



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

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

(11)



1-0026020

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 13/00; C12P 13/02;
C12P 13/06; C12P 13/08; C12R 1/19;
C12P 13/20; C12P 7/42; C12P 7/46;
C12P 9/00; C12R 1/15; C12N 15/09;
C12P 13/14

(13) B

(21) 1-2014-04349

(22) 03/07/2013

(86) PCT/JP2013/068205 03/07/2013

(87) WO 2014/007273 A1 09/01/2014

(30) 2012-149431 03/07/2012 JP

(45) 26/10/2020 391

(43) 27/04/2015 325A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8210 Japan

(72) IIDA Kougo (JP); IWASAKI Takumi (JP); NISHI Tatsunari (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) SINH VẬT CHƯA CÓ NHÂN ĐIỂN HÌNH ĐỂ SẢN XUẤT HỢP CHẤT CHUYỂN HOÁ TRUNG GIAN (P) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT CHUYỂN HOÁ TRUNG GIAN (P)

(57) Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vi khuẩn mà có thể làm giảm lượng hợp chất trung gian P được chuyển hóa thành sản phẩm chuyển hóa M và tích tụ một cách hiệu quả hợp chất P trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M. Sáng chế đề xuất sinh vật chưa có nhân điển hình có tất cả các dấu hiệu (a) đến (d) như được định nghĩa trong bản mô tả để tích tụ hợp chất P bằng cách điều hòa mức biểu hiện của enzym X mà chuyển hóa hợp chất P dưới dạng sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vi sinh vật được sử dụng để sản xuất các chất hữu ích, như các axit hữu cơ hoặc các axit amin, và phương pháp sản xuất các chất hữu ích có sử dụng các vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kỹ thuật để thu các vi sinh vật mà có thể sản sinh một cách hữu hiệu các hợp chất hữu ích, như các axit hữu cơ, các axit amin, các axit nucleic, hoặc các vitamin, nhờ, ví dụ, đưa vào sự đột biến khuyết dưỡng hoặc đột biến hướng chuyển hóa hoặc kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã được phát triển. Như được thể hiện trên Fig.1, phương pháp thu các thể khuyết dưỡng trong đó hoạt tính của enzym X để chuyển hóa hợp chất P thành sản phẩm chuyển hóa M đã được loại bỏ thường được sử dụng để tạo ra một cách hữu hiệu hợp chất P trong chu trình sinh tổng hợp hoặc chu trình trao đổi chất trong đó sản phẩm chuyển hóa M là không thể thiếu cho sự phát triển được tạo ra từ nguồn cacbon qua hợp chất P làm sản phẩm chuyển hóa trung gian. Tuy nhiên, khi hợp chất P hữu ích được tạo ra với thể đột biến, sự bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M vào môi trường là cần thiết, và chi phí sản xuất bị gia tăng.

Ví dụ, đã có báo cáo rằng axit shikimic là sản phẩm chuyển hóa trung gian trong chu trình axit shikimic được thể hiện trên Fig.2 có thể được tạo ra một cách hữu hiệu với việc sử dụng *Escherichia coli* trong đó hoạt tính shikimat kinaza đã được loại bỏ (tài liệu sáng chế 1 và tài liệu phi sáng chế 1). Tuy nhiên, nếu các vi sinh vật này được sử dụng, sự khuyết dưỡng axit parahydroxybenzoic, sự khuyết dưỡng axit p-aminobenzoic, và sự khuyết dưỡng axit 2,3-dihydroxybenzoic được phát triển ngoài sự khuyết dưỡng tryptophan, sự khuyết dưỡng tyrosin, và sự khuyết dưỡng phenylalanin. Điều này đòi hỏi sự bổ sung 6 loại hợp chất này vào môi trường. Đồng thời, đã có báo cáo rằng axit 3-dehydroshikimic dưới dạng sản phẩm chuyển hóa trung gian trong chu trình axit shikimic có thể được tạo ra với việc sử dụng *Escherichia coli* trong đó hoạt tính shikimat dehydrogenaza đã được

loại bỏ, bất lợi là, các vi sinh vật cũng cần 6 loại hợp chất nêu trên (tài liệu sáng chế 2 và tài liệu phi sáng chế 2).

Thông qua sự đưa các đột biến nhờ, ví dụ, xử lý bằng các chất gây đột biến, như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin hoặc etyl metansulfonat, sự chiếu tia UV hoặc ứng dụng bức xạ, hoặc sự đột biến tự phát, sự đột biến làm giảm lượng enzym X mà chuyển hóa hợp chất P thành sản phẩm chuyển hóa M có thể được đưa vào để làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra. Như vậy, lượng hợp chất P có thể được gia tăng. Trong trường hợp này, hoạt tính của enzym X vẫn còn, và một phần của hợp chất P được chuyển hóa thành sản phẩm chuyển hóa M như một hệ quả. Do vậy, các điều kiện để tối đa hóa lượng hợp chất P được tạo ra không được xác định một cách dễ dàng.

