



(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) 
1-0023018

(51)⁷ C12N 1/20, 15/00, C12P 19/44, 19/62 (13) B

(21)	1-2012-03356	(22)	11.05.2011		
(86)	PCT/US2011/036028	11.05.2011	(87)	WO2011/143291	17.11.2011
(30)	61/333,540	11.05.2010	US		
(45)	25.02.2020	383	(43)	25.02.2013	299
(73)	DOW AGROSCIENCES LLC (US) 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America				
(72)	HAN Lei (US), Ute Galm (DE)				
(74)	Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)				

(54) QUY TRÌNH CHUYỂN HÓA VÀ PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN HÓA CHỦNG SẢN XUẤT SPINOSAD THÀNH CHỦNG SẢN XUẤT TIỀN CHẤT SPINETORAM VÀ TẾ BÀO VẬT CHỦ BIẾN ĐỔI GEN TẠO RA TIỀN CHẤT SPINETORAM

(57) Sáng chế đề cập đến gen sinh tổng hợp spinosyn, vi sinh vật sản xuất spinosyn được biến nạp bằng gen sinh tổng hợp, phương pháp sử dụng gen sinh tổng hợp này để gia tăng quá trình tạo ra các hợp chất dạng phân tử vòng lớn trừ sâu spinosyn, và phương pháp sử dụng gen hoặc mảnh của chúng để làm thay đổi sản phẩm được tạo ra bởi vi sinh vật sản xuất spinosyn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để chuyển hóa chủng sản xuất spinosyn A và D thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram, spinosyn J và L.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kỹ thuật di truyền phân tử để phá vỡ sự biểu hiện của gen. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến đột biến ở gen *spnK* chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Patent Mỹ số 5,362,634 đề cập đến sản phẩm lên men A83543 là nhóm các hợp chất có liên quan được tạo ra bởi *Saccharopolyspora spinosa*. Các hợp chất đã biết của nhóm này được gọi là các yếu tố hoặc hợp phần, và mỗi yếu tố hoặc hợp phần này được ký hiệu bằng một chữ cái. Trong bản mô tả này, các hợp chất này được gọi là spinosyn A, B, v.v.. Các hợp chất spinosyn này có thể dùng để phòng trừ nhện, giun tròn và sâu bọ, cụ thể là các loài cánh vảy và hai cánh, và chúng khá thân thiện về mặt môi trường và có đặc tính độc đáng chú ý.

Hợp chất spinosyn được tạo ra trong tự nhiên bao gồm hệ nhân 3 vòng 5,6,5, được dung hợp với lacton vòng lớn có 12 cạnh, đường trung tính (rhamnoza) và đường amino (forosamin) (xem ấn phẩm của Kirst và đồng tác giả (1991)). Nếu đường amino không có mặt thì các hợp chất này được gọi là aglycon giả của A, D, v.v., và nếu đường trung tính không có mặt thì các hợp chất này được gọi là aglycon giả nghịch của A, D, v.v.. Danh pháp thường dùng hơn để chỉ aglycon giả là spinosyn A 17-Psa, spinosyn D 17-Psa, v.v., và aglycon giả nghịch là spinosyn A 9-Psa, spinosyn D 9-Psa, v.v.

Trong tự nhiên, các hợp chất spinosyn có thể được tạo ra nhờ quá trình lên men từ các môi trường nuôi cấy NRRL 18395, 18537, 18538, 18539, 18719, 18720, 18743 và 18823. Các môi trường nuôi cấy này đã được lưu giữ và nằm trong Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy gốc của Trung tâm nghiên cứu khu vực miền Trung Tây, Dịch vụ nghiên cứu nông nghiệp, Bộ nông nghiệp Mỹ, 1815 North University Street, Peoria, Ill., 61604.

Patent Mỹ số 5,362,634 và đơn yêu cầu cấp patent châu Âu đồng dạng số 375316 A1 đề cập đến spinosyn A, B, C, D, E, F, G, H, và J. Người ta nói rằng các hợp chất này được tạo ra bằng cách nuôi cấy chủng vi sinh vật mới *Saccharopolyspora spinosa* được chọn từ NRRL 18395, NRRL 18537, NRRL 18538, và NRRL 18539.

Công bố đơn quốc tế số WO 93/09126 đề cập đến spinosyn L, M, N, Q, R, S, và T. Tài liệu này cũng đề cập đến hai chủng sản xuất spinosyn J: NRRL 18719 và NRRL 18720, và chủng sản xuất spinosyn Q, R, S, và T: NRRL 18823.

Công bố đơn quốc tế số WO 94/20518 và patent Mỹ số 5,6704,486 đề cập đến spinosyn K, O, P, U, V, W, và Y, và dẫn xuất của chúng. Các tài liệu này cũng đề cập đến chủng sản xuất spinosyn K là NRRL 18743.

Thách thức trong việc tạo ra các hợp chất spinosyn xuất phát từ việc cần phải dùng thể tích lên men rất lớn để tạo ra lượng spinosyn rất nhỏ. Rất muốn làm tăng hiệu quả tạo ra spinosyn và nhờ đó làm tăng tính khả dụng của spinosyn trong khi giảm được chi phí sản xuất của chúng.

Sẽ có lợi nếu tạo ra các gen tổng hợp sinh học tách dòng để dùng trong việc tạo ra dẫn xuất spinosyn mới có thể có phổ hoạt tính trừ sâu khác nhau. Mong muốn tạo ra được các dẫn xuất mới vì mặc dù các spinosyn đã biết có phổ ức chế sâu bọ rộng nhưng chúng vẫn không phòng trừ được tất cả các côn trùng. Có thể tạo ra các kiểu phòng trừ khác nhau bằng các hợp chất trung gian sinh tổng hợp của spinosyn, hoặc bằng dẫn xuất của chúng được tạo ra *in vivo*, hoặc bằng dẫn xuất thu được từ quá trình cải biến hóa học chúng *in vitro*.

Cũng sẽ có lợi nếu tổng hợp các hợp chất trung gian mới bằng các chủng đột biến của *S. spinosa* trong đó các phần của gen mã hóa enzym để sinh tổng hợp spinosyn đã được thay thế bằng các phần của cùng gen này đã được gây đột biến đặc hiệu *in vitro*, hoặc bằng các phần gen tương ứng từ các sinh vật khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình chuyển hóa chủng sản xuất spinosad như spinosyn A và D thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram như spinosyn J và L. Quy trình như vậy có thể bao gồm quá trình tạo ra cải biến ở gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O methyltransferaza. Cải biến này có thể được tạo ra nhờ quá trình gây khuyết đoạn trong khung, đột biến, thay thế, khuyết đoạn, cài xen và các quá trình tương tự. Khuyết đoạn trong khung có thể là trong toàn bộ hệ gen bao gồm gây khuyết đoạn của đầu 5', đầu

3', hoặc của vùng ghi mã *spnK*. Một khuyết đoạn trong khung như vậy có thể bao gồm khuyết đoạn trình tự nêu trong SEQ. ID. NO: 9. Đột biến điểm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đột biến ở các vị trí cặp bazơ 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131. Các đột biến này có thể dẫn đến những thay đổi trong quá trình dịch mã của gen *spnK*. Những thay đổi như vậy có thể thay đổi về axit amin, thay thế, hoặc tạo ra codon kết thúc. Các cải biến như vậy dẫn đến việc tạo ra hợp chất spinosyn J và L thay vì spinosyn A và D.

Phương pháp cụ thể theo sáng chế bao gồm bước chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram bằng cách làm bất hoạt gen *spnK* trong khi vẫn duy trì gen tạo ra spinosyn J và L. Việc làm bất hoạt hoặc phá vỡ hoạt tính của protein spnK bình thường có thể được thực hiện bằng cách gây khuyết đoạn trong khung, đột biến, thay thế, khuyết đoạn, cài xen và các phương pháp tương tự. Việc này cũng có thể được thực hiện bằng các thao tác di truyền đối với trình tự khởi đầu phiên mã hoặc trình tự vị trí gắn kết ribosom.

Sáng chế còn đề xuất tế bào vật chủ biến đổi gen có thể tạo ra tiền chất spinetoram. Vật chủ biến đổi gen này có thể được tạo ra bằng cách cải biến gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O methyltransferaza. Cải biến này có thể được thực hiện bằng cách gây khuyết đoạn trong khung, đột biến, thay thế, khuyết đoạn, cài xen và các phương pháp tương tự. Khuyết đoạn trong khung có thể bao gồm gây khuyết đoạn của đầu 5', đầu 3', hoặc của vùng ghi mã *spnK*.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram bằng cách cải biến gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O methyltransferaza. Quy trình này có thể bao gồm gây khuyết đoạn trong khung, đột biến điểm, khuyết đoạn, và cài xen. Khuyết đoạn trong khung như vậy có thể bao gồm việc gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3', và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*. Khuyết đoạn này có thể bao gồm gây khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn đến việc phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*. Cài xen có thể bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit cài xen phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*. Đột biến điểm có thể xảy ra ở các vị trí cặp bazơ 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131. Các đột biến điểm này có thể dẫn đến việc thay thế axit amin ở vị trí hoạt động hoặc vị trí gắn kết cơ chất của gen *spnK*.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào vật chủ biến đổi gen có thể tạo ra tiền chất spinetoram, trong đó tế bào vật chủ biến đổi gen này là tế bào vật chủ nhân sơ mà bình thường không tạo ra lượng đáng kể tiền chất spinetoram, bằng cách tạo ra cải biến ở gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O metyltransferaza. Các phương án thực hiện khác bao gồm phương pháp chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram bằng cách làm bất hoạt gen *spnK* trong khi vẫn duy trì gen tạo ra spinosyn J và L. Các phương pháp như vậy có thể bao gồm gây khuyết đoạn trong khung, đột biến điểm, khuyết đoạn và cài xen. Khuyết đoạn trong khung như vậy có thể bao gồm gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3' và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*. Khuyết đoạn có thể bao gồm gây khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*. Cài xen có thể bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit cài xen phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*. Đột biến điểm có thể xảy ra ở các vị trí cặp bazơ 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131. Các đột biến điểm này có thể dẫn đến việc thay thế axit amin ở vị trí hoạt động hoặc vị trí gắn kết cơ chất của gen *spnK*. Các phương pháp làm bất hoạt *spnK* khác có thể được thực hiện bằng cách thao tác di truyền ở vị trí gắn kết ribosom hoặc bằng cách thao tác di truyền ở trình tự khởi đầu phiên mã của gen *spnK*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 minh họa vị trí của đột biến điểm *spnK*. Đột biến được tô đậm trong trình tự kiểu đại của *spnK* (SEQ ID NO: 17).

FIG. 2 thể hiện bản đồ vật lý của *spnJ*, *spnK*, *spnL* và *spnM*. Các sản phẩm PCR tạo ra được thể hiện bằng các đường nằm dưới bản đồ nhiễm sắc thể.

FIG. 3 thể hiện sự hợp nhất của cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* trong vùng *spnLM* dưới dạng một tái tổ hợp tương đồng chéo theo một phương án thực hiện của sáng chế. (Dấu hoa thị thể hiện trình tự ghi mã không hoàn chỉnh của *spnJ* và *spnM*).

FIG. 4 minh họa thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của gen *spnK* theo một phương án thực hiện của sáng chế. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR thể hiện khuyết đoạn trong khung của gen *spnK*.

FIG. 5 thể hiện đồ thị của catxet cài xen chứa catxet của gen kháng apramycin trong khung (*aac(3)IV*) trong *spnK* theo một phương án thực hiện của sáng chế.

FIG. 6 thể hiện vị trí gắn kết ribosom (được ký hiệu là Shine-Dalgarno) được định vị trước trình tự ghi mã *spnK* theo một phương án thực hiện của sáng chế (SEQ ID NO:16). Trình tự này được tô đậm trong hình vẽ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Có nhiều mục đích sử dụng đối với AND tách dòng của *Saccharopolyspora spinosa*. Các gen tách dòng có thể được dùng để làm tăng hiệu suất của spinosyn và tạo ra spinosyn mới. Hiệu suất tăng có thể thu được bằng cách hợp nhất vào hệ gen của chủng cụ thể hai bản sao của gen đối với enzym bất kỳ đang giới hạn tốc độ trong chủng đó. Trong các trường hợp mà con đường sinh tổng hợp bị phong bế trong các chủng đột biến cụ thể do thiếu enzym theo yêu cầu, việc tạo ra spinosyn mong muốn có thể được khôi phục bằng cách hợp nhất bản sao của các gen theo yêu cầu. Tại nơi con đường sinh tổng hợp bị phá vỡ, chủng tiền chất khác nhau có thể được tạo ra. Đặc biệt hơn, việc phá vỡ gen *spnK* có thể dẫn đến quá trình tạo ra spinosyn J và L thay vì tạo ra spinosyn A và D.

Spinosyn mới có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các mảnh ADN tách dòng để phá vỡ các bước trong quá trình sinh tổng hợp spinosyn. Việc phá vỡ này có thể dẫn đến sự tích tụ của các tiền chất hoặc các sản phẩm "va chạm" ("shunt" products) (dẫn xuất của tiền chất được xử lý trong tự nhiên). Các mảnh này có thể dùng để thực hiện phá vỡ là các mảnh bên trong gen với các bazơ được bỏ đi từ cả các đầu 5' và 3' của gen cũng như toàn bộ hệ gen. Các trường hợp tái tổ hợp tương đồng dùng các mảnh như vậy dẫn đến việc tạo ra hai bản sao không hoàn chỉnh của gen: một bản sao bị mất các bazơ đã được bỏ đi từ đầu 5' và một bản sao mất các bazơ đã được bỏ đi từ đầu 3'. Số bazơ được bỏ đi ở mỗi đầu của mảnh phải đủ lớn để sao cho các bản sao không hoàn chỉnh của gen đều không giữ được hoạt tính.

Định nghĩa sau được dùng trong bản mô tả này và phải được viện dẫn để làm sáng tỏ yêu cầu bảo hộ và phần mô tả. Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các patent Mỹ và đơn yêu cầu cấp patent viện dẫn trong bản mô tả này được đưa vào bằng cách viện dẫn.

Khi được dùng trong bản mô tả này, các mạo từ không xác định "một" đứng trước một yếu tố hoặc hợp phần theo sáng chế được dự định đề cập không giới hạn phạm vi sáng chế đến số trường hợp (tức là, sự kiện) của yếu tố hoặc hợp phần. Vì vậy "một" cần phải được hiểu là bao gồm một hoặc ít nhất một, và dạng từ số ít này của

yếu tố hoặc hợp phần cũng bao gồm cả số nhiều trừ khi con số này có ý nghĩa rõ ràng là số ít.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “bao gồm” và “gồm” nghĩa là sự có mặt của các đặc điểm, các số nguyên, các bước, hoặc các hợp phần được nêu được viện dẫn trong yêu cầu bảo hộ, nhưng thuật ngữ này không hạn chế sự có mặt hoặc bổ sung một hoặc nhiều các đặc điểm, các số nguyên, các bước, các hợp phần hoặc nhóm của chúng khác. Điều đó có nghĩa là chế phẩm, hỗn hợp, quy trình, phương pháp, vật phẩm, hoặc dụng cụ “bao gồm” hoặc “gồm” danh mục của các yếu tố không chỉ giới hạn ở các yếu tố đó mà có thể bao gồm các yếu tố khác không được liệt kê một cách rõ ràng hoặc gắn liền với nó. Khi được dùng trong bản mô tả này, “hoặc” để chỉ bao gồm và loại trừ “hoặc”. Ví dụ, điều kiện A hoặc B thỏa mãn một trong các điều kiện bất kỳ sau: A là đúng (hoặc có mặt) và B là sai (hoặc không có mặt), A là sai (hoặc không có mặt) và B là đúng (hoặc có mặt), và cả A và B đều đúng (hoặc có mặt).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” để chỉ việc biến đổi số lượng của thành phần hoặc chất phản ứng theo sáng chế hoặc được dùng để chỉ sự thay đổi về định lượng bằng số có thể xảy ra, ví dụ, nhờ phép đo thông thường và các quy trình xử lý chất lỏng được dùng để điều chế chất cô đặc hoặc sử dụng dung môi trên thế giới; do sai số không chủ ý trong các quy trình này; do sự khác nhau về quá trình sản xuất, nguồn, hoặc độ tinh khiết của thành phần được dùng để điều chế chế phẩm hoặc thực hiện phương pháp; và các yếu tố tương tự. Thuật ngữ “khoảng” cũng bao hàm lượng khác do các điều kiện cân bằng khác nhau với chế phẩm thu được từ hỗn hợp ban đầu cụ thể. Dù có hay không biến đổi bởi thuật ngữ “khoảng” yêu cầu bảo hộ bao gồm các dạng tương đương với số lượng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “sáng chế” hoặc “sáng chế này” là thuật ngữ không giới hạn phạm vi sáng chế và được dự định bao hàm tất cả các thay đổi có thể như được mô tả trong phần mô tả và nêu trong yêu cầu bảo hộ.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “polypeptit” và “peptit” sẽ được dùng lẫn cho nhau để chỉ polyme của hai hoặc nhiều axit amin được nối cùng nhau bằng liên kết peptit. Theo một khía cạnh, thuật ngữ này cũng bao gồm các cải biến sau biểu hiện của polypeptit, ví dụ, glycosyl hoá, axetyl hóa, phosphoryl hoá và các quá trình tương tự. Các hợp chất bao gồm trong định nghĩa là, ví dụ, peptit chứa một hoặc nhiều chất tương tự của axit amin hoặc axit amin dán nhãn và chất bất chước peptit. Peptit có thể chứa L-axit amin.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “peptit được quan tâm”, “POI”, “sản phẩm gen”, “sản phẩm gen đích”, và “vùng mã hóa đích sản phẩm gen” để chỉ sản phẩm peptit/protein khác loài mong muốn được mã hóa bởi gen ngoại lai biểu hiện tái tổ hợp. Peptit được quan tâm có thể bao gồm sản phẩm peptit/protein bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein, các protein dung hợp, enzym, peptit, polypeptit, và oligopeptit. Peptit được quan tâm có kích thước chiều dài nằm trong khoảng từ 2 đến 398 axit amin.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “cấu trúc gen” dùng để chỉ một loạt các axit nucleic liên kế có thể dùng để điều hòa kiểu di truyền hoặc phenotip của sinh vật. Ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về cấu trúc gen bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phân tử axit nucleic, và khung đọc mở, gen, catxet biểu hiện, vật truyền, plasmit và các cấu trúc tương tự.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “gen nội sinh” dùng để chỉ gen tự nhiên ở vị trí tự nhiên của nó trong hệ gen của sinh vật.

Khi được dùng trong bản mô tả này, “gen ngoại lai” dùng để chỉ gen không được tìm thấy thông thường trong sinh vật chủ, mà được đưa vào sinh vật chủ bằng cách biến nạp gen. Gen ngoại lai có thể bao gồm gen tự nhiên được lồng vào sinh vật không tự nhiên, hoặc gen khảm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khác loài” đối với trình tự trong sinh vật/hệ gen cụ thể thể hiện rằng trình tự thu được từ các loài ngoại lai, hoặc, nếu từ cùng loài, về cơ bản được cải biến từ dạng tự nhiên của nó trong chế phẩm và/hoặc locut hệ gen bằng cách can thiệp sự can thiệp của con người. Do vậy, ví dụ, sự biểu hiện gen khác loại dùng để chỉ quy trình biểu hiện gen từ một sinh vật/hệ gen bằng cách đặt nó vào hệ gen của sinh vật/hệ gen khác nhau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tái tổ hợp” dùng để chỉ sự kết hợp nhân tạo của hai đoạn riêng rẽ khác của trình tự, ví dụ, bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách thao tác di truyền các đoạn phân lập của axit nucleic bằng kỹ thuật di truyền. “Thể tái tổ hợp” cũng bao gồm tế bào hoặc vật truyền, đã được cải biến bằng cách đưa vào axit nucleic khác loài hoặc tế bào có nguồn gốc từ tế bào được cải biến như vậy, nhưng không bao hàm việc sửa đổi tế bào hoặc vật truyền bởi trường hợp xuất hiện trong tự nhiên (ví dụ, đột biến tự phát, biến nạp tự nhiên, tải nạp tự nhiên, chuyển vị trí tự nhiên) như trường hợp xảy ra mà không can thiệp sự can thiệp của con người.

Thuật ngữ “được xử lý bằng kỹ thuật di truyền” hoặc “được sửa đổi về mặt di truyền” nghĩa là sửa đổi về mặt khoa học cấu trúc của vật liệu di truyền ở sinh vật sống. Nó bao gồm sự sản xuất và sử dụng tái tổ hợp ADN. Cụ thể hơn, nó được dùng để mô tả sinh vật được xử lý bằng kỹ thuật di truyền hoặc được cải biến từ sinh vật xuất hiện trong tự nhiên. Kỹ thuật di truyền có thể được thực hiện bằng một số kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thay thế gen, khuếch đại gen, phá vỡ gen, chuyển nhiễm, biến nạp bằng cách sử dụng các plasmit, virus, hoặc các vật truyền khác. Sinh vật biến đổi gen, ví dụ, vi sinh vật biến đổi gen, cũng thường được dùng để chỉ sinh vật tái tổ hợp, ví dụ, vi sinh vật tái tổ hợp.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bị phá vỡ” hoặc “sự phá vỡ” khi nói đến gen đã được thao tác di truyền bằng tay hoặc được cải biến nhờ kỹ thuật di truyền hoặc nhờ nguyên nhân tự nhiên làm thay đổi hoạt tính của gen. Hoạt tính gen như vậy có thể tăng hoặc giảm. Ngoài ra, việc phá vỡ này có thể khử bỏ chức năng của protein. Để tạo điều kiện thuận lợi việc giảm như vậy, số bản sao của gen có thể giảm, ví dụ, bằng cách dưới biểu hiện hoặc phá vỡ gen. Nói rằng gen “dưới biểu hiện” nếu mức phiên mã của gen này giảm so với gen kiểu dại. Mức phiên mã này có thể được đo bằng, ví dụ, phân tích thâm Northern định lượng lượng mARN dưới dạng chỉ thị đối với sự biểu hiện của gen. Khi được dùng trong bản mô tả này, gen là dưới biểu hiện nếu lượng của mARN sinh ra giảm ít nhất 1%, 2%, 5% 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% hoặc thậm chí nhiều hơn 500%, so với lượng mARN được sinh ra từ gen kiểu dại. Theo cách khác, trình tự khởi đầu phiên mã yếu có thể được dùng để định hướng sự biểu hiện của polynucleotit. Theo phương án thực hiện khác, trình tự khởi đầu phiên mã, vùng điều hòa và/hoặc vị trí gắn kết ribosom xuôi chiều của gen có thể được sửa đổi để đạt được sự biểu hiện giảm. Sự biểu hiện cũng có thể được giảm bằng cách làm giảm chu kỳ bán rã tương đối của ARN thông tin. Theo phương án thực hiện khác, hoạt tính của chính polypeptit có thể được giảm bằng cách sử dụng một hoặc nhiều đột biến trong trình tự axit amin polypeptit, làm giảm hoạt tính. Ví dụ, sửa đổi ái lực của polypeptit đối với cơ chất tương ứng của nó có thể dẫn đến việc làm hoạt tính giảm. Tương tự, chu kỳ bán rã tương đối của polypeptit có thể giảm. Trong trường hợp khác, sự biểu hiện của gen giảm hoặc hoạt tính giảm, việc giảm này có thể đạt được bằng cách sửa đổi thành phần của môi trường nuôi cấy tế bào và/hoặc các phương pháp được dùng để nuôi cấy. “Biểu hiện giảm” hoặc “hoạt tính giảm” khi được dùng trong bản mô tả này nghĩa là giảm ít nhất 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% hoặc

thậm chí nhiều hơn 500%, so với protein, polynucleotit, gen kiểu đại; hoặc hoạt tính và/hoặc nồng độ của protein có mặt trước khi polynucleotit hoặc polypeptit giảm. Hoạt tính của protein spnK cũng có thể được giảm bằng cách cho protein tiếp xúc với chất ức chế chung hoặc đặc hiệu của hoạt tính của nó. Các thuật ngữ “hoạt tính giảm”, “hoạt tính giảm hoặc khử bỏ” được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

“Trình tự kiểm soát” sự biểu hiện để chỉ chung trình tự khởi đầu phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, trình tự kết thúc phiên mã, miền điều hòa xuôi chiều, gen tăng cường, và các trình tự tương tự, cung cấp chung cho quá trình phiên mã và quá trình dịch mã của trình tự mã hoá trong tế bào vật chủ. Không phải tất cả các trình tự kiểm soát này luôn cần phải có mặt trong vật truyền tái tổ hợp chừng nào gen mong muốn có khả năng được phiên mã và được dịch mã.

