểm 13, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.

15. Tế bào biến nạp chứa catxet biểu hiện theo điểm 2 hoặc 3.

16. Tế bào biến nạp theo điểm 15, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.

17. Tế bào biến nạp theo điểm 16, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.

18. Tế bào biến nạp chứa vectơ theo điểm 4 hoặc 5.
19. Tế bào biến nạp theo điểm 18, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
20. Tế bào biến nạp theo điểm 19, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
21. Tế bào biến nạp chứa phương tiện nhân dòng theo điểm 6 hoặc 7.
22. Tế bào biến nạp theo điểm 21, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
23. Tế bào biến nạp theo điểm 22, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
24. Tế bào biến nạp chứa vectơ biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.
25. Tế bào biến nạp theo điểm 24, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
26. Tế bào biến nạp theo điểm 25, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
27. Tế bào biến nạp chứa vectơ nhân dòng theo điểm 10 hoặc 11.
28. Tế bào biến nạp theo điểm 27, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
29. Tế bào biến nạp theo điểm 28, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.

30. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 1.
31. Tế bào chủ theo điểm 30, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
32. Tế bào chủ theo điểm 31, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
33. Tế bào chủ chứa catxet biểu hiện theo điểm 2 hoặc 3.
34. Tế bào chủ theo điểm 33, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
35. Tế bào chủ theo điểm 34, trong đó tế bào vi khuẩn là một tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
36. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 4 hoặc 5.
37. Tế bào chủ theo điểm 36, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
38. Tế bào chủ theo điểm 37, trong đó tế bào vi khuẩn là tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
39. Tế bào chủ chứa phương tiện nhân dòng theo điểm 6 hoặc 7.
40. Tế bào chủ theo điểm 39, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
41. Tế bào chủ theo điểm 40, trong đó tế bào vi khuẩn là tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.

42. Tế bào chủ chứa vectơ biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.
43. Tế bào chủ theo điểm 42, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
44. Tế bào chủ theo điểm 43, trong đó tế bào vi khuẩn là tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
45. Tế bào chủ chứa vectơ nhân dòng theo điểm 10 hoặc 11.
46. Tế bào chủ theo điểm 45, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
47. Tế bào chủ theo điểm 46, trong đó tế bào vi khuẩn là tế bào của loài bất kỳ thuộc các loài *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* hoặc *Staphylococcus*, hoặc *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* hoặc *Pseudomonas fluorescens*.
48. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa axit nucleic theo điểm 1.
49. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 48, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.
50. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa catxet biểu hiện theo điểm 2 hoặc 3.
51. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 50, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.
52. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa vectơ theo điểm 4 hoặc 5.
53. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 52, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.
54. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa phương tiện nhân dòng theo điểm 6 hoặc 7.

55. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 54, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.

56. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa vector biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.

57. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 56, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.

58. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó động vật này chứa vector nhân dòng theo điểm 10 hoặc 11.

59. Động vật chuyển gen không phải người theo điểm 58, trong đó động vật này là chuột, chuột cống, dê, thỏ, cừu, lợn hoặc bò.

60. Cây chuyển gen chứa axit nucleic theo điểm 1.

61. Cây chuyển gen theo điểm 60, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

62. Cây chuyển gen chứa catxet biểu hiện theo điểm 2 hoặc 3.

63. Cây chuyển gen theo điểm 62, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ

linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

64. Cây chuyển gen chứa vectơ theo điểm 4 hoặc 5.

65. Cây chuyển gen theo điểm 64, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

66. Cây chuyển gen chứa phương tiện nhân dòng theo điểm 6 hoặc 7.

67. Cây chuyển gen theo điểm 66, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

68. Cây chuyển gen chứa vectơ biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.

69. Cây chuyển gen theo điểm 68, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

70. Cây chuyển gen chứa vectơ nhân dòng theo điểm 10 hoặc 11.

71. Cây chuyển gen theo điểm 70, trong đó cây này là ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó cây này là ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tòng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

72. Hạt chuyển gen chứa axit nucleic theo điểm 1.

73. Hạt chuyển gen theo điểm 72, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt

đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tồng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

74. Hạt chuyển gen chứa catxet biểu hiện theo điểm 2 hoặc 3.

75. Hạt chuyển gen theo điểm 74, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vùng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tồng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

76. Hạt chuyển gen chứa vectơ theo điểm 4 hoặc 5.

77. Hạt chuyển gen theo điểm 76, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vùng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tồng bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

78. Hạt chuyển gen chứa phương tiện nhân dòng theo điểm 6 hoặc 7.

79. Hạt chuyển gen theo điểm 78, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tằm bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

80. Hạt chuyển gen chứa vector biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.

81. Hạt chuyển gen theo điểm 80, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tằm bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

82. Hạt chuyển gen chứa vector nhân dòng theo điểm 10 hoặc 11.

83. Hạt chuyển gen theo điểm 82, trong đó hạt này của cây ngô, khoai tây, cà chua, lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương hoặc cây thuốc lá, hoặc cây cỏ và/hoặc cây làm thức ăn gia súc, hoặc cho động vật nhai lại, trong đó cây cỏ hoặc cây làm thức ăn là cỏ, ngô, kê, đậu tương, lúa mì, kiều mạch, lúa mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, cỏ hàng năm, lúa miến, cỏ sudan, cỏ thảo nguyên hoặc cỏ buffel; hoặc hạt là hạt ngô, mầm lúa mì, hạt dầu, cải dầu, đậu tương, mầm lúa mạch, hạt hướng dương, vừng, đậu phộng hoặc hạt

đậu, hạt cỏ linh lăng, hạt bông, hạt rum, hạt lúa miến, mầm yến mạch, hạt mạch đen, hạt kê, hạt đại mạch, mầm gạo, đậu hà lan, hoặc hạt cây thuốc lá, trong đó hạt này của cây ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải bắp, đậu phộng, mía, bông, rum, lạc, lúa miến, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kê, đại mạch, lúa, tằm bách, đậu hà lan, đậu, đậu tương, khoai tây, khoai lang, sắn, khoai môn, cây chuối hoa hoặc củ cải đường.

84. Polypeptit phytaza được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp, trong đó polypeptit phytaza này bao gồm:

(a) (i) trình tự axit amin có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO:2 và được mã hoá bởi polynucleotit chứa ít nhất một trong số các cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm:

các nucleotit ở các vị trí 139 đến 141 là TTT hoặc TTC;
 các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 289 đến 291 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí 406 đến 408 là CAT hoặc CAC;
 các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 475 đến 477 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí 676 đến 678 là GAT hoặc GAC;
 các nucleotit ở các vị trí 697 đến 699 là TGG;
 các nucleotit ở các vị trí 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG;
 các nucleotit ở các vị trí 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và
 các nucleotit ở các vị trí 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT;

(ii) trình tự axit amin có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO:2 và được mã hoá bởi polynucleotit chứa ít nhất một trong số các cải biến về trình tự cặp bazơ nucleotit so với SEQ ID NO:1, được chọn từ nhóm bao gồm:

các nucleotit ở các vị trí tương đương 139 đến 141 là TTT hoặc TTC;

các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 289 đến 291 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 406 đến 408 là CAT hoặc CAC;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 475 đến 477 là GAA hoặc GAG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 487 đến 489 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 490 đến 492 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 502 đến 504 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 535 đến 537 là CGT, CGC, CGA, CGG, AGA hoặc AGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 676 đến 678 là GAT hoặc GAC;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 697 đến 699 là TGG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 823 đến 825 là GTT, GTC, GTA hoặc GTG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 865 đến 867 là GCT, GCC, GCA hoặc GCG;
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 1045 đến 1047 là TAT hoặc TAC; và
 các nucleotit ở các vị trí tương đương 1087 đến 1089 là CCA, CCC, CCG hoặc CCT;