Sáng chế bộc lộ phương pháp tạo ra hợp chất P một cách hiệu quả mà không cần bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M vào môi trường bằng cách cho phép chất kìm hãm hướng đến sự phiên mã gen x mã hóa enzym X, để điều hòa lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra. Tuy nhiên, chưa có trường hợp nào báo cáo rằng trong đó hiệu suất của hợp chất P đã được nâng cao bằng cách điều hòa sự phiên mã của gen x bằng việc sử dụng đoạn khởi đầu khác, sự phiên mã bị ức chế bởi chất kìm hãm, thay vì đoạn khởi đầu có nguồn gốc từ gen x.

Khi tạo ra các hợp chất hữu ích bằng cách sử dụng các vi sinh vật, các hợp chất hữu ích thường được tạo ra nhờ chu trình được tách ra từ hợp chất P trong chu trình sinh tổng hợp hoặc chu trình trao đổi chất trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon nhờ hợp chất P làm sản phẩm chuyển hóa trung gian. Trong trường hợp này, phương pháp thu các thể khuyết dưỡng trong đó hoạt tính enzym X đã được loại bỏ thường được sử dụng. Tuy nhiên, phương pháp này cần bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M vào môi trường, và chi phí sản xuất gia tăng một cách bất lợi.

Liên quan đến sự sản xuất các chất đích bằng cách sử dụng chu trình axit shikimic có nhiều chu trình được phân nhánh (Fig.2), ví dụ, nhiều chủng sản sinh tryptophan được biết là có sự khuyết dưỡng tyrosin và phenylalanin để ngăn chặn axit chorismic, làm sản phẩm chuyển hóa trung gian, từ sự đi vào trong chu trình

tổng hợp tyrosin hoặc phenylalanin (tài liệu sáng chế 3 và các tài liệu phi sáng chế 3 và 4). Ngoài ra, các chủng sản sinh phenylalanin được biết là có sự khuyết dưỡng tyrosin (các tài liệu sáng chế 4 và 5 và tài liệu phi sáng chế 5). Do vậy, khi tạo ra axit amin thơm hữu ích, cần bao gồm loại axit amin thơm khác nữa vào môi trường.

Cũng đã có báo cáo rằng khoảng 40g/L axit protocatechuic có thể được tạo ra bằng cách tạo ra thể đột biến trong đó enzym mà chuyển hóa axit 3-dehydroshikimic (sau đây được viết tắt là “DHS”) thành axit shikimic (tức là, sản phẩm chuyển hóa M) đã được loại bỏ và lượng 3-deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (sau đây được viết tắt là “DAHP”) làm nguyên liệu khởi đầu trong chu trình axit shikimic đã được gia tăng (tài liệu phi sáng chế 6). Tuy nhiên, nếu thể đột biến này được sử dụng, ngoài sự khuyết dưỡng tryptophan, sự khuyết dưỡng tyrosin, và sự khuyết dưỡng phenylalanin, sự khuyết dưỡng axit p-hydroxybenzoic, sự khuyết dưỡng axit p-aminobenzoic, và sự khuyết dưỡng axit 2,3-dihydroxybenzoic được phát triển. Do vậy, sự bổ sung 6 loại hợp chất này vào môi trường là cần thiết, nhưng lại không có lợi. Ngoài ra, các chủng sản sinh axit protocatechuic đã thu được bằng cách đưa sự đột biến vào trong vi khuẩn *Corynebacterium* (tài liệu sáng chế 6) hoặc *Brevibacterium* (các tài liệu sáng chế 7 và 8). Chủng này cần các nguồn dinh dưỡng như tyrosin, để sản sinh axit protocatechuic. Hơn nữa, lượng axit protocatechuic tối đa được tạo ra bởi thể đột biến này là khoảng 13g/L, và lượng này là nhỏ hơn lượng được sinh ra bởi sinh vật dinh dưỡng thụ động axit amin thơm (tài liệu sáng chế 8).

Ikeda 2006 (tài liệu phi sáng chế 7) đề cập đến ưu điểm trong kỹ thuật chuyển hóa để sản xuất các axit amin thơm và các chất trung gian thơm hữu ích trong *Corynebacterium glutamicum* và *Escherichia coli*.