“Tái tổ hợp” dùng để chỉ hợp nhất của các đoạn trình tự ADN hoặc ARN giữa hai phân tử ADN hoặc ARN. “Tái tổ hợp tương đồng” xảy ra giữa hai phân tử ADN lai hóa bởi vì trình tự nucleotit tương đồng hoặc bổ trợ có mặt trong mỗi phân tử ADN.

Các thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” hoặc “lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt” dùng để chỉ các điều kiện trong đó đầu dò sẽ lai hóa ưu tiên với đích của nó sau đó, và ở mức độ nhỏ hơn, hoặc không phải tất cả, với các trình tự khác. “Lai hóa nghiêm ngặt” và “các điều kiện rửa lai hóa nghiêm ngặt” trong nội dung các thử nghiệm lai hóa axit nucleic như lai hóa Southern và northern là độc lập về trình tự, và khác nhau trong các điều kiện thông số môi trường khác nhau. Hướng dẫn kỹ về lai hóa axit nucleic được tìm thấy trong Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probes assays*, Elsevier, New York. Nói chung, các điều kiện lai hóa và rửa nghiêm ngặt cao được chọn là khoảng 5°C thấp hơn nhiệt độ nóng chảy nhiệt (T_m) đối với trình tự đặc hiệu ở nồng độ ion và độ pH xác định. T_m là là nhiệt độ (trong điều kiện nồng độ ion và pH xác định) mà tại đó 50% trình tự đích lai hóa với đầu dò phù hợp hoàn toàn. Các điều kiện rất nghiêm ngặt được chọn là bằng T_m đối với đầu dò cụ thể.

Một ví dụ về các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt đối với lai hóa axit nucleic bổ trợ có hơn 100 gốc bổ trợ trên thiết bị lọc trong thấm Southern hoặc Northern là 50% formamit với 1mg heparin ở nhiệt độ 42°C, với lai hóa được thực hiện qua đêm. Một ví dụ về các điều kiện rửa nghiêm ngặt cao là 0,15 M NaCl ở nhiệt độ 72°C trong thời

gian khoảng 15 phút. Một ví dụ về các điều kiện rửa nghiêm ngặt là rửa 0,2xSSC ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 15 phút (Xem, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, để mô tả dung dịch đệm SSC). Thông thường, điều kiện rửa nghiêm ngặt cao được áp dụng trước điều kiện rửa nghiêm ngặt thấp để loại bỏ tín hiệu đầu dò nền. Một ví dụ về điều kiện rửa nghiêm ngặt trung bình cho sợi kép, ví dụ, có hơn 100 nucleotit, là 1xSSC ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 15 phút. Một ví dụ về điều kiện rửa nghiêm ngặt thấp cho sợi kép, ví dụ, có hơn 100 nucleotit, là 4xSSC ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 15 phút. Nói chung, tín hiệu độ ồn có tỷ lệ lớn hơn 2x (hoặc cao hơn) so với tín hiệu quan sát được đối với đầu dò không liên quan trong thử nghiệm lai hóa cụ thể thể hiện việc dò lai hóa đặc hiệu. Axit nucleic không lai hóa với nhau trong các điều kiện nghiêm ngặt về cơ bản vẫn giống nhau nếu polypeptit mà chúng mã hóa về cơ bản là giống nhau. Điều này xảy ra, ví dụ, khi bản sao của axit nucleic được tạo ra bằng cách sử dụng sự suy thoái codon tối đa được cho phép bởi mã di truyền.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit phân lập có thể lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt, tốt hơn là trong các điều kiện nghiêm ngặt cao, với polynucleotit theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lai hóa” được dự định để mô tả các điều kiện lai hóa và rửa mà trong đó trình tự nucleotit ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là nằm trong khoảng từ 85% đến 90%, tốt nhất là ít nhất 95% tương đồng với nhau thường duy trì lai hóa với nhau.

Theo một phương án thực hiện, axit nucleic theo sáng chế có mức tương đồng ít nhất là 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc nhiều hơn với trình tự axit nucleic được thể hiện trong đơn này hoặc dạng bổ trợ của nó.

Ví dụ khác không giới hạn phạm vi sáng chế về các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt là lai hóa trong 6x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C, tiếp đó là một hoặc nhiều lần rửa trong 1xSSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ 50°C, tốt hơn là ở nhiệt độ 55°C, tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 60°C và thậm chí tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 65°C.

Các điều kiện nghiêm ngặt cao có thể bao gồm việc ủ ở nhiệt độ 42°C trong khoảng thời gian vài ngày, như trong khoảng từ 2 đến 4 ngày, bằng cách sử dụng đầu

dò ADN dán nhãn như digoxigenin (DIG)-đầu dò ADN dán nhãn, tiếp đó là một hoặc nhiều lần rửa trong 2xSSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ trong phòng và một hoặc nhiều lần rửa trong 0,5xSSC, 0,1% SDS hoặc 0,1xSSC, 0,1% SDS ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65 đến 68°C. Cụ thể, các điều kiện nghiêm ngặt cao bao gồm, ví dụ, trong khoảng thời gian từ 2h đến 4 ngày ủ ở nhiệt độ 42°C bằng cách sử dụng đầu dò ADN dán nhãn DIG (được điều chế, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ dán nhãn DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Germany) trong dung dịch như dung dịch DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH) có hoặc không có 100µg/mL ADN tinh dịch cá hồi, hoặc dung dịch bao gồm 50% formamit, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisatrat), 0,02% natri dodecyl sulfat, 0,1% N-lauroylsarcosin, và 2% chất phản ứng phong bế (Roche Diagnostics GmbH), tiếp đó là rửa các bộ lọc hai lần trong khoảng thời gian từ 5 đến 15 phút trong 2xSSC và 0,1% SDS ở nhiệt độ trong phòng và sau đó rửa hai lần trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 phút trong 0,5xSSC và 0,1% SDS hoặc 0,1xSSC và 0,1% SDS ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65 đến 68°C.

Theo một số phương án thực hiện phân tử axit nucleic phân lập theo sáng chế lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt cao với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể tương ứng với phân tử axit nucleic xuất hiện trong tự nhiên. Khi được dùng trong bản mô tả này, phân tử axit nucleic “xuất hiện trong tự nhiên” dùng để chỉ phân tử ARN hoặc ADN có trình tự nucleotit xảy ra trong tự nhiên (ví dụ, mã hóa protein tự nhiên).

Người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ biết các điều kiện để áp dụng cho các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt và nghiêm ngặt cao. Hướng dẫn bổ sung liên quan đến các điều kiện như vậy là sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, trong Sambrook et al., 1989, *Phân tử Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; và Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Sequences in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.).

Mảnh ADN tách dòng chứa gen cho enzym sinh tổng hợp spinosyn có thể nhân đôi gen mã hóa cho enzym giới hạn tốc độ trong quá trình tạo ra spinosyn. Việc nhân đôi này có thể được dùng làm tăng hiệu suất trong trường hợp bất kỳ khi một trong số các hoạt tính mã hóa giới hạn quá trình tổng hợp spinosyn mong muốn. Đạt được hiệu suất của dạng này tăng trong quá trình lên men *Streptomyces fradiae* bằng cách nhân đôi gen mã hóa metyltransferaza giới hạn tốc độ chuyển hóa macrocin thành tylosin (Baltz et al., 1997).

Các hợp chất trung gian đặc hiệu (hoặc dẫn xuất tự nhiên của chúng) có thể được tổng hợp bằng các chủng đột biến của *S. spinosa* trong đó một số gen mã hóa enzym để sinh tổng hợp spinosyn đã bị phá vỡ. Các chủng như vậy có thể được tạo ra bằng cách hợp nhất, nhờ tái tổ hợp tương đồng, plasmit đột biến chứa một mảnh bên trong của gen đích. Khi hợp nhất plasmit, hai bản sao không hoàn chỉnh của gen sinh tổng hợp được tạo ra, nhờ đó khử bỏ chức năng enzym nó mã hóa. Cơ chất cho enzym này, hoặc một số dẫn xuất tự nhiên của chúng, sẽ tích tụ khi lên men chủng đột biến. Chủng này được dùng một cách hiệu quả để tạo ra chủng *Saccharopolyspora erythraea* tạo ra dẫn xuất 6-deoxyerytromyxin mới (Weber & McAlpine, 1992).

Các chủng như vậy có thể được tạo ra bằng cách trao đổi vùng đích, nhờ tái tổ hợp tương đồng chéo kép, với plasmit đột biến chứa mảnh mới giữa các trình tự không được gây đột biến ở bên sườn vùng đích. Gen lai hóa sẽ tạo ra protein có chức năng được sửa đổi, hoặc thiếu hoạt tính hoặc thực hiện biến nạp enzym mới. Dẫn xuất mới sẽ tích tụ khi lên men chủng đột biến. Chủng này được dùng để tạo ra chủng *Saccharopolyspora erythraea* tạo ra dẫn xuất novel anhydroerytromyxin mới (Donadio et al., 1993).

Gen sinh tổng hợp spinosyn và ORF liên quan được tách dòng và trình tự ADN của mỗi loại được xác định. Các gen tách dòng và ORF dưới đây được gọi là *spnA*, *spnB*, *spnC*, *spnD*, *spnE*, *spnF*, *spnG*, *spnH*, *spnI*, *spnJ*, *spnK*, *spnL*, *spnM*, *spnN*, *spnO*, *spnP*, *spnQ*, *spnR*, *spnS*, ORFL15, ORFL16, ORFR1, ORFR2, *S. spinosa gtt*, *S. spinosa gdh*, *S. spinosa epi*, và *S. spinosa kre*.

Saccharopolyspora spinosa tạo ra hỗn hợp gồm chín hợp chất có liên quan mật thiết được gọi chung là “spinosyn”. Trong hỗn hợp này, spinosyn A và D, được biết dưới dạng spinosad, là hợp phần chính và có hoạt tính cao nhất đối với đích côn trùng quan trọng. Spinosyn J và L, hai trong số các hợp phần phụ trong hỗn hợp spinosyn, là các tiền chất cho spinetoram, thuốc trừ sâu spinosyn thế hệ thứ hai. Các phương án theo sáng chế đề xuất sự chuyển hoá trực tiếp của chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram nhờ thao tác di truyền *spnK* mã hóa cho 3'-O-methyltransferaza.

Spinosad là thuốc trừ sâu do Dow AgroSciences (Indianapolis, Ind.) sản xuất chứa phần lớn là khoảng 85% spinosyn A và khoảng 15% spinosyn D. Spinosyn A và D là sản phẩm tự nhiên được tạo ra bởi quá trình lên men *Saccharopolyspora spinosa*, như được đề cập trong patent Mỹ số 5,362,634. Spinosad là hoạt chất của một số chế

phẩm trừ sâu mua được trên thị trường của Dow AgroSciences, bao gồm sản phẩm phòng trừ côn trùng TRACER™, SUCCESS™, SPINTOR™, và CONSERVE™. Ví dụ, sản phẩm TRACER chứa trong khoảng từ 44% đến 48% spinosad (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 4 pao spinosad cho mỗi galông. Các hợp chất spinosyn trong chế phẩm dạng hạt và chế phẩm dạng lỏng hữu dụng để phòng trừ nhện, giun tròn, và sâu bọ, cụ thể là loài cánh vảy, cánh tơ, và hai cánh. Trong bản mô tả này, Spinosyn A và D cũng được gọi là Spinosyn A/D.

Spinetoram là hỗn hợp của 5,6-đihydro-3'-etoxy spinosyn J (hợp phần chính) và 3'-etoxy spinosyn L do Dow AgroSciences sản xuất. Hỗn hợp này có thể được điều chế bằng cách etoxyl hóa hỗn hợp của spinosyn J và spinosyn L, tiếp đó là hydrogenation. Liên kết đôi ở vị trí 5,6 của spinosyn J và 3' etoxy của nó được hydro hóa nhiều hơn một cách dễ dàng so với liên kết đôi ở vị trí 5,6 của spinosyn L và dẫn xuất 3' etoxy của nó, do cản trở về mặt không gian bởi nhóm methyl ở C-5 trong spinosyn L và dẫn xuất 3' etoxy của nó. Xem patent Mỹ số 6,001,981. Trong bản mô tả này, Spinosyn J và L cũng được gọi là Spinosyn J/L.

Gần đây đã chứng minh được rằng *spnK* mã hóa cho 3'-O-methyltransferaza. Xem, Kim et al., *JACS*, 132(9): 2901-3 (2010). Các tác giả sáng chế đã thấy rằng *spnK* có thể được loại bỏ ra khỏi nhóm gen sinh tổng hợp spinosyn nhờ tái tổ hợp tương đồng chéo kép trong khung mà không gây hiệu ứng phân cực khi phiên mã các gen xuôi dòng *spnL* và *spnM*. Điều này cho phép chúng sản xuất spinosad được xử lý để tạo ra chủng sản xuất tiền chất spinetoram. Điều này cũng thể hiện rằng chủng tách gen *spnK* đã bị mất hoạt tính 3'-O methyltransferaza.

Các phương án theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* dẫn đến việc tạo ra một khuyết đoạn trong khung của gen *spnK* bằng cách loại bỏ một hoặc nhiều codon ở chủng sản xuất spinosad. Một khuyết đoạn trong khung của gen *spnK* có thể bao gồm việc cắt đứt bất kỳ phần bất kỳ của gen *spnK*. Khuyết đoạn trong khung theo sáng chế bao gồm gây khuyết đoạn loại bỏ đoạn trình tự mã hoá protein, vẫn giữ được khung đọc đúng sau khi khuyết đoạn. Một số các phương án theo sáng chế có thể bao gồm gây khuyết đoạn là “khuyết đoạn sạch”, tức là, chúng không chứa trình tự ADN ngoại sinh được lồng vào gen. Một khuyết đoạn trong khung của gen *spnK* có thể bao gồm việc loại bỏ vị trí bất kỳ từ 1 đến 397 axit amin. Nó có thể bao gồm việc loại bỏ codon khởi đầu. Nó có thể còn bao gồm việc loại bỏ miền bảo toàn bất kỳ hoặc vùng khởi đầu phiên mã bất kỳ.

Ký hiệu thông thường được dùng trong bản mô tả này để mô tả trình tự polynucleotit: đầu bên trái của trình tự polynucleotit sợi đơn là đầu 5'; hướng bên trái của trình tự polynucleotit sợi kép được dùng để chỉ hướng 5'. Hướng bổ sung nucleotit từ 5' đến 3' vào các bản sao ARN mới tạo ra được dùng để chỉ hướng phiên mã. Sợi ADN có cùng trình tự như mRNA được dùng để chỉ “sợi mã hóa”; trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như mRNA được phiên mã từ ADN đó và được định vị từ 5' đến đầu 5' của bản sao ARN được dùng để chỉ “trình tự xuôi chiều”; trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và là từ 3' đến đầu 3' của bản sao ARN mã hóa được dùng để chỉ “trình tự ngược dòng”.

Các phương án theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* dẫn đến việc tạo ra một khuyết đoạn trong khung đầu 5' của gen *spnK* bằng cách loại bỏ một hoặc nhiều codon ở chủng sản xuất spinosad. Các codon này có thể bao gồm trường hợp thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của codon ATG.

Các phương án theo sáng chế bổ sung có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* dẫn đến việc tạo ra một khuyết đoạn trong khung đầu 3' của gen *spnK* bằng cách loại bỏ một hoặc nhiều codon ở chủng sản xuất spinosad.

Các phương án thực hiện khác theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* trong khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*, một codon hoặc nhiều codon, trong khi rời khỏi cả đầu 5' và đầu 3' của gen nguyên vẹn.

Các phương án theo sáng chế bổ sung có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* bao gồm một hoặc nhiều đột biến điểm dẫn đến việc kết thúc phiên mã sớm hoặc thay thế axit amin ở nhiều vị trí bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vị trí hoạt tính và/hoặc ở vị trí gắn kết cơ chất. Một hoặc nhiều đột biến điểm như vậy có thể xảy ra trong motif gắn kết SAM, dẫn đến việc kết thúc sớm là ở vị trí hoạt động hoặc vị trí gắn kết cơ chất. Một hoặc nhiều đột biến điểm như vậy cũng có thể là ở vị trí tác động đến toàn bộ cấu trúc *SpnK* hoặc tác động đến việc cuộn xoắn đúng có thể khử bỏ chức năng *spnK*. Một hoặc nhiều đột biến điểm như vậy có thể được tạo ra nhờ việc dò hiện tượng đa hình theo chức năng hoặc bằng cách gây đột biến.

“Hiện tượng đa hình theo chức năng” khi được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ thay đổi trình tự cặp bazơ của gen tạo ra sự thay đổi định tính hoặc sự thay đổi định lượng hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen đó (ví dụ, thay đổi tính đặc hiệu của hoạt tính; thay đổi mức hoạt tính). Thuật ngữ “hiện tượng đa hình theo chức năng” bao gồm đột biến, khuyết đoạn và cài xen.

Nói chung, bước dò hiện tượng đa hình được quan tâm có thể được thực hiện bằng cách thu gom mẫu sinh học chứa ADN từ nguồn, và sau đó xác định sự có mặt hoặc không có mặt của ADN chứa hiện tượng đa hình được quan tâm trong mẫu sinh học.

Việc xác định sự có mặt hoặc không có mặt của ADN mã hóa đột biến cụ thể có thể được thực hiện bằng đầu dò oligonucleotit được đánh dấu bằng nhóm dò thích hợp, và/hoặc bằng phản ứng khuếch đại như phản ứng chuỗi polymeaza hoặc phản ứng chuỗi ligaza (sản phẩm của phản ứng khuếch đại sau đó được dò bằng đầu dò oligonucleotit được đánh dấu hoặc một số kỹ thuật khác). Ngoài ra, bước dò có thể bao gồm bước dò đối tượng là dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với đột biến cụ thể. Rất nhiều dạng thử nghiệm đầu dò oligonucleotit khác nhau đã biết có thể được dùng để thực hiện sáng chế. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,302,204 của Wahl et al.; patent Mỹ số 4,358,535 của Falkow et al.; patent Mỹ số 4,563,419 của Ranki et al.; và patent Mỹ số 4,994,373 của Stavrianopoulos et al.

Việc khuếch đại trình tự axit nucleic được chọn hoặc trình tự axit nucleic đích có thể được thực hiện bằng phương tiện thích hợp bất kỳ. Xem tổng quát trong Kwoh et al., Am. Biotechnol. Lab. 8, 14-25 (1990). Ví dụ về kỹ thuật khuếch đại thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng chuỗi polymeaza, phản ứng chuỗi ligaza, khuếch đại thay thế sợi (Xem tổng quát trong G. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396 (1992); G. Walker et al., nucleic acids Res. 20, 1691-1696 (1992)), sự khuếch đại trên cơ sở phiên mã (Xem D. Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177 (1989)), sao chép trình tự tự kéo dài (hoặc "3SR") (Xem J. Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878 (1990)), hệ sao chép Q ϕ (Xem P. Lizardi et al., BioTechnology 6, 1197-1202 (1988)), sự khuếch đại trên cơ sở trình tự axit nucleic (hoặc "NASBA") (Xem R. Lewis, Genetic Engineering News 12 (9), 1 (1992)), phản ứng chuỗi phục hồi (hoặc "RCR") (Xem R. Lewis, trên đây), và sự khuếch đại ADN phản hồi (hoặc "BDA") (Xem R. Lewis, trên đây). Phản ứng chuỗi polymeaza thường được ưu tiên.

Phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) có thể được thực hiện theo kỹ thuật đã biết. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; và 4,965,188. Nói chung, PCR bao gồm, trước tiên, xử lý mẫu axit nucleic (ví dụ, với sự có mặt của ADN polymeaza ổn định nhiệt) bằng một đoạn mồi oligonucleotit cho mỗi sợi của trình tự đặc hiệu được dò trong các điều kiện lai hóa sao cho sản phẩm kéo dài của mỗi đoạn

mỗi được tổng hợp bổ trợ với mỗi sợi axit nucleic, với đoạn mỗi bổ trợ đủ cho mỗi sợi của trình tự đặc hiệu để lai hóa với nó sao cho sản phẩm kéo dài này được tổng hợp từ mỗi đoạn mỗi, khi nó được tách khỏi dạng bổ trợ của nó, có thể dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp sản phẩm kéo dài của đoạn mỗi khác, và sau đó xử lý mẫu trong các điều kiện làm biến tính để tách sản phẩm kéo dài đoạn mỗi ra khỏi khuôn mẫu của chúng nếu trình tự hoặc các trình tự được dò có mặt. Các bước này được lặp lại theo chu trình cho đến khi thu được mức khuếch đại mong muốn. Việc dò trình tự khuếch đại có thể được thực hiện bằng cách thêm vào sản phẩm phản ứng một đầu dò oligonucleotit có khả năng lai hóa với sản phẩm phản ứng (ví dụ, một đầu dò oligonucleotit theo sáng chế), đầu dò mang nhãn dò, và sau đó dò nhãn phù hợp với kỹ thuật đã biết, hoặc bằng cách theo dõi trực tiếp bằng hình ảnh trên gel. Các đầu dò như vậy có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 5 đến 500 nucleotit, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 250, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 100 hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 50 axit nucleic. Khi các điều kiện PCR cho phép khuếch đại tất cả các dạng alen, các dạng này có thể được phân biệt bằng cách lai hóa với một đầu dò đặc hiệu alen, bằng cách phân cắt endonucleaza giới hạn, bằng cách điện di trên gel gradien biến tính, hoặc kỹ thuật khác.

Phản ứng chuỗi ligaza (LCR) cũng được thực hiện phù hợp với kỹ thuật đã biết. Xem, ví dụ, R. Weiss, Science 254, 1292 (1991). Nói chung, phản ứng được thực hiện bằng hai cặp đầu dò oligonucleotit: một cặp gắn kết với một sợi của trình tự được dò; cặp kia gắn kết với sợi kia của trình tự được dò. Mỗi cặp cùng trùng lặp hoàn toàn sợi mà nó phù hợp. Phản ứng được thực hiện bằng cách trước tiên, làm biến tính (ví dụ, tách) các sợi của trình tự được dò, sau đó cho các sợi phản ứng với hai cặp của đầu dò oligonucleotit với sự có mặt của ligaza ổn định nhiệt sao cho mỗi cặp của đầu dò oligonucleotit được nối cùng nhau, sau đó tách sản phẩm phản ứng, và sau đó thực hiện lặp lại theo chu trình quy trình cho đến khi trình tự được khuếch đại đến mức mong muốn. Sau đó, việc dò có thể được thực hiện theo cách giống như như được mô tả trên đây đối với PCR.