(iii) trình tự axit amin chứa ít nhất một trong số các đột biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm:

axit amin alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được thay bằng phenylalanin;

axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được thay bằng histidin;

axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit

glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit aspartic;

axit amin valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tryptophan;

axit amin glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được thay bằng alanin;

axit amin threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tyrosin;

và

axit amin loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được thay bằng prolin;

hoặc

(iv) trình tự axit amin chứa ít nhất một trong số các cải biến gốc axit amin so với SEQ ID NO:2, được chọn từ nhóm bao gồm:

axit amin ở vị trí tương đương alanin ở vị trí axit amin 47 của SEQ ID NO:2 được thay bằng phenylalanin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 97 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 136 của SEQ ID NO:2 được thay bằng histidin;

axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương asparagin ở vị trí axit amin 159 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit glutamic;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 163 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương axit aspartic ở vị trí axit amin 164 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương axit glutamic ở vị trí axit amin 168 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương glyxin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID NO:2 được thay bằng arginin;

axit amin ở vị trí tương đương xystein ở vị trí axit amin 226 của SEQ ID NO:2 được thay bằng axit aspartic;

axit amin ở vị trí tương đương valin ở vị trí axit amin 233 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tryptophan;

axit amin ở vị trí tương đương glutamin ở vị trí axit amin 275 của SEQ ID NO:2 được thay bằng valin;

axit amin ở vị trí tương đương arginin ở vị trí axit amin 289 của SEQ ID NO:2 được thay bằng alanin;

axit amin ở vị trí tương đương threonin ở vị trí axit amin 349 của SEQ ID NO:2 được thay bằng tyrosin; và

axit amin ở vị trí tương đương loxin ở vị trí axit amin 363 của SEQ ID NO:2 được thay bằng prolin;

(b) polypeptit theo (a) có hoạt tính phytaza nhưng thiếu: trình tự tín hiệu hoặc trình tự proprotein;

(c) polypeptit theo (a) có hoạt tính phytaza và còn chứa trình tự khác loài;

(d) polypeptit theo (c), trong đó trình tự axit amin khác loài là, hoặc chứa trình tự tín hiệu (dẫn đầu) khác loài, hoặc đuôi hoặc yếu tố quyết định kháng nguyên, hoặc trình tự nucleotit khác loài chứa trình tự khởi đầu khác loài;

(e) polypeptit theo bất kỳ trong số polypeptit theo (a) đến (d), trong đó (i) polypeptit được glycosyl hoá, hoặc polypeptit chứa ít nhất một vị trí glycosyl hoá, (ii) polypeptit theo (i) trong đó quá trình glycosyl hoá là quá trình glycosyl hoá đầu N hoặc glycosyl hoá đầu O; (iii) polypeptit theo (i) hoặc (ii) trong đó polypeptit được glycosyl hoá sau khi được biểu hiện trong tế bào nấm men; hoặc (iv) polypeptit theo (iii) trong đó tế bào nấm men là *P. pastoris* hoặc *S. pombe*; hoặc

(f) polypeptit theo bất kỳ trong số polypeptit theo (a) đến (e), trong đó (i) polypeptit còn chứa các gốc axit amin bổ trợ giữa một trình tự tín hiệu (trình tự dẫn đầu hoặc peptit dẫn đầu) và enzym.

85. Polypeptit phytaza được phân lập, tổng hợp hoặc tái tổ hợp theo điểm 84, trong đó các cải biến trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các cải biến từ (a) đến (v):

(a) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(b) các đột biến A47F, C97E, N159V, T163R, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;

(c) các đột biến A47F, T136H, N159V, T163R, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;

(d) các đột biến A47F, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(e) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159V, T163R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(f) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;

(g) các đột biến A47F, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;

(h) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, T163R, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;

(i) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(j) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159E, T163R, D164R, G179R, V233W, Q275V, R289A, T349Y và L363P;

(k) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159V, T163R, D164R, G179R, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(l) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

(m) các đột biến A47F, C97E, N159V, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;

- (n) các đột biến A47F, C97E, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;
- (o) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159E, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;
- (p) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, T163R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;
- (q) các đột biến A47F, C97E, T136H, N159V, T163R, D164R, E168R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;
- (r) các đột biến A47F, T136H, N159E, T163R, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V, R289A và T349Y;
- (s) các đột biến A47F, T136H, N159V, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;
- (t) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159V, D164R, G179R, C226D, V233W, Q275V và T349Y;
- (u) các đột biến A47F, C97V, T136H, N159V, D164R, G179R, V233W, Q275V và T349Y; và
- (v) các đột biến A47F, T136H, N159V, C226D, V233W và T349Y.

86. Phương pháp sản xuất polypeptit tái tổ hợp bao gồm các bước: (a) chuẩn bị axit nucleic, trong đó axit nucleic bao gồm trình tự theo điểm 1; và (b) biểu hiện axit nucleic theo bước (a) trong điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit, nhờ đó tạo ra polypeptit tái tổ hợp, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước biến nạp axit nucleic trong bước (a) vào tế bào chủ sau đó biểu hiện axit nucleic trong bước (a), nhờ đó tạo ra polypeptit tái tổ hợp trong tế bào chủ được biến nạp.

87. Phương pháp thuỷ phân inositol-hexaphosphat thành inositol và phosphat vô cơ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) chuẩn bị polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin theo điểm 84, hoặc, polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo điểm 1; (b) chuẩn bị chế phẩm chứa inositol-hexaphosphat; và (c) cho polypeptit trong bước (a) phản ứng với chế phẩm trong bước (b) trong điều kiện để polypeptit thuỷ phân inositol-hexaphosphat tạo ra inositol và phosphat vô cơ.

88. Phương pháp theo điểm 87, trong đó điều kiện nhiệt độ là từ 37°C đến 70°C.
89. Phương pháp theo điểm 87, trong đó điều kiện nhiệt độ là từ 50°C đến 80°C.
90. Phương pháp theo điểm 87, trong đó điều kiện nhiệt độ là từ 60°C đến 90°C.
91. Phương pháp theo điểm 87, trong đó chế phẩm chứa axit phytic.
92. Phương pháp khử keo của dầu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) chuẩn bị polypeptit có hoạt tính phytaza, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin theo điểm 84, hoặc, polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo điểm 1; (b) chuẩn bị chế phẩm chứa dầu thực vật; và (c) cho polypeptit trong bước (a) và dầu thực vật trong bước (b) phản ứng với nhau trong điều kiện để polypeptit có thể cắt liên kết inositol-phosphat vô cơ, nhờ đó dầu thực vật sẽ được khử keo.
93. Phương pháp sản xuất thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc thực phẩm bổ sung, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
- (a) biến nạp thực vật, phần của thực vật hoặc tế bào thực vật bằng polynucleotit mã hoá polypeptit enzym phytaza, trong đó phytaza này là polypeptit chứa trình tự axit amin theo điểm 84, hoặc, polypeptit được mã hoá bởi axit nucleic theo điểm 1; (b) nuôi cấy thực vật, phần của thực vật hoặc tế bào thực vật trong điều kiện để enzym phytaza được biểu hiện; và, (c) cải biến thực vật, phần của thực vật hoặc tế bào thực vật thành chế phẩm thích hợp để làm thức ăn cho gia súc, hoặc thực phẩm, hoặc thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung, hoặc bổ sung thực vật, phần của thực vật hoặc tế bào thực vật được nuôi cấy vào thức ăn gia súc, hoặc thực phẩm, hoặc thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung, nhờ đó tạo ra thức ăn gia súc, hoặc thực phẩm, thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung.
94. Phương pháp theo điểm 93, trong đó polynucleotit chứa trong vector biểu hiện, và vector này chứa trình tự kiểm soát biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic trong tế bào thực vật.
95. Phương pháp theo điểm 94, trong đó động vật là động vật có dạ dày một ngăn và động vật là động vật nhai lại.
96. Phương pháp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 93 đến 95, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn gia súc, hoặc thực phẩm hoặc thức ăn bổ sung ở dạng chất mang để phân phối, hạt cơm, viên nén, gel, dạng lỏng, dạng xít, hạt nghiền hoặc dạng bột.