Bongaerts et al., 2001 (tài liệu phi sáng chế 8) đề cập đến kỹ thuật chuyển hóa để sản xuất vi sinh vật của các axit amin thơm và các hợp chất có nguồn gốc từ *Escherichia coli* và *Corynebacterium glutamicum*.

Yi et al., 2003 (tài liệu phi sáng chế 9) đề cập đến sự vận chuyển glucoza biến đổi và sản lượng sản phẩm chu trình shikimat trong *E. coli*.

Yi et al., 2002 (tài liệu phi sáng chế 10) đề cập đến sự biểu hiện được biến đổi của phosphoenolpyruvat mà gia tăng sản lượng sản phẩm chu trình shikimat

trong *E. coli*.

JP 2010/207094 A (tài liệu sáng chế 9) đề cập đến phương pháp sản xuất axit protocatechuic bao gồm bước tạo ra axit protocatechuic từ tiền chất axit protocatechuic bằng cách sử dụng chất biến đổi của vi sinh vật mà thuộc chủng *Corynebacterium*.

Li et al., 1999 (tài liệu phi sáng chế 11) đề cập đến phương pháp sản xuất axit 3-dehydroshikimic bằng cách sử dụng chất biến đổi *Escherichia coli* và mô tả vấn đề cải thiện hiệu quả sản xuất axit protocatechuic bằng phương pháp này.

JP 2000/295996 A (tài liệu sáng chế 10) đề cập đến phương pháp sản xuất purin nucleotit bằng cách nuôi cấy vi sinh vật, ví dụ *Corynebacterium ammoniagenes*, mà có khả năng sản xuất tiền chất của purin nucleotit và ADN được đưa vào trong đó, mà ADN có thể cảm ứng và biểu hiện enzym mà có thể tổng hợp purin nucleotit từ tiền chất.

WO 2011/138006 A1 (tài liệu sáng chế 11) đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào mà được cải biến tái tổ hợp trên kiểu đại của nó và biểu diễn năng suất tối ưu của chất chuyển hóa cụ thể.

JP 2006/508684 A (tài liệu sáng chế 12) đề cập đến phương pháp sử dụng chất kìm hãm để điều chỉnh các biểu hiện gen trong các vi sinh vật mà thuộc chủng *Corynebacterium*.

Teramoto et al., 2009 (tài liệu phi sáng chế 12) đề cập đến các hệ thống chuyển hóa mà bao gồm chu trình axit shikimic bao gồm việc tạo ra axit protocatechuic trong *Corynebacterium glutamicum*.

US 5,272,073 A (tài liệu sáng chế 13) đề cập đến các hệ thống chuyển hóa mà bao gồm chu trình axit shikimic bao gồm việc tạo ra axit protocatechuic trong các vi sinh vật thuộc chủng *Corynebacterium*.

Các tài liệu kỹ thuật đã biết

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Patent Mỹ 6,472,169

Tài liệu sáng chế 2: Patent Mỹ 5,821,266

Tài liệu sáng chế 3: Patent Nhật Bản 4,305,184

Tài liệu sáng chế 4: JP H05-49489 A (1993)

Tài liệu sáng chế 5: JP H05-304971 A (1993)

Tài liệu sáng chế 6: JP S45-39036 B (1970)

Tài liệu sáng chế 7: JP S50-89592 A (1975)

Tài liệu sáng chế 8: JP S60-98989 A (1985)

Tài liệu sáng chế 9: JP 2010/207094 A (2010)

Tài liệu sáng chế 10: JP 2000/295996 A (2000)

Tài liệu sáng chế 11: WO 2011/138006 A1 (2011)

Tài liệu sáng chế 12: JP 2006/508684 A (2006)

Tài liệu sáng chế 13: US 5,272,073 A (1993)

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Biotechnol. Prog., 19, 808, 2003

Tài liệu phi sáng chế 2: Biotechnol. Bioeng., 64, 61, 1999

Tài liệu phi sáng chế 3: Agric. Biol. Chem., 39, 343, 1975

Tài liệu phi sáng chế 4: Appl. Environ. Microbiol., 65, 2497, 1999

Tài liệu phi sáng chế 5: Agric. Biol. Chem., 37, 2013, 1973

Tài liệu phi sáng chế 6: J. Am. Chem. Soc., 127, 2874, 2005

Tài liệu phi sáng chế 7: Applied Microbiology and Biotechnology, 69, 615, 2006

Tài liệu phi sáng chế 8: Metabolic Engineering, 3, 289, 2001

Tài liệu phi sáng chế 9: Biotechnology Progress, 19, 1450, 2003

Tài liệu phi sáng chế 10: Biotechnology Progress, 18, 1141, 2002

Tài liệu phi sáng chế 11: Biotechnology Progress, 15, 876, 1999

Tài liệu phi sáng chế 12: Appl. Environ. Microbiol., 75, 3461, 2009

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp thu chủng vi khuẩn mà có thể làm giảm lượng hợp chất P được chuyển hóa thành sản phẩm chuyển hóa M và tích tụ một cách hiệu quả hợp chất P trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M khi sản xuất hợp chất P bằng cách sử dụng vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp hoặc chu trình trao đổi chất trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho

sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon nhờ hợp chất P làm sản phẩm chuyển hóa trung gian (Fig.1). Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất Q từ hợp chất P được tích tụ với sự trợ giúp của enzym Y (Fig.3).

