



(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) 
1-0023097

(51)⁷ **C12N 1/21, C12P 19/18, C12N 15/09,**
9/10, 9/12

(13) **B**

(21) 1-2011-03215

(22) 08.06.2009

(86) PCT/EP2009/004112 08.06.2009

(87) WO2010/142305 16.12.2010

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.05.2012 290

(73) JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (DE)

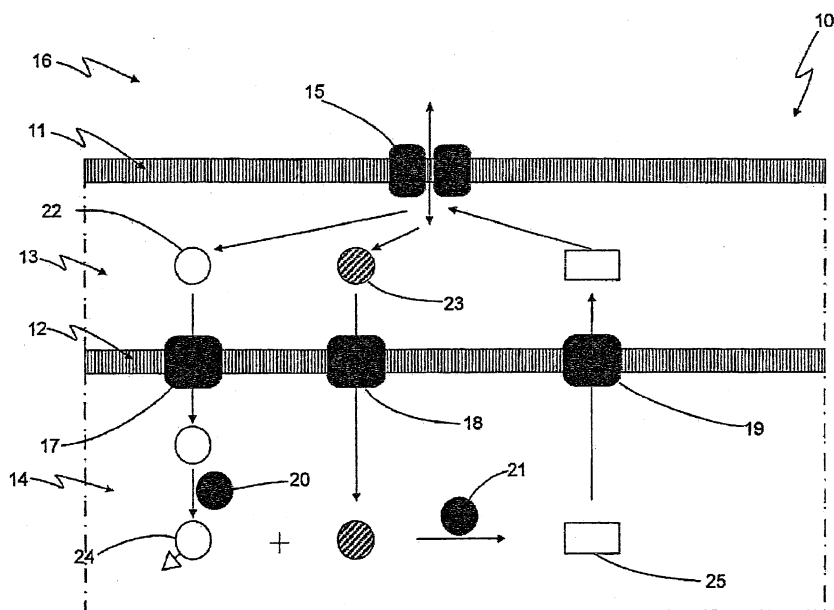
Maarweg 32 53619 Rheinbreitbach, German

(72) JENNEWEIN, Stefan (DE), HUEFNER, Eric (DE), PARKOT, Julia (DE)

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) **TẾ BÀO TỔNG HỢP FUCOSYLLACTOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT FUCOSYLLACTOZA TỪ TẾ BÀO NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào tổng hợp fucosyllactoza được nuôi cấy ổn định trong một môi trường, tế bào này được điều chỉnh để sản xuất fucosyllactoza, tế bào này được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho enzym liên quan đến quá trình tổng hợp fucosyllactoza. Ngoài ra, tế bào này còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein của họ chất vận chuyển tiết ra đường, chất tương đồng chức năng hoặc dẫn xuất của chúng. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất fucosyllactoza từ tế bào trên đây.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào tổng hợp oligosacarit ở sữa người (Human Milk Oligosaccharides-HMO) được nuôi cấy ổn định trong một môi trường, tế bào này được điều chỉnh để sản xuất oligosacarit, tế bào này được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho enzym liên can đến quá trình tổng hợp oligosacarit. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất HMO từ tế bào này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào có khả năng tổng hợp HMO là đã được biết đến, ví dụ, từ ấn phẩm của Dumon và các đồng tác giả, 2001.

Từ lâu đã biết rằng sữa mẹ, bên cạnh lactoza, bao gồm hỗn hợp phức hợp của oligosacarit được gọi là oligosacarit ở sữa người (Human Milk Oligosaccharides-HMO). Phần oligosacarit này của sữa mẹ là độc đáo về thành phần và số lượng. Trái ngược với các động vật có vú khác, sữa mẹ chứa nồng độ oligosacarit nằm trong khoảng từ 7 đến 12 g/l, mức này theo thừa số là 10 đến 100 cao hơn so với trong hầu hết các động vật có vú khác (Boehm & Stahl, 2007, Kunz và các đồng tác giả, 2000, Newburg & Neubauer, 1995).

Ngày nay, hơn 80 hợp chất, thuộc về HMO, đã được xác định đặc điểm về mặt cấu trúc. Nhìn chung, HMO, không giống với các oligosacarit khác được tìm thấy trong cơ thể con người, được đặc trưng bởi gốc lactoza ở đầu mút khử, và fucoza và/hoặc axit sialic ở đầu mút không khử,

Phân biệt được hai loại cơ bản: Oligosacarit của cấu trúc typ I có fucoza được liên kết qua $\alpha 1,4$ vào GlcNAc, trong khi đó những oligosacarit của cấu trúc typ II thể hiện sự fucosyl hóa ở $\alpha 1,3$ của GlcNAc hoặc glucoza; một trong hai typ có thể chứa

fucoza được liên kết ở $\alpha 1,2$ vào galactoza. Hầu hết những oligosacarit nổi trội là 2'-fucosyllactoza và 3-fucosyllactoza.

Những cấu trúc này liên quan gần gũi với các epitop của biểu mô tế bào bề mặt thể tiếp hợp glyco, các kháng nguyên nhóm máu-mô Lewis như Lewis x (Le^X) ($Gal(\beta 1-4)[Fuc-(\alpha 1-3)]GlcNAc(\beta 1)$) (Newburg, 2001). Tính đồng đẳng cấu trúc của HMO với các epitop biểu mô đem lại thuộc tính bảo vệ trước mầm bệnh là vi khuẩn.

Ví dụ, độc tính của *Escherichia coli* (Cravioto và các đồng tác giả, 1991), *Vibrio cholerae* (Coppa và các đồng tác giả, 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Andersson và các đồng tác giả, 1986) hoặc *Campylobacter jejuni* gây bệnh (Ruiz-Palacios và các đồng tác giả, 2003) có thể được giảm xuống đáng kể bằng cách liên kết mầm bệnh vào HMO thay vì vào các glycan bề mặt niêm mạc của người, và đồng thời sự liên kết vào các độc tố như độc tố đường ruột có tính ổn định nhiệt của *E. coli* (Crane và các đồng tác giả, 1994).

Bên cạnh các tác dụng cục bộ trong đường ruột đã được đề cập, HMO là còn có khả năng gây ra những tác dụng toàn thân nơi trẻ sơ sinh bằng cách xâm nhập vòng đại tuần hoàn (Gneth và các đồng tác giả, 2001). Tác dụng của HMO đối với các tương tác protein-carbohydrat, ví dụ, liên kết selectin-bạch cầu, có thể điều biến các đáp ứng miễn dịch và làm giảm các đáp ứng viêm (Bode, 2006, Kunz & Rudloff, 2006).

Để làm giảm tần suất của các lây nhiễm do trẻ sơ sinh mắc phải và, do đó, làm giảm tỷ lệ tử vong trẻ sơ sinh nữa, tất nhiên, nhìn chung là rất thích hợp khi cung cấp cho trẻ sơ sinh dinh dưỡng chứa HMO. Có thể dễ dàng làm được điều này trong các cộng đồng xã hội, mà ở đó bú sữa mẹ được thực hành phổ biến và rộng rãi. Tuy nhiên, nhìn chung, điều này không được như vậy.

Vẫn tồn tại một số lý do y tế, như sự lây truyền bệnh truyền nhiễm có thể có từ mẹ sang con, điều này trong một số hoàn cảnh nhất định có chứng lý chống lại việc bú sữa mẹ. Tại nhiều nước Châu Phi, ví dụ, bú sữa mẹ có thể là lý do chính của lây nhiễm HIV trong suốt thời kỳ sơ sinh.

Đồng thời, các hoàn cảnh văn hóa có thể dẫn đến việc từ chối bú sữa mẹ, như trường hợp tại các nước công nghiệp lớn như, ví dụ, Mỹ.

Do thực tế là HMO có thể được tìm thấy trong nguồn tự nhiên, như sữa của các động vật có vú khác, chỉ ở các nồng độ thấp, việc chiết oligosacarit từ nguồn tự nhiên thì không thích hợp để làm thỏa mãn nhu cầu về HMO.

Việc tổng hợp hóa học oligosacarit thì gian khổ và đòi hỏi nhiều bước bảo vệ và khử bảo vệ (Kretzschmar & Stahl, 1998), do đó thường thì tương đối đắt và có tỷ lệ thu hồi thấp.

Do đó, sản xuất bằng lên men oligosacarit bằng cách sử dụng sinh vật được thiết kế bằng công nghệ sinh học là giải pháp thay thế nhiều hứa hẹn cho việc tổng hợp HMO quy mô lớn.

Trong suốt thập kỷ vừa qua, một vài nỗ lực thành công của phép tổng hợp HMO bằng cách sử dụng hoặc sự lên men bằng *E. coli* tái tổ hợp hoặc chuyển hóa bằng enzym *in vitro*, đã được công bố. Những nỗ lực này đã tập trung chủ yếu vào việc tổng hợp các hợp chất đã được fucosyl hóa thuộc về hoặc giống hệt HMO.