97. Phương pháp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 93 đến 96, trong đó enzym phytaza được glycosyl hoá, hoặc enzym phytaza được glycosyl hoá để tạo ra khả năng chịu nhiệt hoặc ổn định với nhiệt trong quá trình tạo viên.

98. Phương pháp theo điểm 96 hoặc 97, trong đó chất mang để phân phối được tạo ra bằng cách tạo viên hỗn hợp bao gồm mầm hạt và enzym phytaza để tạo ra hạt, và hạt cốm được sản xuất trong điều kiện có sử dụng nồi hơi, hạt cốm được sản xuất trong điều kiện nhiệt độ lớn hơn 80°C trong khoảng 5 phút, và hạt cốm chứa enzym phytaza có hoạt tính đặc hiệu là ít nhất từ 350 đến 900 đơn vị/mg enzym.

99. Chế phẩm chứa polypeptit theo điểm 84, trong đó chế phẩm này là chế phẩm protein, dược phẩm, thực phẩm, thức ăn, thực phẩm bổ sung, thức ăn bổ sung, chất mang phân phối enzym ăn được hoặc hấp thu được, chế phẩm ăn kiêng, suất ăn được chế biến sẵn (meal ready-to-eat - MRE), đồ uống, hoạt chất hydrat hóa, viên nén nhai được, bột đậu tương, đồ nướng hoặc ngũ cốc ăn sáng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> VERENIUM CORPORATION

STEER, Brian

DYCAICO, Mark

KLINE, Katie

TREFZER, Axel

TODARO, Tom

SOLBAK, Arne I., Jr.

EL-FARRAH, Fatima

ALVARADO, Alberto

FREY, Gerhard

<120> AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP, TỔNG HỢP HOẶC TÁI TỔ HỢP MÃ HOÁ ENZYM
PHYTAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT

<130> 564462015240

<140> PCT/US2007/079187

<141> 2007-09-21

<150> US 60/846,831

<151> 2006-09-21

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1299

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

atgaaagcga tcttaatccc atttttatct cttctgattc cgtaacccc gcaatctgca 60
 ttgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tcgtcatggt 120
 gtgcgtgctc caaccaaggc cagcaactg atgcaggatg tcacccaga cgcattggcca 180
 acctggccgg taaaactggg tgagctgaca ccgcgcgggtg gtgagctaata cgcctatctc 240
 ggacattact ggcgtcagcg tctgtagcc gacggattgc tgcctaaatg tggctgccc 300
 cagtctggtc aggtcgcgat tattgtgat gtcgacgagc gtaccgtaa aacaggcgaa 360
 gccttcgccg ccgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataacca ggcagatacg 420
 tccagtccc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg 480
 aacgtgactg acgcgatcct cgagagggca ggagggtcaa ttgctgactt tacggggcat 540
 tatcaaacgg cgttcgcga actggaacgg gtgcttaatt ttccgaatc aaacttgtgc 600
 cttaaactg agaacagga cgaagctgt tcattaacgc aggcattacc atcggaactc 660
 aaggtgagcg ccgactgtgt ctcatcacc ggtgcggtta gcctcgcac aatgctgacg 720
 gagatatttc tctgcaaca agcacaggga atgccggagc cgggggtggg aaggatcacc 780
 gattcacacc agtgaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaattga tttgctacaa 840
 cgcacgccag aggttgccc cagccgcgc acccggtat tagatttgat caagacagcg 900
 ttgacgccc atccaccga aaaacaggcg tatggtgtga cattaccac ttgctgctg 960

tttatcgccg gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcactgga gctcaactgg 1020
 acgcttcccg gtcagccgga taacacgccg ccaggtggtg aactggtgtt tgaacgctgg 1080
 cgtcggctaa gcgataacag ccagtggatt caggtttcgc tggcttcca gactttacag 1140
 cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacgccgc ccggagaggt gaaactgacc 1200
 ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcatgtgtt cgttggcagg ttttacgcaa 1260
 atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agttttaa 1299

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45
 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60
 Lys Leu Gly Glu Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys
 85 90 95
 Cys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser

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

<210> 3

<211> 1308

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

atgaaagcga tcttaatccc atttttatct cttctgattc cgtaacccc gcaatctgca 60
 ttcgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tcgtcatggt 120
 gtgcgtgctc caaccaaggc cagcaactg atgcaggatg tcaccccaga cgcattggcca 180
 acctggccgg taaaactggg tgagctgaca ccgcgcgggtg gtgagctaata cgctatctc 240
 ggacattact ggcgtcagcg tctggtagcc gacggattgc tgcctaaatg tggctgccc 300
 cagtctggtc aggtgcgat tattgtctgat gtcgacgagc gtaccgtaa aacaggcgaa 360
 gccttcgccc cgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataccca ggcagatacg 420
 tccagtccc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg 480
 aacgtgactg acgcgatctc cgagagggca ggagggtcaa ttgctgactt taccgggcat 540
 tatcaaacgg cgtttcgca actggaacgg gtgcttaatt ttccgaatc aaacttgtgc 600
 cttaaactgt agaaacagga cgaaagtgt tcattaacgc aggcattacc atcggaactc 660
 aaggtgagcg ccgactgtgt ctattaacc ggtgcggtaa gcctgcacat aatgctgacg 720
 gagatatttc tctgcaaca agcacaggga atgccggagc cggggtgggg aaggatcacc 780
 gattcacacc agtggaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaatttga ttgctacaa 840
 cgcacgccag aggttgccc cagccgcgcc acccgttat tagatttgat caagacagcg 900
 ttgacgcccc atccaccgca aaaacaggcg tatggtgtga cattaccac ttgctgtg 960
 tttatcgccg gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcactgga gctcaactgg 1020
 acgcttccc gtcagccgga taacacgccc ccagggtgtg aactggtgt tgaacgtgg 1080
 cgtcggtcaa gcgataacag ccagtggatt caggtttcgc tggcttcca gactttacg 1140
 cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacggcg ccggagaggt gaaactgacc 1200
 ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcattgtgt cgttggcagg ttttacgcaa 1260
 atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agtttgagat ctatctta 1308