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực để đạt được các mục đích nêu trên nhờ các nghiên cứu nhằm tạo ra chủng vi khuẩn mà có thể sản sinh một cách hiệu quả chất đích (tức là, DHS) từ chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (sau đây được viết tắt là “chủng ATCC13032”). Ban đầu, họ tạo ra chủng NSH Δ aroE3 bằng cách đưa sự đột biến khuyết đoạn vào trong gen aroE3 (cg1835) mà mã hóa shikimat dehydrogenaza (enzym X) thúc đẩy sự chuyển hóa DHS thành axit shikimic (sản phẩm chuyển hóa M) từ chủng NSH trong đó sự biểu hiện của nhiều enzym liên quan đến chu trình sinh tổng hợp từ glucoza thành DHS (Hợp chất P) đã được gia tăng và sự phiên mã gen qsuB (cg0502) mã hóa DHS dehydrataza (Enzym Y) thúc đẩy sự chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic được chỉ định bởi gen khởi đầu tuf (cg0587) (sau đây được viết tắt là “đoạn khởi đầu Tu”). Kết quả là, các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng tốc độ sinh trưởng của chủng NSH Δ aroE3 sẽ bị giảm đáng kể mà không cần bổ sung 3 loại axit amin thơm (tức là, tryptophan, phenylalanin, và tyrosin). Các tác giả sáng chế cũng xác nhận rằng chủng NSH Δ aroE3 này sẽ sản sinh 0,5g/L axit protocatechuic nhờ sự nuôi cấy chủng này trong môi trường được bổ sung 3 loại axit amin thơm và axit shikimic. Để điều hòa mức biểu hiện của gen shikimat dehydrogenaza hoạt hóa (gen aroE3) bằng chất kim hãm được mã hóa bởi gen vanR (cg2615) (sau đây được viết tắt là “gen kim hãm VanR”), hậu quả là, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 được sinh ra từ chủng NSH Δ aroE3 bằng cách kết hợp gen aroE3 được gắn với gen khởi đầu vanA (cg2616) (sau đây được viết tắt là “đoạn khởi đầu vanA”) vào trong nhiễm sắc thể. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chủng NSH Δ aroE3_vanE3 có thể sinh trưởng trong môi trường tổng hợp mà không được bổ sung 3 loại axit amin thơm và axit shikimic và chủng này sản sinh 16,6g/L axit protocatechuic. Điều này đã dẫn đến sự hoàn thành sáng chế. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã tạo ra chủng trong đó mức biểu hiện gen aroE3 được điều chỉnh bởi chất kim hãm được mã hóa bởi gen rhcR (cg1308) (sau đây được viết tắt là “gen kim hãm RhcR”) từ chủng NSH Δ aroE3. Kết quả là, đạt được năng suất của axit protocatechuic ở mức 11,2g/L, và các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng có thể đạt được năng suất axit

protocatechuic tuyệt vời bằng cách sử dụng chất kìm hãm khác với gen kìm hãm VanR.

Ngoài sự đột biến khuyết đoạn của gen *aroE3* ở chủng *NSHΔaroE3* thì chủng *NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD* được tạo ra bằng cách đưa các sự đột biến khuyết đoạn vào trong gen *qsuD* (cg0504) mã hóa shikimat dehydrogenaza mà đẩy nhanh mức chuyển hóa của DHS thành axit shikimic (sản phẩm chuyển hóa M) và gen *qsuB* mã hóa DHS dehydrataza. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng chủng *NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD* sẽ không phát triển mà không có sự bổ sung 3 loại axit amin thơm, vitamin K2, và axit p-aminobenzoic. Các tác giả sáng chế cũng xác nhận rằng chủng *NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD* này sẽ sản sinh 7,7g/L DHS nhờ sự nuôi cấy chủng này trong môi trường được bổ sung các chất phụ gia nêu trên. Theo cách giống như trong trường hợp tạo ra chủng *NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD*, chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuBΔqsuD* được tạo ra từ from chủng *NSHΔaroE3_vanE3* bằng cách đưa sự đột biến khuyết đoạn vào trong gen *qsuD* và gen *qsuB*, và chủng *Pben-vanR* được tạo ra từ chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuBΔqsuD* bằng cách kết hợp ADN gồm có gen khởi đầu *benA* (cg2637) được nối với gen *vanR* mà mã hóa gen kìm hãm VanR vào trong nhiễm sắc thể. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chủng *Pben-vanR* có thể phát triển trong môi trường tổng hợp mà không được bổ sung các chất phụ gia và chủng này sẽ sản sinh 15,4g/L DHS. Điều này dẫn đến sự hoàn thành sáng chế.