Kỹ thuật khuếch đại ADN nêu trên có thể bao gồm việc sử dụng đầu dò, cặp đầu dò, hoặc hai cặp đầu dò gắn kết đặc hiệu với ADN chứa hiện tượng đa hình theo chức năng, nhưng không gắn kết với ADN không chứa hiện tượng đa hình theo chức năng. Theo cách khác, đầu dò hoặc cặp đầu dò có thể gắn kết với ADN đều chứa và không chứa hiện tượng đa hình theo chức năng, nhưng tạo ra hoặc khuếch đại sản

phẩm (ví dụ, sản phẩm giãn dài) trong đó sự khác nhau có thể dò được có thể được xác định (ví dụ, sản phẩm ngắn hơn, trong đó hiện tượng đa hình theo chức năng là đột biến khuyết đoạn). Các đầu dò như vậy có thể được tạo ra phù hợp với kỹ thuật chuẩn từ các trình tự đã biết của ADN trong hoặc đi liền với gen được liên kết với *spnK* hoặc từ các trình tự có thể được sinh ra từ các gen như vậy phù hợp với kỹ thuật chuẩn.

Sẽ đánh giá được rằng bước dò được mô tả ở đây có thể được thực hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Các phương tiện xác định gián tiếp khác dạng alen bao gồm đo gen đánh dấu đa hình được liên kết với hiện tượng đa hình theo chức năng cụ thể, đã được chứng minh đối với số lượng thay đổi của các trình tự bazơ lặp lại (VNTR - variable number tandem repeats).

Sinh học phân tử bao gồm rất nhiều kỹ thuật để phân tích các trình tự axit nucleic và protein. Nhiều kỹ thuật trong số các kỹ thuật và phương pháp này tạo thành cơ sở của thử nghiệm và thử nghiệm chẩn đoán lâm sàng. Các kỹ thuật này bao gồm phân tích axit nucleic lai hóa, phân tích enzym giới hạn, phân tích trình tự gen, và tách và tinh chế axit nucleic và protein (Xem, ví dụ, J. Sambrook, E. F. Fritsch, và T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Phần lớn các kỹ thuật này bao gồm việc thực hiện rất nhiều thao tác (ví dụ, lấy nhỏ giọt, ly tâm, và điện di) trên số lượng lớn mẫu. Chúng thường phức tạp và tiêu tốn thời gian, và nói chung đòi hỏi độ chính xác cao. Nhiều kỹ thuật bị hạn chế trong ứng dụng của chúng do thiếu độ nhạy, tính đặc hiệu, hoặc độ tin cậy.

Phân tích axit nucleic lai hóa thường bao gồm việc dò số lượng rất nhỏ axit nucleic đích đặc hiệu (ADN hoặc ARN) với mức đầu dò AND dư, trong số lượng tương đối lớn axit nucleic không đích phức hợp. Việc làm giảm tính phức tạp của axit nucleic trong mẫu hữu ích cho việc dò số lượng bản sao thấp (tức là nằm trong khoảng từ 10,000 đến 100,000) của axit nucleic đích. Việc khử phức hợp ADN đạt được đến mức độ nhất định nhờ khuếch đại trình tự axit nucleic đích. (Xem, M. A. Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, 1990, Spargo et al., 1996, *Molecular & Cellular Probes*, liên quan đến sự khuếch đại SDA). Việc đạt được này là do sự khuếch đại axit nucleic đích dẫn đến một lượng trình tự axit nucleic đích vô cùng lớn đối với các trình tự không đích nhờ đó cải thiện bước lai hóa đích sau đó.

Bước lai hóa bao gồm bước đặt mẫu ADN đã chuẩn bị tiếp xúc với đầu dò báo cáo đặc hiệu ở các điều kiện cài đặt tối ưu cho sự lai hóa xảy ra giữa trình tự đích ADN và đầu dò. Lai hóa có thể được thực hiện dưới dạng bất kỳ trong một số dạng. Ví dụ, nhiều mẫu phân tích axit nucleic lai hóa được thực hiện trong nhiều thiết bị lọc và dạng nền rắn (Xem Beltz et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 100, Part et al., Eds., Academic Press, New York, Chapter 19, pp. 266-308, 1985). Một dạng, được gọi là lai hóa “thấm điểm” (dot blot), bao gồm gắn không cộng hóa trị ADN đích với thiết bị lọc tiếp đó là lai hóa sau đó với đầu dò được đánh dấu chất đồng vị phóng xạ. Lai hóa “thấm điểm” được ứng dụng rộng rãi trong hơn 2 thập kỷ qua với nhiều phiên bản được phát triển (Xem Anderson và Young, in *nucleic acids Hybridization--A Practical Approach*, Hames và Higgins, Eds., IRL Press, Washington, D.C. Chapter 4, pp. 73-111, 1985). Ví dụ, phương pháp thấm điểm được phát triển cho nhiều phân tích đột biến hệ gen (EPA 0228075 của Nanibhushan et al.) và dò các dòng vô tính trùng lặp và cấu trúc của bản đồ hệ gen (patent Mỹ số 5,219,726 của Evans).

Kỹ thuật bổ sung để thực hiện nhiều mẫu phân tích axit nucleic lai hóa bao gồm thiết bị đa thành phần vi dạng hoặc thiết bị ma trận (ví dụ, chip ADN) (Xem M. Barinaga, 253 *Science*, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 *Bio/Technology*, pp. 757-758, 1992). Các phương pháp này thường gắn trình tự ADN đặc hiệu với vùng đặc hiệu rất nhỏ của nền rắn, như vi lỗ chip ADN. Các dạng lai hóa này là phiên bản tỷ lệ nhỏ của hệ “thấm điểm” và hệ lai hóa “xăng đuych” thông thường.

Lai hóa dạng nhỏ có thể được dùng để thực hiện “sắp xếp trình tự bằng cách lai hóa” (SBH) (Xem M. Barinaga, 253 *Science*, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 *Bio/Technology*, pp. 757-758, 1992). SBH sử dụng tất cả các nucleotit oligome có thể (n-me) để xác định n-me trong mẫu ADN chưa biết, sau đó được sắp thẳng hàng bằng thuật toán phân tích để tạo ra trình tự ADN (Xem, Drmanac patent Mỹ số 5,202,231).

Có hai dạng để thực hiện SBH. Dạng thứ nhất bao gồm việc tạo ra rãnh chứa tất cả các n-me có khả năng trên nền, sau đó được lai hóa với trình tự đích. Dạng thứ hai bao gồm việc gắn trình tự đích với nền, sau đó được tạo đầu dò với tất cả các n-me có khả năng. Southern, (đơn yêu cầu cấp patent Anh số GB 8810400, 1988; E. M. Southern et al., 13 *Genomics* 1008, 1992), đề xuất sử dụng dạng thứ nhất để phân tích hoặc trình tự ADN. Southern đã nhận diện đột biến 1 điểm đã biết bằng cách sử dụng ADN bộ gen được khuếch đại bằng PCR. Southern cũng được mô tả phương pháp để tổng hợp rãnh chứa oligonucleotit trên nền rắn cho SBH. Drmanac et al., (260 *Science*

1649-1652, 1993), sử dụng dạng thứ hai cho một số trình tự ADN ngắn (116 bp). ADN đích được gắn vào nền màng (dạng “thấm điểm”). Mỗi thiết bị lọc sau đó được lai hóa với oligonucleotit 10-me và 1-me được dán nhãn 272. Khoảng rộng của các điều kiện nghiêm ngặt được sử dụng để đạt được lai hóa đặc hiệu cho mỗi đầu dò n-me. Thời gian rửa thay đổi trong khoảng từ 5 phút đến qua đêm bằng cách sử dụng nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 16°C. Phần lớn đầu dò đòi hỏi thời gian rửa là 3 giờ ở nhiệt độ 16°C. Các bộ lọc đã được phơi sáng trong khoảng thời gian từ 2 đến 18 giờ để dò các tín hiệu lai hóa.

Nói chung, nhiều các phương pháp có thể dùng để dò và phân tích gen lai hóa. Tùy thuộc vào nhóm chất báo cáo (flophore, enzym, chất đồng vị phóng xạ, v.v.) được dùng để đánh dấu đầu dò ADN, việc dò và phân tích được thực hiện bằng huỳnh quang, đo nhiệt lượng, hoặc bằng cách tự chụp phóng xạ. Bằng cách quan sát và đo phóng xạ phát ra, như phóng xạ huỳnh quang hoặc phát xạ hạt, thông tin có thể thu được về gen lai hóa. Thậm chí khi các phương pháp dò có độ nhạy trong rất cao, việc dò gen lai hóa gặp khó khăn do bởi nền sự có mặt nguyên liệu gắn kết không đặc hiệu. Do vậy, việc dò gen lai hóa tùy thuộc vào cách lai hóa đặc hiệu và nhạy có thể được thực hiện. Liên quan đến phân tích di truyền, một số phương pháp đã được phát triển để nỗ lực làm tăng tính đặc hiệu và độ nhạy.

Một dạng phân tích di truyền là phân tích tập trung vào việc giải thích hiện tượng đa hình của một axit nucleic hoặc (“các SNP”). Yếu tố thiên về việc sử dụng SNP là tính phong phú cao của chúng trong hệ gen của người (nhất là so với chuỗi lặp liên kề ngắn (short tandem repeat - STR)), vị trí thường xuyên của chúng trong mã hoá hoặc vùng điều hòa của gen (có thể tác động đến protein cấu trúc hoặc mức biểu hiện), và độ ổn định của chúng khi chuyển từ một thế hệ đến thế hệ tiếp theo (Landegren et al., *Genome Research*, Vol. 8, pp. 769-776, 1998).

SNP đã được xác định là vị trí bất kỳ trong hệ gen tồn tại trong hai biến thể và biến dị phổ biến nhất xảy ra nhỏ hơn 99% thời gian. Để sử dụng SNP làm chất đánh dấu gen phổ biến, có thể quyết định đối với kiểu di truyền của chúng một cách dễ dàng, nhanh chóng, chính xác, và hiệu quả về giá thành. Rất nhiều kỹ thuật hiện sẵn có để phân loại các SNP (để xem lại, xem Landegren et al., *Genome Research*, Vol. 8, pp. 769-776, (1998), tất cả các SNP này đều cần khuếch đại đích. Chúng bao gồm sắp xếp trình tự trực tiếp (Carothers et al., *BioTechniques*, Vol. 7, pp. 494-499, 1989), hiện tượng đa hình cấu trúc một sợi (Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 86, pp.

2766-2770, 1989), sự khuếch đại đặc hiệu alen (Newton et al., *Axit nucleic Research*, Vol. 17, pp. 2503-2516, (1989), phân cắt giới hạn (Day và Humphries, *Analytical Biochemistry*, Vol. 222, pp. 389-395, 1994), và thử nghiệm lai hóa. Trong dạng cơ bản nhất của chúng, thử nghiệm lai hóa hoạt động chức năng bằng cách phân biệt chất báo cáo oligonucleotit ngắn đối với các đích tương xứng và không tương xứng. Nhiều quy trình phỏng theo quy trình cơ bản đã được phát triển. Các quy trình này bao gồm phản ứng chuỗi nối (Wu và Wallace, *Gene*, Vol. 76, pp. 245-254, 1989) và sắp xếp trình tự nhỏ (Syvanen et al., *Genomics*, Vol. 8, pp. 684-692, 1990). Các quy trình cải tiến khác bao gồm việc sử dụng hoạt tính 5'-nucleaza của Taq ADN polymeaza (Hollvà et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, pp. 7276-7280, 1991), chất hướng dẫn phân tử (Tyagi và Kramer, *Nature Biotechnology*, Vol. 14, pp. 303-308, 1996), đường cong biến tính do nhiệt (Howell et al., *Nature Biotechnology*, Vol. 17, pp. 87-88, 1999) và “chip” ADN (Wang et al., *Science*, Vol. 280, pp. 1077-1082, 1998).

Một hiện tượng nữa có thể được dùng để phân biệt SNP là năng lượng tương tác axit nucleic hoặc năng lượng co cụm bazơ có nguồn gốc từ lai hóa nhiều đầu dò đặc hiệu đích với một đích. (Xem, R. Ornstein et al., “An Optimized Potential Function for the Calculation of Nucleic Acid Interaction Energies,” *Biopolymes*, Vol.17, 2341-2360 (1978); J. Norberg và L. Nilsson, *Biophysical Journal*, Vol. 74, pp. 394-402, (1998); và J. Pieters et al., *Nucleic Acid Research*, Vol. 17, no. 12, pp. 4551-4565 (1989)). Hiện tượng co cụm bazơ được dùng trong dạng duy nhất trong sáng chế này để thu được sự biệt hóa có Tm nhạy cao cho phép dò trực tiếp các SNP trong mẫu axit nucleic.

Các phương pháp bổ sung đã được dùng để phân biệt trình tự axit nucleic trong các sinh vật liên quan hoặc trình tự ADN. Ví dụ, patent Mỹ số 5,030,557 của Hogan et al. mô tả rằng cấu trúc bậc hai và bậc ba của axit nucleic một sợi đích có thể được tác động bằng cách gắn kết oligonucleotit “trợ giúp” ngoài oligonucleotit “đầu dò” tạo ra Tm cao hơn giữa đầu dò và axit nucleic đích. Tuy nhiên, patent này bị hạn chế ở chỗ phương pháp của nó chỉ sử dụng năng lượng lai hóa để sửa đổi cấu trúc bậc hai và bậc ba của các sợi ARN tự gắn mỗi, mà nếu không được sửa đổi sẽ có xu hướng ngăn ngừa đầu dò lai hóa với đích.

Liên quan đến việc sắp xếp trình tự ADN, K. Khrapko et al., *Federation của European Biochemical Societies Letters*, Vol. 256, no. 1,2, pp. 118-122 (1989), ví dụ, mô tả rằng lai hóa co cụm liên tục dẫn đến sự ổn định kép. Ngoài ra, J. Kieleczawa et

al., Science, Vol. 258, pp. 1787-1791 (1992), mô tả việc sử dụng các sợi hexame liên kết để môi ADN tổng hợp trong đó các sợi liên kết này xem ra làm ổn định quá trình môi. Tương tự, L. Kotler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, pp. 4241-4245, (1993) mô tả trình tự tính đặc hiệu trong việc môi phản ứng sắp xếp trình tự ADN bằng cách sử dụng modul oligonucleotit hexame và pentame. Ngoài ra, S. Parinov et al., Nucleic Acids Research, Vol. 24, no. 15, pp. 2998-3004, (1996), mô tả việc sử dụng co cụm bazơ oligome để sắp xếp trình tự ADN kết hợp với chip sắp xếp trình tự AND thụ động. Ngoài ra, G. Yershov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 4913-4918 (1996), mô tả ứng dụng của năng lượng co cụm bazơ trong SBH trên vi chip thụ động. Trong ví dụ của Yershov, đầu dò ADN 10 me được bám chặt với bề mặt của vi chip và lai hóa với các trình tự đích kết hợp với đầu dò ngắn bổ sung, sự kết hợp của các đầu dò này được xem là để làm ổn định đầu dò gắn kết. Trong dạng này, có thể giải thích các đoạn ngắn của trình tự axit nucleic để sắp xếp trình tự ADN. Yershov còn lưu ý rằng trong hệ của họ hiệu ứng mất ổn định của sự không tương xứng được tăng lên bằng cách sử dụng đầu dò ngắn hơn (ví dụ, 5-me). Sử dụng các đầu dò ngắn như vậy để sắp xếp trình tự ADN tạo ra khả năng để phân biệt sự không tương xứng cùng trình tự đã dò chứ không phải là sự không tương xứng ở một vị trí đặc hiệu của phức hợp lai hóa đầu dò/đích. Sử dụng đầu dò dài hơn (ví dụ, các oligo 8-me, 10-me, và 13-me) ít chức năng hơn đối với các mục đích như vậy.

Một ví dụ nữa về phương pháp sử dụng sự co cụm bazơ trong phân tích axit nucleic bao gồm phương pháp được đề cập trong patent Mỹ số 5,770,365 của Lane et al., trong đó sáng chế này mô tả phương pháp này giữ axit nucleic đích bằng cách sử dụng đầu dò giữ đơn phân tử có vòng sợi đơn và vùng sợi kép tác động kết hợp cùng với đích gắn kết để làm ổn định sự tạo thành sợi kép nhờ năng lượng co cụm.

Trình tự nucleotit có thể là một cách thuận tiện được cải biến bằng cách gây đột biến vị trí trực tiếp phù hợp với các phương pháp thông thường. Theo cách khác, trình tự nucleotit có thể được điều chế bằng cách tổng hợp hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng thiết bị tổng hợp oligonucleotit, trong đó oligonucleotit được thiết kế tính theo trình tự axit amin của polypeptit mong muốn, và tốt hơn là chọn lọc các codon này được ưu tiên trong tế bào vật chủ trong đó polypeptit tái tổ hợp sẽ được tạo ra.

Spinosyn mới cũng có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến các gen tách dòng, và thay thế gen đột biến cho dạng tương ứng không đột biến của chúng ở sinh

vật sản xuất spinosyn. Việc gây đột biến có thể bao gồm, ví dụ: 1) gây khuyết đoạn hoặc làm bất hoạt miền KR, DH hoặc ER sao cho một hoặc nhiều chức năng này bị phong bế và chúng tạo ra spinosyn có nhân lacton với liên kết đôi, nhóm hydroxyl, hoặc nhóm keto không có mặt trong nhân của spinosyn A (Xem Donadio et al., 1993); 2) thay thế miền AT sao cho axit carboxylic khác nhau được đưa vào trong nhân lacton (Xem Ruan et al., 1997); 3) bổ sung miền KR, DH, hoặc ER vào môđun PKS hiện tại sao cho chúng tạo ra spinosyn có nhân lacton với liên kết bão hoà, nhóm hydroxyl, hoặc liên kết đôi không có mặt trong nhân của spinosyn A; hoặc 4) cộng hoặc trừ môđun PKS hoàn chỉnh sao cho nhân lacton vòng có số nguyên tử cacbon nhiều hơn hoặc ít hơn. PKS lai hóa có thể được tạo ra bằng cách thay thế miền tại spinosyn PKS bằng miền tại PKS khác loài. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,626,010. Cũng lưu ý rằng spinosyn nhờ cải biến đường được gắn vào khung spinosyn lacton có thể bao gồm các cải biến gốc rhamnoza và/hoặc forosamin hoặc gắn kết của đường deoxy khác nhau. Nhóm Salas ở Tây Ban Nha đã chứng minh được rằng các hợp chất polyketit mới có thể được tạo ra bằng cách thay thế phân tử đường hiện tại bằng các phân tử đường khác nhau. Rodriguez et al. J. Mol. Microbiol Biotechnol. 2000 Jul;2(3):271-6. Các ví dụ sau giúp minh họa việc sử dụng gây đột biến để tạo ra spinosyn với tính năng cải biến.

ADN từ vùng có cụm gen spinosyn có thể được dùng dưới dạng đầu dò lai hóa để xác định các trình tự tương đồng. Do vậy, ADN được tách dòng theo sáng chế có thể được dùng để định vị các plasmit bổ sung từ thư viện gen *Saccharopolyspora spinosa* trùng lặp vùng được mô tả trong bản mô tả này mà còn chứa ADN không tách dòng trước đó từ các vùng liên kề trong hệ gen của *Saccharopolyspora spinosa*. Ngoài ra, ADN từ vùng được tách dòng theo sáng chế có thể được dùng để xác định các trình tự không giống nhau nhưng tương tự ở các sinh vật khác. Đầu dò lai hóa thường có chiều dài ít nhất khoảng 20 bazơ và được dán nhãn để cho phép dò.

Kiểu gây đột biến khác nhau có thể được dùng theo sáng chế nhằm nhiều mục đích. Chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp hướng vào vị trí, gây đột biến điểm ngẫu nhiên, tái tổ hợp tương đồng, dịch chuyển ADN hoặc các phương pháp gây đột biến đệ quy khác, cấu trúc khảm, gây đột biến bằng cách sử dụng uraxil chứa khuôn mẫu, gây đột biến hướng oligonucleotit, gây đột biến ADN được cải biến phosphorothioat, việc gây đột biến bằng cách sử dụng ADN kép có khe hoặc các phương pháp tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Các phương pháp bổ sung thích hợp bao gồm phục hồi không tương xứng điểm, gây đột biến bằng cách sử dụng chúng

vật chủ phục hồi không hoàn toàn, chọn lọc giới hạn và tinh chế giới hạn, gây đột biến khuyết đoạn, gây đột biến bằng cách tổng hợp toàn bộ gen, phục hồi đứt gãy sợi kép, và các phương pháp tương tự. Việc gây đột biến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên quan đến các cấu trúc khảm, cũng nằm trong phạm vi sáng chế. Theo một phương án thực hiện, việc gây đột biến có thể được chỉ dẫn bởi những thông tin đã biết về các phân tử xuất hiện trong tự nhiên hoặc các phân tử đã sửa đổi hoặc đột biến xuất hiện trong tự nhiên, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự, so sánh trình tự, các đặc tính vật lý, cấu trúc tinh thể hoặc các thông tin tương tự.

Nội dung và ví dụ mô tả về các phương pháp này được đề cập trong bản mô tả này. Thông tin bổ sung được tìm thấy trong các ấn phẩm và tài liệu viện dẫn được nêu trong: Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462(1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201(1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); *Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high

frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Point Mismatch Repair, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakamar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et

al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001). W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); and, I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995). Các thông tin chi tiết hơn nữa về các phương pháp nêu trên có thể tìm thấy trong Methods in Enzymology Volume 154, cũng được mô tả có thể dùng để kiểm soát các vấn đề rắc rối của các phương pháp gây đột biến khác nhau.

Các thuật ngữ “mức tương đồng” hoặc “phần trăm đồng nhất” được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Nhằm mục đích sáng chế này, đã xác định trong bản mô tả rằng để xác định phần trăm tương đồng của hai trình tự axit amin hoặc hai trình tự axit nucleic, các trình tự này được sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khe hở có thể được đưa vào trong trình tự của axit amin hoặc trình tự axit nucleic thứ nhất để sắp xếp thẳng hàng tối ưu trình tự của axit amin hoặc trình tự axit nucleic thứ hai). Gốc axit amin hoặc nucleotit ở các vị trí axit amin tương ứng hoặc vị trí nucleotit sau đó được so sánh. Khi vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm bởi cùng gốc axit amin hoặc nucleotit như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử này là đồng nhất ở vị trí đó. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số vị trí đồng nhất chia cho các trình tự (tức là, % đồng nhất = số vị trí đồng nhất / tổng số vị trí (tức là, vị trí trùng lặp x 100)). Tốt hơn là, hai trình tự có cùng chiều dài.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng một số chương trình máy tính khác nhau có thể dùng để xác định mức tương đồng giữa hai trình tự. Ví dụ, so sánh các trình tự và xác định của phần trăm đồng nhất giữa hai các trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán chính xác. Theo một phương án thực hiện được ưu tiên, phần trăm đồng nhất giữa hai axit amin các trình tự được xác định bằng cách sử dụng thuật toán the Needleman và Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) được đưa vào trong chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (sẵn có trên internet ở trang web của accelrys, cụ thể là ở trang <http://www.accelrys.com>), bằng cách sử dụng ma trận Blossom 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng lượng khe là 16, 14, 12, 10, 8, 6 hoặc 4 và trọng lượng chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng tất cả các thông số khác nhau này sẽ dẫn đến thu được kết quả hơi khác nhau nhưng tất cả phần trăm đồng nhất của hai trình tự không bị sửa đổi đáng kể khi sử dụng thuật toán khác nhau.

Theo phương án thực hiện khác, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (sẵn có trên internet ở trang web của accelrys, cụ thể là ở trang <http://www.accelrys.com>),

bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và trọng lượng khe là 40, 50, 60, 70 hoặc 80 và trọng lượng chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Theo phương án thực hiện khác, phần trăm đồng nhất giữa hai axit amin hoặc trình tự nucleotit được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989) được đưa vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) (sẵn có trên internet ở trang web của vega, cụ thể là ALIGN – IGH Montpellier, hoặc cụ thể là ở <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) bằng cách sử dụng bảng gốc trọng lượng PAM120, điểm phạt chiều dài khe là 12 và điểm phạt là 4.