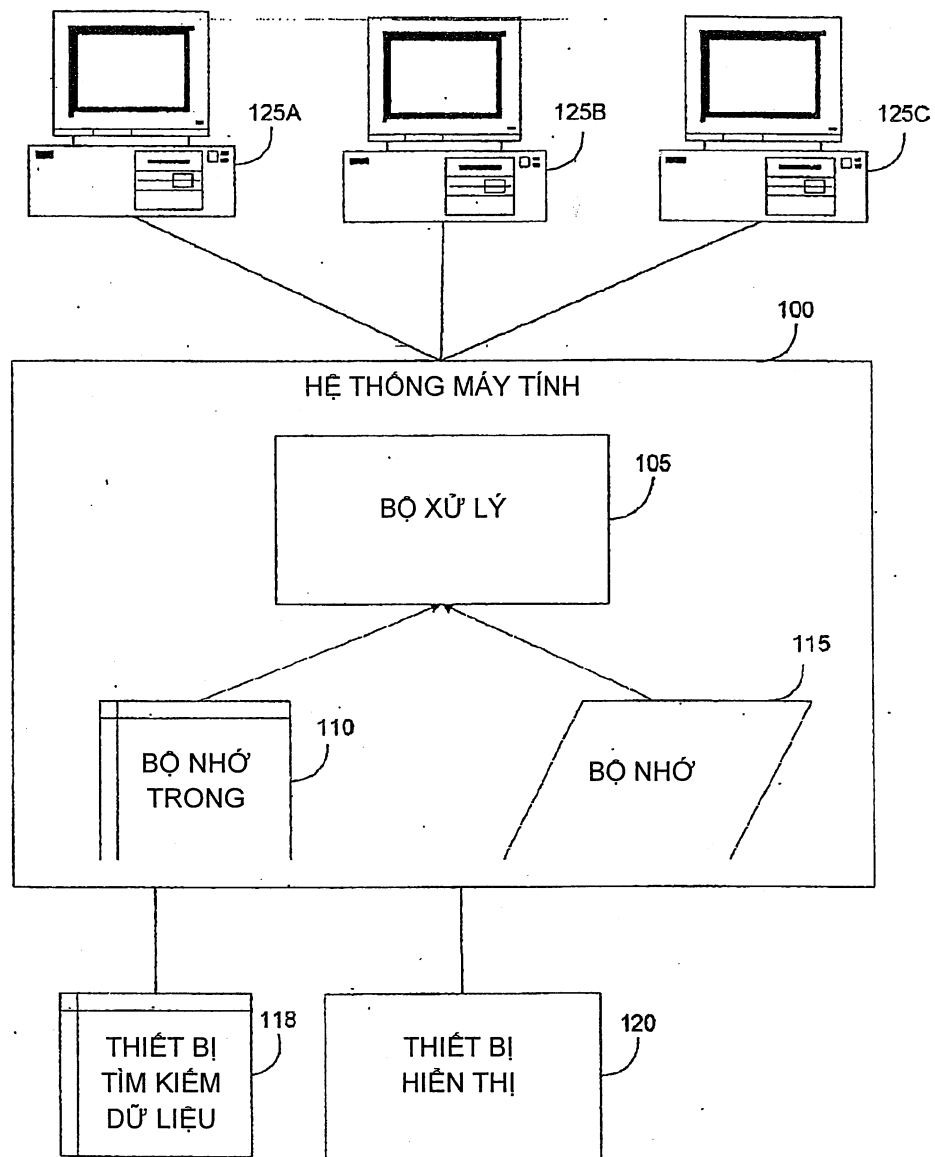


FIG. 1

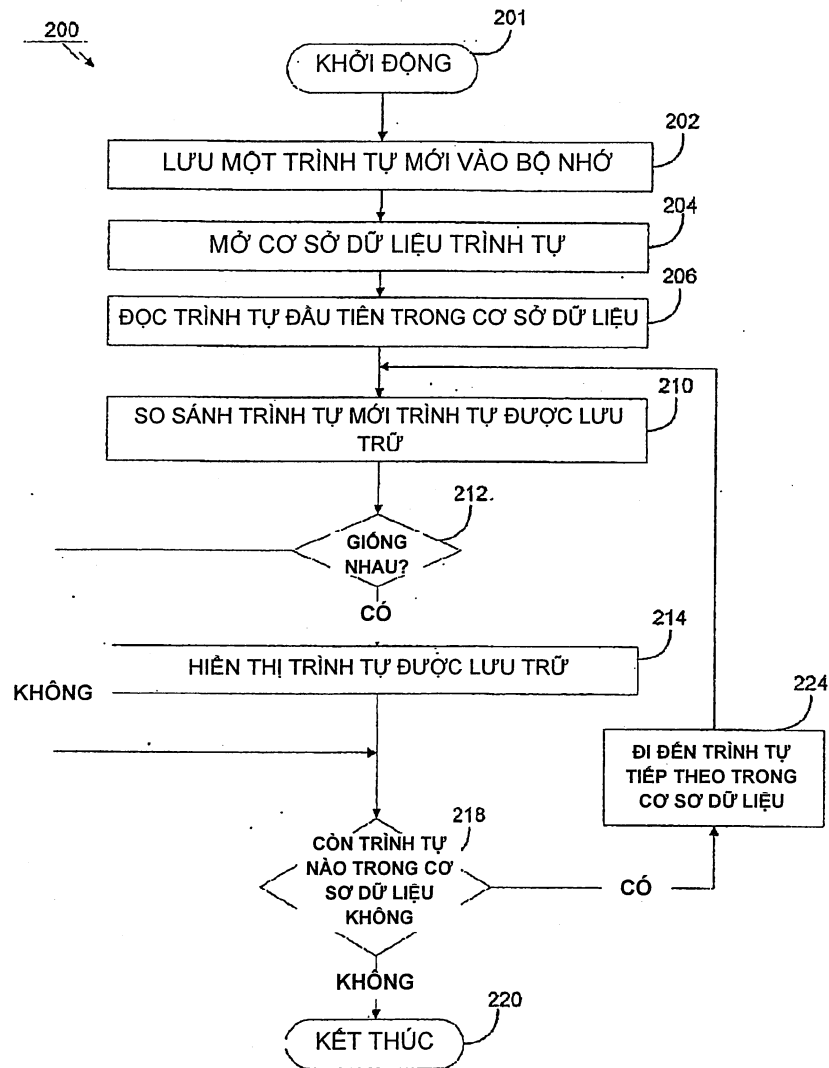
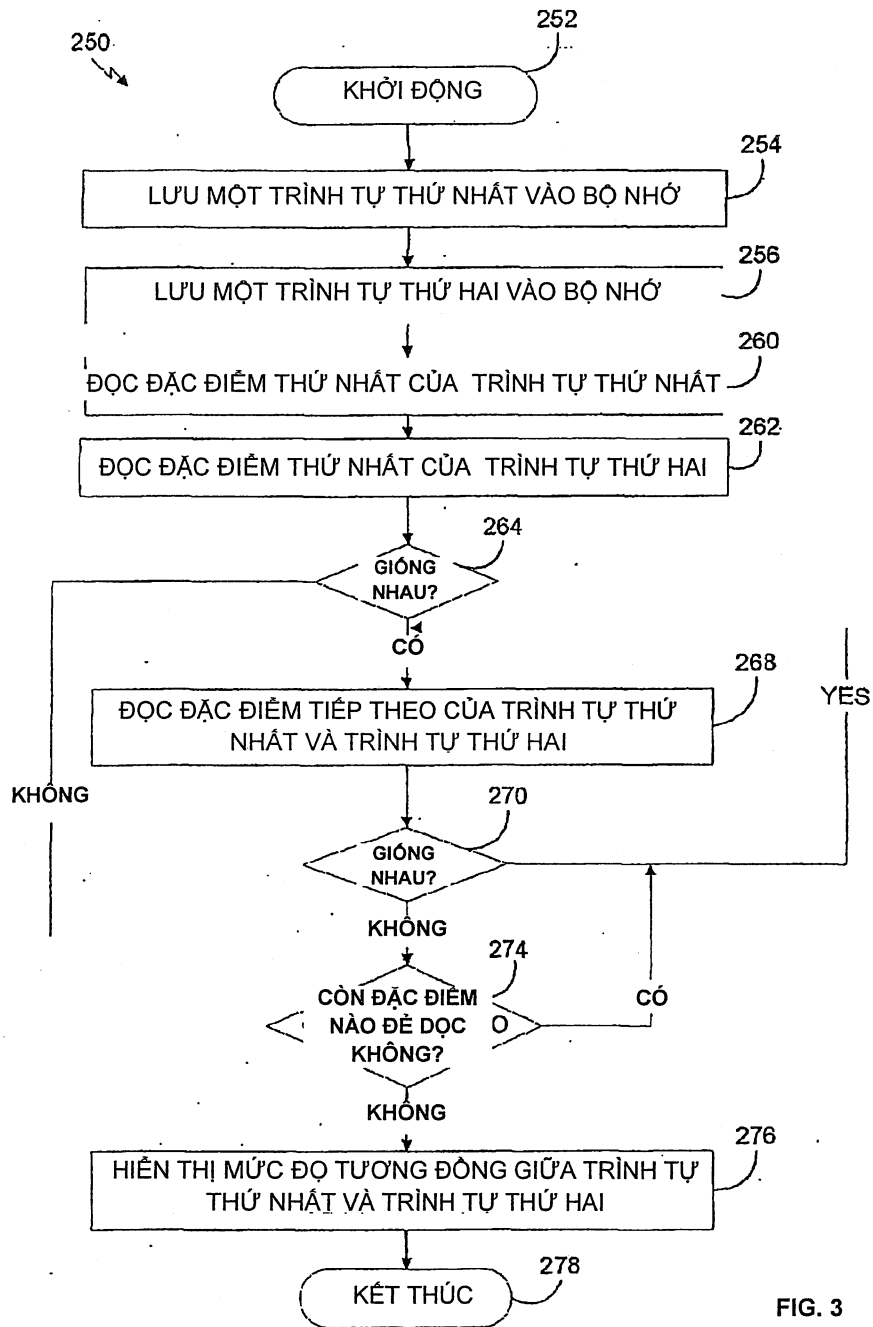