Sáng chế đề cập đến các mục (1) đến (16) dưới đây.

(1) Sinh vật chưa có nhân điển hình có tất cả các dấu hiệu (a) đến (d) sau đây để tích tụ hợp chất P bằng cách điều chỉnh mức biểu hiện của enzym X mà chuyển hóa hợp chất P dưới dạng sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon:

(a) hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được chọn từ các enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp hợp chất P từ nguồn cacbon mà có thể được sử dụng bởi sinh vật chưa có nhân điển hình được gia tăng so với sinh vật chưa có nhân điển hình kiểu đại;

(b) hoạt tính của enzym X bị mất hoặc bị giảm bởi sự đột biến thể đoạn,

khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen kiểu đại x mã hóa protein của enzym X, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x;

(c) sự phiên mã of DNA mã hóa enzym hoạt tính X được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu A, đoạn khởi đầu này khác với đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x và trong đó sự phiên mã bị kìm hãm nhờ sự trợ giúp của protein kìm hãm R; và

(d) sự phiên mã của một hoặc nhiều bản sao của gen z mã hóa protein kìm hãm R được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu có sẵn cho gen và/hoặc đoạn khởi đầu cảm ứng B mà khác với đoạn khởi đầu vốn có;

trong đó sinh vật chưa có nhân điển hình tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Escherichia coli*.

(2) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục (1), trong đó sự đột biến thể đoạn ở vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x như được xác định ở dấu hiệu (b) là sự đột biến thể đoạn của toàn bộ hoặc một phần của vùng khởi đầu có ADN của đoạn khởi đầu A như được xác định ở dấu hiệu (c).

(3) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục (1) hoặc (2), trong đó hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa khác với enzym X trong số các enzym của sinh vật chưa có nhân điển hình mà chuyển hóa hợp chất P bị mất hoặc giảm.

(4) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó gen z mã hóa protein kìm hãm R là gen vanR (cg2615), gen pcaR (cg2624), hoặc gen rhcR (cg1308) của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và, trong đó đoạn khởi đầu A tốt hơn là gen khởi đầu vanA (cg2616), gen khởi đầu pobA (cg1226), gen khởi đầu pcaH (cg2631), hoặc gen khởi đầu rhcH (cg1309) của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

(5) Phương pháp sản xuất hợp chất P từ nguồn cacbon, trong đó hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian được chuyển hóa bằng enzym X thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M, phương pháp này bao gồm hai giai đoạn

nuôi cấy:

i) giai đoạn nuôi cấy sớm, trong đó mức biểu hiện của enzym X cho phép sự chuyển hóa của hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp mà trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng;

ii) giai đoạn nuôi cấy muộn, trong đó sự biểu hiện của enzym X được ức chế bằng cách ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và tốt hơn là cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kìm hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và hợp chất P được tạo ra được tích tụ.

(6) Phương pháp sản xuất hợp chất P từ nguồn cacbon, trong đó hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian được chuyển hóa bằng enzym X thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M, phương pháp này bao gồm hai giai đoạn nuôi cấy:

i) giai đoạn nuôi cấy sớm, trong đó mức biểu hiện của enzym X cho phép sự chuyển hóa của hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng;

ii) giai đoạn nuôi cấy muộn, trong đó sự biểu hiện của enzym X được ức chế bằng cách giảm sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kìm hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và hợp chất P được tạo ra được tích tụ.

(7) Phương pháp sản xuất hợp chất P theo mục (5) hoặc (6), trong đó sự kết hợp của hợp chất P và sản phẩm chuyển hóa M là sự kết hợp bất kỳ trong số các sự kết hợp của các mục từ (f) đến (i) dưới đây:

(f) hợp chất P là 3-dehydroaxit shikimic và sản phẩm chuyển hóa M là axit shikimic;

(g) hợp chất P là axit glutamic và sản phẩm chuyển hóa M là N-axetylglutamat hoặc γ -glutamyl phosphat;

(h) hợp chất P là axit aspartic và sản phẩm chuyển hóa M là β -aspartyl phosphat; và

(i) hợp chất P là serin và sản phẩm chuyển hóa M là glyxin.