Các trình tự axit nucleic và protein theo sáng chế có thể còn được sử dụng làm “trình tự truy vấn” để thực hiện tra cứu đối với dữ liệu cơ sở chung để, ví dụ, nhận diện các thành viên của họ khác hoặc các trình tự có liên quan. Các tra cứu như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTN và BLASTX (phiên bản 2,0) của Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Tra cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTN, điểm=100, chiều dài từ=12 để thu được trình tự nucleotit tương đồng với phân tử axit nucleic theo sáng chế. Tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTX, điểm=50, chiều dài từ=3 để thu được axit amin các trình tự tương đồng với phân tử protein theo sáng chế. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có khe nhằm mục đích so sánh, Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul et al., (1997) Nucleic Acid Res. 25 (17): 3389-3402. Khi dùng chương trình BLAST và Gapped BLAST, các thông số mặc định của chương trình tương ứng (ví dụ, BLASTX và BLASTN) có thể được dùng. (sẵn có trên internet ở trang web của NCBI, cụ thể là ở trang <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Các phương án thực hiện khác theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* có thể bao gồm một hoặc nhiều khuyết đoạn bazơ nucleotit có thể phá vỡ khung đọc bình thường của *spnK*. Khuyết đoạn như vậy có thể bao gồm vị trí bất kỳ từ 1 đến 1194 nucleotit. Khuyết đoạn như vậy tác động đến khung đọc bình thường của *spnK* dẫn đến việc tạo ra chủng sản xuất tiền chất spinetoram.

Phương án thực hiện khác theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* có thể bao gồm một hoặc nhiều đoạn cài xen nucleotit trong vùng ghi mã *spnK* phá vỡ khung đọc bình thường của *spnK*. Đoạn cài xen như vậy tác động đến khung đọc bình thường của *spnK* dẫn đến việc tạo ra chủng sản xuất tiền chất spinetoram.

Các phương án theo sáng chế bổ sung có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* bao gồm việc sử dụng kỹ thuật đối nghĩa hoặc có nghĩa để khử bỏ hoặc tác động đáng kể đến việc tạo ra protein *spnK*. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ biết cách để đạt được hiệu ứng đối nghĩa và đồng ức chế. Ví dụ, phương pháp đồng ức chế đã được mô tả trong Jorgenen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui và Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Vì vậy, sáng chế còn đề xuất các phương pháp làm câm gen, bằng cách biểu hiện ở sinh vật như *S. spinosa*, axit nucleic có đoạn lặp đảo 5' hoặc 3' với trình tự đích có nghĩa hoặc đối nghĩa, trong đó trình tự đích có nghĩa hoặc đối nghĩa này trình tự gần như đồng nhất với gen đích bị ức chế, nhưng đoạn lặp đảo này không có liên quan về trình tự với gen đích. Theo phương án thực hiện khác, đoạn lặp đảo khác loài được đặt bên sườn bởi trình tự đích 5' và 3'.

Cấu trúc làm câm gen có thể được biểu hiện trong sinh vật được chọn, ví dụ, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nhân thật, ví dụ, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật có vú.

Vật truyền biểu hiện thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm vật truyền nhân sơ và nhân thật (ví dụ, plasmid, phagemid, hoặc thể thực khuẩn), bao gồm vật truyền động vật có vú và vật truyền thực vật. Vật truyền nhân sơ thích hợp bao gồm các plasmid như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vật truyền thường được sử dụng để thao tác di truyền ADN ở *Actinomyces*, (ví dụ pSET152, pOJ260, pIJ101, pJV1, pSG5, pHJL302, pSAM2, pKC1250. Các plasmid như vậy được mô tả bởi Kieser et al. ("Practical Streptomyces Genetics," 2000). Các vật truyền khác thích hợp có thể bao gồm các plasmid như các plasmid có khả năng sao chép ở *E. coli* (ví dụ, pBR322, ColE1, pSC101, PACYC 184, itVX, pRSET, pBAD (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) và các vật truyền tương tự). Các plasmid như vậy được mô tả bởi Sambrook (tài liệu "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)) và nhiều vật truyền như vậy mua được trên thị trường. Các plasmid *Bacillus* bao gồm pC194, pC221, pT127, và các plasmid tương tự, và được mô tả bởi Gryczan (In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), pp. 307-329). Các plasmid *Streptomyces* thích

hợp bao gồm pli101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169:4177-4183, 1987), và thể thực khuẩn *Streptomyces* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ψ C31 (Chater et al., In: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54). Các plasmid *Pseudomonas* được John et al. xem xét (Rev. Infect. Dis. 8:693-704, 1986), và Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 33:729-742, 1978).

Việc ức chế sự biểu hiện của gen cụ thể là công cụ quan trọng cho cả nghiên cứu và phát triển của sinh vật biến đổi gen phù hợp hơn nữa với mục đích cụ thể. Việc làm câm gen có thể được thực hiện bằng cách đưa vào gen chuyển tương ứng với gen được quan tâm theo hướng đối nghĩa với trình tự khởi đầu phiên mã của nó (Xem, ví dụ, Sheehy et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:8805-8808 (1988); Smith et al., Nature 334:724-726 (1988)), hoặc theo hướng có nghĩa với trình tự khởi đầu phiên mã của nó (Napoli et al., Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krol et al., Plant Cell 2:291-299 (1990); patent Mỹ số 5,034,323; patent Mỹ số 5,231,020; và patent Mỹ số 5,283,184), cả hai cách này đều dẫn đến sự biểu hiện giảm của gen chuyển cũng như gen nội sinh.

Đã được thông báo việc làm câm gen sau phiên mã đi liền với sự tích tụ các mảnh nhỏ (từ 20 đến 25 nucleotit) của ARN đối nghĩa, có thể được tổng hợp từ khuôn mẫu ARN và có thành phần xác định tính đặc hiệu và tính chuyển động của quy trình (Hamilton & Baulcombe, Science 286:950-952 (1999)). Rõ ràng là trong số sinh vật việc đưa vào dsARN (ARN sợi kép) là thành phần quan trọng dẫn đến việc làm câm gen (Fire et al., Nature 391:806-811 (1998); Timmons & Fire, Nature 395:854 (1998); WO99/32619; Kennerdell & Carthew, tế bào 95:1017-1026 (1998); Ngo et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998); Waterhouse et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:13959-13964 (1998); WO99/53050; Cogoni & Macino, Nature 399:166-169 (1999); Lohmann et al., Dev. Biol. 214:211-214 (1999); Sanchez-Alvarado & Newmark, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96:5049-5054 (1999)). Ở vi khuẩn gen ức chế không cần phải là gen vi khuẩn nội sinh vì cả gen chuyển báo cáo lẫn gen virus đều là đối tượng để làm câm gen sau phiên mã bằng gen chuyển được đưa vào (English et al., Plant Cell 8:179-188 (1996); Waterhouse et al, trên đây). Tuy nhiên, trong tất cả các trường hợp nêu trên, một vài mức tương tự về trình tự có thể được ưu tiên giữa gen chuyển được đưa vào và gen được ức chế.

Trong các ví dụ trước, việc đưa vào gen chuyển có nghĩa chứa 5'-UTR ("vùng chưa dịch mã"), vùng mã hóa và 3'-UTR của gen ACC oxidaza trong điều kiện kiểm

soát trình tự khởi đầu phiên mã CaMV 35S dẫn đến hoạt tính enzym ACC oxidaza giảm 15% trong quần thể cây cà chua (Hamilton et al., Plant J. 15:737 746 (1998); WO98/53083). Tuy nhiên, nếu đoạn lặp đảo và có nghĩa của một phần 5'-UTR của ACC oxidaza này chứa trong cấu trúc, sự ức chế quan sát được là 96% ở thực vật (Hamilton et al., trên đây). Ngoài ra, sự ức chế của gen ACC oxidaza khác liên quan đến trình tự với vùng mã hóa của gen chuyển chứ không phải với 5'-UTR của gen chuyển được ức chế, cho thấy ARN sợi kép của phần phiên mã bất kỳ hướng đích toàn bộ phiên mã ARN để làm suy biến. Ngoài ra, việc làm câm gen sau phiên mã tần số cao và mức độ cao đã được phát hiện bằng cách đưa vào cấu trúc chứa đoạn lặp đảo của vùng mã hóa của virus hoặc gen thông tin, hoặc bằng cách lai chéo cùng thực vật biểu hiện các bản sao có nghĩa và đối nghĩa của vùng mã hóa của gen đích (Waterhouse et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:13959 13964 (1998)). Các kết quả tương tự thu được bằng cách biểu hiện gen chuyển có nghĩa và đối nghĩa trong điều kiện kiểm soát các trình tự khởi đầu phiên mã khác nhau trong cùng thực vật (Chuang & Meyerowitz, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:4985 4990 (2000)).

Các phương án thực hiện khác theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* bao gồm làm câm gen. Cụm từ “làm câm gen” dùng để chỉ quy trình trong đó sự biểu hiện của sản phẩm gen đặc hiệu được làm giảm đi hoặc được làm yếu đi. Quy trình làm câm gen có thể xảy ra theo nhiều con đường. Trừ khi có chỉ dẫn khác, khi được dùng trong bản mô tả này, việc làm câm gen dùng để chỉ việc làm giảm sự biểu hiện sản phẩm gen tạo ra từ quá trình can thiệp ARN (ARNi), đã được xác định, mặc dù con đường có đặc trưng một phần nhờ đó ARN can thiệp có kích thước nhỏ (siARN) tác động phối hợp với các protein vật chủ (ví dụ, phức hợp làm câm cảm ứng ARN, RISC) để làm suy biến ARN thông tin (mARN) trong kiểu phụ thuộc trình tự. Mức độ làm câm gen có thể được đo bằng nhiều cách, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đo mức độ phiên mã bằng phân tích thắm Northern, kỹ thuật B-ADN, cấu trúc báo cáo có nghĩa phiên mã, xác định đặc tính biểu hiện (ví dụ, chip ADN), và các kỹ thuật có liên quan. Theo cách khác, mức làm câm có thể được đo bằng cách đánh giá mức protein được mã hóa bởi gen đặc hiệu. Việc đo này có thể được thực hiện bằng cách thực hiện một số nghiên cứu bao gồm phân tích Western, đo mức độ biểu hiện của protein báo cáo có, ví dụ, đặc tính phát huỳnh quang (ví dụ, GFP) hoặc hoạt tính enzym (ví dụ, kiểm phosphataza), hoặc một vài phương pháp khác.

Các phương án bổ sung bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin ở vị trí hoạt động hoặc vị trí gắn kết cơ chất của gen *spnK* làm bất hoạt gen *spnK* và dẫn đến tạo ra spinosyn J/L. Nói chung, người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng khuyết đoạn hoặc thay thế nhỏ có thể thực hiện được với các trình tự axit amin của peptit theo sáng chế mà không gây tác động bất lợi quá mức đến hoạt tính của chúng. Do vậy, các protein và peptit chứa các khuyết đoạn hoặc thay thế như vậy là khía cạnh khác nữa theo sáng chế. Ở peptit chứa thay thế hoặc đoạn thay thế của axit amin, một hoặc nhiều axit amin của trình tự peptit có thể được thay bằng một hoặc nhiều axit amin khác trong đó thay thế như vậy không tác động đến chức năng của trình tự đó. Những thay đổi như vậy có thể được chỉ dẫn bởi những dấu hiệu tương tự đã biết giữa các axit amin về các dấu hiệu vật lý như mật độ tích điện, tính kỵ nước/tính ưa nước, kích thước và cấu hình, sao cho axit amin được thế bằng axit amin khác về cơ bản có các đặc tính chức năng giống nhau. Ví dụ: Ala có thể thay bằng Val hoặc Ser; Val có thể thay bằng Ala, Leu, Met, hoặc Ile, tốt hơn là Ala hoặc Leu; Leu có thể thay bằng Ala, Val hoặc Ile, tốt hơn là Val hoặc Ile; Gly có thể thay bằng Pro hoặc Cys, tốt hơn là Pro; Pro có thể thay bằng Gly, Cys, Ser, hoặc Met, tốt hơn là Gly, Cys, hoặc Ser; Cys có thể thay bằng Gly, Pro, Ser, hoặc Met, tốt hơn là Pro hoặc Met; Met có thể thay bằng Pro hoặc Cys, tốt hơn là Cys; His có thể thay bằng Phe hoặc Gln, tốt hơn là Phe; Phe có thể thay bằng His, Tyr, hoặc Trp, tốt hơn là His hoặc Tyr; Tyr có thể thay bằng His, Phe hoặc Trp, tốt hơn là Phe hoặc Trp; Trp có thể thay bằng Phe hoặc Tyr, tốt hơn là Tyr; Asn có thể thay bằng Gln hoặc Ser, tốt hơn là Gln; K₂Gln có thể thay bằng His, Lys, Glu, Asn, hoặc Ser, tốt hơn là Asn hoặc Ser; Ser có thể thay bằng Gln, Thr, Pro, Cys hoặc Ala; Thr có thể thay bằng Gln hoặc Ser, tốt hơn là Ser; Lys có thể thay bằng Gln hoặc Arg; Arg có thể thay bằng Lys, Asp hoặc Glu, tốt hơn là Lys hoặc Asp; Asp có thể thay bằng Lys, Arg, hoặc Glu, tốt hơn là Arg hoặc Glu; và Glu có thể thay bằng Arg hoặc Asp, tốt hơn là Asp. Khi đã thực hiện, các thay đổi có thể được sàng lọc thông thường để xác định hiệu quả của chúng đối với chức năng.

Các phương án thực hiện khác theo sáng chế có thể bao gồm thao tác di truyền ở gen *spnK* bao gồm thao tác di truyền ở vị trí gắn kết ribosom (RBS). Vị trí gắn kết ribosom (được ký hiệu là Shine-Dalgarno), được định vị xuôi chiều của trình tự ghi mã *spnK*, có thể được thao tác di truyền bằng tay sao cho gen *spnK* bị phá vỡ dẫn đến tạo ra chủng sản xuất tiền chất spinetoram.

Các phương án theo sáng chế bổ sung có thể bao gồm ức chế bằng enzym tác động đến nhiều con đường tạo tín hiệu cho gen *spnK* có thể dẫn đến việc tạo ra chủng sản xuất spinetoram. Các phương pháp dò hoạt tính enzym được đi liền với đích có thể bao gồm việc sử dụng thử nghiệm gắn kết enzym.

Phương án thực hiện khác theo sáng chế bao gồm việc làm đứt quãng trình tự khởi đầu phiên mã trình tự mã hóa cho gen *spnK*. Việc làm đứt quãng như vậy có thể nhờ kiểu thao tác di truyền bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm cụt, làm khuyết đoạn, gây đột biến điểm và cài xen. Các thao tác di truyền như vậy có thể là trong hoặc ngoài khung. Các thao tác di truyền như vậy dẫn đến tạo ra chủng sản xuất spinetoram.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết hơn trong các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế sau.

Ví dụ 1: Tạo ra của đột biến điểm trong *spnK*

Đột biến điểm trong gen *spnK* được tạo ra nhờ gây đột biến ngẫu nhiên chủng sản xuất A và D *Saccharopolyspora spinosa* (Kieser et al., 2000). Các chủng đột biến tạo ra spinosyn J và L thay vì spinosyn A và D được xác định đặc điểm tiếp nhờ khuếch đại PCR gen *spnK*, tiếp đó là sắp xếp trình tự ADN. Gen *spnK* là PCR được khuếch đại bằng *spnKF* (SEQ ID NO: 1; GGGAATTCCATATGTCCACAACGCACGAGATCGA) và *spnKR* (SEQ ID NO: 2; GCCGCTCGAGCTCGTCCTCCGCGCTGTTACGTCS) bằng cách sử dụng hệ PCR FailSafe (Epicentre Biotechnologies; Madison, WI). Sản phẩm PCR thu được được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế ADN MoBio Ultraclean PCR Clean-up (MoBio Laboratories; Solana Beach, CA) và được tách dòng vào vật truyền tách dòng TA bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA). Khuẩn lạc vi khuẩn giả định chứa sản phẩm PCR được phân lập và xác nhận nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn. Việc sắp xếp trình tự ADN dòng vô tính plasmit chủ động được thực hiện theo quy trình được nhà sản xuất mô tả bằng cách sử dụng kit CEQTM DTCS-Quick Start (Beckman-Coulter; Palo Alto, CA). Các phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng lõi lọc gel Performa DTR (Edge BioSystems; Gaithersburg, MD) theo trình tự được nhà sản xuất mô tả. Trình tự phản ứng được phân tích trên hệ phân tích ADN Beckman-Coulter CEQTM 2000 XL và việc xác định đặc điểm nucleotit

được thực hiện bằng cách sử dụng SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation; Ann Arbor, MI). Kết quả sắp xếp trình tự xác nhận vị trí của đột biến điểm trong trình tự gen *spnK*. Đột biến điểm thu được được liệt kê trong bảng 1 và được tô đậm trong Fig.1.

Quá trình lên men *spnK* các chủng đột biến của *Saccharopolyspora spinosa* có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thối lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Để khẳng định sự có mặt của yếu tố spinosyn trong dịch nổi bề mặt, các phần chiết của canh thối lên men được làm khô trong SpeedVac qua đêm tiếp đó là chia phần cặn giữa nước và ete. Lớp ete được làm khô bằng cách làm bay hơi trong điều kiện dòng khí N₂. Sau đó, mẫu được hòa tan trong axeton-d₆ và được chuyển đến ống NMR để thu nhận 1D proton NMR. Profin NMR được so sánh với profin NMR của chuẩn spinosyn. Kết quả NMR chỉ ra sự có mặt của lượng dư J/L so với A/D. Lên men chủng chứa đột biến điểm tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn J và L, so với *Saccharopolyspora spinosa* kiểm chứng tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn A và D.

Bảng 1: Danh mục đột biến điểm, định vị của chúng trong *spnK* và các hợp chất spinosyn được tạo ra bởi các chủng này trong quá trình lên men.

Chủng #	Đột biến thu được	Vị trí đột biến	Tạo ra hợp chất Spinosyn
1.	TGG (W) → TGA codon kết thúc	Cặp bazơ 528	<i>Spinosyn J and L</i>
2.	CGC (R) → TGC (C)	Cặp bazơ 589	<i>Spinosyn J and L</i>
3.	GGT (G) → GAT (D)	Cặp bazơ 602	<i>Spinosyn J and L</i>
4.	GGC (G) → GAC (D)	Cặp bazơ 668	<i>Spinosyn J and L</i>
5.	CTC (L) → TTC (F)	Cặp bazơ 721	<i>Spinosyn J and L</i>
6.	GAC (D) → GGC (G)	Cặp bazơ 794	<i>Spinosyn J and L</i>
7.	CGG (R) → TGG (W)	Cặp bazơ 862	<i>Spinosyn J and L</i>
8.	GAT (D) → AAT (N)	Cặp bazơ 895	<i>Spinosyn J and L</i>
9.	ACC (T) → ATC (I)	Cặp bazơ 908	<i>Spinosyn J and L</i>
10.	CAG (Q) → TAG codon kết thúc	Cặp bazơ 937	<i>Spinosyn J and L</i>
11.	TGG (W) → TGA codon kết thúc	Cặp bazơ 1131	<i>Spinosyn J and L</i>
Mẫu đối chứng	Mẫu đối chứng dạng đại	Không có	<i>Spinosyn A và D</i>

Ví dụ 2: Tạo ra đột biến khuyết đoạn *spnK*

Cấu trúc của vật truyền khuyết đoạn trong khung *spnK*

Mảnh ADN 1595bp là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng sản xuất spinosyn A và D (Hopwood et al., 1985). Mảnh này kéo dài codon khởi đầu của *spnK* và chứa vùng mã hoá *spnJ* không có đầu 5' của *spnJ* (Fig. 2). Phản ứng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng kit PCR FailSafe (Epicentre Biotechnologies; Madison, WI) và đoạn mồi xuôi #1 (SEQ ID NO: 3; CGGTGCCCCGAATTCCATGACCCG) và đoạn mồi ngược #1 (SEQ ID NO: 4; GTGCGTTCTAGACATATGAGCTCCTCATGGCTG).

Phản ứng PCR thứ hai được hoàn thành tạo ra mảnh ADN 1951bp; mảnh này chứa đầu 3' của *spnK*, *spnL* nguyên vẹn và đầu 5' của *spnM* (Fig. 2). Phản ứng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng kit PCR the FailSafe và đoạn mồi xuôi #2 (SEQ ID NO: 5; GTGCCATCTAGACTGGACGACATATTGCACCTG) và đoạn mồi ngược #2 (SEQ ID NO: 6; GAATGCGAAGCT TACGATCTCGTCGTCCTCGTG). Sản phẩm PCR được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế PCR QIAquick (Qiagen; Valencia, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mảnh PCR 1595bp được phân cắt bằng *EcoRI* và *XbaI*. Mảnh PCR 1951bp được phân cắt bằng *XbaI* và *HindIII*. Khi hoàn thành phân cắt bằng enzym giới hạn mảnh được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế PCR QIAquick. Mảnh phân cắt được nối với các vị trí giới hạn *EcoRI* và *HindIII* tương ứng của plasmit pOJ260 bằng cách sử dụng kit nối ADN FastLink (Epicentre; Madison, WI) và biến nạp các tế bào tốt *E. coli* TOP10 (Invitrogen; Carlsbad, CA). Khuẩn lạc được chọn và được sàng lọc cho sản phẩm nối mong muốn nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn và phân tích trình tự ADN. Dòng vô tính dương tính được nhận diện và dòng vô tính được chọn được dùng để gây khuyết đoạn sau đó trong khung *spnK* trong *Saccharopolyspora spinosa*. Trình tự thu được của gen khuyết đoạn *spnK* mảnh trong plasmit pOJ260 có mặt trong bảng 2.