Ví dụ, một vài công bố mô tả phép tổng hợp các cấu trúc Lewis lacto-*N*-neofucopentaoza, lacto-*N*-neodifucohexaoza và lacto-*N*-neodifucooctaoza, cũng như 2'- và 3-fucosyllactoza (Albermann và các đồng tác giả, 2001, Dumon và các đồng tác giả, 2006, Dumon và các đồng tác giả, 2001, Dumon và các đồng tác giả, 2004, Koizumi và các đồng tác giả, 2000). Trong những trường hợp này, fucosyl hóa bằng enzym các chất chiết như, ví dụ, lactoza, được thực hiện bằng các fucosyltransferaza (FucTs).

Hầu hết các công bố ghi nhận việc sản xuất các hợp chất đã được fucosyl hóa liên quan đến chủ đề này mô tả cách sử dụng FucTs có nguồn gốc từ *Helicobacter pylori*. Nhìn chung, FucTs của người cũng có thể được sử dụng vì mục đích này. Tuy nhiên, khi được biểu hiện quá mức trong tế bào vi khuẩn, FucTs từ các nguồn vi khuẩn thường ít gặp các vấn đề như sự gấp cuộn sai và tính không tan hơn.

Ngoài ra, hầu hết các hệ thống đã được công bố của phép tổng hợp các hợp chất đã được fucosyl hóa dựa trên lượng GDP-fucoza nội sinh của *E. coli*, vi khuẩn này thường được sử dụng để tổng hợp axit colonic exopolysacarit chứa fucoza (Grant và

các đồng tác giả, 1970). Trong những trường hợp này, tính khả dụng của GDP-fucoza tất nhiên gặp trở ngại, hạn chế hiệu suất tổng hợp.

Gần đây, các tác giả sáng chế của sáng chế này đã mô tả toàn bộ quy trình sản xuất tế bào mới sử dụng enzym Fkp (Parkot và *các đồng tác giả*, 2008), toàn bộ nội dung của đơn yêu cầu cấp Patent này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Fkp (Coyne và *các đồng tác giả*, 2005), chất này có nguồn gốc từ *Bacteroides fragilis*, là enzym hai chức năng, enzym này sở hữu cả hoạt tính fucokinaza và hoạt tính L-fucoza-1-P-guanylyltransferaza. Vì vậy, trước tiên, fucoza đã được cung cấp ngoại sinh được phosphoryl hóa và sau đó, được hoạt hóa nucleotit để tạo phân tử tiền chất quan trọng GDP-fucoza. Con đường cứu vớt fucoza trên cơ sở Fkp đã được sử dụng một cách thành công để tổng hợp oligosacarit đã được fucosyl hóa (Parkot và *các đồng tác giả*, 2008).

Ngay cả khi, ở mức tổng hợp hóa sinh như vậy, các phương pháp quan trọng đã được phát triển, các phương pháp đã biết dùng cho việc tổng hợp oligosacarit *in vivo* đều mang những nhược điểm nhất định, ức chế, nhiều nhất là, sự sản xuất hàng loạt đối với oligosacarit.

Khó khăn thực sự trong việc sản xuất oligosacarit trong tế bào ở tốc độ cao, một mặt, là sự làm giàu quy mô lớn ở nội bào của phụ phẩm oligosacarit và nucleotit đã được sản xuất, và mặt khác việc chiết oligosacarit đã được sản xuất.

Do quá trình làm giàu nội bào, các sản phẩm của phản ứng tổng hợp có thể dần dần phát triển tác dụng ức chế-sản phẩm đối với enzym tổng hợp. Vì vậy, tại một thời điểm cụ thể, phép tổng hợp này trở nên chậm một cách thiếu hiệu quả. Ngoài ra, các sản phẩm có thể đạt đến nồng độ gây độc tế bào đẩy các tế bào đi đến chỗ phân giải hoặc ít nhất là hiện tượng ngừng chuyển hóa. Trong trường hợp bất kỳ, hiện tượng không sản xuất nội bào liên tục oligosacarit là có thể xảy ra.

Ngoài ra, có thể dự kiến được rằng sự tích tụ của các lượng dư của oligosacarit cuối cùng sẽ dẫn đến sự phân giải tế bào và sự chết tế bào. Lần phân giải tế bào này hoặc lần phân giải tế bào được thực hiện sau đó được sử dụng cho việc chiết oligosacarit đã được tổng hợp từ tế bào sẽ tạo ra hỗn hợp phức hợp của oligosacarit

đích và tế bào các hợp phần (các sản phẩm chuyển hóa, mảnh vụn). Việc tinh chế oligosacarit đích từ hỗn hợp phức hợp này thì đắt đỏ và vì vậy mà đối với hầu hết oligosacarit là không kinh tế.

Trong những hoàn cảnh này, sản xuất oligosacarit bằng kỹ thuật sinh học là rất không hiệu quả và khó kiểm soát, đặc biệt là vì phương pháp sản xuất oligosacarit bằng kỹ thuật sinh học đã biết được thực hiện bằng cách sử dụng phương thức nuôi cấy theo mẻ, sự nuôi cấy theo mẻ như vậy, từ quan điểm kinh tế, thì không được như ý lắm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Xem xét những điều trên đây, mục tiêu của sáng chế là cải thiện các phương pháp của quy trình sản xuất bằng kỹ thuật sinh học oligosacarit theo cách mà sự sản xuất đó được tạo thuận lợi và được làm cho kiểm soát được dễ dàng hơn, và nhìn chung, theo cách mà sản lượng của oligosacarit được nâng cao.

Để đạt được mục tiêu của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào có khả năng, tổng hợp oligosacarit ở sữa người (Human Milk Oligosaccharides-HMO) được nuôi cấy ổn định trong một môi trường, tế bào này được điều chỉnh để sản xuất oligosacarit. tế bào này được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho enzym liên quan đến quá trình tổng hợp oligosacarit. Ngoài ra, tế bào còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein của họ chất vận chuyển tiết ra đường, chất tương đồng chức năng hoặc dẫn xuất của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất HMO từ tế bào này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các ưu điểm khác nữa được nêu trong phần mô tả các phương án dưới đây và các hình vẽ kèm theo.

Rõ ràng là những đặc tính đã được đề cập trên đây và những đặc tính sẽ được giải thích dưới đây có thể được sử dụng không chỉ ở dạng kết hợp được chỉ ra một cách

lần lượt, mà còn ở những dạng kết hợp khác hoặc đứng một mình, mà không đi trệch khỏi phạm vi của sáng chế.

Một vài phương án của sáng chế được minh họa trong các Fig. và được giải thích chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây. Trong các Fig.:

- Fig. 1 biểu thị hình vẽ tổng quan dạng sơ đồ của phép tổng hợp oligosacarit và vận chuyển bên trong tế bào vi khuẩn gram âm được cải biến theo sáng chế;
- Fig. 2 biểu thị các kết quả của các lần đo 3-fucosyllactosa trong khối lượng ẩm tế bào và các dịch nổi ở trên của sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn, có so sánh các kiểu gen khác nhau; và
- Fig. 3 trình bày sự so sánh giữa các lượng của 3-fucosyllactosa được tổng hợp trong sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn có các kiểu gen khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, oligosacarit được hiểu là các polyme ngắn của monosacarit, chứa ít nhất 2 tiểu đơn vị-đường. Oligosacarit có thể được phân nhánh hoặc tạo thành mạch thẳng của các tiểu đơn vị. Ngoài ra, các tiểu đơn vị đường của oligosacarit có thể nổi bật bởi một số cải biến hóa học. Do vậy, oligosacarit theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều gốc không phải đường.

Trình tự axit nucleic, theo sáng chế, mô tả mã di truyền, được trình bày bằng polyme axit nucleic, như, ví dụ, polyme axit desoxyribonucleic hoặc polyme axit ribonucleic. Do đó, mã di truyền có thể bao gồm các trình tự ghi mã, trong đó có thông tin để tạo protein, hoặc các vùng không ghi mã bao gồm, ví dụ, vùng gen khởi đầu, vùng gắn kết hợp chất điều hòa hoặc hợp chất phụ trợ, đoạn đệm và trình tự cấu trúc ảnh hưởng đến cấu trúc bậc hai hoặc cấu trúc bậc ba của chính polyme axit nucleic và/hoặc tham gia vào tiến trình của nó.

“Được biến nạp để chứa”, theo sáng chế, đề cập đến phương pháp bất kỳ của việc chèn ít nhất một trình tự axit nucleic phụ thêm vào các tế bào, sau đó, trình tự axit nucleic này có mặt bên trong tế bào hoặc ở dạng plasmit hoặc được tích hợp vào nhiễm

sắc thể/các nhiễm sắc thể tế bào. Các phương pháp biến nạp đã biết bao gồm, ví dụ, sự biến nạp hóa học hoặc mở lỗ bằng xung điện. Nhìn chung, có thể đạt được sự chuyển gen ổn định, thậm chí với sự vắng mặt của các chất chọn lọc, bằng cách tích hợp nhiễm sắc thể của ít nhất một trình tự axit nucleic phụ thêm. Vì mục đích này, tế bào có thể được gây nhiễm bằng virus hoặc thể thực khuẩn. Theo cách khác, có thể áp dụng các phương tiện khác của việc tái tổ hợp tương đồng và tái tổ hợp không tương đồng có sử dụng, ví dụ, hệ thống trên cơ sở virus hoặc hệ thống trên cơ sở transposon.