(8) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) có dấu hiệu (e) sau đây ngoài các dấu hiệu (a) đến (d), để chuyển hóa hợp chất P được tích tụ thành hợp chất Q với sự trợ giúp của enzym Y:

(e) hiệu suất chuyển hóa hợp chất P thành hợp chất Q được gia tăng hoặc mức biểu hiện gen y được điều chỉnh khác với gen kiểu dại bởi vì sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen y mã hóa protein của enzym Y, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen y.

(9) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục (8), trong đó hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa trong số các enzym của sinh vật chưa có nhân điển hình mà chuyển hóa hợp chất Q bị mất hoặc giảm.

(10) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục (8) hoặc (9), trong đó sự đột biến thể đoạn ở vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen y như được xác định ở dấu hiệu (e) là sự đột biến thể đoạn của toàn bộ hoặc một phần của vùng khởi đầu với ADN của đoạn khởi đầu C mà khác với đoạn khởi đầu vốn có thúc đẩy sự phiên mã gen hoặc đoạn khởi đầu A.

(11) Sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục (10), trong đó đoạn khởi đầu C là giống đoạn khởi đầu B hoặc sự phiên mã đoạn khởi đầu C được điều chỉnh bằng protein điều hòa sự phiên mã protein B, trong đó đoạn khởi đầu C tốt hơn là đoạn khởi đầu cảm ứng, trong đó đặc biệt là đoạn khởi đầu C được cảm ứng với sự bổ sung hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm axit ferulic, axit vanilic, vanilin, axit benzoic, axit 3-hydroxybenzoic, resorxinol, axit 4-hydroxybenzoic, axit 2,4-dihydroxybenzoic, fructoza, và sucroza.

(12) Phương pháp sản xuất hợp chất Q bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (8) đến (11) đồng thời ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và tốt hơn là cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kim hãm

R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra và gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra.

(13) Phương pháp sản xuất hợp chất Q bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (8) đến (11) đồng thời giải ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kìm hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra và gia tăng lượng hợp chất Q được tạo thành.

(14) Phương pháp sản xuất hợp chất Q theo mục (12) hoặc (13), trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo mục bất kỳ trong số các mục từ (8) đến (11) với sự có mặt của nguồn cacbon và sau đó cảm ứng sự phiên mã của đoạn khởi đầu C để gia tăng mức biểu hiện enzym Y, bằng cách đó gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra.

(15) Phương pháp sản xuất hợp chất Q theo mục bất kỳ trong số các mục từ (12) đến (14), trong đó sự kết hợp của hợp chất P, hợp chất Q, và sản phẩm chuyển hóa M là sự kết hợp bất kỳ trong số các sự kết hợp của các mục từ (j) đến (w) sau đây:

(j) hợp chất P là axit 3-dehydroshikimic, hợp chất Q là axit protocatechuic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit shikimic, và trong đó tốt hơn là enzym X là shikimat dehydrogenaza và enzym Y là 3-dehydroshikimat dehydrataza;

(k) hợp chất P là axit chorismic, hợp chất Q là axit anthranilic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit prephenic;

(l) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit 4-hydroxyphenylpyruvic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit phenylpyruvic;

(m) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit arogenic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit phenylpyruvic;

(n) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit phenylpyruvic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit 4-hydroxyphenylpyruvic hoặc axit arogenic;

(o) hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, hợp chất Q là axit 2-isopropylmalic, và sản phẩm chuyển hóa M là valin;

(p) hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, hợp chất Q là valin, và sản phẩm chuyển hóa M là axit 2-isopropylmalic;

(q) hợp chất P là axit glutamic, hợp chất Q là γ -glutamyl phosphat, và sản phẩm chuyển hóa M là N-axetylglutamat;

(r) hợp chất P là axit glutamic, hợp chất Q là N-axetylglutamat, và sản phẩm chuyển hóa M là γ -glutamyl phosphat;

(s) hợp chất P là axit aspartic, hợp chất Q là asparagin, và sản phẩm chuyển hóa M là β -aspartyl phosphat;

(t) hợp chất P là aspartat β -semialdehyt, hợp chất Q là axit 2,3-dihydrodipicolinic, và sản phẩm chuyển hóa M là homoserin;

(u) hợp chất P là homoserin, hợp chất Q là o-axetylhomoserin, và sản phẩm chuyển hóa M là homoserin phosphat;

(v) hợp chất P là homoserin, hợp chất Q là homoserin phosphat, và sản phẩm chuyển hóa M là o-axetylhomoserin; và

(w) hợp chất P là serin, hợp chất Q là o-axetylserin, và sản phẩm chuyển hóa M là glyxin.