Bảng 2: Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotit của gen khuyết đoạn *spnK*

40

spnK (SEQ ID NO:17)

(1) ATGTCACAACGCACGAGATCGAAACCGTGGAAACGCATCA

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(1)

ATGTCT-----

80

spnK (SEQ ID NO:17)

(41) TCCTCGCCGCCGGATCCAGTGCGGCGAGCCTGGCCGACCT

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

120

spnK (SEQ ID NO:17)

(81) GACCACCGAACTCGGACTCGCCAGGATCGCACCCGTGCTG

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

160

spnK (SEQ ID NO:17)

(121) ATCGACGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCGGCCCCCGACA

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

200

spnK (SEQ ID NO:17)

(161) TCGAACGGACCGAGGTCGCGGTCCAGATCACCCACCGAGG

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

240

spnK (SEQ ID NO:17)

(201) CGAGACCGTTGACTTCGTCTGACGCTACAGTCCGGTGAG

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

280

spnK (SEQ ID NO:17)

(241) CTGATCAAGGCCGAGCAACGACCGGTCCGAGACGTCCCGC

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

320

spnK (SEQ ID NO:17)

(281) TGCGGATCGGTTACGAGCTCACCGATCTCATCGCCGAGTT

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

360

spnK (SEQ ID NO:17)

(321) GTTCGGCCCAGGAGCTCCAGGGCCGTCCGCGCCCGGAGC

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

400

spnK (SEQ ID NO:17)

(361) ACCAACTTCCTCCGAACCACCACATCCGGTTCGATACCCG

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

440

spnK (SEQ ID NO:17)

(401) GTCCGTCGGAAGTGTCCGATGGCTTCCAGGCCATCTCCGC

khuyết đoạn spnK (SEQ ID NO:9)

(7)

480

spnK (SEQ ID NO:17)

(441) AGTGGTCGCCGGCTGCGGGCACCGACGTCCCGACCTCAAC

khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
520						
spnK (SEQ ID NO:17)	(481)	TTGCTCGCCTCCCACTACCGCACGGACAAGTGGGGCGGCC				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
560						
spnK (SEQ ID NO:17)	(521)	TGCACTGGTTACCCCGCTATACGAGCGACACCTCGGCGA				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
600						
spnK (SEQ ID NO:17)	(561)	GTTCCGTGATCGCCCGGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
640						
spnK (SEQ ID NO:17)	(601)	GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCGGCGGCGAATCCCTGA				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
680						
spnK (SEQ ID NO:17)	(641)	AGATGTGGAAGCGCTACTTCCACCGCGGCCTCGTGTTCCG				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
720						
spnK (SEQ ID NO:17)	(681)	GATGGACGTTTTTCGACAAGTCCTTCTCGACCAGCAGAGG				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
760						
spnK (SEQ ID NO:17)	(721)	CTCTGCACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAGCCCGAGGAGC				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
800						
spnK (SEQ ID NO:17)	(761)	TGGCCGCCGTTGACGACAAGTACGGACCGTTTCGACATCAT				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
840						
spnK (SEQ ID NO:17)	(801)	CATCGACGATGGCAGCCACATCAACGGACACGTGCGCACA				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
880						
spnK (SEQ ID NO:17)	(841)	TCCCTGGAAACGCTGTTCCCCCGGTTGCGCAGCGGTGGCG				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
920						
spnK (SEQ ID NO:17)	(881)	TATACGTGATCGAGGATCTGTGGACGACCTATGCTCCCGG				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO:9)	(7)
960						
spnK (SEQ ID NO:17)	(921)	ATTTCGGCGGGCAGGCGCAGTGCCCCGGCCGACCCGGCACC				

khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
1000						
spnK (SEQ ID NO:17)	(961)	ACGGTCAGCCTGCTCAAGAACCTGTTGGAAGGCGTTCAGC				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
1040						
spnK (SEQ ID NO:17)	(1001)	ACGAGGAGCAGCCGCATGCGGGCTCGTACGAGCCGAGCTA				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
1080						
spnK (SEQ ID NO:17)	(1041)	CCTGGAACGCAATTTGGTCGGCCTCCACACCTACCACAAC				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
1120						
spnK (SEQ ID NO:17)	(1081)	ATCGCGTTCTGGAGAAAGGCGTCAACGCCGAAGGCGGCG				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
1160						
spnK (SEQ ID NO:17)	(1121)	TTCCTGCTTGGGTGCCAAGGAGTCTGGACGACATATTGCA				
khuyết	đoạn	spnK	(SEQ	ID	NO: 9)	(7)
-----AGACTGGACGACATATTGCA-----						
1194						
spnK (SEQ ID NO:17)	(1161)	CCTGGCCGACGTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA				
khuyết	đoạn	spnK (SEQ ID NO:9)	(27)	CCTGGCCGACGTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA		

Vì vậy một khuyết đoạn *spnK* sẽ bao gồm trình tự:

ATGTCTAGACTGGACGACATATTGCACCTGGCCGACGTGAACAGCGCGGA
GGACGAGTGA (SEQ ID NO: 9).

Tiếp hợp của vật truyền *spnK* khuyết đoạn vào *Saccharopolyspora spinosa*

Cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* được biến nạp vào chủng thể cho tiếp hợp *E. coli* ET12567/pUZ8002. Chủng biến nạp dương tính được nhận diện và được dùng để cấy bình cầu chứa môi trường canh thịt Luria (chứa các chất kháng sinh thích hợp) để sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc ở 225 vòng/phút. Việc xác nhận về tính đồng nhất của plasmit được thực hiện bằng cách phân lập plasmit ADN và hoàn thành phân cắt bằng enzym giới hạn từ chủng thể cho *E. coli*. Khi xác nhận rằng tính chính xác của dòng vô tính này là đúng, môi trường nuôi cấy còn lại được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C để sử dụng tiếp.

Tiếp hợp các tế bào *E. coli* mang cấu trúc khuyết đoạn vào khung *spnK* bằng *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994). Thể sau cộng hợp giả định kháng apramycin, do sự có mặt của chất đánh dấu gen kháng apramycin trên khung vật truyền của cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK*, được chọn.

Xác nhận thể sau cộng hợp và sự khuếch đại của vùng *spnK* để xác định vị trí hợp nhất

Một thể sau cộng hợp sơ cấp sinh trưởng trên môi trường R6 và được chuyển nhiễm vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để khẳng định phenotíp kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Tripxin (Canh thịt đậu tương Tripxin - TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ ủ và ADN bộ gen được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập ADN bộ gen của Edge BioSystem theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Edge BioSystems; Gaithersburgh, MD). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp dưới dạng khuôn mẫu với đoạn mồi *spnK* Del xác định tính hợp lệ 1Xuôi (SEQ ID NO: 7; GTTCACGGTGATTCCGGTGA CTCTCG) và *spnK* Del xác định tính hợp lệ 1Ngược (SEQ ID NO: 8; ACCTGCACTGCTTCCTGGAGCTTC). Ngoài ra, ADN bộ gen được tách ra từ chủng bố mẹ kiểm chứng *Saccharopolyspora spinosa* và plasmit ADN của cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* được dùng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR kiểm chứng. Kết quả khuếch đại bằng PCR được sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự chỉ ra rằng cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* hợp nhất vào vùng *spnLM* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo (Fig. 3). Hợp nhất ở vùng *spnLM* được tạo ra, trong nhiễm sắc thể, một bản sao nguyên vẹn của *spnJ*, *spnK*, *spnL*, và *spnM* được làm cùn xuôi chiều của khung vật truyền pOJ260 và *spnJa* được làm cùn, và *spnL* nguyên vẹn và *spnM* trước của khung vật truyền.

Phân lập thể đột biến khuyết đoạn trong khung *spnK* chéo kép

Một thể đột biến chéo kháng apramycin được cấy lên các đĩa thạch BHI khi không có mặt apramycin và được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa theo Hopwood et al., (1985) và được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Các bào tử được cấy lên 10 đĩa thạch BHI mới không có apramycin và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Bước

này được lặp lại ba lần. Chế phẩm bào tử được pha loãng đến 10^{-6} bằng cách sử dụng glyxerol 20% và các bào tử loãng được đặt lên mười đĩa thạch BHI. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển một khuẩn lạc. Khuẩn lạc riêng lẻ được để loang trên các đĩa thạch BHI mới có và không có apramycin. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển khuẩn ty. Khuẩn lạc không phát triển trên các đĩa thạch BHI chứa 50µg/mL apramycin được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR.

Nhận biết và xác định tính hợp lệ của thể đột biến chéo kép

Thể đột biến chéo kép được xác nhận nhờ PCR. Đoạn môi, *spnK* Del xác định tính hợp lệ 1Xuôi (SEQ ID NO: 7) và *spnK* Del xác định tính hợp lệ 1Ngược (SEQ ID NO: 8), được thiết kế để gắn kết trong các gen *spnL* và *spnJ* được dùng để khuếch đại PCR bằng cách sử dụng hệ PCR FailSafe. Kích thước của các sản phẩm PCR được xác định nhờ điện di gel agarosa. Thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của gen *spnK* được nhận diện (Fig. 4) và được chọn tính theo kích thước của sản phẩm PCR. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR thể hiện khuyết đoạn trong khung của gen *spnK*.

Spinosyn việc tạo ra thể đột biến chéo kép nhờ lên men bình cầu lắc

Lên men thể đột biến chéo kép có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thịt lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Để khẳng định sự có mặt của yếu tố spinosyn trong dịch nổi bề mặt, các phần chiết của canh thịt lên men được làm khô trong SpeedVac qua đêm tiếp đó là chia phần cặn giữa nước và ete. Lớp ete được làm khô bằng cách làm bay hơi trong điều kiện dòng khí N₂. Sau đó, mẫu được hòa tan trong axeton-d₆ và được chuyển đến ống NMR để thu nhận 1D proton NMR. Profin NMR được so sánh với profin NMR của chuẩn spinosyn. Lên men thể đột biến chéo kép tạo ra spinosyn J và L. Kết quả NMR chỉ ra sự có mặt của lượng dư J/L so với A/D.

Ví dụ 3: Tạo ra đột biến cài xen *spnK*

Thể đột biến *Saccharopolyspora spinosa* được tạo ra nhờ đột biến cài xen trong gen *spnK*. Mảnh ADN chứa catxet của gen kháng apramycin trong khung (*aac(3)IV*) trong gen *spnK* và gen *spnJ* và *spnL* xuôi chiều và trước liên tục ở bên sườn các trình

tự được xây dựng (Fig. 5). Đoạn gen *aac(3)IV* được tách dòng vào plasmit và biến nạp vào the chủng thể cho tiếp hợp *E. coli* ET12567/pUZ8002. Chủng biến nạp dương tính được nhận diện và được dùng để cấy bình cầu chứa môi trường canh thịt Luria (chứa các chất kháng sinh thích hợp) để sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 37°C kết hợp lắc ở 225 vòng/phút. Việc xác nhận của tính đồng nhất của plasmit được thực hiện bằng cách phân lập plasmit ADN và hoàn thành phân cắt bằng enzym giới hạn. Khi xác nhận rằng plasmit chứa catxet cài xen apramycin là đúng, môi trường nuôi cấy còn lại được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C.

Tiếp hợp của tế bào thể cho *E. coli* với *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994). Việc chuyển catxet gen apramycin từ *E. coli* và sau đó hợp nhất plasmit này vào hệ gen của *Saccharopolyspora spinosa* được chọn bằng cách sử dụng tính kháng apramycin.

Một thể sau cộng hợp sơ cấp được sinh trưởng trên môi trường R6 và được chuyển vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để khẳng định phenotip kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Triptxin (TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ ủ và ADN bộ gen được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập ADN bộ gen của Edge BioSystem theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Edge BioSystems; Gaithersburgh, MD). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp làm khuôn mẫu. Sản phẩm PCR mong muốn được tách dòng vào plasmit bằng cách sử dụng kỹ thuật tách dòng TOPO® (Invitrogen; Carlsbad CA). Khuẩn lạc vi khuẩn giả định chứa sản phẩm PCR, tách dòng trong vật truyền TOPO®, được tách và xác nhận nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn. Việc sắp xếp trình tự ADN dòng vô tính plasmit chủ động được thực hiện. Kết quả của việc sắp xếp trình tự chỉ ra rằng catxet cài xen apramycin hợp nhất vào gen *spnK* của *Saccharopolyspora spinosa* nhờ tái tổ hợp tương đồng chéo kép. Cài xen thu được nhờ tái tổ hợp tương đồng phá vỡ quá trình phiên mã của *spnK* nhờ đó khử bỏ gen chức năng *spnK*.

Quá trình lên men các chủng đột biến *spnK* của *Saccharopolyspora spinosa* có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thịt lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Để khẳng

định sự có mặt của yếu tố *spinosyn* trong dịch nổi bề mặt, các phần chiết của canh thịt lên men được làm khô trong SpeedVac qua đêm tiếp đó là chia phần cặn giữa nước và ete. Lớp ete được làm khô bằng cách làm bay hơi trong điều kiện dòng khí N₂. Sau đó, mẫu được hòa tan trong axeton-d₆ và được chuyển đến ống NMR để thu nhận 1D proton NMR. Profin NMR được so sánh với profin NMR của chuẩn *spinosyn*. Kết quả NMR chỉ ra sự có mặt của lượng dư J/L so với A/D. Quá trình lên men chủng chứa đột biến cài xen tạo ra hỗn hợp *spinosyn* chứa *spinosyn* J và L, so với *Saccharopolyspora spinosa* kiểm chứng tạo ra hỗn hợp *spinosyn* chứa *spinosyn* A và D.

Ví dụ 4: Phá vỡ trình tự *spnK* Shine Dalgarno

Trình tự Shine Dalgarno định vị xuôi chiều của *spnK* (Fig. 6) bị phá vỡ nhờ đó dẫn đến giảm quá trình dịch mã của *spnK* mRNA. Chủng đột biến của *Saccharopolyspora spinosa* chứa trình tự *spnK* Shine Dalgarno khuyết đoạn được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình tương tự như được mô tả trong ví dụ 2. Hai mảnh có ít nhất chiều dài là 1500bp định vị xuôi chiều và trước trình tự *spnK* Shine Dalgarno là PCR được khuếch đại. Các mảnh này không chứa trình tự 5'-AGGAGCTC-3' sau. Hai mảnh này được nối cùng nhau trong plasmit như pOJ260 có thể được dùng để tiếp hợp với *Saccharopolyspora spinosa*.

Plasmit mong muốn được biến nạp vào chủng thể cho tiếp hợp *E. coli* ET12567/pUZ8002. Chủng biến nạp dương tính được xác nhận nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn. Khi xác nhận rằng chủng *E. coli* chứa plasmit là đúng, tiếp hợp của các tế bào *E. coli* với *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994). Chuyển plasmit từ tế bào thể cho *E. coli* và hợp nhất sau đó của plasmit vào hệ gen của *Saccharopolyspora spinosa* được chọn bằng cách sử dụng tính kháng chất kháng sinh.

Sự hợp nhất của plasmit vào nhiễm sắc thể của *Saccharopolyspora spinosa* được xác định đặc điểm phân tử nhờ sự khuếch đại PCR vùng hệ gen ADN đặc hiệu. Tóm lại, ADN bộ gen được phân lập và cài xen chứa trình tự *spnK* Shine Dalgarno là PCR được khuếch đại, tách dòng và sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự thể hiện rằng cấu trúc khuyết đoạn *spnK* Shine-Dalgarno hợp nhất vào vùng *spnJK* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo.

Thể đột biến chéo kép thu được chứa trình tự *spnK* Shine Dalgarno bị phá vỡ bằng cách sử dụng quy trình đã được mô tả trong ví dụ 2. Khuẩn lạc không thể sinh

trường trên các đĩa thạch BHI chứa chất kháng sinh được chọn nhờ chất đánh dấu có mặt trên khung vật truyền được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR. Đoạn môi được thiết kế để gắn kết trong gen *spnK* và *spnJ* được dùng. Sản phẩm PCR thu được được tách dưới dòng vào plasmit bằng cách sử dụng kỹ thuật tách dòng the TOPO® (Invitrogen; Carlsbad CA). Khuẩn lạc vi khuẩn chứa sản phẩm PCR, tách dòng trong vật truyền TOPO® được tách và xác nhận nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn. Việc sắp xếp trình tự ADN dòng vô tính plasmit chủ động được thực hiện. Kết quả sắp xếp trình tự chỉ ra rằng trình tự *spnK* Shine Dalgarno nucleotit bị phá vỡ từ hệ gen của *Saccharopolyspora spinosa*. Quá trình lên men các chủng đột biến *spnK* Shine-Dalgarno của *Saccharopolyspora spinosa* có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns *et al.*, (WO 2003070908). Phân tích canh thịt lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz *et al.*, (patent Mỹ số 6,143,526). Để khẳng định sự có mặt của yếu tố spinosyn trong dịch nổi bề mặt, các phần chiết của canh thịt lên men được làm khô trong SpeedVac qua đêm tiếp đó là chia phần cặn giữa nước và ete. Lớp ete được làm khô bằng cách làm bay hơi trong điều kiện dòng khí N₂. Sau đó, mẫu được hòa tan trong axeton-d₆ và được chuyển đến ống NMR để thu nhận 1D proton NMR. Kết quả NMR chỉ ra sự có mặt của lượng dư J/L so với A/D. Profin NMR được so sánh với Profin NMR của chuẩn spinosyn. Quá trình lên men chủng chứa đột biến trình tự *spnK* Shine Dalgarno khuyết đoạn tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn J và L, so với *Saccharopolyspora spinosa* kiểm chứng tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn A và D.

Ví dụ 5: Giảm sự biểu hiện 3'-O-metyltransferaza nhờ quá trình điều hòa dưới ARN đối nghĩa của *spnK*

Plasmit được thiết kế để tạo ra asRNA (ARN đối nghĩa) bổ trợ với trình tự ghi mã *spnK*. Quá trình điều hòa dưới thu được của sự biểu hiện gen *spnK* dẫn đến giảm hoạt tính *spnK*.

Trình tự ghi mã *spnK* là PCR được khuếch đại và được tách dòng vào plasmit như pOJ260 để hợp nhất vào nhiễm sắc thể của *Saccharopolyspora spinosa*. Theo cách khác, trình tự ghi mã *spnK* có thể được tách dòng vào plasmit được duy trì và sao chép một cách ổn định trong cytosol của *Saccharopolyspora spinosa*. Plasmit thu được

được xây dựng để tạo ra *spnK* asRNA bằng cách biểu hiện sợi đối nghĩa của *spnK* bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu phiên mã vi khuẩn bảo toàn cao. *spnK* asRNPlasmit này được biến nạp vào chủng thể cho tiếp hợp *E. coli* ET12567/pUZ8002. Chủng biến nạp dương tính được xác nhận nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn. Khi xác nhận rằng chủng *E. coli* chứa plasmit là đúng, tiếp hợp của plasmit từ tế bào thể cho *E. coli* với *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Matsushima et al., (1994). Chuyển *spnK* asRNPlasmit từ *E. coli* vào *Saccharopolyspora spinosa* được chọn bằng cách sử dụng tính kháng chất kháng sinh; tính kháng được mã hóa trên *spnK* asRNPlasmit. ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp và được dùng làm khuôn mẫu để khuếch đại PCR để khẳng định sự tồn tại của plasmit.

Quá trình lên men chủng của *Saccharopolyspora spinosa* chứa *spnK* asRNPlasmit có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thối lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al, (patent Mỹ số 6,143,526). Để khẳng định sự có mặt của yếu tố spinosyn trong dịch nổi bề mặt, các phần chiết của canh thối lên men được làm khô trong SpeedVac qua đêm tiếp đó là chia phần cặn giữa nước và ete. Lốp ete được làm khô bằng cách làm bay hơi trong điều kiện dòng khí N₂. Sau đó, mẫu được hòa tan trong axeton-d₆ và được chuyển đến ống NMR để thu nhận 1D proton NMR. Kết quả NMR chỉ ra sự có mặt của lượng dư J/L so với A/D. Profin NMR được so sánh với profin NMR của chuẩn spinosyn. Lên men chủng chứa *spnK* asRNPlasmit tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn J và L, so với *Saccharopolyspora spinosa* kiểm chứng tạo ra hỗn hợp spinosyn chứa spinosyn A và D.

Ví dụ 6: Tạo ra đột biến khuyết đoạn bổ sung *spnK*

Ví dụ 6,1 Cấu trúc của vật truyền khuyết đoạn đầu 5' *spnK*

ADN bộ gen của chủng sản xuất spinosyn A và D (Hopwood et al., 1985) là PCR được khuếch đại để tạo ra hai mảnh ADN. Mảnh khuếch đại thứ nhất có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp xuôi chiều của codon khởi đầu ATG. Mảnh khuếch đại thứ hai có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp trước của cặp bazơ 61 *spnK*. Khuếch đại bằng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Đoạn mỗi

oligonucleotit được tổng hợp để kết hợp các trình tự gắn kết enzym giới hạn. Sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn làm tách các trình tự gắn kết được kết hợp bởi đoạn nối. Các mảnh này được nối cùng nhau và sau đó được nối vào các vị trí giới hạn tương ứng của plasmit pOJ260. Sản phẩm nối thu được được tách dòng vào các tế bào *E. coli* tốt. Khuẩn lạc được chọn và được sàng lọc cho sản phẩm nối mong muốn nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn và phân tích trình tự ADN. Dòng vô tính dương tính được nhận diện và dòng vô tính được chọn được dùng để gây khuyết đoạn đầu 5' sau đó của *spnK* in *Saccharopolyspora spinosa*. Trình tự thu được của mảnh gen *spnK* khuyết đoạn trong plasmit pOJ260 có mặt trong bảng 3. Vì vậy, khuyết đoạn codon khởi đầu *spnK* sẽ bao gồm trình tự: (SEQ ID NO: 10).

Bảng 3: Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotit của đầu 5' khuyết đoạn của *spnK*

30	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(1)
	GGAGCTCATCAG-----						
	spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ ID NO:14)	(1)
	GGAGCTCATCAGGATGTCCACAACGCACGA						
60	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(14)

	spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ ID NO:14)	(31)
	GATCGAAACCGTGGAACGCATCATCCTCGC						
90	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(14)
	-----GCGGCGAGCCTGGCCGA						
	spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ ID NO:14)	(61)
	CGCCGGATCCAGTGCGGCGAGCCTGGCCGA						
120	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(31)
	CCTGACCACCGAACTCGGACTCGCCAGGAT						
	spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ ID NO:14)	(91)
	CCTGACCACCGAACTCGGACTCGCCAGGAT						
150	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(61)
	CGCACCCGTGCTGATCGACGAGATCCTCTT						
	spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ ID NO:14)	(121)
	CGCACCCGTGCTGATCGACGAGATCCTCTT						
180	spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ ID NO:10)	(91)
	CCGCGCGGAACCGGCCCCCGACATCGAACG						

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(151)
<u>CCGCGCGGAACCGGCCCCGACATCGAACG</u>	
210	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(121)
<u>GACCGAGGTTCGCGGTCCAGATCACCCACCG</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(181)
<u>GACCGAGGTTCGCGGTCCAGATCACCCACCG</u>	
240	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(151)
<u>AGGCGAGACCGTTGACTTCGTCCTGACGCT</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(211)
<u>AGGCGAGACCGTTGACTTCGTCCTGACGCT</u>	
270	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(181)
<u>ACAGTCCGGTGAGCTGATCAAGGCCGAGCA</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(241)
<u>ACAGTCCGGTGAGCTGATCAAGGCCGAGCA</u>	
300	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(211)
<u>ACGACCGGTTCGGAGACGTCCCGCTGCGGAT</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(271)
<u>ACGACCGGTTCGGAGACGTCCCGCTGCGGAT</u>	
330	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(241)
<u>CGGTTACGAGCTCACCGATCTCATCGCCGA</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(301)
<u>CGGTTACGAGCTCACCGATCTCATCGCCGA</u>	
360	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(271)
<u>GTTGTTTCGGCCCAGGAGCTCCCAGGGCCGT</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(331)
<u>GTTGTTTCGGCCCAGGAGCTCCCAGGGCCGT</u>	
390	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(301)
<u>CGGCGCCCGGAGCACCAACTTCCTCCGAAC</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(361)
<u>CGGCGCCCGGAGCACCAACTTCCTCCGAAC</u>	
420	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(331)
<u>CACCACATCCGGTTCGATACCCGGTCCGTC</u>	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(391)
<u>CACCACATCCGGTTCGATACCCGGTCCGTC</u>	
450	

spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(361)
<u>GGAAGTGTCCGATGGCTTCCAGGCCATCTC</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(421)
<u>GGAAGTGTCCGATGGCTTCCAGGCCATCTC</u>								
480								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(391)
<u>CGCAGTGGTCGCCGGCTGCGGGCACCGACG</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(451)
<u>CGCAGTGGTCGCCGGCTGCGGGCACCGACG</u>								
510								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(421)
<u>TCCCGACCTCAACTTGCTCGCCTCCCACTA</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(481)
<u>TCCCGACCTCAACTTGCTCGCCTCCCACTA</u>								
540								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(451)
<u>CCGCACGGACAAGTGGGGCGGCCTGCACTG</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(511)
<u>CCGCACGGACAAGTGGGGCGGCCTGCACTG</u>								
570								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(481)
<u>GTTACCCCCGCTATACGAGCGACACCTCGG</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(541)
<u>GTTACCCCCGCTATACGAGCGACACCTCGG</u>								
600								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(511)
<u>CGAGTTCGGTGATCGCCCGGTGCGCATCCT</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(571)
<u>CGAGTTCGGTGATCGCCCGGTGCGCATCCT</u>								
630								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(541)
<u>GGAGATCGGTGTGGGTGGCTACAACCTCGA</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(601)
<u>GGAGATCGGTGTGGGTGGCTACAACCTCGA</u>								
660								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(571)
<u>CGGTGGCGGCGGCGAATCCCTGAAGATGTG</u>								
spnK	và	seq	xuôi	chiều	(SEQ	ID	NO:14)	(631)
<u>CGGTGGCGGCGGCGAATCCCTGAAGATGTG</u>								
690								
spnK	khuyết	đoạn	đầu	5'	(SEQ	ID	NO:10)	(601)
<u>GAAGCGCTACTTCCACCGCGGCCTCGTGTT</u>								