Đối với các ứng dụng công nghệ sinh học, việc trích xuất oligosacarit lớn hơn từ tế bào là một vấn đề phức tạp. Về căn bản, điều này đúng là như vậy, bởi vì chỉ có ít cơ chế tế bào liên quan đến sự vận chuyển như vậy đã được nhận diện. Lý do xảy ra hiện tượng trích xuất oligosacarit không thường xuyên từ các tế bào là phép tổng hợp oligosacarit tiêu thụ lượng lớn các nguồn lực tế bào. Do đó, sự tổn hao các hợp chất này thường bất lợi cho tế bào.

Ngoài ra, đa số các cơ chế đã biết dùng để trích xuất oligosacarit bao gồm sự cải biến hóa học đối với oligosacarit, ví dụ, bằng cách liên kết chúng vào các gốc-lipit (Alaimo và các đồng tác giả 2006). Vì vậy, oligosacarit không chỉ được mang trên màng, ức chế sự giải phóng chúng vào môi trường, mà còn liên kết hóa học vào các gốc-lipit, làm giảm tính tan của chúng trong môi trường nước. Do vậy, các cơ chế này khó lòng phù hợp để sử dụng trong sản xuất oligosacarit quy mô lớn.

Họ chất vận chuyển tiết ra đường (SET), trước tiên, được Liu và các đồng nghiệp mô tả (Liu *et al*, 1999a) đối với *E. coli*, bao gồm các protein SetA, SetB và SetC. Các chất tương đồng (tính đồng nhất axit amin >50%) của các protein vận chuyển được tìm thấy chủ yếu trong *Enterobacteriaceae* (Liu và các đồng tác giả 1999a).

Bên cạnh glucoza và lactoza, các protein trích xuất SET thể hiện tính đặc hiệu trên cơ chất đối với monosacarit và disacarit cụ thể cũng như, ví dụ, phân tử cảm ứng isopropyl- β -D-thiogalactosit (IPTG) và chất đồng đẳng đường *o*-nitrophenyl- β -D-thiogalactosit (ONPG) độc hại (Liu và các đồng tác giả, 1999b). Tuy nhiên, các nghiên

cứu hóa sinh đã cho thấy rằng, ví dụ, SetA biểu hiện hoạt tính vận chuyển từ rất thấp xuống bằng zero đối với các phân tử lớn hơn như heptosa hoặc trisacarit.

Vì những lý do trên đây, không thể dự kiến được là protein trích xuất của họ SET sẽ thích hợp cho việc vận chuyển oligosacarit.

Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, thật ngạc nhiên là, sự biểu hiện quá mức của protein trích xuất SET dẫn đến một sự trích xuất hữu hiệu đối với oligosacarit.

Ngoài ra, protein SET đã được chứng minh là có tác dụng trích xuất lactoza, một trong những chất chiết của phản ứng tổng hợp. Do đó, dự kiến được rằng việc tổng hợp oligosacarit được thực hiện trong các tế bào được cải biến sẽ diễn tiến rất chậm và không hiệu quả do sự rút liên tục của chất chiết khỏi tế bào.

Ngược lại, các tác giả sáng chế lần đầu tiên đã có thể chứng minh rằng, mặc dầu sự biểu hiện quá mức của protein trích xuất SET, việc tổng hợp oligosacarit thu được trong các tế bào được cải biến thì có hiệu suất cao.

Nhìn chung, tốt hơn, nếu tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn, nấm, động vật và thực vật. Do đó, cụ thể là, tốt hơn, nếu tế bào là tế bào *Escherichia coli*.

Do đó, ưu điểm là các tế bào *E. coli* đem lại hoạt tính chuyển hóa cao và tỷ lệ tái sản xuất cao. Ngoài ra, *E. coli* là một trong số sinh vật được mô tả đặc điểm tốt nhất cho mục đích sinh học phân tử và kỹ thuật sinh học. Nhiều kỹ thuật dùng cho việc biến nạp và nuôi cấy vi khuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này đã được làm thích ứng một cách đặc biệt với *E. coli*. Ngoài ra, các chủng *E. coli* có một loạt nền di truyền thì có bán trên thị trường.

Ngoài ra, tốt hơn, nếu enzym được chọn từ nhóm bao gồm glycosyltransferaza, glycosyltransferaza loại Leloir, glycosyltransferaza không phải Leloir, sialyltransferaza, galactosyltransferaza, fucosyltransferaza, mannosyltransferaza, *N*-axetylglucosaminyltransferaza, *N*-axetylgalactosaminyltransferaza.

Theo một phương án, enzym là fucosyltransferaza.

Ngoài ra, tốt hơn, nếu chất vận chuyển tiết ra đường là SetA hoặc một dẫn xuất của nó.

Ưu điểm trong trường hợp này là SetA, trong số các thành viên đã được mô tả về mặt hóa sinh của họ SET gồm các protein trích xuất, thể hiện nổi bật tính đặc hiệu trên cơ chất rộng nhất. Vì vậy, một tập hợp rộng nhất gồm oligosacarit có thể, ít nhất về mặt tiềm năng được trích xuất và vì vậy mà được sản xuất, bằng cách sử dụng SetA.

Đồng thời, tốt hơn, nếu tế bào còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein tạo thuận lợi cho hoặc thúc đẩy quá trình nhập vào của các chất chiết cần thiết đối với phép tổng hợp oligosacarit.

Do đó, thuận lợi là nồng độ chất chiết bên trong tế bào được tăng lên. Trong các hoàn cảnh bình thường, sự trích xuất các chất chiết như fucoza hoặc lactoza bị hạn chế bởi tính khả dụng của các protein nhập vào tương ứng. Tuy nhiên, trong trường hợp tế bào được điều chỉnh cho việc tổng hợp oligosacarit quy mô lớn, thì sự trích xuất các chất chiết, dựa trên các mức nội sinh của các protein nhập vào, có thể không đủ để cung cấp chất chiết một cách ổn định cho phản ứng tổng hợp. Có thể giải quyết vấn đề này bằng cách biểu hiện quá mức các protein nhập vào tương ứng.

Các protein nhập vào liên quan đến trường hợp này chủ yếu là những chất vận chuyển dùng cho các monosacarit hoặc disacarit như chất vận chuyển lactoza, ví dụ β -galactosid permeaza (LacY) của *E. coli*, hoặc chất vận chuyển fucoza, ví dụ, fucoza permeaza (FucP) của *E. coli*, nhưng cũng có thể bao gồm các chất vận chuyển dùng cho nucleotit và chất chiết khác.

Đặc biệt thích hợp, nếu tế bào được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein được chọn từ nhóm bao gồm chất vận chuyển lactoza, chất vận chuyển fucoza, chất vận chuyển axit sialic, chất vận chuyển galactoza, chất vận chuyển mannoza, chất vận chuyển *N*-axetylglucosamin, chất vận chuyển *N*-axetylgalactosamin, chất vận chuyển-ABC, chất vận chuyển dùng cho đường được hoạt hóa nucleotit và chất vận chuyển dùng cho nucleobazơ, nucleosit hoặc nucleotit.

Liên quan đến vấn đề này, đường được hoạt hóa nucleotit có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, GDP-fucoza, CMP-sialic axit, UDP-galactoza, UDP-glucoza, GDP-mannoza, UDP-glucosamin hoặc UDP-galactosamin.

Ngoài ra, thuật ngữ nucleobazơ là viết tắt của Guanin, Xytosin, Adenin, Thymin và Uraxil. nucleosit là viết tắt của Guanosin, Xytidin, Adenosin, Thymidin và Uridin trong khi đó nucleotit có thể là monophosphat, diphosphat hoặc triphosphat của Guanosin, Xytidin, Adenosin, Thymidin hoặc Uridin.

Ngoài ra, tốt hơn, nếu tế bào còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein được chọn từ nhóm bao gồm nucleotidyltransferaza, guanylyltransferaza, uridylyltransferaza, Fkp, L-fucoza kinaza, fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza, CMP-axit sialic syntetaza, galactoza kinaza, galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza, glucoza kinaza, glucoza-1-phosphat uridylyltransferaza, mannoza kinaza, mannoza-1-phosphat guanylyltransferaza, GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannoza reductaza, glucosamin kinaza, glucosamin-phosphat axetyltransferaza, N-axetylglucosamin-phosphat uridylyltransferaza, UDP-N-axetylglucosamin 4-epimeraza, UDP-N-axetylglucosamin 2-epimeraza.

Liên quan đến vấn đề này, thuật ngữ nucleotidyl transferaza thường đề cập đến các enzym mà có thể chuyển các nucleotit lên trên đường chứa nhóm rượu được este hóa bằng axit phosphoric, nó là đường có trong tự nhiên hoặc đường không phải tự nhiên.

Do đó, ưu điểm là, như cũng được mô tả trong Parkot và các đồng tác giả 2008, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, có thể bổ sung lượng nội bào của đường được hoạt hóa nucleotit như GDP-fucoza. Vì vậy, phép tổng hợp oligosacarit được làm cho hiệu quả hơn.

Ngoài ra, nhìn chung, tốt hơn, nếu con đường dị hóa của tế bào dùng cho monosacarit, disacarit hoặc oligosacarit được chọn liên can đến và/hoặc cần thiết cho sự tổng hợp oligosacarit bị làm bất hoạt ít nhất một phần.