(16) Phương pháp sản xuất axit protocatechuic như được mô tả trong mục (j) của mục (15), trong đó hoạt tính chuyển hóa axit protocatechuic bị mất hoặc bị giảm nhờ quá trình đưa sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit vào trong vùng dịch mã hoặc sự phiên mã/vùng điều hòa sự dịch mã của một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa protocatechuat 2,3-dioxygenaza, gen mã hóa protocatechuat 3,4-dioxygenaza, gen mã hóa protocatechuat 4,5-dioxygenaza, và gen mã hóa protocatechuat decarboxylaza.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, có thể thu được các vi sinh vật mà có thể sản sinh một cách hiệu quả các hợp chất hữu cơ hữu ích như DHS hoặc axit protocatechuic, từ nguồn cacbon như glucoza. Bằng cách sử dụng các vi sinh vật theo sáng chế, thì DHS hoặc axit protocatechuic có thể được tạo ra một cách hữu hiệu bằng cách sử dụng môi trường mà không được bổ sung các axit amin thơm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện phương pháp sản xuất hợp chất P hữu ích, hợp chất này là sản phẩm chuyển hóa trung gian trong chu trình sinh tổng hợp từ nguồn cacbon

cho sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng, bằng cách đó cho phép chất kìm hãm R, là sản phẩm của gen z, điều chỉnh mức biểu hiện của enzym X (tức là, enzym đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa hợp chất P thành sản phẩm chuyển hóa M).

Fig.2 thể hiện chu trình axit shikimic liên quan đến sự sinh tổng hợp axit amin thơm từ nguồn cacbon.

Fig.3 thể hiện phương pháp điều hòa mức biểu hiện của enzym nhờ chất kìm hãm R, là sản phẩm của gen z, để tạo ra hợp chất P hữu ích trong chu trình sinh tổng hợp từ nguồn cacbon cho sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng và biểu hiện enzym Y mà đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa hợp chất P thành hợp chất Q, bằng cách đó tạo ra hợp chất Q hữu ích.

Fig.4 biểu hiện rằng hợp chất P có thể được tạo ra một cách hữu hiệu bởi vì mức biểu hiện enzym X thấp và lượng được điều chỉnh của sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra do sự ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A bởi chất kìm hãm R.

Fig.5 biểu hiện rằng sự ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A bởi chất kìm hãm R được giảm bớt và enzym X được tạo ra một cách thông thường ở giai đoạn nuôi cấy sớm, sự phiên mã đoạn khởi đầu A bị tái ức chế bởi chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X bị giảm đáng kể, và hợp chất P được tích tụ ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Fig.6 giải thích sự phiên mã đoạn khởi đầu A xảy ra và enzym X được tạo ra một cách thông thường bởi vì lượng nhỏ của chất kìm hãm R ở giai đoạn nuôi cấy sớm, mức biểu hiện enzym X bị giảm đáng kể bởi vì sự gia tăng lượng chất kìm hãm R, và hợp chất P là được tích tụ như vậy ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Fig.7 giải thích sự phiên mã đoạn khởi đầu được kìm hãm bởi chất kìm hãm R được mã hóa bởi gen z được định vị ở dòng dưới của đoạn khởi đầu B, mức biểu hiện enzym X bị giảm đáng kể, hợp chất P được tích tụ, và hợp chất P sau đó được chuyển hóa thành hợp chất Q với sự trợ giúp của enzym Y, là sản phẩm của gen z.

Fig.8 giải thích sự ức chế phiên mã đoạn khởi đầu A bởi chất kìm hãm R được giảm bớt và enzym X được tạo ra như vậy một cách bình thường ở giai đoạn nuôi cấy sớm, sự phiên mã đoạn khởi đầu A bị tái ức chế bởi chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X bị giảm đáng kể, và hợp chất P được tích tụ được chuyển hóa