FIG. 2



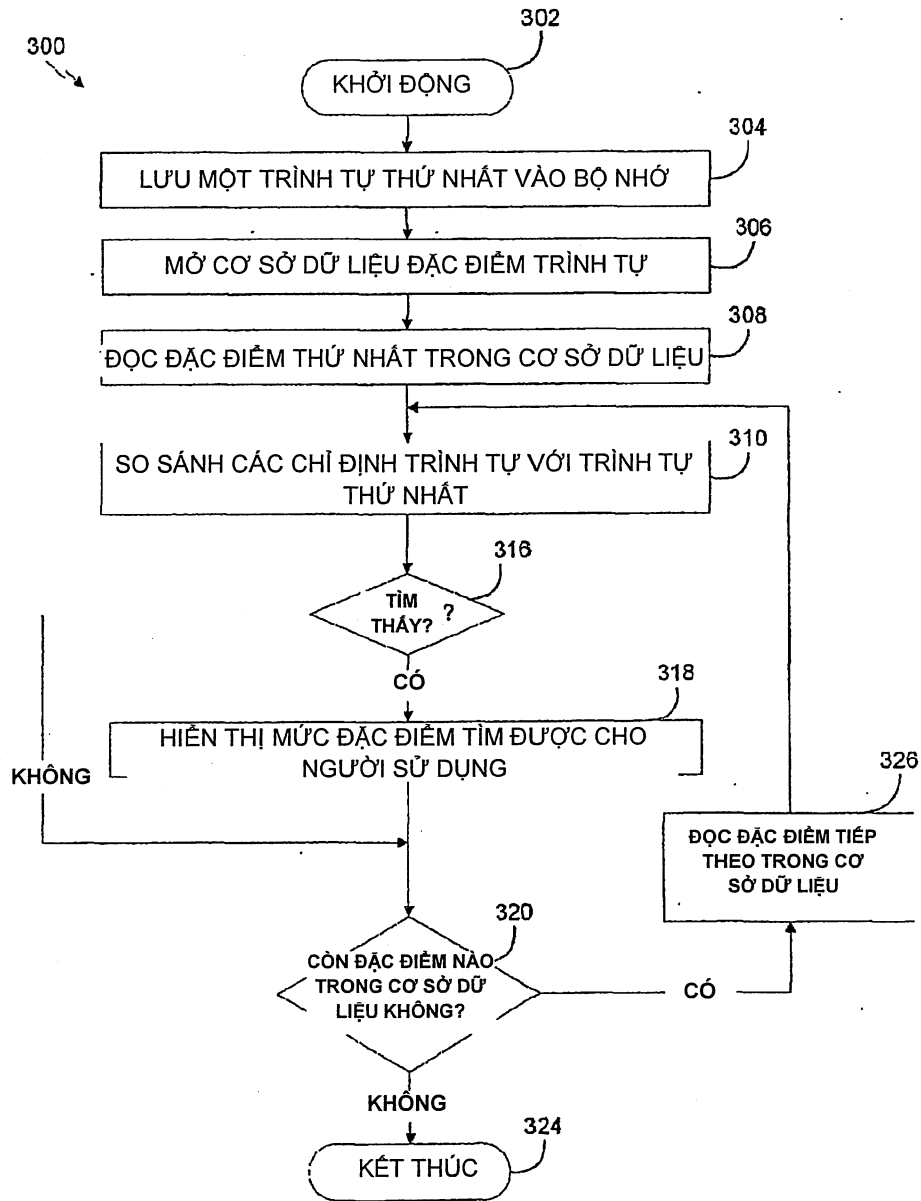


FIG. 4

FIG.5

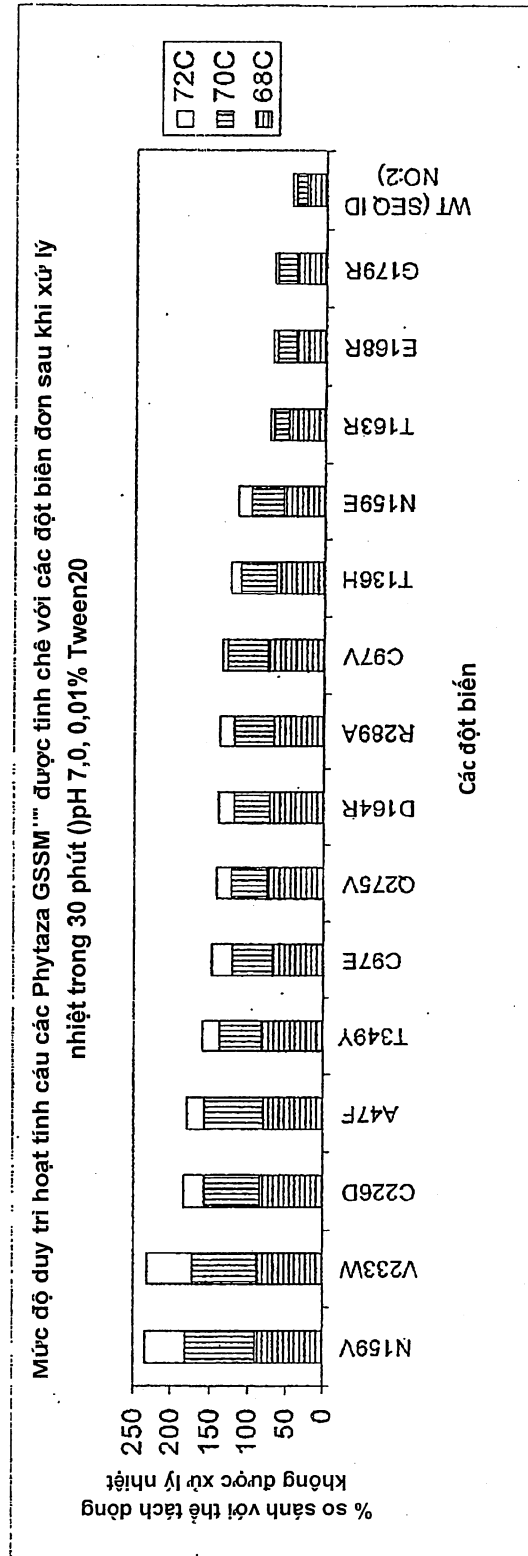
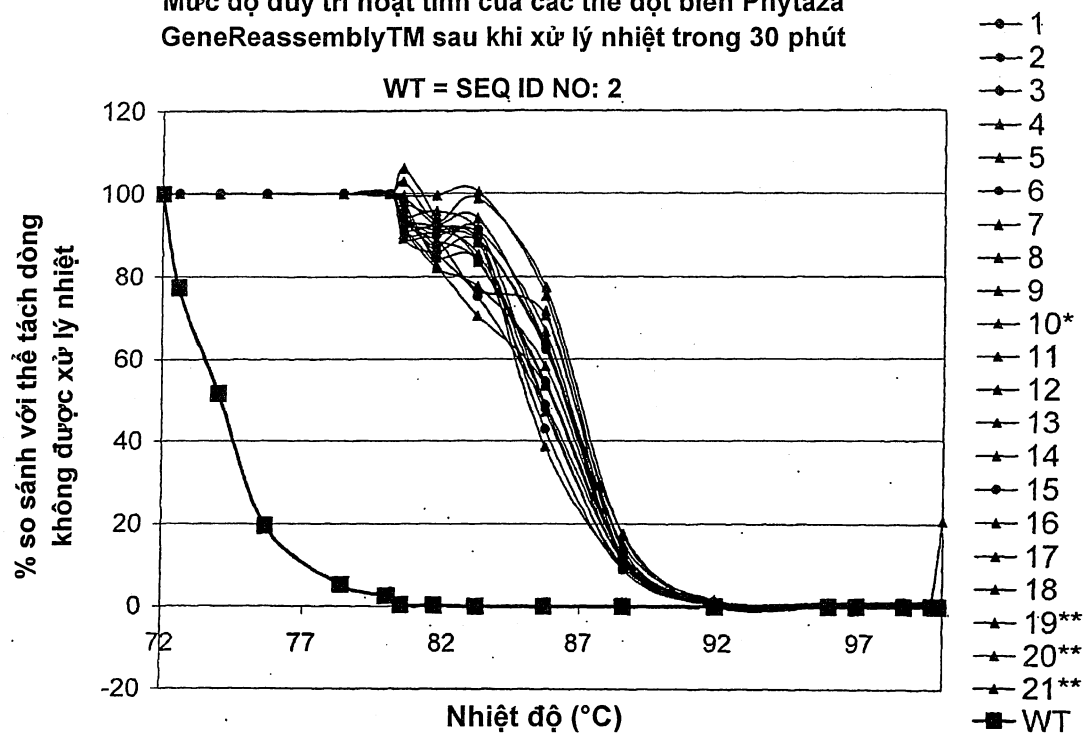


Figure 6

Mức độ duy trì hoạt tính của các thể đột biến Phytaza
GeneReassemblyTM sau khi xử lý nhiệt trong 30 phút

WT = SEQ ID NO: 2



	Nhiệt độ (°C)																	
Phytaza Số	72	72,6	74	75,7	78,4	80	80,5	81,7	83,2	85,7	88,6	91,9	95,9	96,9	98,6	99,6	100	
1	100	100	100	100	100	100	94,7	90,0	90,2	42,9	9,1	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,4	
2	100	100	100	100	100	100	94,2	85,7	75,3	48,9	11,8	0,9	0,6	0,5	0,8		0,6	
3	100	100	100	100	100	100	94,5	87,3	91,5	48,8				0,3	0,3			
4	100	100	100	100	100	100	94,3	92,5	94,2	63,7	11,7	1,2	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	
5	100	100	100	100	100	100	90,3	90,8	88,9	63,3	12,1	1,1	1,0	0,9	0,9	0,8	1,0	
6	100	100	100	100	100	100	98,0	93,5	84,2	54,5	12,8	1,3	0,0	0,8	0,6	0,6	1,0	
7	100	100	100	100	100	100	94,6	87,3		71,7	17,6	0,7	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	
8	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	100,5	75,3	14,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	
9	100	100	100	100	100	100	91,8	82,2	77,5	58,2	12,2	1,4	1,1	1,0			1,2	
10*	100	100	100	100	100	100	94,6	95,8	91,7	66,6	11,7	0,5	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4	
11	100	100	100	100	100	100	96,6	82,8		64,5	15,2	1,6	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	
12	100	100	100	100	100	100	93,2	88,8	83,6	53,8	11,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	
13	100	100	100	100	100	100	92,4	82,7	70,6	53,6	11,0	0,8	0,4	0,4		0,5	20,8	
14	100	100	100	100	100	100	103,0	93,4	98,8	77,4	17,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	
15	100	100	100	100	100	100	91,7	92,2	89,4	62,2	12,9		0,2	0,3	-0,2	0,2	0,2	
16	100	100	100	100	100	100	93,2	91,4	89,2	38,7	10,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	
17	100	100	100	100	100	100	98,0	84,7	84,3	47,0	10,1	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2	
18	100	100	100	100	100	100	89,2	85,8	88,2	48,5	9,4	0,7	0,8	0,4	0,5	0,4	0,2	
19**	100	100	100	100	100	100	99,2	92,1	85,5	54,4	11,0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	
20**	100	100	100	100	100	100	89,4	88,8	76,6	70,6	12,2	0,3	0,2		0,2	0,2	0,2	