Ưu điểm ở đây là toàn bộ hiệu suất tổng hợp có thể được tăng lên. Điều này là đúng bởi vì ít chất chiết hơn dành cho phép tổng hợp oligosacarit bị tiêu thụ bởi hiện tượng chuyển hóa nội sinh của tế bào.

Theo phương án được mô tả dưới đây, ví dụ, các tế bào được sử dụng, tế bào này thiếu sự phân hủy lactoza. Điều này có thể được thực hiện bằng cách làm bất hoạt enzym β -galactosidaza, enzym này được mã hóa bởi gen *lacZ*. Sự cải biến gen này ngăn ngừa hiện tượng phân cắt nội bào lactoza thành các monosacarit glucoza và galactoza có thể chuyển hóa nhanh được. Vì vậy, lactoza có mặt ở nồng độ cao hơn trong vai trò là phân tử nhận cho phản ứng glycosyl hóa/fucosyl hóa kế tiếp.

Theo một phương án khác nữa, các tế bào được sử dụng cho phép tổng hợp oligosacarit chỉ hoặc bên cạnh sự thiếu hụt *lacZ* được mô tả trên đây, thiếu hụt sự phân hủy L-fucoza. Có thể thực hiện được điều này bằng cách làm bất hoạt gen *fucA* ghi mã cho enzym dị hóa chính yếu fuculoza-1-phosphat aldolaza (FucA) của con đường phân hủy fucoza.

Tất nhiên, cũng sẵn có các kỹ thuật khác, từ các chất ức chế enzym đến các cấu trúc RNAi được chuyển nhiễm một cách ổn định, những kỹ thuật này có thể được sử dụng để ít nhất là làm bất hoạt một phần các con đường dị hóa.

Trong phạm vi của sáng chế, nhìn chung, tốt hơn, nếu oligosacarit chứa ít nhất ba tiểu đơn vị và/hoặc biểu hiện nổi bật trọng lượng phân tử là ít nhất bằng 480 g/mol.

Tất cả các HMO có tầm quan trọng lớn lao có trọng lượng phân tử trên ngưỡng này.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất oligosacarit, bao gồm các bước:

- a) tạo ra tế bào theo sáng chế,
- b) nuôi cấy tế bào trong môi trường dưới các điều kiện cho phép sản xuất oligosacarit đã nêu,
- c) chiết oligosacarit đã nêu từ môi trường nuôi cấy.

Trong phạm vi của sáng chế, các điều kiện cho phép được hiểu là những điều kiện liên quan đến thông số vật lý hoặc thông số hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiệt độ, độ pH, áp suất, áp suất thẩm thấu và nồng độ sản phẩm/chất chiết.

Theo một phương án cụ thể, các điều kiện cho phép có thể bao gồm khoảng nhiệt độ là $30 \pm 20^{\circ}\text{C}$, khoảng pH là 7 ± 3 .

Phương pháp được mô tả trên đây có được ưu điểm là oligosacarit có thể được chiết một cách trực tiếp từ môi trường nuôi cấy, trong khi đó các phương pháp đã biết đòi hỏi sự phân giải tế bào và sự chiết kế tiếp đối với oligosacarit từ sản phẩm phân giải thu được.

Liên quan đến vấn đề này, tốt hơn, nếu bước b) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học dòng chảy liên tục.

Ưu điểm là, bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học dòng chảy liên tục, có thể dễ dàng làm tăng lượng oligosacarit sản xuất ra. Điều này là đúng, bởi vì phép tổng hợp xảy ra một cách liên tục ở mức tương đối cao.

Đồng thời, tốt hơn, nếu môi trường trong bước b) chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm những chất bổ sung cơ bản dùng để hỗ trợ sự tăng trưởng và nhân lên của tế bào, chất chọn lọc, chất kích động của hoạt tính gen và chất chiết cần thiết cho sự tổng hợp oligosacarit.

Các chất bổ sung tiêu biểu dùng để hỗ trợ sự tăng trưởng và nhân lên của tế bào thì đã được biết đến rộng rãi từ giải pháp kỹ thuật hiện có và được mô tả, ví dụ, trong Sambrook và Russel, 2001. Những chất bổ sung cơ bản như vậy đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng chung của các tế bào được nuôi cấy, chứa, ví dụ, protein, carbohydrat, lipid và khoáng chất.

Đồng thời, các chất chọn lọc như chất kháng sinh thì đã được biết đến rộng rãi từ giải pháp kỹ thuật hiện có, ví dụ Sambrook và Russel, 2001. Các chất như vậy có thể được sử dụng để bảo vệ sản phẩm nuôi cấy của các tế bào được cải biến về mặt di truyền khỏi sự nhiễm dai dẳng các sinh vật cạnh tranh như nấm hoặc vi khuẩn. Ngoài ra, ví dụ, trong các quần thể vi khuẩn, các chất chọn lọc có thể được sử dụng để làm ổn định thông tin di truyền được chứa trên plasmid.

Các chất kích động của hoạt tính gen có thể được sử dụng để kích thích hoặc ức chế hoạt tính của các gen hoặc tập hợp của các gen cụ thể trong tế bào một cách chọn lọc. Những chất kích động như vậy là từ các hợp chất hóa học đơn giản như isopropyl-

1-thio- β -D-galactopyranosit (IPTG) đến các hợp chất phức tạp hơn như hormon. Chất kích động như vậy của hoạt tính gen thì đã được biết đến rộng rãi từ giải pháp kỹ thuật hiện có, ví dụ, từ Sambrook và Russel, 2001.

Ngoài ra, tốt hơn, nếu các chất chiết được chọn từ nhóm bao gồm arabinoza, threosa, erythroza, riboza, ribuloza, xyloza, glucoza, D-2-deoxy-2-amino-glucoza, *N*-axetylglucosamin, glucosamin, fructoza, mannoza, galactoza, *N*-axetylgalactosamin, galactosamin, sorboza, fucoza, axit *N*-axetylneuraminic, glycosit, đường không phải tự nhiên, nucleobazơ, nucleosit, nucleotit và dipolyme hoặc polyme có thể có bất kỳ của chúng.

Nhìn chung, tốt hơn, nếu oligosacarit chứa ít nhất ba tiểu đơn vị và/hoặc biểu hiện nổi bật trọng lượng phân tử là ít nhất bằng 480 g/mol.

Theo một phương án của sáng chế, oligosacarit được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trên đây là fucosyllactoza, ưu điểm trong trường hợp này là fucosyllactoza là một trong số các hợp chất nổi trội nhất có mặt trong HMO.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng hợp oligosacarit và vận chuyển bên trong tế bào vi khuẩn gram âm

Fig.1 biểu thị mặt cắt của tế bào vi khuẩn gram âm 10. Tế bào vi khuẩn gram âm 10 theo sáng chế bao gồm màng ngoài 11, màng huyết tương 12, chu chất 13, nằm giữa màng ngoài 11 đã nêu và màng huyết tương 12 đã nêu, và chất dịch bào tương 14, được bọc trong màng huyết tương 12 đã nêu. Màng ngoài chứa các porin mà thông qua đó các hợp chất tan trong nước có thể di chuyển từ môi trường 16 vào chu chất 13 và ngược lại.

Theo một phương án của sáng chế, màng huyết tương bao gồm FucP, làm chất vận chuyển-chất chiết thứ nhất 17, LacY, làm chất vận chuyển chất chiết thứ hai 18, và SetA, làm yếu tố trích xuất sản phẩm.

Ngoài ra, Fkp, làm nucleotidyltransferaza 20, và FutAco, làm glycosyltransferaza 21, được chứa trong chất dịch bào tương 14.

Khi, theo phương án này, fucoza, trong vai trò là chất chiết thứ nhất 22, và lactoza, trong vai trò là chất chiết thứ hai 23, được cung cấp vào môi trường 16, chúng đi vào chu chất 13 thông qua porin 15. Sau đó, chất chiết thứ nhất 22 được vận chuyển bằng chất vận chuyển chất chiết thứ nhất 17 vào chất dịch bào tương 14. Trong chất dịch bào tương, chất chiết thứ nhất 22 được cải biến bởi nucleotidyltransferaza 20 tạo ra chất chiết thứ nhất đã được nucleotit hóa 24, GDP-fucoza.

Chất chiết thứ hai 23, được nhập vào chất dịch bào tương 14 bởi yếu tố nhập chất chiết thứ hai 15.

Sau đó, glycosyltransferaza 21 xúc tác phản ứng giữa chất chiết thứ nhất đã được nucleotit hóa, GDP-fucoza, và chất chiết thứ hai, lactoza, tạo ra oligosacarit 25, 3-fucosyllactoza, và GDP (không được thể hiện).

Kế tiếp, oligosacarit 25 được trích xuất khỏi chất dịch bào tương 14 bởi yếu tố trích xuất sản phẩm 19 (SetA) vào chu chất 13 và có thể rời khỏi chu chất 13 thông qua porin 15, đi vào môi trường 16.