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(661)
GAAGCGCTACTTCCACGCGGCCTCGTGTT	
720	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(631)
CGGGATGGACGTTTTTCGACAAGTCCTTCCT	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(691)
CGGGATGGACGTTTTTCGACAAGTCCTTCCT	
750	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(661)
CGACCAGCAGAGGCTCTGCACCGTCCGCGC	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(721)
CGACCAGCAGAGGCTCTGCACCGTCCGCGC	
780	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(691)
CGACCAGAGCAAGCCCCGAGGAGCTGGCCGC	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(751)
CGACCAGAGCAAGCCCCGAGGAGCTGGCCGC	
810	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(721)
CGTTGACGACAAGTACGGACCGTTCGACAT	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(781)
CGTTGACGACAAGTACGGACCGTTCGACAT	
840	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(751)
CATCATCGACGATGGCAGCCACATCAACGG	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(811)
CATCATCGACGATGGCAGCCACATCAACGG	
870	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(781)
ACACGTGCGCACATCCCTGGAAACGCTGTT	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(841)
ACACGTGCGCACATCCCTGGAAACGCTGTT	
900	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(811)
CCCCCGGTTGCGCAGCGGTGGCGTATACGT	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(871)
CCCCCGGTTGCGCAGCGGTGGCGTATACGT	
930	
spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10)	(841)
GATCGAGGATCTGTGGACGACCTATGCTCC	
spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14)	(901)
GATCGAGGATCTGTGGACGACCTATGCTCC	
960	

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (871)
 CGGATTTCGGCGGGCAGGCGCAGTGCCCGGC

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (931)
 CGGATTTCGGCGGGCAGGCGCAGTGCCCGGC

990

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (901)
 CGCACCCCGGCACACGGTCAGCCTGCTCAA

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (961)
 CGCACCCCGGCACACGGTCAGCCTGCTCAA

1020

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (931)
 GAACCTGTTGGAAGGCGTTTCAGCACGAGGA

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (991)
 GAACCTGTTGGAAGGCGTTTCAGCACGAGGA

1050

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (961)
 GCAGCCGCATGCGGGCTCGTACGAGCCGAG

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1021)
 GCAGCCGCATGCGGGCTCGTACGAGCCGAG

1080

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (991)
 CTACCTGGAACGCAATTTGGTCGGCCTCCA

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1051)
 CTACCTGGAACGCAATTTGGTCGGCCTCCA

1110

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (1021)
 CACCTACCACAACATCGCGTTCCTGGAGAA

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1081)
 CACCTACCACAACATCGCGTTCCTGGAGAA

1140

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (1051)
 AGGCGTCAACGCCGAAGGCGGCGTTCCTGC

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1111)
 AGGCGTCAACGCCGAAGGCGGCGTTCCTGC

1170

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (1081)
 TTGGGTGCCAAGGAGTCTGGACGACATATT

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1141)
 TTGGGTGCCAAGGAGTCTGGACGACATATT

1200

spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (1111)
 GCACCTGGCCGACGTGAACAGCGCGGAGGA

spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1171)
 GCACCTGGCCGACGTGAACAGCGCGGAGGA
 1201
 spnK khuyết đoạn đầu 5' (SEQ ID NO:10) (1141) CGAGTGA
 spnK và seq xuôi chiều (SEQ ID NO:14) (1201) CGAGTGA

Tiếp hợp vật truyền *spnK* khuyết đoạn vào *Saccharopolyspora spinosa*

Quá trình tiếp hợp của các tế bào *E. coli* mang cấu trúc khuyết đoạn đầu 5' *spnK* bằng *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994) và được lấy làm ví dụ trong ví dụ 2. Thể sau cộng hợp giả định kháng apramycin, do sự có mặt của chất đánh dấu gen kháng apramycin trên khung vật truyền của cấu trúc khuyết đoạn đầu 5' *spnK*, được chọn.

Xác nhận thể sau cộng hợp và vùng khuếch đại *spnK* để xác định vị trí hợp nhất

Một thể sau cộng hợp sơ cấp sinh trưởng trên môi trường R6 được chuyển vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để kháng định phenotip kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Tripxin (TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ của ủ và ADN bộ gen được phân lập. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp làm khuôn mẫu với đoạn mồi được thiết kế để dò một thể đột biến chéo. Kết quả khuếch đại bằng PCR sản phẩm được sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự thể hiện rằng cấu trúc khuyết đoạn đầu 5' *spnK* hợp nhất vào vùng *spnJK* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo.

Phân lập của thể đột biến khuyết đoạn đầu 5' *spnK* chéo kép

Một thể đột biến chéo kháng apramycin được cấy lên các đĩa thạch BHI khi không có mặt apramycin và được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa theo Hopwood et al., (1985) và được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Các bào tử được cấy lên các đĩa thạch BHI mới không có apramycin và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Bước này được lặp lại nhiều lần. Chế phẩm bào tử được pha loãng bằng cách sử dụng glyxerol 20% và các bào tử loãng được dàn mỏng trên các đĩa thạch BHI. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển một khuẩn lạc. Khuẩn lạc riêng lẻ

được dán lên các đĩa thạch BHI mới có và không có apramycin. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển khuẩn ty. Khuẩn lạc không sinh trưởng trên các đĩa thạch BHI chứa 50µg/mL apramycin được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR.

Nhận biết và xác định tính hợp lệ của thể đột biến chéo kép

Thể đột biến chéo kép được xác nhận nhờ PCR. Đoạn môi được thiết kế để gắn kết trong gen *spnJ* và *spnK* được dùng để khuếch đại PCR. Kích thước của các sản phẩm PCR được xác định nhờ điện di gel agarosa. Thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của đầu 5' của gen *spnK* được nhận diện và được chọn tính theo kích thước của sản phẩm PCR. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR chỉ ra khuyết đoạn của codon khởi đầu ATG và đầu 5' của gen *spnK*.

Sản xuất spinosyn nhờ lên men bình cầu lắc

Quá trình lên men thể đột biến chéo kép có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thịt lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Quá trình lên men thể đột biến chéo kép tạo ra spinosyn J và L.

Ví dụ 6.2 Cấu trúc của vật truyền khuyết đoạn trong khung *spnK*

Hai mảnh ADN là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng sản xuất spinosyn A và D (Hopwood et al., 1985). Mảnh khuếch đại thứ nhất có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp xuôi chiều của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất. Mảnh khuếch đại thứ hai có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp trước của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất. Khuếch đại bằng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Đoạn môi oligonucleotit được tổng hợp để kết hợp các trình tự gắn kết enzym giới hạn. Sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn làm tách các trình tự gắn kết được kết hợp bởi đoạn môi. Các mảnh được nối cùng và sau đó được nối vào tương ứng các vị trí giới hạn của plasmid pOJ260. Sản phẩm nối thu được được tách dòng vào các tế bào *E. coli* tốt. Khuẩn lạc được chọn và được sàng lọc cho sản phẩm nối mong muốn nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn và

phân tích trình tự ADN. Dòng vô tính dương tính được nhận diện và dòng vô tính được chọn được dùng để gây khuyết đoạn sau đó trong khung miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất của *spnK* trong *Saccharopolyspora spinosa*. Trình tự thu được của mảnh gen khuyết đoạn *spnK* trong plasmit pOJ260 có mặt trong bảng 4. Vì vậy, khuyết đoạn *spnK* sẽ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 11.

Bảng 4: Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotit của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất khuyết đoạn của *spnK* (miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất được gạch dưới).

30					
spnK (SEQ ID NO:17)	(1)	ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAACCGTG			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(1)
ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAACCGTG					
60					
spnK (SEQ ID NO:17)	(31)	GAACGCATCATCCTCGCCGCCGGATCCAGT			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(31)
GAACGCATCATCCTCGCCGCCGGATCCAGT					
90					
spnK (SEQ ID NO:17)	(61)	GCGGCGAGCCTGGCCGACCTGACCACCGAA			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(61)
GCGGCGAGCCTGGCCGACCTGACCACCGAA					
120					
spnK (SEQ ID NO:17)	(91)	CTCGGACTCGCCAGGATCGCACCCGTGCTG			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(91)
CTCGGACTCGCCAGGATCGCACCCGTGCTG					
150					
spnK (SEQ ID NO:17)	(121)	ATCGACGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(121)
ATCGACGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG					
180					
spnK (SEQ ID NO:17)	(151)	GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGGTGCGG			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(151)
GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGGTGCGG					
210					
spnK (SEQ ID NO:17)	(181)	GTCCAGATCACCCACCGAGGCGAGACCGTT			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(181)
GTCCAGATCACCCACCGAGGCGAGACCGTT					
240					
spnK (SEQ ID NO:17)	(211)	GACTTCGTCCTGACGCTACAGTCCGGTGAG			
spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11)					(211)
GACTTCGTCCTGACGCTACAGTCCGGTGAG					
270					

spnK (SEQ ID NO:17) (241) CTGATCAAGGCCGAGCAACGACCGGTCGGA
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (241)
 CTGATCAAGGCCGAGCAACGACCGGTCGGA
 300
 spnK (SEQ ID NO:17) (271) GACGTCCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (271)
 GACGTCCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC
 330
 spnK (SEQ ID NO:17) (301) ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTTCGGCCCCA
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (301)
 ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTTCGGCCCCA
 360
 spnK (SEQ ID NO:17) (331) GGAGCTCCCAGGGCCGTGCGCGCCCGGAGC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (331)
 GGAGCTCCCAGGGCCGTGCGCGCCCGGAGC
 390
 spnK (SEQ ID NO:17) (361) ACCAACTTCCTCCGAACCACCACATCCGGT
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (361)
 ACCAACTTCCTCCGAACCACCACATCCGGT
 420
 spnK (SEQ ID NO:17) (391) TCGATACCCGGTCCGTCCGAACTGTCCGAT
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (391)
 TCGATACCCGGTCCGTCCGAACTGTCCGAT
 450
 spnK (SEQ ID NO:17) (421) GGCTTCCAGGCCATCTCCGCAGTGGTCGCC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (421)
 GGCTTCCAGGCCATCTCCGCAGTGGTCGCC
 480
 spnK (SEQ ID NO:17) (451) GGCTGCGGGCACCAGCTCCCGACCTCAAC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (451)
 GGCTGCGGGCACCAGCTCCCGACCTCAAC
 510
 spnK (SEQ ID NO:17) (481) TTGCTCGCCTCCCACTACCGCACGGACAAG
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (481)
 TTGCTCGCCTCCCACTACCGCACGGACAAG
 540
 spnK (SEQ ID NO:17) (511) TGGGGCGGCCTGCACTGGTTACCCCGCTA
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (511)
 TGGGGCGGCCTGCACTGGTTACCCCGCTA
 570
 spnK (SEQ ID NO:17) (541) TACGAGCGACACCTCGGCGAGTTCCGTGAT
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (541)
 TACGAGCGACACCTCGGCGAGTTCCGTGAT

600

spnK (SEQ ID NO:17) (571) CGCCCGGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (561)

630

spnK (SEQ ID NO:17) (601) GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCGGCGGC

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (561)

-----TGGCGGCGGC

660

spnK (SEQ ID NO:17) (631) GAATCCCTGAAGATGTGGAAGCGCTACTTC

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (571)

GAATCCCTGAAGATGTGGAAGCGCTACTTC

690

spnK (SEQ ID NO:17) (661) CACCGCGGCCTCGTGTTCGGGATGGACGTT

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (601)

CACCGCGGCCTCGTGTTCGGGATGGACGTT

720

spnK (SEQ ID NO:17) (691) TTCGACAAGTCCTTCCTCGACCAGCAGAGG

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (631)

TTCGACAAGTCCTTCCTCGACCAGCAGAGG

750

spnK (SEQ ID NO:17) (721) CTCTGCACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (661)

CTCTGCACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG

780

spnK (SEQ ID NO:17) (751) CCCGAGGAGCTGGCCGCCGTTGACGACAAG

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (691)

CCCGAGGAGCTGGCCGCCGTTGACGACAAG

810

spnK (SEQ ID NO:17) (781) TACGGACCGTTTCGACATCATCATCGACGAT

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (721)

TACGGACCGTTTCGACATCATCATCGACGAT

840

spnK (SEQ ID NO:17) (811) GGCAGCCACATCAACGGACACGTGCGCACA

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (751)

GGCAGCCACATCAACGGACACGTGCGCACA

870

spnK (SEQ ID NO:17) (841) TCCCTGGAAACGCTGTTCCCCCGGTTGCGC

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (781)

TCCCTGGAAACGCTGTTCCCCCGGTTGCGC

900

spnK (SEQ ID NO:17) (871) AGCGGTGGCGTATACGTGATCGAGGATCTG

spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (811)
AGCGGTGGCGTATACGTGATCGAGGATCTG
 930
 spnK (SEQ ID NO:17) (901) TGGACGACCTATGCTCCCGGATTTCGGCGGG
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (841)
TGGACGACCTATGCTCCCGGATTTCGGCGGG
 960
 spnK (SEQ ID NO:17) (931) CAGGCGCAGTGCCCGGCCGCACCCGGCACC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (871)
CAGGCGCAGTGCCCGGCCGCACCCGGCACC
 990
 spnK (SEQ ID NO:17) (961) ACGGTCAGCCTGCTCAAGAACCTGTTGGAA
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (901)
ACGGTCAGCCTGCTCAAGAACCTGTTGGAA
 1020
 spnK (SEQ ID NO:17) (991) GGCGTTTCAGCACGAGGAGCAGCCGCATGCG
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (931)
GGCGTTTCAGCACGAGGAGCAGCCGCATGCG
 1050
 spnK (SEQ ID NO:17) (1021) GGCTCGTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (961)
GGCTCGTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC
 1080
 spnK (SEQ ID NO:17) (1051) AATTTGGTCGGCCTCCACACCTACCACAAC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (991)
AATTTGGTCGGCCTCCACACCTACCACAAC
 1110
 spnK (SEQ ID NO:17) (1081) ATCGCGTTCCTGGAGAAAGGCGTCAACGCC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (1021)
ATCGCGTTCCTGGAGAAAGGCGTCAACGCC
 1140
 spnK (SEQ ID NO:17) (1111) GAAGGCGGCGTTCCTGCTTGGGTGCCAAGG
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (1051)
GAAGGCGGCGTTCCTGCTTGGGTGCCAAGG
 1170
 spnK (SEQ ID NO:17) (1141) AGTCTGGACGACATATTGCACCTGGCCGAC
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (1081)
AGTCTGGACGACATATTGCACCTGGCCGAC
 1194
 spnK (SEQ ID NO:17) (1171) GTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA
 spnK SAM#1 khuyết đoạn (SEQ ID NO:11) (1111)
GTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA

Tiếp hợp của vật truyền *spnK* khuyết đoạn vào *Saccharopolyspora spinosa*

Tiếp hợp của các tế bào *E. coli* mang cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* bằng *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994) và được lấy làm ví dụ trong ví dụ 2. Thể sau cộng hợp giả định kháng apramycin, do sự có mặt của chất đánh dấu gen kháng apramycin trên khung vật truyền của cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK*, được chọn.

Xác nhận của thể sau cộng hợp và vùng khuếch đại *spnK* để xác định vị trí hợp nhất

Một thể sau cộng hợp sơ cấp sinh trưởng trên môi trường R6 được chuyển vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để khẳng định phenotip kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Tripxin (TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ của ủ và ADN bộ gen được phân lập. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp làm khuôn mẫu với đoạn mồi được thiết kế để dò một thể đột biến chéo. Kết quả khuếch đại bằng PCR được sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự thể hiện rằng cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* hợp nhất vào vùng *spnK* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo.

Phân lập của chéo kép thể đột biến khuyết đoạn trong khung *spnK*

Một thể đột biến chéo kháng apramycin được cấy lên các đĩa thạch BHI khi không có mặt apramycin và được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa theo Hopwood et al., (1985) và được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Các bào tử được cấy lên các đĩa thạch BHI mới không có apramycin và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Bước này được lặp lại nhiều lần. Chế phẩm bào tử được pha loãng bằng cách sử dụng glyxerol 20% và các bào tử loãng được dàn mỏng trên các đĩa thạch BHI. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển một khuẩn lạc. Khuẩn lạc riêng lẻ được dán lên các đĩa thạch BHI mới có và không có apramycin. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển khuẩn ty. Khuẩn lạc không sinh trưởng trên các đĩa thạch BHI chứa 50µg/mL apramycin được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR.

Nhận biết và xác định tính hợp lệ của thể đột biến chéo kép

Thể đột biến chéo kép được xác nhận nhờ PCR. Đoạn môi được thiết kế để gắn kết trong gen *spnK* được dùng để khuếch đại PCR. Kích thước của các sản phẩm PCR được xác định nhờ điện di gel agarosa. Thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất trong gen *spnK* được nhận diện và được chọn tính theo kích thước của sản phẩm PCR. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR chỉ ra khuyết đoạn của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất trong gen *spnK*.

Sản xuất spinosyn nhờ lên men bình cầu lắc

Quá trình lên men thể đột biến chéo kép có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích cạnh tranh lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Quá trình lên men thể đột biến chéo kép tạo ra spinosyn J và L.

Ví dụ 6.3 Cấu trúc của vật truyền khuyết đoạn trong khung *spnK*

Hai mảnh ADN là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng sản xuất spinosyn A và D (Hopwood et al., 1985). Mảnh khuếch đại thứ nhất có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp xuôi chiều của miền methyltransferazathe phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai. Mảnh khuếch đại thứ hai có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp trước của miền methyltransferazathe phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai. Khuếch đại bằng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Đoạn môi oligonucleotit được tổng hợp để kết hợp các trình tự gắn kết enzym giới hạn. Sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn làm tách các trình tự gắn kết được kết hợp bởi đoạn môi. Các mảnh được nối cùng và sau đó được nối vào tương ứng các vị trí giới hạn của plasmit pOJ260. Sản phẩm nối thu được được tách dòng vào các tế bào *E. coli* tốt. Khuẩn lạc được chọn và được sàng lọc cho sản phẩm nối mong muốn nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn và phân tích trình tự ADN. Dòng vô tính dương tính được nhận diện và dòng vô tính được chọn được dùng để gây khuyết đoạn sau đó trong khung miền methyltransferazathe phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai của *spnK* trong *Saccharopolyspora spinosa*. Trình tự thu được của gen khuyết đoạn *spnK* mảnh trong

plasmid pOJ260 có mặt trong bảng 5. Vì vậy, khuyết đoạn *spnK* sẽ bao gồm trình tự:
SEQ ID NO: 12.

Bảng 5: Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotit của miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai khuyết đoạn của *spnK* (miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định được gạch dưới).

30					
spnK (SEQ ID NO:17)	(1)	ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAACCGTG			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(1)				
ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAACCGTG					
60					
spnK (SEQ ID NO:17)	(31)	GAACGCATCATCCTCGCCGCCGGATCCAGT			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(31)				
GAACGCATCATCCTCGCCGCCGGATCCAGT					
90					
spnK (SEQ ID NO:17)	(61)	GCGGCGAGCCTGGCCGACCTGACCACCGAA			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(61)				
GCGGCGAGCCTGGCCGACCTGACCACCGAA					
120					
spnK (SEQ ID NO:17)	(91)	CTCGGACTCGCCAGGATCGCACCCGTGCTG			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(91)				
CTCGGACTCGCCAGGATCGCACCCGTGCTG					
150					
spnK (SEQ ID NO:17)	(121)	ATCGACGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(121)				
ATCGACGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG					
180					
spnK (SEQ ID NO:17)	(151)	GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGGTCGCG			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(151)				
GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGGTCGCG					
210					
spnK (SEQ ID NO:17)	(181)	GTCCAGATCACCCACCGAGGCGAGACCGTT			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(181)				
GTCCAGATCACCCACCGAGGCGAGACCGTT					
240					
spnK (SEQ ID NO:17)	(211)	GACTTCGTCCTGACGCTACAGTCCGGTGAG			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(211)				
GACTTCGTCCTGACGCTACAGTCCGGTGAG					
270					
spnK (SEQ ID NO:17)	(241)	CTGATCAAGGCCGAGCAACGACCGGTCGGA			
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12)	(241)				
CTGATCAAGGCCGAGCAACGACCGGTCGGA					
300					

spnK (SEQ ID NO:17) (271) GACGTCCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (271)
GACGTCCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC
 330
 spnK (SEQ ID NO:17) (301) ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTTCGGCCCA
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (301)
ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTTCGGCCCA
 360
 spnK (SEQ ID NO:17) (331) GGAGCTCCCAGGGCCGTCGGCGCCCGGAGC
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (331)
GGAGCTCCCAGGGCCGTCGGCGCCCGGAGC
 390
 spnK (SEQ ID NO:17) (361) ACCAACTTCCTCCGAACCAACCATCCGGT
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (361)
ACCAACTTCCTCCGAACCAACCATCCGGT
 420
 spnK (SEQ ID NO:17) (391) TCGATACCCGGTCCGTTCGGAACGTGTCGGAT
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (391)
TCGATACCCGGTCCGTTCGGAACGTGTCGGAT
 450
 spnK (SEQ ID NO:17) (421) GGCTTCCAGGCCATCTCCGCAGTGGTTCGCC
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (421)
GGCTTCCAGGCCATCTCCGCAGTGGTTCGCC
 480
 spnK (SEQ ID NO:17) (451) GGCTGCGGGCACCGACGTCCCGACCTCAAC
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (451)
GGCTGCGGGCACCGACGTCCCGACCTCAAC
 510
 spnK (SEQ ID NO:17) (481) TTGCTCGCCTCCCACTACCGCACGGACAAG
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (481)
TTGCTCGCCTCCCACTACCGCACGGACAAG
 540
 spnK (SEQ ID NO:17) (511) TGGGGCGGCCTGCACTGGTTACACCCGCTA
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (511)
TGGGGCGGCCTGCACTGGTTACACCCGCTA
 570
 spnK (SEQ ID NO:17) (541) TACGAGCGACACCTCGGCGAGTTCCGTGAT
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (541)
TACGAGCGACACCTCGGCGAGTTCCGTGAT
 600
 spnK (SEQ ID NO:17) (571) CGCCCGGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC
 spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (571)
CGCCCGGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC

630

spnK (SEQ ID NO:17) (601) GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCGGCGGC

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (601)

GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCGGCGGC

660

spnK (SEQ ID NO:17) (631) GAATCCCTGAAGATGTGGAAGCGCTACTTC

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (631)

GAATCCCTGAAGATGTGGAAGCGCTACTTC

690

spnK (SEQ ID NO:17) (661) CACCGCGGCCTCGTGTTCCGGGATGGACGTT

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (661)

CACCGCGGCCTCGTGTTCCGGGATGGACGTT

720

spnK (SEQ ID NO:17) (691) TTCGACAAGTCCTTCCTCGACCAGCAGAGG

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (691)

TTCGACAAGTCCTTCCTCGACCAGCAGAGG

750

spnK (SEQ ID NO:17) (721) CTCTGCACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (721)

CTCTGCACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG

780

spnK (SEQ ID NO:17) (751) CCCGAGGAGCTGGCCGCCGTTGACGACAAG

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (751)

CCCGAGGAGCTGGCCGCCGTTGACGACAAG

810

spnK (SEQ ID NO:17) (781) TACGGACCGTTCGACATCATCATCGACGAT

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (781)

840

spnK (SEQ ID NO:17) (811) GGCAGCCACATCAACGGACACGTGCGCACA

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (781)

870

spnK (SEQ ID NO:17) (841) TCCCTGGAAACGCTGTTCCCCCGGTTGCGC

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (781)

900

spnK (SEQ ID NO:17) (871) AGCGGTGGCGTATACGTGATCGAGGATCTG

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (781)

-----CGAGGATCTG

930

spnK (SEQ ID NO:17) (901) TGGACGACCTATGCTCCCGGATTCTGGCGGG

spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (791)
TGGACGACCTATGCTCCCGGATTTCGGCGGG
960
spnK (SEQ ID NO:17) (931) CAGGCGCAGTGCCCGGCCGCACCCGGCACC
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (821)
CAGGCGCAGTGCCCGGCCGCACCCGGCACC
990
spnK (SEQ ID NO:17) (961) ACGGTCAGCCTGCTCAAGAACCTGTTGGAA
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (851)
ACGGTCAGCCTGCTCAAGAACCTGTTGGAA
1020
spnK (SEQ ID NO:17) (991) GGCGTTTCAGCACGAGGAGCAGCCGCATGCG
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (881)
GGCGTTTCAGCACGAGGAGCAGCCGCATGCG
1050
spnK (SEQ ID NO:17) (1021) GGCTCGTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (911)
GGCTCGTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC
1080
spnK (SEQ ID NO:17) (1051) AATTTGGTCCGGCCTCCACACCTACCACAAC
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (941)
AATTTGGTCCGGCCTCCACACCTACCACAAC
1110
spnK (SEQ ID NO:17) (1081) ATCGCGTTCCTGGAGAAAGGCGTCAACGCC
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (971)
ATCGCGTTCCTGGAGAAAGGCGTCAACGCC
1140
spnK (SEQ ID NO:17) (1111) GAAGGCGGCGTTCCTGCTTGGGTGCCAAGG
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (1001)
GAAGGCGGCGTTCCTGCTTGGGTGCCAAGG
1170
spnK (SEQ ID NO:17) (1141) AGTCTGGACGACATATTGCACCTGGCCGAC
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (1031)
AGTCTGGACGACATATTGCACCTGGCCGAC
1194
spnK (SEQ ID NO:17) (1171) GTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA
spnK SAM#2 khuyết đoạn (SEQ ID NO:12) (1061)
GTGAACAGCGCGGAGGACGAGTGA

Tiếp hợp của vật truyền *spnK* khuyết đoạn vào *Saccharopolyspora spinosa*

Tiếp hợp của các tế bào *E. coli* mang cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* bằng *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả

trong Matsushima et al., (1994) và được lấy làm ví dụ trong ví dụ 2. Thể sau cộng hợp giả định kháng apramycin, do sự có mặt của chất đánh dấu gen kháng apramycin trên khung vật truyền của cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK*, được chọn.