21**	100	100	100	100	100	100	106,1	93,9		63,8	12,7	1,0	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	
WT (SEQ ID NO:2)	100	77,4	51,7	19,5	5,29	2,6	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

FIG. 7

-257-

FIG.9

Phytase		Các đột biến có khả năng															
được gây đột biến số	Số các đột biến	A47F	C97V	C97E	T136H	N159V	N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	L363P
1	10X	A47F		C97E	T136H	N159V					G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
2	10X	A47F		C97E		N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
3	10X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
4	12X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
5	12X	A47F	C97V		T136H	N159V		T163R		E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
6	12X	A47F	C97V		T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
7	11X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
8	11X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
9	12X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
10*	12X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	L363P
11	11X	A47F	C97V		T136H	N159V	N159E	T163R	D164R		G179R		V233W	Q275V	R289A	T349Y	
12	13X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
13	10X	A47F		C97E		N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
14	12X	A47F		C97E		N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
15	13X	A47F	C97V		T136H		N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
16	10X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R			G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
17	12X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
18	11X	A47F			T136H	N159V	N159E	T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	
19**	9X	A47F			T136H	N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
20**	10X	A47F	C97V		T136H	N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y	
21**	9X	A47F	C97V		T136H	N159V			D164R		G179R		V233W	Q275V		T349Y	
22	6X	A47F			T136H	N159V						C226D	V233W			T349Y	

* Có thêm đột biến (L363P) không được gây ra bằng quá trình gây tiến hoá GSSM™. Đột biến này được đưa vào bằng gây đột biến ngẫu nhiên và có thể hoặc không có liên quan đến tính bền nhiệt.