Ví dụ 2: Vật liệu và phương pháp

2.1 Kiến tạo các plasmid biểu hiện và phát triển chủng *E. coli*

E. coli JM109(DE3) (Promega; www.promega.com) được sử dụng làm chủng chủ ban đầu cho việc phát triển chủng sản xuất *E. coli*. Tất cả các đoạn môi oligonucleotit được sử dụng cho các quy trình vô tính hóa thì được liệt kê trong bảng 1. Các plasmid pACYC-*lacY* và pACYC-*lacY-setA* được kiến tạo như sau: các gen *lacY* (tương ứng với số truy cập GenBank ACB02461) (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) và *setA* (tương ứng với số truy cập GenBank YP_025293) (GenBank) được khuếch đại từ ADN hệ gen của *E. coli* TOP10 (Invitrogen; www.invitrogen.com) bằng cách sử dụng các đoạn môi *lacY* NcoI forward/*lacY* EcoRI reverse và *setA* NdeI forward/*setA* XhoI reverse. Các sản phẩm PCR được đưa vào quy trình tiêu hóa bằng enzym cắt giới hạn đã được chỉ ra, và được buộc với vector biểu hiện đã được tiêu hóa tương ứng pACYCDuet-1 (Novagen; www.merckbiosciences.co.uk).

Các plasmid thu được được kiểm tra bằng sự tiêu hóa giới hạn, điện di trên gel agarosa cũng như giải trình tự với các đoạn môi pACYCduetUP1, DuetDOWN-1-

Primer, DuetUP2-Primer và T7-Terminator-Primer để chèn chính xác các gen (dữ liệu không được thể hiện). Các plasmit pCOLA-*fkp-fucP* và pET-*futAco* được sử dụng thì đã được kiến tạo trước đó (Parkot và các đồng tác giả, 2008). Để thu được các chủng JM00, JM01 và JM02, các dạng kết hợp khác nhau của các plasmit được đưa vào *E. coli* JM109(DE3) bằng phương pháp mở lỗ bằng xung điện (Dower và các đồng tác giả, 1988). Tất cả các plasmit và các chủng vi khuẩn được liệt kê trong bảng 2.

2.2 Làm bất hoạt quá trình dị hóa fucoza trong *E. coli*:

Để ngăn ngừa sự phân hủy fucoza được cung cấp từ bên ngoài vào, gen *fucA* ghi mã cho enzym dị hóa chính yếu L-fuculoza-1-phosphat aldolaza được xóa bỏ khỏi nhiễm sắc thể của *E. coli* JM109(DE3). Tất cả các đoạn môi oligonucleotit được sử dụng cho các quy trình làm phát sinh đột biến được liệt kê trong bảng 1. Đối với việc kiến tạo đột biến xóa bỏ *fucA*, thì áp dụng phương pháp của Datsenko và Wanner (Datsenko và Wanner, 2000), bằng cách sử dụng các đoạn môi *fucA*-knock-f và *fucA*-knock-r. Sự xóa bỏ chính xác của *fucA* được xác nhận bằng PCR có sử dụng các đoạn môi *fucA*-control-f và *fucA*-control-r bằng cách chặn vị trí chèn nhiễm sắc thể, và kiểu hình âm tính fucoza được xác minh bằng cách dàn mỏng vi khuẩn trên môi trường aga tối thiểu M9 (Sambrook và Russell, 2001) có fucoza được bổ sung trong vai trò là nguồn carbon đơn lẻ (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 1. Các đoạn môi được sử dụng trong nghiên cứu này.

Tên	Trình tự (5'→3')*	Vị trí giới hạn được bổ sung
<i>fucA</i> -knock-f	AATTACTCTTCAATTCGTAACCCATAGGT TTTGAATTTCTCCAGCACTACGGCAATCT CTTCATCGCTCAGCAGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCGAAGTTC	
<i>fucA</i> -knock-r	GGTGGGTAATTAAACGGCTAATTCAATA GTGTGAAAGGAACAACATTATTGCCCTG	

	TTTTGAATCAGAGAGAGGGCTGACATGG	
	GAATTAGCCATGGTCC	
fucA-control-f	CATTCTGTTAGCCATCATCCTTCTCC	
fucA-control-r	GAAGAAGATGGTGGGTAATTAAACGGC	
setA NdeI forward	AAGGGAAAAACATATGATCTGGATAATG	NdeI
	ACGATGGCTCGCCGTATGAACGGTG	
setA XhoI reverse	AAGGGAAAAACTCGAGCCACGTCATCAA	XhoI
	ACGTCTTTAACCTTTGCGG	
lacY NcoI forward	AAGGAAATATACCATGGGCTACTATTTA	NcoI
	AAAAACACAACTTTTGGATGTTTCGG	
lacY EcoRI reverse	AAGGAAAACCGAATTCGATTGCTTAAGC	EcoRI
	GACTTCATTCACCTGACGACGCAGCAGG	
	G	
pACYCduetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	
DuetDOWN-1-Primer	GATTATGCGGCCGTGTACAA	
DuetUP2-Primer	TTGTACACGGCCGCATAATC	
T7-Terminator-Primer	TATGCTAGTTATTGCTCAG	

* Các vị trí nhận biết endonucleaza giới hạn được gạch chân.

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn và các plasmit được sử dụng trong nghiên cứu này.

Tên	(các) đặc điểm liên quan*	Những phần tham chiếu
Chủng <i>E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, Invitrogen $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(araleu)$	
	7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	
JM109(DE3)	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , Promega <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZ\Delta M15</i>], IDE3	

JM109(DE3) $\Delta fucA$	JM109(DE3) đột biến xóa bỏ <i>fucA</i>	Nghiên cứu này
JM00	Chủng đối chứng âm, JM109(DE3) chứa các vector rỗng pCOLADuet-1, pETDuet-1 và pACYCDuet-1	Nghiên cứu này
JM01	JM109(DE3) chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> và pACYC- <i>lacY</i>	Nghiên cứu này
JM02	JM109(DE3) chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> và pACYC- <i>lacY-setA</i>	Nghiên cứu này
JM03	JM109(DE3) chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> và pACYC- <i>lacY-setA</i>	Nghiên cứu này
JM Δ 00	Chủng đối chứng âm, JM109(DE3) $\Delta fucA$ chứa các vector rỗng pCOLADuet-1, pETDuet-1 và pACYCDuet-1	Nghiên cứu này
JM Δ 01	JM109(DE3) $\Delta fucA$ chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> và pACYC- <i>lacY</i>	Nghiên cứu này
JM Δ 02	JM109(DE3) $\Delta fucA$ chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> , pET- <i>futAco</i> và pACYC- <i>lacY-setA</i>	Nghiên cứu này
JM Δ 03	JM109(DE3) $\Delta fucA$ chứa pCOLA- <i>fkp-fucP</i> và pACYC- <i>lacY-setA</i>	Nghiên cứu này
Các plasmit		
pCOLADuet-1	vector biểu hiện, Km ^R	Novagen
pETDuet-1	vector biểu hiện, Ap ^R	Novagen
pACYCDuet-1	vector biểu hiện, Cm ^R	Novagen
pCOLA- <i>fkp-fucP</i>	chứa các gen <i>fkp</i> và <i>fucP</i> , Km ^R	Parkot và các đồng tác giả, 2008
pET- <i>futAco</i>	chứa gen fucosyltransferaza được tối ưu hóa codon <i>futAco</i> của <i>H. pylori</i> , Ap ^R	Parkot và các đồng

		tác giả,
		2008
pACYC- <i>lacY</i>	chứa gen <i>lacY</i> , Cm ^R	Nghiên
		cứu này
pACYC- <i>lacY-setA</i>	chứa các gen <i>lacY</i> và <i>setA</i> , Cm ^R	Nghiên
		cứu này

Ap^R, kháng ampicilin; Km^R, kháng kanamycin; Cm^R, kháng cloramphenicol.

2.3 Các điều kiện nuôi cấy và điều chế dịch chiết tế bào

Chủng *E. coli* được tiêm 1:100 từ các sản phẩm nuôi cấy qua đêm trong 100ml môi trường khoáng chất (Samain và các đồng tác giả, 1999), chứa 7,0g l⁻¹ NH₄H₂PO₄, 7,0g l⁻¹ K₂HPO₄, 1,0g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0,5g l⁻¹ axit xitric, 2,0g l⁻¹ KOH, 0,0045g l⁻¹ thiamin·HCl và 7,5ml l⁻¹ dung dịch khoáng chất vi lượng. Dung dịch khoáng chất vi lượng gốc chứa 70mM nitrilotriaxetat (độ pH 6,5), 7,5g l⁻¹ sắt (III) xitrat, 1,3g l⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,21g l⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 0,13g l⁻¹ CuCl₂·2H₂O, 0,25g l⁻¹ H₃BO₃, 1,2g l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O và 0,15g l⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O. Môi trường này được bổ sung 0,1% glucoza và 1% glyxerol trong vai trò là nguồn carbon, và 100 µg ml⁻¹ ampicilin, 50 µg ml⁻¹ kanamycin và/hoặc 20 µg ml⁻¹ cloramphenicol trước khi ủ trong máy lắc quay ở 37°C đem lại sự sục khí tốt.