Việc xác nhận của thể sau cộng hợp và vùng khuếch đại *spnK* để xác định vị trí hợp nhất

Một thể sau cộng hợp sơ cấp sinh trưởng trên môi trường R6 được chuyển vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để kháng định phenotip kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Tripxin (TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ của ủ và ADN bộ gen được phân lập. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp làm khuôn mẫu với đoạn mồi được thiết kế để dò một thể đột biến chéo. Kết quả khuếch đại bằng PCR được sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự thể hiện rằng cấu trúc khuyết đoạn trong khung *spnK* hợp nhất vào vùng *spnK* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo.

Phân lập của chéo kép thể đột biến khuyết đoạn trong khung *spnK*

Một thể đột biến chéo kháng apramycin được cấy lên các đĩa thạch BHI khi không có mặt apramycin và được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa theo Hopwood et al., (1985) và được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Các bào tử được cấy lên các đĩa thạch BHI mới không có apramycin và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Bước này được lặp lại nhiều lần. Chế phẩm bào tử được pha loãng bằng cách sử dụng glyxerol 20% và các bào tử loãng được dàn mỏng trên các đĩa thạch BHI. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển một khuẩn lạc. Khuẩn lạc riêng lẻ được dán lên các đĩa thạch BHI mới có và không có apramycin. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển khuẩn ty. Khuẩn lạc không sinh trưởng trên các đĩa thạch BHI chứa 50 µg/mL apramycin được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR.

Nhận biết và xác định tính hợp lệ của thể đột biến chéo kép

Thể đột biến chéo kép được xác nhận nhờ PCR. Đoạn mồi được thiết kế để gắn kết trong gen *spnK* được dùng để khuếch đại PCR. Kích thước của các sản phẩm PCR được xác định nhờ điện di gel agarosa. Thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của miền methyltransferazathe phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai trong gen *spnK* được nhận diện và được chọn tính theo kích thước của sản phẩm PCR. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR chỉ ra khuyết đoạn của miền methyltransferazathe phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ hai trong gen *spnK*.

Sản xuất spinosyn nhờ lên men bình cầu lắc

Quá trình lên men thể đột biến chéo kép có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thit lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Quá trình lên men thể đột biến chéo kép tạo ra spinosyn J và L.

Ví dụ 6.4 Cấu trúc của *spnK* đầu 3' khuyết đoạn vật truyền

Hai mảnh ADN là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng sản xuất spinosyn A và D (Hopwood et al., 1985). Mảnh khuếch đại thứ nhất có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp xuôi chiều của *spnK* cặp bazơ 1141. Mảnh khuếch đại thứ hai có chiều dài khoảng 1500bp, và được định vị trực tiếp trước của codon kết thúc *spnK* và bao gồm phần *spnL*. Khuếch đại bằng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp để kết hợp các trình tự gắn kết enzym giới hạn. Sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn làm tách các trình tự gắn kết được kết hợp bởi đoạn mồi. Các mảnh được nối cùng và sau đó được nối vào tương ứng các vị trí giới hạn của plasmit pOJ260. Sản phẩm nối thu được được tách dòng vào các tế bào *E. coli* tốt. Khuẩn lạc được chọn và được sàng lọc cho sản phẩm nối mong muốn nhờ phân cắt bằng enzym giới hạn và phân tích trình tự ADN. Dòng vô tính dương tính được nhận diện và dòng vô tính được chọn được dùng để gây khuyết đoạn sau đó của đầu 3' của *spnK* trong *Saccharopolyspora spinosa*. Trình tự thu được của mảnh gen khuyết đoạn *spnK* trong plasmit pOJ260 có mặt trong bảng 6. Vì vậy, khuyết đoạn *spnK* sẽ bao gồm trình tự: SEQ ID NO: 13.

Bảng 6: Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotit của đầu 3' khuyết đoạn của gen *spnK*.

25	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(1)
	ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAA		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1)	ATGTCCACAACGCACGAGATCGAAA
50	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(26)
	CCGTGGAACGCATCATCCTCGCCGC		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(26)	CCGTGGAACGCATCATCCTCGCCGC
75	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(51)
	CGGATCCAGTGCGGCGAGCCTGGCC		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(51)	CGGATCCAGTGCGGCGAGCCTGGCC
100	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(76)
	GACCTGACCACCGAACTCGGACTCG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(76)	GACCTGACCACCGAACTCGGACTCG
125	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(101)
	CCAGGATCGCACCCGTGCTGATCGA		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(101)	CCAGGATCGCACCCGTGCTGATCGA
150	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(126)
	CGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(126)	CGAGATCCTCTTCCGCGCGGAACCG
175	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(151)
	GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(151)	GCCCCCGACATCGAACGGACCGAGG
200	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(176)
	TCGCGGTCCAGATCACCCACCGAGG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(176)	TCGCGGTCCAGATCACCCACCGAGG
225	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(201)
	CGAGACCGTTGACTTCGTCCTGACG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(201)	CGAGACCGTTGACTTCGTCCTGACG
250	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(226)
	CTACAGTCCGGTGAGCTGATCAAGG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(226)	CTACAGTCCGGTGAGCTGATCAAGG
275	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(251)
	CCGAGCAACGACCGGTCGGAGACGT		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(251)	CCGAGCAACGACCGGTCGGAGACGT
300	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(276)
	CCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(276)	CCCGCTGCGGATCGGTTACGAGCTC
325	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(301)
	ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTCCG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(301)	ACCGATCTCATCGCCGAGTTGTTCCG
350	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(326)
	GCCCAGGAGCTCCCAGGGCCGTCGG		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(326)	GCCCAGGAGCTCCCAGGGCCGTCGG
375	khuyết đoạn đầu 3' <i>spnK</i>	(SEQ ID NO:13)	(351)
	CGCCCCGAGCACCAACTTCCTCCGA		
	<i>spnK</i> và seq trước (SEQ ID NO:15)	(351)	CGCCCCGAGCACCAACTTCCTCCGA
400			

khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (376)	
<u>ACCACCACATCCGGTTCGATACCCG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (376)	<u>ACCACCACATCCGGTTCGATACCCG</u>
425	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (401)	
<u>GTCCGTCGGAAGTGTCCGATGGCTT</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (401)	<u>GTCCGTCGGAAGTGTCCGATGGCTT</u>
450	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (426)	
<u>CCAGGCCATCTCCGCAGTGGTCGCC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (426)	<u>CCAGGCCATCTCCGCAGTGGTCGCC</u>
475	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (451)	
<u>GGCTGCGGGCACCGACGTCCCGACC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (451)	<u>GGCTGCGGGCACCGACGTCCCGACC</u>
500	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (476)	
<u>TCAACTTGCTCGCCTCCCACTACCG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (476)	<u>TCAACTTGCTCGCCTCCCACTACCG</u>
525	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (501)	
<u>CACGGACAAGTGGGGCGGCCTGCAC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (501)	<u>CACGGACAAGTGGGGCGGCCTGCAC</u>
550	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (526)	
<u>TGGTTCACCCCGCTATACGAGCGAC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (526)	<u>TGGTTCACCCCGCTATACGAGCGAC</u>
575	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (551)	
<u>ACCTCGGCGAGTTCGGTGATCGCCC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (551)	<u>ACCTCGGCGAGTTCGGTGATCGCCC</u>
600	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (576)	
<u>GGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (576)	<u>GGTGCGCATCCTGGAGATCGGTGTC</u>
625	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (601)	
<u>GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (601)	<u>GGTGGCTACAACCTTCGACGGTGGCG</u>
650	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (626)	
<u>GCGGCGAATCCCTGAAGATGTGGAA</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (626)	<u>GCGGCGAATCCCTGAAGATGTGGAA</u>
675	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (651)	
<u>GCGCTACTTCCACCGCGGCCTCGTG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (651)	<u>GCGCTACTTCCACCGCGGCCTCGTG</u>
700	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (676)	
<u>TTCGGGATGGACGTTTTTCGACAAGT</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (676)	<u>TTCGGGATGGACGTTTTTCGACAAGT</u>
725	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (701)	
<u>CCTTCCTCGACCAGCAGAGGCTCTG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (701)	<u>CCTTCCTCGACCAGCAGAGGCTCTG</u>
750	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (726)	
<u>CACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (726)	<u>CACCGTCCGCGCCGACCAGAGCAAG</u>
775	
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (751)	
<u>CCCGAGGAGCTGGCCGCGTTGACG</u>	
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (751)	<u>CCCGAGGAGCTGGCCGCGTTGACG</u>

800	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(776)
ACAAGTACGGACCGTTCGACATCAT		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(776)	ACAAGTACGGACCGTTCGACATCAT
825	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(801)
CATCGACGATGGCAGCCACATCAAC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(801)	CATCGACGATGGCAGCCACATCAAC
850	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(826)
GGACACGTGCGCACATCCCTGGAAA		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(826)	GGACACGTGCGCACATCCCTGGAAA
875	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(851)
CGCTGTTCCCCCGGTTGCGCAGCGG		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(851)	CGCTGTTCCCCCGGTTGCGCAGCGG
900	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(876)
TGGCGTATACGTGATCGAGGATCTG		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(876)	TGGCGTATACGTGATCGAGGATCTG
925	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(901)
TGGACGACCTATGCTCCCGGATTCTG		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(901)	TGGACGACCTATGCTCCCGGATTCTG
950	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(926)
GCGGGCAGGCGCAGTGCCCGGCCGC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(926)	GCGGGCAGGCGCAGTGCCCGGCCGC
975	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(951)
ACCCGGCACCACGGTCAGCCTGCTC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(951)	ACCCGGCACCACGGTCAGCCTGCTC
1000	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(976)
AAGAACCTGTTGGAAGGCGTTCAGC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(976)	AAGAACCTGTTGGAAGGCGTTCAGC
1025	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1001)
ACGAGGAGCAGCCGCATGCGGGCTC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1001)	ACGAGGAGCAGCCGCATGCGGGCTC
1050	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1026)
GTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1026)	GTACGAGCCGAGCTACCTGGAACGC
1075	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1051)
AATTTGGTCGGCCTCCACACCTACC		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1051)	AATTTGGTCGGCCTCCACACCTACC
1100	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1076)
ACAACA-----		
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1076)	ACAACATCGCGTTCCTGGAGAAAGG
1125	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1082)

spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1101)	CGTCAACGCCGAAGGCGGCGTTCCT
1150	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1082)

spnK và seq trước (SEQ ID NO:15)	(1126)	GCTTGGGTGCCAAGGAGTCTGGACG
1175	khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13)	(1082)

```

spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (1151) ACATATTGCACCTGGCCGACGTGAA
1200
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (1082) -----
CAGCA
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (1176) CAGCGCGGAGGACGAGTGAACAGCA
1225
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (1087)
GAGGGGCGAACACACAGGCATTTC
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (1201) GAGGGGCGAACACACAGGCATTTC
1238
khuyết đoạn đầu 3' spnK (SEQ ID NO:13) (1112) GACCGCGGATCAG
spnK và seq trước (SEQ ID NO:15) (1226) GACCGCGGATCAG

```

Tiếp hợp của vật truyền *spnK* khuyết đoạn vào *Saccharopolyspora spinosa*

Tiếp hợp của các tế bào *E. coli* mang *spnK* đầu 3' cấu trúc khuyết đoạn bằng *Saccharopolyspora spinosa* được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả trong Matsushima et al., (1994) và được lấy làm ví dụ trong ví dụ 2. Thể sau cộng hợp giả định kháng apramycin, do sự có mặt của chất đánh dấu gen kháng apramycin trên khung vật truyền của *spnK* đầu 3' cấu trúc khuyết đoạn, được chọn.

Xác nhận của thể sau cộng hợp và vùng khuếch đại *spnK* để xác định vị trí hợp nhất

Một thể sau cộng hợp sơ cấp sinh trưởng trên môi trường R6 được chuyển vào các đĩa thạch Brain Heart Infusion (BHI) được bổ sung 50µg/mL apramycin và 25µg/mL axit nalidixic để khẳng định phenotíp kháng. Khuẩn ty của thể sau cộng hợp được cấy từ đĩa BHI vào môi trường canh thịt đậu tương Tripxin (TSB) được bổ sung 50µg/mL apramycin. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 29°C kết hợp lắc ở 250 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Khuẩn ty được thu hoạch sau thời gian 72 giờ của ủ và ADN bộ gen được phân lập. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen được tách ra từ thể sau cộng hợp làm khuôn mẫu với đoạn môi được thiết kế để dò một thể đột biến chéo. Kết quả khuếch đại bằng PCR được sắp xếp trình tự. Dữ liệu sắp xếp trình tự thể hiện rằng *spnK* đầu 3' cấu trúc khuyết đoạn hợp nhất vào vùng *spnKL* nhờ một tái tổ hợp tương đồng chéo.

Phân lập thể đột biến khuyết đoạn đầu 3' chéo kép *spnK*

Một thể đột biến chéo kháng apramycin được cấy lên các đĩa thạch BHI khi không có mặt apramycin và được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Các bào tử được thu hoạch từ các đĩa theo Hopwood et al., (1985) và được cất giữ trong glyxerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Các bào tử được cấy lên các đĩa thạch BHI mới không có apramycin và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 14 ngày. Bước này được lặp lại nhiều lần. Chế phẩm bào tử được pha loãng bằng cách sử dụng glyxerol

20% và các bào tử loãng được dàn mỏng trên các đĩa thạch BHI. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển một khuẩn lạc. Khuẩn lạc riêng lẻ được dán lên các đĩa thạch BHI mới có và không có apramycin. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 29°C trong thời gian 10 ngày để phát triển khuẩn ty. Khuẩn lạc không sinh trưởng trên các đĩa thạch BHI chứa 50µg/mL apramycin được nhận diện là ứng cử viên của thể đột biến chéo kép và được chọn để xác định tính hợp lệ bằng cách sử dụng PCR.

Nhận biết và xác định tính hợp lệ của thể đột biến chéo kép

Thể đột biến chéo kép được xác nhận nhờ PCR. Đoạn mồi được thiết kế để gắn kết trong gen *spnK* và *spnL* được dùng để khuếch đại PCR. Kích thước của các sản phẩm PCR được xác định nhờ điện di gel agarosa. Thể đột biến chéo kép dẫn đến khuyết đoạn của đầu 3' của gen *spnK* được nhận diện và được chọn tính theo kích thước của sản phẩm PCR. Kích thước và trình tự ADN của mảnh PCR chỉ ra khuyết đoạn của đầu 3' của gen *spnK*.

Sản xuất spinosyn nhờ lên men bình cầu lắc

Quá trình lên men thể đột biến chéo kép có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Burns et al., (WO 2003070908). Phân tích canh thối lên men về sự có mặt của yếu tố spinosyn có thể được thực hiện trong các điều kiện được mô tả bởi Baltz et al., (patent Mỹ số 6,143,526). Quá trình lên men thể đột biến chéo kép tạo ra spinosyn J và L.

Tất cả các patent và công bố được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Phần mô tả trên đây nhằm minh họa sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Sáng chế được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ sau, với các dạng tương đương của yêu cầu bảo hộ được bao hàm trong đó.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DowAgrosciences
Han, Lei

<120> Quy trình chuyển hóa và phương pháp chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram và tế bào vật chủ biến đổi gen tạo ra tiền chất spinetoram

<130> 69250

<160> 17

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: spnKF

<400> 1

gggaattcca tatgtccaca acgcacgaga tcga

34

<210> 2

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: spnKR

<400> 2

gccgctcgag ctgctcctcc gcgctgttca cgtc

34

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: đoạn mỗi thuận #1

<400> 3

cgggtgcccga attccatgac ccg

23

<210> 4

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: đoạn mỗi nghịch #1

<400> 4

gtgcgttcta gacatatgag ctcctcatgg ctg

33

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: đoạn mỗi thuận #2

<400> 5

gtgccatcta gactggacga catattgcac ctg

33

<210> 6

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: đoạn mỗi nghịch #2

<400> 6

gaatgcgaag cttacgatct cgtcgtccgt g

31

<210> 7

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: spnK Del Xác nhận tính hợp lệ 1Thuận

<400> 7

gttcacggtg attccggtga ctcg

24

<210> 8

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit: spnK Del Xác nhận tính hợp lệ 1Nghịch

<400> 8

acctgcactg cttcctggag cttc

24

<210> 9

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự spnK chứa khuyết đoạn bên trong

<400> 9

atgtctagac tggacgacat attgcacctg gccgacgtga acagcgcgga ggacgagtga

60

<210> 10

<211> 1147

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự spnK chứa khuyết đoạn ở đầu 5'

<400> 10

ggagctcatc acggcgccga gcctggccga cctgaccacc gaactcggac tcgccaggat

60

cgcacccgtg ctgatcgacg agatcctett ccgcgcggaa ccggcccccg acatcgaacg

120

gaccgaggtc gcggtccaga tcaccaccg aggcgagacc gttgacttcg tcctgacgct

180

acagtccggt gagctgatca aggccgagca acgaccggtc ggagacgtcc cgctgcggat 240
 cggttacgag ctcaccgatc tcatcgccga gttgttcggc ccaggagctc ccagggccgt 300
 cggcgcccgg agcaccaact tcctccgaac caccacatcc ggttcgatac ccggtccgtc 360
 ggaactgtcc gatggcttcc aggccatctc cgcagtggtc gccggctgcg ggcaccgacg 420
 tcccgaacct aacttgctcg cctcccacta ccgcacggac aagtggggcg gcctgcactg 480
 gttcaccgag ctatacgagc gacacctcgg cgagttccgt gatcgcccgg tgcgcatcct 540
 ggagatcggg gtcgggtggc acaacttcga cgggtggcggc gggaatccc tgaagatgtg 600
 gaagcgctac ttccaccgag gcctcgtgtt cgggatggac gttttcgaca agtccttcct 660
 cgaccagcag aggtctctga ccgtccgcgc cgaccagagc aagcccagg agctggccgc 720
 cggtgacgac aagtacggac cggtcgacat catcatcgac gatggcagcc acatcaacgg 780
 acacgtgcgc acatccctgg aaacgctgtt ccccgggtg cgcagcggtg gcgtatacgt 840
 gatcgaggat ctgtggacga cctatgctcc cggattcggc gggcaggcgc agtggccggc 900
 cgcaccggc accacggtca gcctgctcaa gaacctgttg gaaggcgttc agcacgagga 960
 gcagccgcat gcgggctcgt acgagccgag ctacctgaa cgcaatttg tggcctcca 1020
 cacctaccac aacatcgctt tcctggagaa aggcgtcaac gccgaaggcg gcgttcctgc 1080
 ttgggtgcca aggagtctgg acgacatatt gcacctggcc gacgtgaaca gcgcggagga 1140
 cgagtga 1147

<210> 11

<211> 1134

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuyết đoạn miền methyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin giả định thứ nhất của spnK

<400> 11

atgtccacaa cgcacgagat cgaaaccgtg gaacgcatca tcctcgccgc cggatccagt 60

gcggcgagcc tggccgacct gaccaccgaa ctcggactcg ccaggatcgc acccgtgctg 120

atcgacgaga tcctcttccg cgcggaaccg gcccccgaca tcgaacggac cgaggtcgcg 180
 gtccagatca cccaccgagg cgagaccgtt gacttcgtcc tgacgtaca gtccggtgag 240
 ctgatcaagg ccgagcaacg accggtcgga gacgtcccg cgcggatcgg ttacgagctc 300
 accgatctca tcgccgagtt gttcggccca ggagctcca gggccgctcg cgcccggagc 360
 accaacttcc tccgaaccac cacatccggt tcgatacccg gtccgtcgga actgtccgat 420
 ggcttccagg ccatctccgc agtggtcgcc ggctgcgggc accgacgtcc cgacctcaac 480
 ttgctcgctt ccactaccg caccgacaag tggggcggcc tgcactggtt caccocgcta 540
 tacgagcgac acctcggcga tggcggcggc gaatccctga agatgtggaa gcgctacttc 600
 caccgcggcc tcgtgttcgg gatggacgtt ttgacaagt ccttcctcga ccagcagagg 660
 ctctgcaccg tccgcgccga ccagagcaag cccgaggagc tggccgccgt tgacgacaag 720
 tacggaccgt tcgacatcat catcgacgat ggcagccaca tcaacggaca cgtgcgcaca 780
 tccttgaaa cgctgttccc ccggttcgc agcggtggcg tatacgtgat cgaggatctg 840
 tggacgacct atgtcccggt attcggcggg caggcgcagt gcccgccgc acccggcacc 900
 acggtcagcc tgctcaagaa cctgttgaa ggcgttcagc acgaggagca gccgatgcg 960
 ggctcgtacg agccgagcta cctggaacgc aatttggtcg gcctccacac ctaccacaac 1020
 atcgcgttcc tggagaaagg cgtcaacgcc gaaggcggcg ttctgcttg ggtgccaagg 1080
 agtctggacg acatattgca cctggccgac gtgaacagcg cggaggacga gtga 1134

<210> 12
 <211> 1084
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khuyết đoạn miền metyltransferaza phụ thuộc S-adenosylmethionin già định thứ hai của spnK