** Có thêm đuôi Histidin ở đầu C (RSHHHHHH)

FIG. 10

Đột biến GSSM™	Axit amin gốc	Axit amin được đột biến thành	Vị trí gây đột biến mã bộ ba	Các vị trí nucleotit của mã bộ ba được đột biến trong SEQ ID NO:1	Mã bộ ba gốc	Mã bộ ba được đột biến thành	Tất cả các mã bộ ba có thể có đối với axit amin được gây đột biến
A47F	A	F	47	139-141	GCC	TTT	TTT, TTC
C97V	C	V	97	289-291	TGT	GTT	GTT, GTC, GTA, GTG
C97E	C	E	97	289-291	TGT	GAG	GAA, GAG
T136H	T	H	136	406-408	ACC	CAT hoặc GTC	CAT, CAC
N159V	N	V	159	475-477	AAC	GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
N159E	N	E	159	475-477	AAC	GAG	GAA, GAG
T163R	T	R	163	487-489	ACT	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
D164R	D	R	164	490-492	GAC	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
E168R	E	R	168	502-504	GAG	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
G179R	G	R	179	535-537	GGG	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
C226D	C	D	226	676-678	TGT	GAT	GAT, GAC
V223W	V	W	223	667-669	GTA	TGG	TGG
Q275V	Q	V	275	823-825	CAA	GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
R289A	R	A	289	865-867	CGC	GCT	GCT, GCC, GCA, GCG
T349Y	T	Y	349	1045-1047	ACG	TAT	TAT, TAC
L363P	L	P	363	1087-1089	CTA	CCA	CCA, CCC, CCG, CCT