Khi các sản phẩm nuôi cấy đạt đến mật độ quang học (OD_{600nm}) là xấp xỉ 1,0, thì isopropyl-1thio-β-D-galactopyranosit (IPTG) cảm ứng được bổ sung ở nồng độ là 0,5mM, và sản phẩm nuôi cấy được ủ qua đêm ở 28°C trong điều kiện lắc liên tục. Sau xấp xỉ 16 giờ, L-fucoza 40mM và lactoza 20mM được bổ sung. Sau đó, sản phẩm nuôi cấy được ủ một cách liên tục ở 28°C trong điều kiện lắc liên tục.

Ở một vài thời điểm, các mẫu 20ml của sản phẩm nuôi cấy được thu gom, và các tế bào được thu hoạch bằng cách quay ly tâm. Các dịch nổi ở trên của mẻ nuôi cấy được tách và được phân tích ngay lập tức bằng sắc ký trao đổi anion hiệu suất cao (HPAEC) hoặc được bảo quản ở -20°C. Các viên kết tế bào được rửa bằng PBS

(Sambrook và Russell, 2001), được tái tạo huyền phù 5 lần trọng lượng nước cất viên kết, và được phân giải bằng cách đun sôi trong 10 phút. Để thu được các phần nội bào, mảnh vụn tế bào được tách bằng ly tâm và sản phẩm phân giải tế bào trong suốt được bảo quản ở -20°C hoặc được phân tích ngay lập tức bằng HPAEC.

2.4 SDS-PAGE

Sự biểu hiện của protein dị tương đồng được kiểm tra bằng SDS-PAGE (Sambrook và Russell, 2001) (dữ liệu không được thể hiện). Dịch chiết protein được điều chế trong 1x đệm nạp gel SDS, và gel polyacrylamit được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue.

2.5 Phát hiện oligosacarit bằng sắc ký trao đổi anion hiệu suất cao bằng phương pháp phát hiện bằng đo cường độ dòng điện xung (HPAEC-PAD)

Các mẫu được phân tích bằng sắc ký trao đổi anion hiệu suất cao (HPAEC) bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện bằng đo cường độ dòng điện xung (PAD) Decade II (Antec Leyden; www.antec-leyden.nl) và cột CarboPac PA20 (Dionex; www.dionex.com) được nối với hệ thống HPLC (Shimadzu; www.shimadzu.eu). Thiết bị phát hiện tính nhạy cảm được ấn định ở $50\mu\text{A}$ điện áp xung được áp dụng là $0,05\text{V}$.

Monosacarit, disacarit và oligosacarit được rửa giải bằng natri hydroxit 10mM ở tốc độ dòng chảy là $0,4\text{ml phút}^{-1}$. Sau 30 phút rửa giải đẳng dòng bằng $\text{NaOH } 10\text{mM}$, cột được rửa trong 20 phút bằng $\text{NaOH } 200\text{mM}$ để thu được thời gian lưu lại ổn định và sau đó được tái tạo bằng $\text{NaOH } 10\text{mM}$ trong 20 phút. Đối với tất cả các mẫu đã được phân tích, $20\mu\text{l}$ dung dịch được pha loãng với nước cất theo tỷ lệ 1:2 được sử dụng cho việc phân tích HPAEC. Phép phân tích thông qua HPAEC-PAD đã cho thấy thời gian lưu lại trên cột HPLC được sử dụng là xấp xỉ 3,5 phút đối với tiêu chuẩn L-fucoza, xấp xỉ 15 phút đối với tiêu chuẩn lactoza, và xấp xỉ 11-12 phút đối với tiêu chuẩn 3-fucosyllactoza (dữ liệu không được thể hiện). Các tiêu chuẩn của các chất glyxerol và glucoza, những chất này được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong vai trò là nguồn carbon, được ghi lại với thời gian lưu lại lần lượt là xấp xỉ 1,5 phút và 7-8 phút.

Ví dụ 3: Sản xuất 3-fucosyllactose và sự tiết phụ thuộc SetA vào môi trường nuôi cấy bằng *E. coli* tái tổ hợp

Mục đích của thử nghiệm này là nghiên cứu sự trích xuất do SetA gây ra của 3-fucosyllactose nội bào. Các chủng *E. coli* JM01 và JM02 (xem bảng 2) được sử dụng cho các thử nghiệm lên men. Các chủng JM01 và JM02, những chủng này vừa biểu hiện các enzym Fkp và FutAco (α 1,3-fucosyltransferaza) cũng như các protein vận chuyển FucP và LacY, chỉ khác biệt về sự biểu hiện của chất vận chuyển SetA. JM01 thì không sản xuất quá mức SetA, và JM02 thì sản xuất quá mức SetA.

Fig.2 biểu thị các lượng 3-fucosyllactose trong khối lượng ẩm tế bào và dịch nổi ở trên của sản phẩm nuôi cấy *E. coli* JM01 và JM02 được xác định bằng phép phân tích HPAEC-PAD.

Để xác định hiệu quả của sự biểu hiện quá mức SetA, các lần đo được thực hiện ở thời điểm 7, 24 và 32 giờ sau khi cảm ứng sử dụng biểu hiện *fkp*, *fucP*, *lacY*, *futAco* và *setA*.

Trong Fig. này, các phần ngoại bào của 3-fucosyllactose được đo trong *E. coli* JM01 (SetA không được biểu hiện quá mức) được trình bày bằng các cột I, các phần nội bào được trình bày bằng các cột II. Trong trường hợp *E. coli* JM02 (SetA-được biểu hiện quá mức), các phần ngoại bào của 3-fucosyllactose được trình bày bằng các cột III và các phần nội bào được trình bày bằng các cột IV. Tất cả các trị số là những trị số trung bình từ hai thử nghiệm, các thanh báo lỗi biểu thị độ lệch chuẩn tương ứng.

Những phép đo này cho thấy rằng chủng JM01, chủng không biểu hiện quá mức SetA, tích tụ 3-fucosyllactose trong phần chất dịch bào tương.

Ngược lại, nồng độ nội bào của 3-fucosyllactose trong trường hợp chủng JM002, biểu hiện quá mức *setA*, là dưới mức phát hiện.

Ngoài ra, các dịch nổi ở trên từ sản phẩm nuôi cấy JM01 và JM02 thể hiện hàm lượng cụ thể của 3-fucosyllactose. Tuy nhiên, nhờ đó, hàm lượng của 3-fucosyllactose được phát hiện thấy trong dịch nổi ở trên của sản phẩm nuôi cấy JM02 được tăng lên nhiều so với hàm lượng của 3-fucosyllactose được phát hiện thấy trong dịch nổi ở trên của sản phẩm nuôi cấy JM01. Trong khi sau 32 giờ, nồng độ của 3-fucosyllactose

trong dịch nổi ở trên của JM01 là xấp xỉ 21mg l^{-1} , nồng độ 3-fucosyllactose trong trường hợp JM02 là trên 51mg l^{-1} .

Sự so sánh của tổng lượng của 3-fucosyllactose trong các sản phẩm nuôi cấy của *E. coli* JM01 và JM02 được mô tả trong Fig. 3.

Ở đây, tổng lượng của 3-fucosyllactose trong sản phẩm nuôi cấy *E. coli* JM01 là được trình bày bằng các cột I và tổng lượng của 3-fucosyllactose trong sản phẩm nuôi cấy *E. coli* JM02 là được trình bày bằng các cột II. Mặt khác, các trị số trung bình từ hai thử nghiệm cũng được thể hiện.

Sau 32 giờ ủ, chủng JM02 sản xuất tổng cộng $51,68\text{mg l}^{-1}$ nhiều hơn xấp xỉ 57 % 3-fucosyllactose so với chủng JM01 ($32,99\text{mg l}^{-1}$).

Ví dụ 4: Bàn luận

Các kết quả thử nghiệm của phép phân tích HPAEC-PAD cho thấy rằng những khác biệt lớn về sự tổng hợp và vận chuyển của 3-fucosyllactose tồn tại giữa các chủng JM01, mà không có sự biểu hiện quá mức SetA, và JM02, biểu hiện quá mức SetA.

Ban đầu, 3-fucosyllactose là không phát hiện được trong khối lượng ẩm tế bào của sản phẩm nuôi cấy JM02, trong khi đó nồng độ cao của 3-fucosyllactose có thể được đo trong dịch nổi ở trên.

Điều này rõ ràng biểu thị rằng sự biểu hiện quá mức của SetA trong *E. coli* dẫn đến sự trích xuất cực kỳ hữu hiệu 3-fucosyllactose khỏi tế bào.

Vì vậy, các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng SetA, trái ngược với những gì được mong đợi từ giải pháp kỹ thuật hiện có, có thể trích xuất một cách hữu hiệu oligosacarit lớn hơn biểu hiện nổi bật, trong trường hợp này, ba tiểu đơn vị và khối lượng phân tử là 488 g/mol .

Ngược lại, trong khối lượng ẩm tế bào của JM01, một lượng đáng kể của 3-fucosyllactose được phát hiện, trong khi đó chỉ có lượng ít có thể so sánh được 3-fucosyllactose là có mặt trong dịch nổi ở trên.