<400> 12

atgtccacaa cgcacgagat cgaaaccgtg gaacgcatca tcctcgccgc cggatccagt 60

ggggagagcc tggccgacct gaccacogaa ctccgactcg ccaggatcgc acccgtgctg 120
 atcgacgaga tcctcttccg cgcggaaccg gcccccgaca tcgaacggac cgaggctcgc 180
 gtccagatca cccaccgagg cgagaccgtt gacttcgtcc tgacgctaca gtcgggtgag 240
 ctgatcaagg ccgagcaacg accggtcgga gacgtcccgc tgcggatcgg ttacgagctc 300
 accgatctca tcgccgagtt gttcggccca ggagctccca gggccgctcg cgcgcggagc 360
 accaacttcc tccgaaccac cacatccggt tcgatacccg gtccgtcgga actgtccgat 420
 ggcttccagg ccatctccgc agtggctgcc ggctgcgggc accgacgtcc cgacctcaac 480
 ttgctgcct cccactaccg cacggacaag tggggcggcc tgcactggtt cccccgcta 540
 tacgagcgac acctcgcgga gttccgtgat cgcgcggtgc gcatcctgga gatcgggtgc 600
 ggtggctaca acttcgacgg tggcgggggc gaatccctga agatgtggaa gcgctacttc 660
 caccgcggcc tcgtgttcgg gatggacgtt ttcgacaagt ccttcctcga ccagcagagg 720
 ctctgcaccg tccgcgcga ccagagcaag cccgaggagc tggccgccgt tgacgacaag 780
 cgaggatctg tggacgacct atgctcccgg attcggcggg caggcgcagt gcccggccgc 840
 acccggcacc acggtcagcc tgctcaagaa cctgttgga ggcgttcagc acgaggagca 900
 gccgcatcgc ggctcgtacg agccgagcta cctggaacgc aatttggtcg gcctccacac 960
 ctaccacaac atcgcgttcc tggagaaagg cgtcaacgcc gaaggcggcg ttcttgcttg 1020
 ggtgccaagg agtctggacg acatattgca cctggccgac gtgaacagcg cggaggacga 1080
 gtga 1084

<210> 13

<211> 1124

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit spnK chứa khuyết đoạn ở đầu 3'

<400> 13

atgtccacaa cgcacgagat cgaaaccgtg gaacgcatca tcctcgccgc cggatccagt 60

gcggcgagcc tggccgacct gaccaccgaa ctoggactcg ccaggatcg acccgtgctg 120
 atcgacgaga tcctcttccg cgcggaaccg gcccccgaca tcgaacggac cgaggctcg 180
 gtccagatca cccaccgagg cgagaccgtt gacttcgtcc tgacgctaca gtccggtgag 240
 ctgatcaagg ccgagcaacg accggtcggg gacgtcccg tgccgatcgg ttacgagctc 300
 accgatctca tcgccgagtt gtccggccca ggagctccca gggccgtcgg cggccggagc 360
 accaacttcc tccgaaccac cacatccggt tcgatacccg gtccgtcggg actgtccgat 420
 ggcttccagg ccatctccgc agtggtcgcc ggctgcgggc accgacgtcc cgacctcaac 480
 ttgctcgctt cccactaccg cagggacaag tggggcgggc tgcactggtt cccccgcta 540
 tacgagcgac acctcggcga gttccgtgat cggccggtgc gcatacctgga gatcgggtgc 600
 ggtggctaca atttcgacgg tggcgggcgc gaatccctga agatgtggaa gcgctacttc 660
 caccgcggcc tcgtgttcgg gatggacgtt ttcgacaagt ccttcctcga ccagcagagg 720
 ctctgcaccg tccgcgccga ccagagcaag cccgaggagc tggccgccgt tgacgacaag 780
 tacggaccgt tcgacatcat catcgacgat ggcagccaca tcaacggaca cgtgcgcaca 840
 tccctggaaa cgctgttccc ccggttgccg agcgggtggc tatacgtgat cgaggatctg 900
 tggacgacct atgctcccgg attcggcggg caggcgagc gcccggccgc acccggcacc 960
 acggtcagcc tgctcaagaa cctgttgga ggcgttcagc acgaggagca gccgcatgcg 1020
 ggctcgtacg agccgagcta cctggaacgc aatttggtcg gcctccacac ctaccacaac 1080
 acagcagagg ggcgaacaca caggcatttc cgaccgcgga tcag 1124

<210> 14

<211> 1207

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> spnK và trình tự phía trên liền kề

<400> 14

ggagctcatc acgatgtcca caacgcacga gatcgaaacc gtggaacgca tcatacctcgc 60

cgccggatcc agtgcggcga gcctggccga cctgaccacc gaactcggac tcgccaggat 120

cgaccccggtg ctgatcgacg agatcctctt ccgcgcggaa ccggcccccg acatcgaacg 180

gaccgagggtc gcggtccaga tcacccaccg aggcgagacc gttgacttcg tcctgacgct 240

acagtccggt gagctgatca aggcgagca acgaccggtc ggagacgtcc cgctgcggat 300

cggttacgag ctcaccgatc tcatcgccga gttgttcggc ccaggagctc ccagggccgt 360

cggcgcccgg agcaccaact tcctccgaac caccacatcc ggttcgatac ccggtccgtc 420

ggaactgtcc gatggcttcc aggccatctc cgcagtggtc gccggctgcg ggcaccgacg 480

tcccgacctc aacttgctcg cctcccacta ccgcacggac aagtggggcg gcctgcactg 540

gttcaccccg ctatacgagc gacacctcgg cgagttccgt gatcgcccgg tgcgcatcct 600

ggagatcggg gtcggtggct acaacttcga cgggtggcggc ggcgaatccc tgaagatgtg 660

gaagcgctac ttccaccgcg gcctcgtgtt cgggatggac gttttcgaca agtccttcct 720

cgaccagcag aggtctctga ccgtccgcgc cgaccagagc aagcccagg agctggccgc 780

cgttgacgac aagtacggac cgttcgacat catcatcgac gatggcagcc acatcaacgg 840

acacgtgcgc acatccctgg aaacgctgtt cccccggtg cgcagcggtg gcgtatacgt 900

gatcgaggat ctgtggacga cctatgctcc cggattcggc gggcaggcgc agtgcgccgc 960

cgaccccggc accacggtca gcctgctcaa gaacctgttg gaaggcggtc agcacgagga 1020

gcagccgcat gcgggctcgt acgagccgag ctacctggaa cgcaatttg tcggcctcca 1080

cacctaccac aacatcgctg tcctggagaa aggcgtcaac gccgaaggcg gcgttcctgc 1140

ttgggtgcca aggagtctgg acgacatatt gcacctggcc gacgtgaaca gcgcggagga 1200

cgagtga 1207

<210> 15
 <211> 1238
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> spnK và trình tự phía dưới liền kề

<400> 15

```

atgtccacaa cgcacgagat cgaaaccgtg gaacgcatca tcctcgccgc cggatccagt      60

gcggcgagcc tggccgacct gaccaccgaa ctccgactcg ccaggatcg acccgtgctg      120

atcgacgaga tcctcttccg cgcggaaccg gccccgaca tcgaacggac cgaggtcgcg      180

gtccagatca cccaccgagg cgagaccgtt gacttcgtcc tgacgctaca gtccggtgag      240

ctgatcaagg ccgagcaacg accggtcgga gacgtcccg tgccgatcgg ttacgagctc      300

accgatctca tcgccgagtt gttcggccca ggagctccca gggccgtcgg cgcccggagc      360

accaacttcc tccgaaccac cacatccggt tcgatacccg gtccgtcgga actgtccgat      420

ggcttccagg ccatctccgc agtggtcgcc ggctgcgggc accgacgtcc cgacctcaac      480

ttgctcgctt cccactaccg caccgacaag tggggcggcc tgcactggtt caccctgcta      540

tacgagcgac acctcggcga gttccgtgat cgcccgtgac gcatacctgga gatcgggtgc      600

ggtggctaca acttcgacgg tggcgggcgc gaatccctga agatgtggaa gcgctacttc      660

caccgcggcc tcgtgttcgg gatggacgtt ttcgacaagt ccttcctcga ccagcagagg      720

ctctgcaccg tccgcgccga ccagagcaag cccgaggagc tggccgccgt tgacgacaag      780

tacggaccgt tcgacatcat catcgacgat ggcagccaca tcaacggaca cgtgcgcaca      840

tccttgaaaa cgctgttccc ccggttcgac agcgggtggcg tatacgtgat cgaggatctg      900

tggaacacct atgctcccg attcggcggg caggcgcagt gcccgccgc acccggcacc      960

acggtcagcc tgctcaagaa cctggttgaa ggcgttcagc acgaggagca gccgcatcgc     1020

ggctcgtacg agccgagcta cctggaacgc aatttggtcg gcctccacac ctaccacaac     1080

atcgcggtcc tggagaaagg cgtcaacgcc gaaggcggcg ttctgcttg ggtgccaagg     1140

agtctggacg acatattgca cctggccgac gtgaacagcg cggaggacga gtgaacagca     1200

gaggggcgaa cacacaggca tttccgaccg cggatcag                                1238

```

<210> 16

<211> 70

<212> ADN

<213> Saccharopolyspora spinosa

<400> 16

ccgccggcac ggctttcacc cggtcagcca tgaggagctc atcacgatgt ccacaacgca 60

cgagatcgaa 70

<210> 17

<211> 1194

<212> ADN

<213> Saccharopolyspora spinosa

<400> 17

atgtccacaa cgcacgagat cgaaaccgtg gaacgcatca tcctcgccgc cggatccagt 60

gcgggcgagcc tggccgacct gaccaccgaa ctcggaactcg ccaggatcgc acccgtgctg 120

atcgacgaga tcctcttccg cgcggaaccg gccccgaca tcgaacggac cgaggctcgcg 180

gtocagatca cccaccgagg cgagaccgtt gacttcgtcc tgacgctaca gtccggtgag 240

ctgatcaagg ccgagcaacg accggtcggg gacgtcccgc tgcggatcgg ttacgagctc 300

accgatctca tcgccgagtt gttcggccca ggagctccca gggccgctcg cgcccgagc 360

accaacttcc tccgaaccac cacatccggt tcgatacccg gtccgtcggg actgtccgat 420

ggcttccagg ccatctccgc agtgggtcgc ggctgcgggc accgacgtcc cgacctcaac 480

ttgctcgcct ccactaccg cacggacaag tggggcgggc tgcaactggtt caccocgcta 540

tacgagcgac acctcggcga gttccgtgat cgcccggtgc gcactctgga gatcgggtgc 600

ggtggctaca acttcgacgg tggcggcggc gaatccctga agatgtggaa gcgctacttc 660

caccgcgggc tcgtgttcgg gatggacgtt ttcgacaagt ccttctctga ccagcagagg 720

ctctgcaccg tccgcgccga ccagagcaag cccgaggagc tggccgccgt tgacgacaag 780

tacggaccgt tcgacatcat catcgacgat ggcagccaca tcaacggaca cgtgcgcaca 840

tccttggaag cgctgttccc ccggttcgac agcgggtggc tatacgtgat cgaggatctg 900

tggacgacct atgctcccgg attcggcggg caggcgcagt gcccgccgc acccggcacc 960

acggtcagcc tgctcaagaa cctgttgga ggcgttcagc acgaggagca gccgcatgag 1020

ggctcgtagc agccgagcta cctggaacgc aatttggtcg gcctccacac ctaccacaac	1080
atcgcgttcc tggagaaagg cgtcaacgcc gaaggcggcg ttcttgcttg ggtgccaagg	1140
agtctggacg acatattgca cctggccgac gtgaacagcg cggaggacga gtga	1194

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram bao gồm bước tạo ra cải biến ở gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O-methyltransferaza, trong đó cải biến này được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung, đột biến điểm, khuyết đoạn và cài xen, và trong đó đột biến điểm xảy ra ở vị trí cặp bazơ được chọn từ nhóm bao gồm vị trí 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131, trong đó gen *spnK* bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 17, trong đó khuyết đoạn trong khung được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3', và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*, trong đó khuyết đoạn này là khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*, và trong đó cài xen là cài xen bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó gen *spnK* được làm bất hoạt nhờ sử dụng kỹ thuật đối nghĩa.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó cải biến xảy ra trong vùng ghi mã *spnK*.
4. Tế bào vật chủ biến đổi gen tạo ra tiền chất spinetoram, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào vật chủ nhân sơ mà bình thường không tạo ra được lượng đáng kể tiền chất spinetoram, bao gồm tạo ra cải biến ở gen *spnK* để khử hoạt tính 3'-O-methyltransferaza, trong đó cải biến này được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung, đột biến điểm, khuyết đoạn và cài xen, và trong đó đột biến điểm xảy ra ở vị trí cặp bazơ được chọn từ nhóm bao gồm vị trí 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131, trong đó gen *spnK* bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 17, trong đó khuyết đoạn trong khung được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3', và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*, trong đó khuyết đoạn là khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*, và trong đó cài xen là cài xen gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*.
5. Phương pháp chuyển hóa chủng sản xuất spinosad thành chủng sản xuất tiền chất spinetoram bao gồm bước làm bất hoạt gen *spnK* trong khi vẫn duy trì gen tạo ra spinosyn J và L, trong đó bước làm bất hoạt gen *spnK* được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung, đột biến điểm, khuyết đoạn, và cài xen, và trong đó đột biến điểm xảy ra ở vị trí cặp bazơ được chọn từ nhóm bao gồm vị trí 528, 589, 602, 668, 721, 794, 862, 895, 908, 937 và 1131, trong đó gen *spnK* bao gồm trình tự

nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 17, trong đó khuyết đoạn trong khung được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3', và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*, trong đó khuyết đoạn là khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*, và trong đó cài xen là cài xen gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bước làm bất hoạt gen *spnK* được gây ra bằng cách thao tác di truyền ở vị trí gắn kết ribosom.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vị trí gắn kết ribosom là trình tự *spnK* Shine Dalgarno.

8. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bước làm bất hoạt gen *spnK* được gây ra bằng cách thao tác di truyền ở trình tự khởi đầu phiên mã của gen *spnK*.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó trình tự khởi đầu phiên mã được phiên mã đồng thời với trình tự khởi đầu phiên mã cho *spnJ*.

10. Phương pháp theo điểm 5, trong đó khuyết đoạn trong khung được chọn từ nhóm bao gồm gây khuyết đoạn trong khung ở đầu 5', khuyết đoạn trong khung ở đầu 3' và khuyết đoạn trong khung ở vùng ghi mã *spnK*.

11. Phương pháp theo điểm 5, trong đó khuyết đoạn là khuyết đoạn bao gồm một hoặc nhiều bazơ nucleotit dẫn tới phá vỡ khung đọc bình thường của gen *spnK*.

FIG. 1 (SEQ ID NO:17)

```

M S T T E E I E T V E R I I L A A G S S
1 ATGTCACCAA CCGACGAGAT CGAAGCCGTG GAAGCCTACA TCGTCGCCGC CGGATCCAGT
TACGGGTGTT GCGTGTCTTA GCTTTGGCAC CTTCGTAGT AGGAGCGGCG GCTTAGGTCA
A A S L A D L T T E L G L A R I A P V L
61 GCGCGCGAGC TGGCCGACCT GACGACGAA CTGCGACTCG CCGGATCGC ACCGCTGCTG
CGCGGCTCGG ACCGCTGGA CTGGTGGCTT GAGCTTGAGC GGTGCTAGCG TGGGCAAGAC
I D E I L P R A E P A P D I E R T E V A
121 ATCGACGAGA TCGTCTTCG CGCGGAGCG GCGTCGACA TCGAGCGAC CAGGTGCGG
TAGCTGCTCT AGGAGAGAGC GCGGCTTGGC CGGGGCTGT AGCTTGCTG GCTGCGCGC
V Q I T H R G E T V D P V L T L Q S G E
181 GTCCGAGTCA CCGACCGAGG CGAGACGCTT GACTGCTGC TCGGCTACA GTCCGCTGAG
CAGCTGCTAG GGTGCTGC GCTCTGCA CTGAGCGAG ACTGCTGT CAGGCGACTC
L I K A E Q R P V G D V P L R I G Y E L
241 CTEATCAGG CCGAGTACG ACCGCTGGA GAGTCCCGC TCGGATCGG TTACGAGTTC
GACTAGTTC GCGTCTTGC TGGCAGGCT CTGCGGCGC AGCGCTAGC CATGCTCGG
T D L I A E L F G P G A P R A V G A R S
261 ACCGATCTCA TCGCGAGTT GTTCGCGCA GAGTTCCTA GCGGCTCGG CGCGCGGAGC
TGGTAGAGT AGCGCTCAA CAGCGCGGT CTTGAGGCT CCGGCGGCG GCGGCGCTG
T N P L R T T T S G S I P G P S E L S D
281 ACCGATCTTC TCGGAGCGC CACTGCGGT TCGATCGCG GTCGCTCGA ACTGCTCGAT
TGGTGAAGG AGGCTTGTG GTGTAGGCA AGCTTGGC CAGGCGCTC TCGAGGCTA
G F Q A I S A V V A G C G H R R P D L N
421 GCGTTCGAG CCGTCTCGC AGTGTGCGC GCGTGGCGC ACCGAGTCC CGAGCTCAG
CGGAGGCTC GGTAGGCGG TCGCGCGG CGGAGCGCG TGGCTGAGG GCTGAGTGT
L L A S E Y R T D E W G G L H W P T P L
481 TTGCTCGCT CCGCTACCG CCGGAGAGG TGGCGCGC TCGCTGCT CACCGCTCA
ACGAGCGGA GGTGTAGG GTGCTGTTG ACCCGCGG AGTGTAGCA GTGGGCGAT
Y E R H L G E P R D R P V R I L E I G V
541 TACGAGGAC ACTCGCGGA GTTCGTGAT CGCGGCTG GCTGCTGGA GATGCTGTC
ATGCTGCTG TGGAGCGCT CAGGCGCTA GCGGCGAGC CGTAGGAGCT CTAGCGAGG
G S Y N P D G G G G E S L K M W K R Y F
601 GGTGGCTACA ACTCGAGG TGGCGCGCG GATGCTGA AGTGTGGA GCGCTACTTC
CGAGCGTGT TGGAGTGC ACCCGCGCG CTTAGGAGT TCTACCTT CCGGATGAG
H R G L V F G M D V F D H S P L D Q Q R
661 CACCGCGCC TGTGTTCG GATGAGCTT TTGAGAGT CCGTCTGGA CCGAGAGG
GTGGCGCGG AGCAGAGC CTACCTGCA AGCTGTTCA GAGAGAGCT GTGCTGCTC
L C T V R A D Q S K P E E L A A V D D K
721 GCTGCGCGG TCGCGCGGA CCGAGAGG CCGAGAGG TGGCGCGCT TCGAGAGG
GAGAGTGC AGCGCGGCT GTCTGCTTC GCGTCTGCG ACCCGCGCA ACTGCTGTC
Y G P F D I I I D D G S H I N S E V R T
781 TACGAGCTT TCGAGTCT CATCGAGAT GCGAGCGCA TCGAGAGCA CCGAGCGCA
ATGCTGGA AGCTGTAGT GTAGCTGTA CCGTGTGT AGTGTGT GTAGCTGT
S L E T L F P R L R S G G V Y V I E D L
841 TCGTGAAG CCGTGTTC CCGTGTTC AGCGTGTG TATAGTGT CAGGATCTG
AGGAGCTTT GCGAGAGG GCGTGTGCG TCGTGTGCG ATAGCTGTA GCTGCTAGC
W T T Y A P G P G G Q A Q C P A A P G T
901 TGGAGAGCT ATGCTCGCG ATCGCGCG CAGGAGCT GCGCGCGCT ACCCGCGCT
ACTGCTGGA TACGAGGCG TAGCGCGCG GTGCTGTA CCGCGCGCG TGGCGCTG
T V S L L K N L L E G V Q H E E Q P H A
961 ACCTGCGCG TGTGAGGA CCGTGTGGA GCGTGTGCG ACAGAGGCA GCGCTGCG
TGTGCTCG AGCTGCTT GAGAGCTT CCGAGTGT TGTGCTGCT CCGCTGCG
G S Y E P S Y L E R N L V G L H T Y H N
1021 GCTGCTAGG AGCGAGCT CCGGAGCG ATGCTGTG GCTGCTAGC CTAGCAGAG
CGAGCTGCT TCGCTGCT GAGCTGCT TTAGCTAGC CCGAGTGT GATGCTGT
I A P L E K S V N A E G G V P A N V P R
1081 ATCGCTGCG TGGAGAGG CCGTGTGCG GAGCGCGG TGTGCTG TGTGCTGCG
TAGCGAGG ACTGCTTTC GAGTGTGCG CTGCGCGCG AGGAGAGAG CAGGCTTTC
S L D D I L H L A D V N S A E D E *
1141 AGCTGCGCG AGCTGTGCA CCGTGTGCG GTGAGCGG CCGAGAGCA GTG
TGTGCTGCT TGTATAGT GAGCGCTG CAGTGTGCG GCTGCTGCT CACT

```

FIG. 2

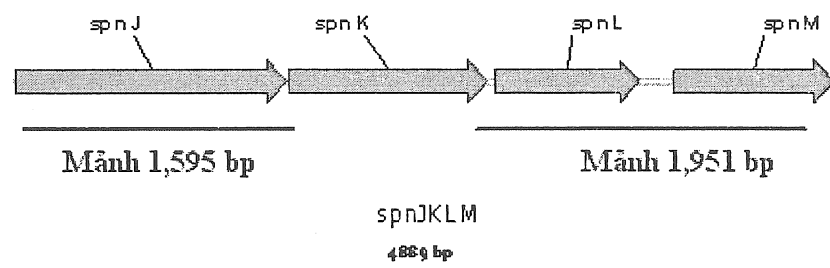


FIG. 3

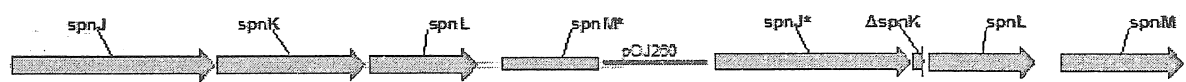


FIG. 4

Khuyết đoạn trong khung *spnK*

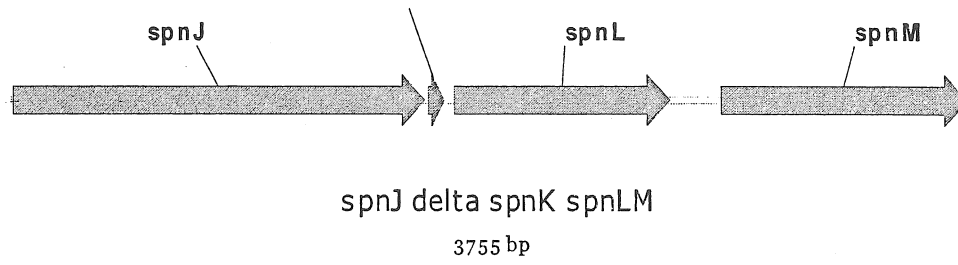


FIG. 5

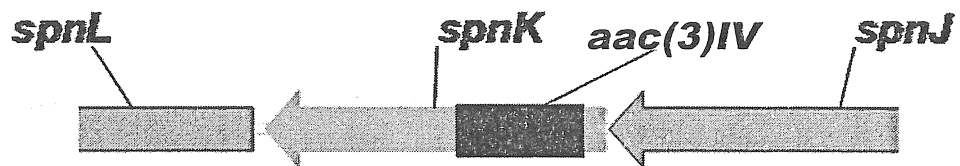


FIG. 6 (SEQ ID NO:16)

Shine-Dalgarno

spnJ

CGGCCGGCAC GGCCTTCACC CGGTCAGCCA TGAAGAGGTC ATCAGGATGT CCACCAAGCA CGAGATCGAA

GGCGGGCGTG CCGAAAGTGG GGCAGTCGGT AATCGTGGG TAGTGCTACA GGTGTTGGGT GCTCTAGCTT

spnK