FIG. 11

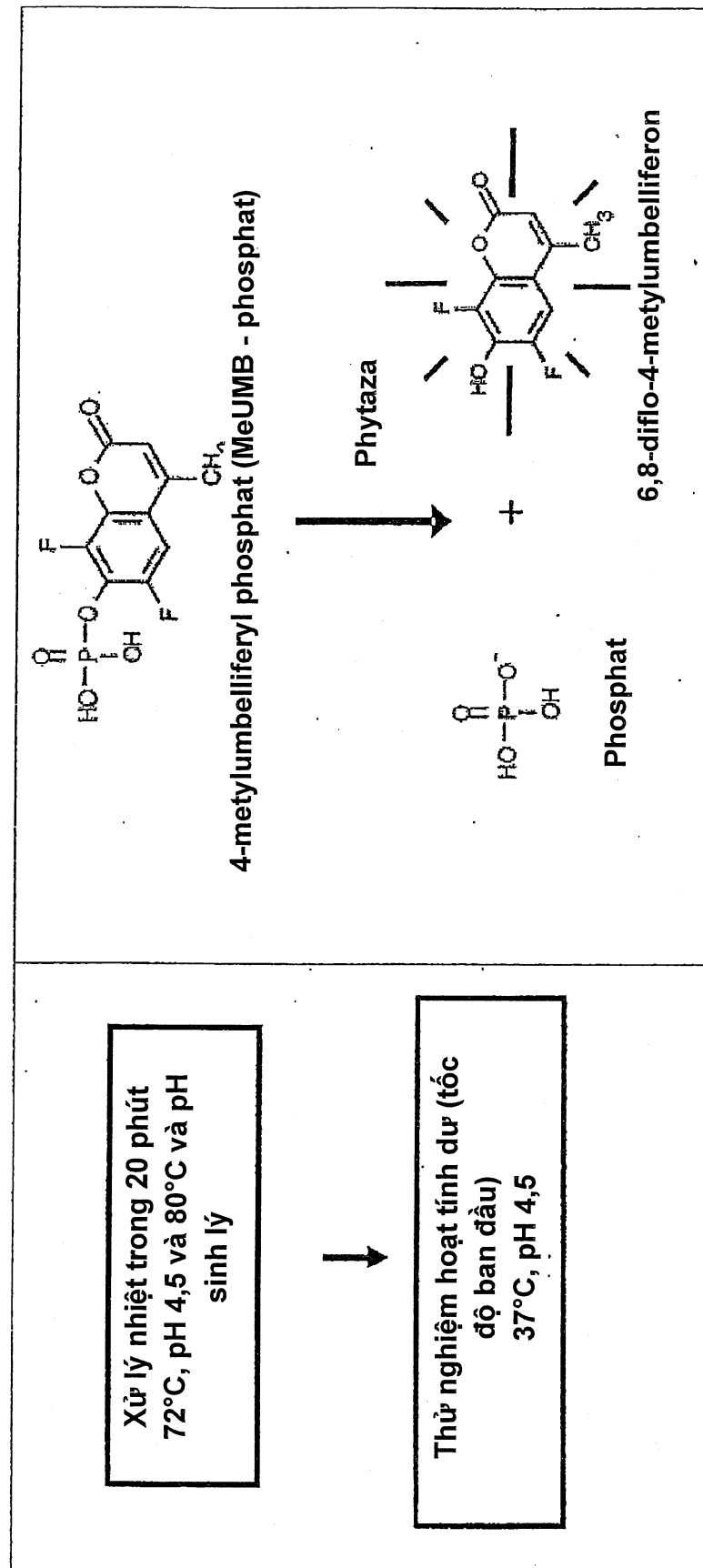


FIG. 12

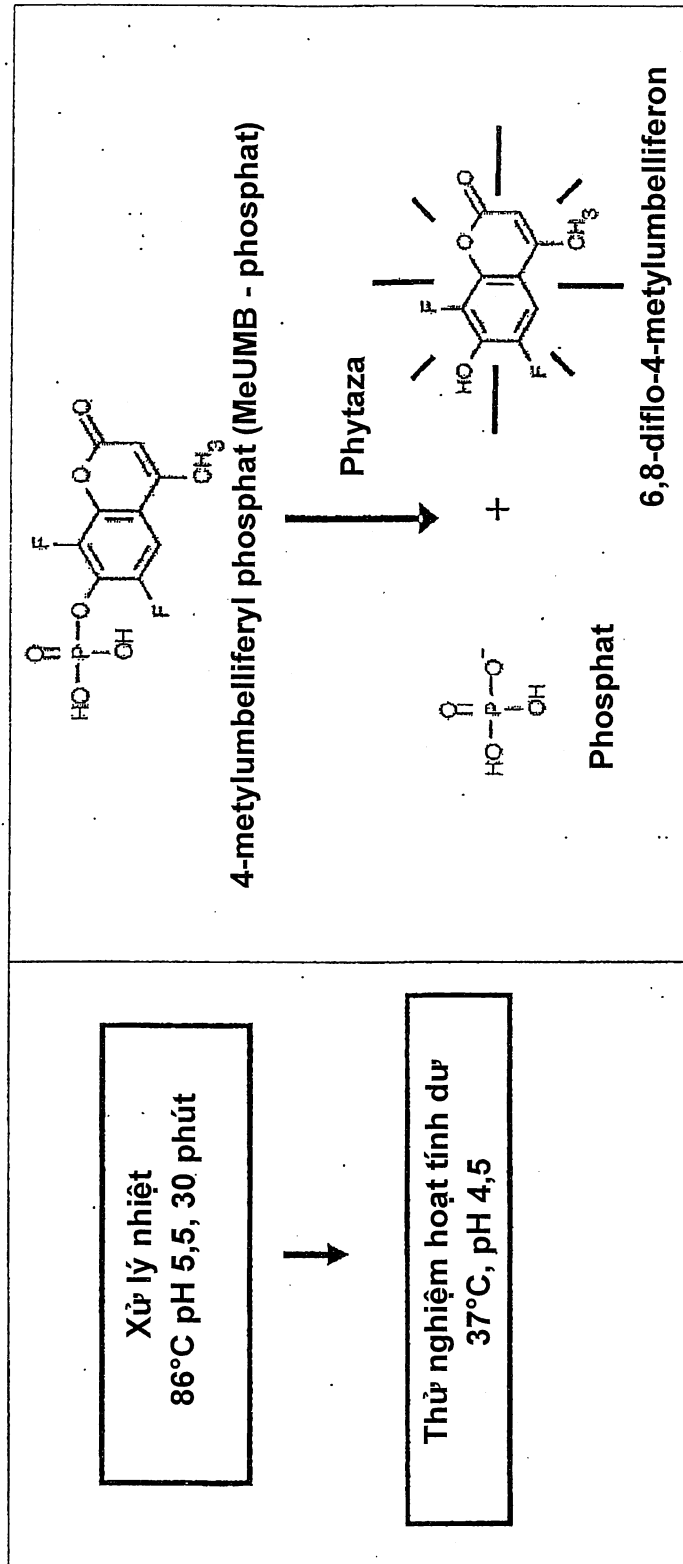
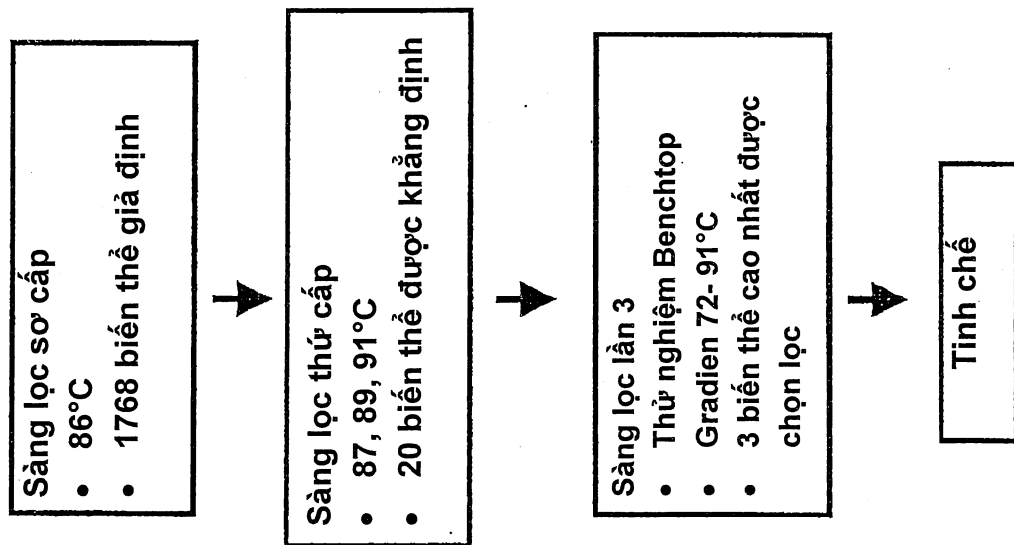


FIG. 13



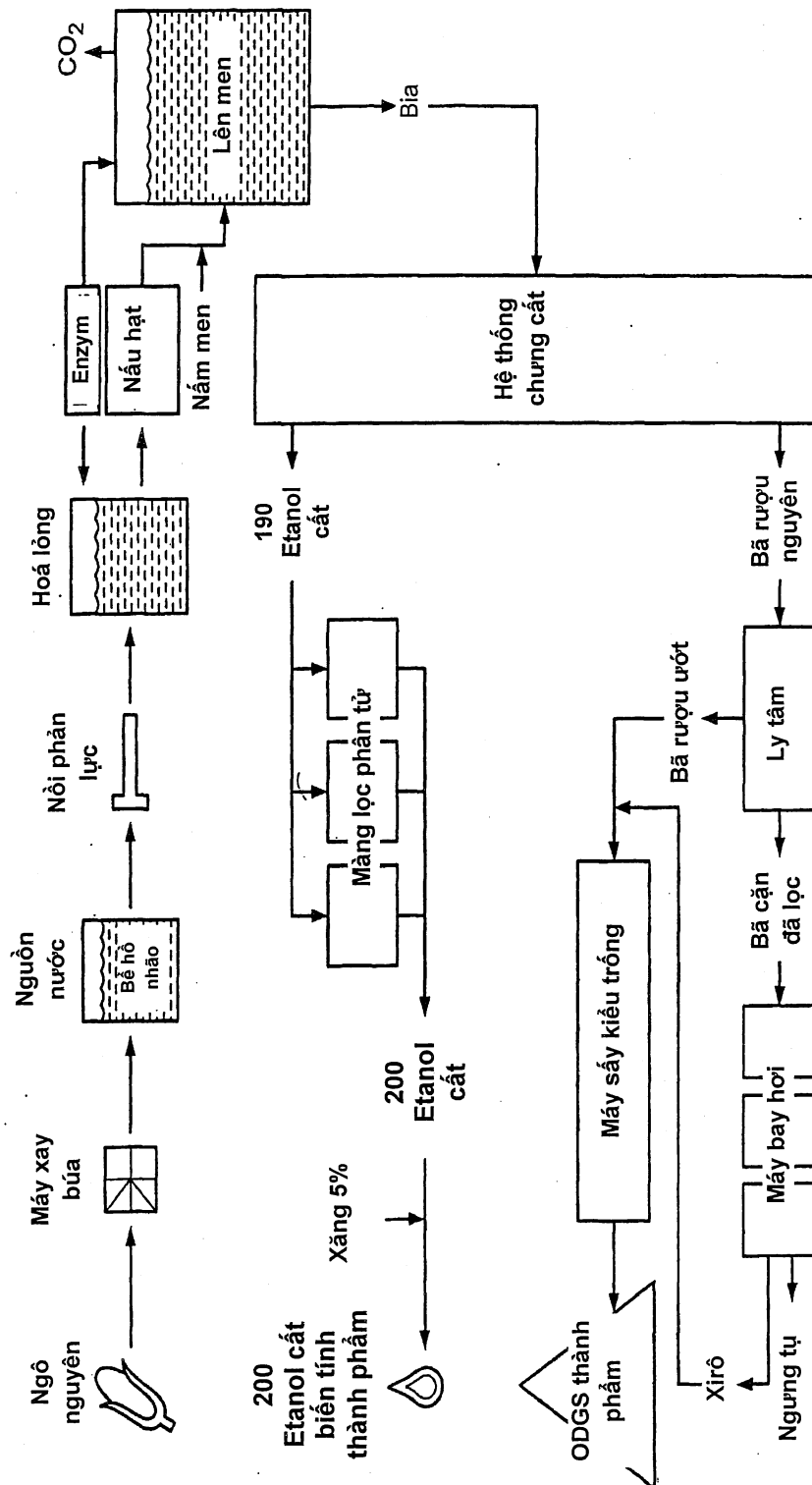


FIG. 14