Kết quả này chứng tỏ rằng, với sự vắng mặt của SetA được biểu hiện quá mức, 3-fucosyllactose tích tụ dày đặc trong chất dịch bào tương của các tế bào vi khuẩn. Thực tế là cũng trong những hoàn cảnh này, 3-fucosyllactose được phát hiện trong dịch

nổi ở trên, theo tình trạng hiệu biết hiện có, có thể bị quy cho sự phân giải tăng của các tế bào vi khuẩn do nồng độ 3-fucosyllactose nội bào cao.

Khi so sánh tổng lượng của 3-fucosyllactose trong sản phẩm nuôi cấy JM01 và JM02, thì rõ ràng là sự biểu hiện quá mức của SetA không chỉ đưa đến nồng độ 3-fucosyllactose trong dịch nổi ở trên tăng, mà còn làm tăng tổng lượng của 3-fucosyllactose được tổng hợp (xem Fig. 3).

Mức tăng về tổng hiệu suất tổng hợp này có thể được quy cho khả năng sống tế bào cao hơn của các tế bào biểu hiện quá mức SetA, khả năng sống này là do tránh được độc tính đối với tế bào-sản phẩm. Theo cách khác hoặc ngoài ra, mức tăng về tổng hiệu suất tổng hợp này cũng có thể được quy cho sự tránh tác dụng ức chế-sản phẩm đối với các enzym tổng hợp do sự trích xuất-sản phẩm do SetA được biểu hiện quá mức gây ra.

Vì vậy, các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng sự biểu hiện quá mức chất vận chuyển SetA là cách hữu hiệu để nâng cao sản lượng của phép tổng hợp oligosacarit, được thực hiện bằng các phương pháp kỹ thuật sinh học sử dụng các tế bào có thể nuôi cấy được. Ngoài ra, khi mà có thể tránh được hầu hết sự ức chế-sản phẩm của các enzym tổng hợp liên quan và độc tính đối với tế bào của phép tổng hợp sản phẩm, thì sự sản xuất được tạo thuận lợi và được làm cho dễ kiểm soát hơn.

Danh mục tài liệu tham khảo

Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F. & M. Aebi, (2006) Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosacarit. *EMBO J* **25**(5): 967-976.

Albermann, C., W. Piepersberg & U. F. Wehmeier, (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr Res* **334**: 97-103.

Andersson, B., O. Porras, L. A. Hanson, T. Lagergard & C. Svanborg-Eden, (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharit. *J Infect Dis* **153**: 232-237.

Bode, L., (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharit. *J Nutr* **136**: 2127-2130.

Boehm, G. & B. Stahl, (2007) Oligosaccharit from milk. *J Nutr* **137**: 847S-849S.

Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, B. Facinelli, L. Ferrante, R. Capretti & G. Orazio, (2006) Human milk oligosaccharit inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrhea pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fyris*. *Pediatr Res* **59**: 377-382.

Coyne, M. J., B. Reinap, M. M. Lee & L. E. Comstock, (2005) Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* **307**: 1778-1781.

Crane, J. K., S. S. Azar, A. Stam & D. S. Newburg, (1994) Oligosaccharit from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J Nutr* **124**: 2358-2364.

Cravioto, A., A. Tello, H. Villafan, J. Ruiz, S. del Vedovo & J. R. Neeser, (1991) Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* **163**: 1247-1255.

Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.

Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *axit nucleics Res* **16**:6127-45.

Dumon, C, C. Bosso, J. P. Uille, A. Heyraud & E. Samain, (2006) Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* **7**: 359-365.

Dumon, C, B. Priem, S. L. Martin, A. Heyraud, C. Bosso & E. Samain, (2001) In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj J* **18**: 465-474.

Dumon, C, E. Samain & B. Priem, (2004) Assessment of the two *Helicobacter pylori* alpha-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharit by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **20**:412-419.

Gnoth, M. J., S. Rudloff, C. Kunz & R. K. Kinne, (2001) Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharit by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* **276**: 34363-34370.

Grant, W. D., I. W. Sutherland & J. F. Wilkimson, (1970) Control of colanic acid synthesis. *J Bacteriol* **103**: 89-96.

Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata, H. Nagano, J. Ohnishi & A. Ozaki, (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**: 213-217.

Kretzschmar, G. & W. Stahl, (1998) Large scale synthesis of linker-modified sialyl-Lewis(X), Lewis(X) and N-acetyllactosamine. *Tetrahedron* **54**: 6341-6358.

Kunz, C. & S. Rudloff, (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharit. *Int Dairy J* **16**: 1341-1346.

Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein & S. Strobel, (2000) Oligosaccharit in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* **20**: 699-722.

Liu, J. Y., P. F. Miller, M. Gosink & E. R. Olson, (1999a) The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**:1845-1851.

Liu, J. Y., P. F. Miller, J. Willard & E. R. Olson, (1999b) Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 22977-22984.

Newburg, D. S., (2001) Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Adv Exp Med Biol* **501**: 3-10.

Newburg, D. S. & S. H. Neubauer, (1995) Carbohydrates in milk. In: Handbook of Milk Composition. R. G. Jensen (ed). San Diego, CA: Academic Press, pp. 273-349.

Parkot, J., E. Hübner & S. Jennewein, (2008) Synthesis of fucosylated compounds. European patent application EP08172267.

Ruiz-Palacios, G. M., L. E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia & D. S. Newburg, (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2 Gal beta 1, 4 GlcNAc), and fucosyloligosaccharit of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* **278**: 14112-14120.

Samain, E., V. Chazalet & R. A. Geremia, (1999) Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharit by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J Biotechnol* **72**: 33-47.

Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy ổn định trong môi trường, trong đó tế bào này được điều chỉnh để sản xuất fucosyllactoza, tế bào này được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho fucosyltransferaza,

khác biệt ở chỗ

tế bào này còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein của họ chất vận chuyển tiết ra đường, chất này xuất fucosyllactoza từ phần bào tan của tế bào vi khuẩn này, hoặc thể tương đồng chức năng của protein.

2. Tế bào vi khuẩn theo điểm 1, khác biệt ở chỗ tế bào này là tế bào *Escherichia coli*.

3. Tế bào vi khuẩn theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ chất vận chuyển tiết ra đường là SetA hoặc dẫn xuất của nó.

4. Tế bào vi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ nó còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein tạo thuận lợi cho hoặc thúc đẩy quá trình nhập vào của các chất chiết cần thiết để tổng hợp oligosacarit, trong đó protein này được chọn từ nhóm bao gồm chất vận chuyển lactoza, chất vận chuyển fucoza, chất vận chuyển axit sialic, chất vận chuyển galactoza, chất vận chuyển mannoza, chất vận chuyển *N*-axetylglucosamin, chất vận chuyển *N*-axetylgalactosamin, chất vận chuyển ABC, chất vận chuyển dùng cho đường được hoạt hóa bằng nucleotit và chất vận chuyển dùng cho nucleobazơ, nucleosit hoặc nucleotit.

5. Tế bào vi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ nó còn được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic ghi mã cho protein được chọn từ nhóm bao gồm nucleotidyltransferaza, guanylyltransferaza, uridylyltransferaza, Fkp, L-fucoza kinaza, fucoza-1-phosphat guanylyltransferaza, CMP-axit sialic syntetaza, galactoza kinaza, galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza, glucoza kinaza, glucoza-1-phosphat uridylyltransferaza, mannoza kinaza, mannoza-1-phosphat guanylyltransferaza, GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannoza reductaza, glucosamin kinaza, glucosamin-phosphat axetyltransferaza, *N*-axetyl-glucosamin-phosphat

uridylyltransferaza, UDP-N-axetylglucosamin 4-epimeraza, UDP-N-axetyl-glucosamin 2-epimeraza.

6. Phương pháp sản xuất fucosyllactosa, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra tế bào vi khuẩn có phần bào tan và được biến nạp để chứa ít nhất một trình tự axit nucleic mã hóa fucosyllactosa, và được biến nạp để quá biểu hiện chất xuất cho fucosyllactosa, chất xuất này có khả năng xuất fucosyllactosa từ phần bào tan của tế bào vi khuẩn này;
- b) nuôi cấy tế bào vi khuẩn này trong môi trường dưới các điều kiện cho phép sản xuất fucosyllactosa đã nêu, trong đó fucosyllactosa được xuất vào môi trường này; và
- c) chiết fucosyllactosa từ môi trường nuôi cấy.

7. Phương pháp theo điểm 6, khác biệt ở chỗ bước b) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học dòng liên tục.

8. Phương pháp theo điểm 6 hoặc 7, khác biệt ở chỗ, môi trường trong bước b) chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm những chất bổ sung cơ bản dùng để hỗ trợ sự tăng trưởng và nhân lên của tế bào, chất chọn lọc, các chất chiết cần thiết cho sự tổng hợp oligosacarit, các chất kích động của hoạt tính gen, trong đó các chất chiết được chọn từ nhóm bao gồm arabinoza, threoza, erythroza, riboza, ribuloza, xyloza, glucoza, D-2-deoxy-2-amino-glucoza, N-axetylglucosamin, glucosamin, fructoza, mannoza, galactoza, N-axetylgalactosamin, galactosamin, sorboza, fucoza, axit N-axetylneuraminic, glycosit, đường không phải tự nhiên, nucleobazơ, nucleosit, nucleotit và dipolyme hoặc polyme có thể có bất kỳ của chúng.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, khác biệt ở chỗ protein là SetA.

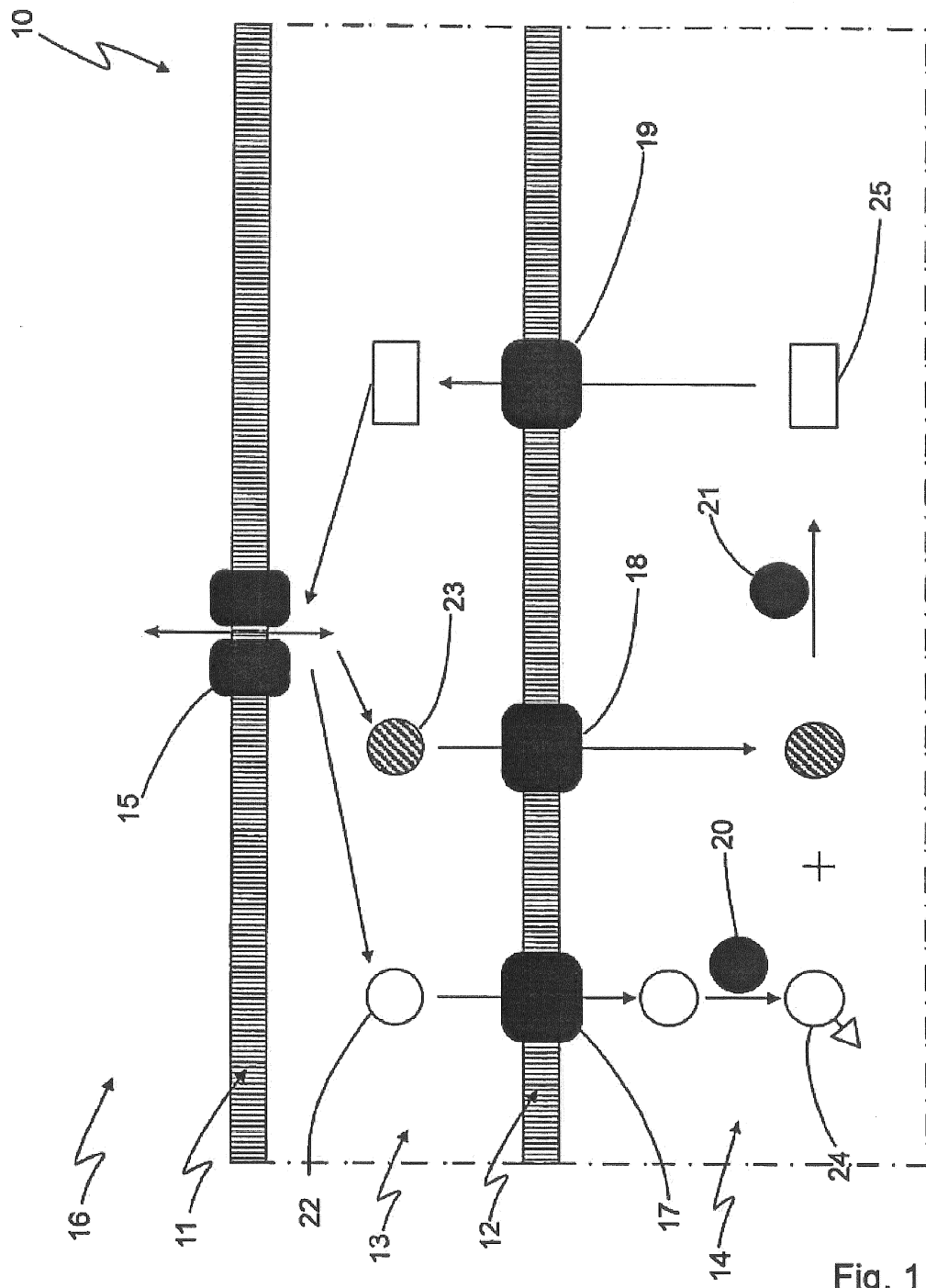


Fig. 1

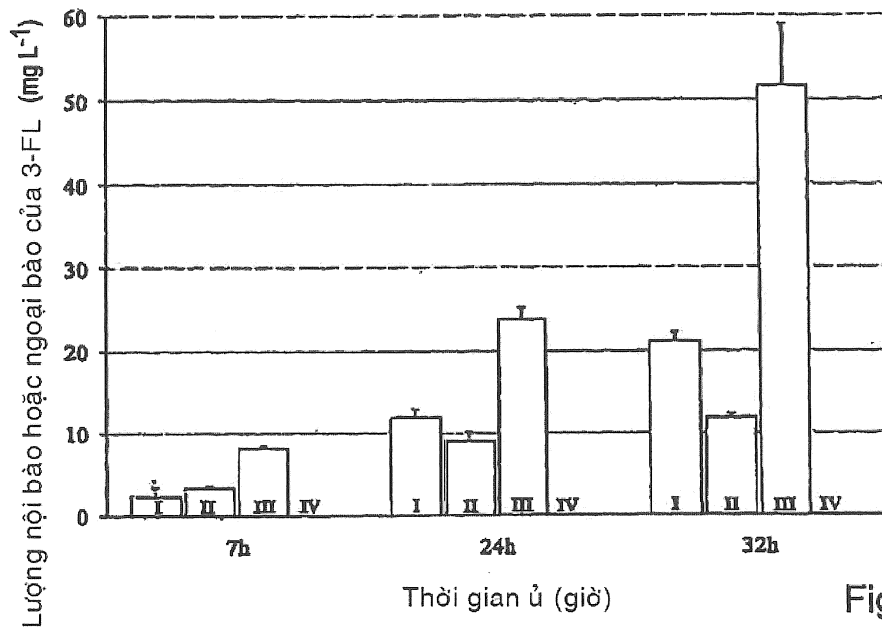


Fig. 2

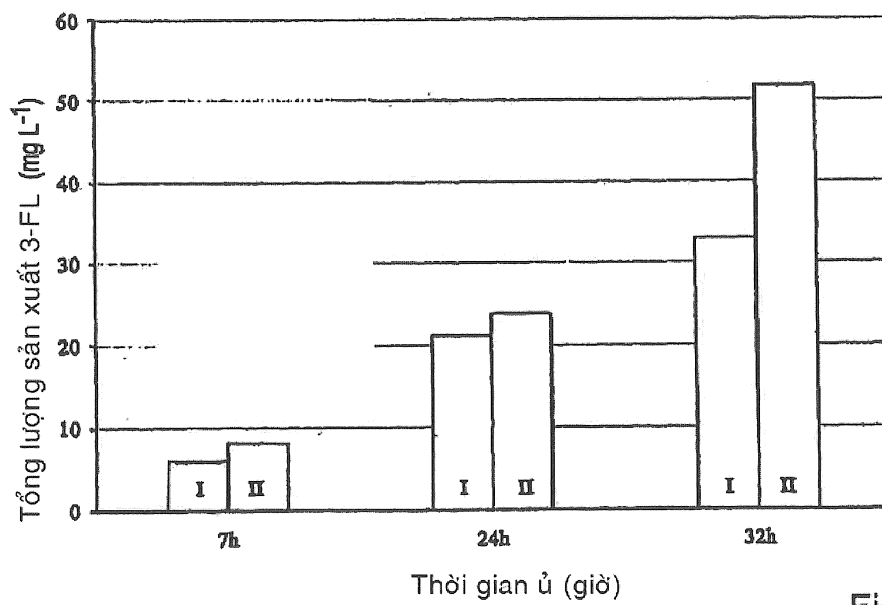


Fig. 3

Danh mục trình tự

<110>	Jennewein Biotechnologie GmbH	
<120>	TẾ BÀO TỔNG HỢP FUCOSYLLACTOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT FUCOSYLLACTOZA TỪ TẾ BÀO NÀY	
<130>	2827P100WO	
<160>	12	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	100	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	1	
	aattactctt caattcgtaa cccataggtt ttgaatttct ccagcactac ggcaatctct	60
	tcatcgctca gcagtgtagg ctggagctgc ttcgaagttc	100
<210>	2	
<211>	100	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	2	
	ggtgggtaat taaacggcta attcaatagt gtgaaaggaa caacattatt gccctgtttt	60
	gaatcagaga gagggctgac atgggaatta gccatggtcc	100
<210>	3	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	3	
	cattctgtta gccatcatcc ttctcc	26
<210>	4	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	4	
	gaagaagatg gtgggtaatt aaacggc	27
<210>	5	
<211>	53	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	5	
	aagggaaaaa catatgatct ggataatgac gatggctcgc cgtatgaacg gtg	53
<210>	6	
<211>	47	
<212>	ADN	
<213>	<i>Escherichia coli</i>	
<400>	6	
	aagggaaaaa ctcgagccac gtcacaaac gtctttaacc tttgcgg	47

<210> 7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 7
 aaggaaatat accatgggct actatttaaa aaacacaaac ttttggatgt tcgg 54

 <210> 8
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 8
 aaggaaaacc gaattcgatt gcttaagcga cttcattcac ctgacgacgc agcaggg 57

 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 9
 ggatctcgac gctctccct 19

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 10
 gattatgcgg ccgtgtacaa 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 11
 ttgtacacgg ccgcataatc 20

 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 12
 tatgctagtt attgctcag 19