thành hợp chất Q với sự trợ giúp của enzym Y ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Fig.9 giải thích sự phiên mã đoạn khởi đầu A xảy ra và enzym X được tạo ra một cách bình thường bởi vì lượng nhỏ của chất kìm hãm R ở giai đoạn nuôi cấy sớm, mức biểu hiện enzym X bị giảm đáng kể bởi vì lượng gia tăng của chất kìm hãm R, và hợp chất P được tích tụ được chuyển hóa thành hợp chất Q với sự trợ giúp của enzym Y ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Fig.10 giải thích sự phiên mã đoạn khởi đầu A bị ức chế bởi chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X được duy trì ở mức thấp để điều chỉnh lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và lượng nhỏ hợp chất P được tạo ra như vậy trong khi cho phép các vi sinh vật để phát triển ở giai đoạn nuôi cấy sớm. Fig.10 cũng giải thích rằng enzym Y mà chuyển hóa hợp chất P thành hợp chất Q được cảm ứng để biểu hiện nhằm gia tăng mức biểu hiện enzym Y, và lượng hợp chất Q được gia tăng ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Fig.11 giải thích sự phiên mã đoạn khởi đầu A bị ức chế bởi chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X được duy trì ở mức thấp để điều chỉnh lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và lượng nhỏ hợp chất P được tạo ra như vậy trong khi cho phép các vi sinh vật để phát triển ở giai đoạn nuôi cấy sớm. Fig.11 cũng giải thích rằng chất kìm hãm R được cảm ứng để biểu hiện nhằm gia tăng lượng hợp chất P được tích tụ, enzym Y mà chuyển hóa hợp chất P được tích tụ thành hợp chất Q được cảm ứng để biểu hiện nhằm gia tăng mức biểu hiện enzym Y, và lượng hợp chất Q được tạo ra được gia tăng như vậy ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với sự tham khảo Fig.1 và Fig.3.

Các vi sinh vật theo sáng chế được sử dụng để tạo ra một cách hữu hiệu hợp chất P hữu ích, hợp chất này là sản phẩm chuyển hóa trung gian trong chu trình sinh tổng hợp từ nguồn cacbon cho sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng và các vi sinh vật này có các dấu hiệu (a) đến (d) được nêu dưới đây. Tốt hơn là, các vi sinh vật là sinh vật chưa có nhân điển hình trong đó hệ thống điều hòa phiên mã bởi chất kìm hãm R đã được phát triển nhằm điều chỉnh sự biểu hiện gen:

(a) hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được chọn từ các enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp hợp chất P từ nguồn cacbon mà có thể được sử dụng bởi sinh

vật chưa có nhân điển hình được gia tăng so với nguồn cacbon được sử dụng bởi sinh vật chưa có nhân điển hình kiểu đại;

(b) hoạt tính của enzym X bị mất hoặc bị giảm bởi sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen kiểu đại x mã hóa protein của enzym X mà chuyển hóa hợp chất P thành sản phẩm chuyển hóa M, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x;

(c) sự phiên mã ADN mã hóa enzym hoạt tính X được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu A, mà khác với đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x và trong đó sự phiên mã bị ức chế với sự trợ giúp của protein kìm hãm R; và

(d) sự phiên mã của một hoặc nhiều bản sao của gen z mã hóa protein kìm hãm R được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu có sẵn đối với gen và/hoặc đoạn khởi đầu cảm ứng B mà khác với đoạn khởi đầu vốn có.

Về một hoặc nhiều enzym được chọn từ các enzym liên quan đến chu trình sinh tổng hợp từ nguồn cacbon, như glucoza, cho hợp chất P, hoạt tính enzym có thể được gia tăng và/hoặc lượng enzym protein có thể được gia tăng theo cách được mô tả dưới đây. Như vậy, các vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế có thể được tạo ra có dấu hiệu (a). Đặc biệt, hoạt tính enzym có thể được tăng cường và/hoặc lượng enzym protein có thể được gia tăng bằng cách, ví dụ, đưa sự đột biến vào trong điểm khởi đầu sự dịch mã của gen mã hóa enzym protein, đưa sự đột biến vào trong vùng khởi đầu của gen, thay thế đoạn khởi đầu bằng đoạn khởi đầu khỏe mạnh khác, khuếch đại gen bằng cách nhân dòng thành nhiều bản sao plasmit, gia tăng mức biểu hiện của protein mà điều hòa dương tính sự phiên mã của gen, và/hoặc làm giảm hoặc xóa bỏ sự biểu hiện của mà điều hòa âm tính sự phiên mã của gen. Như vậy, lượng hợp chất P được tạo ra có thể được gia tăng. Trong trường hợp của enzym mà trải qua sự ức chế phản hồi bởi sản phẩm chuyển hóa nằm ở dòng dưới, theo cách khác, sự đột biến axit amin mà làm giảm sự ức chế phản hồi có thể được đưa vào trong enzym protein, để gia tăng lượng hợp chất P được tạo ra. Sự đưa đột biến vào trong ADN hoặc protein có thể được thực hiện bởi sự gây đột biến, công nghệ ADN tái tổ hợp, kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng, hoặc các kỹ thuật khác.

Dấu hiệu (b) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ hoạt tính của enzym X

nhờ sự gây đột biến, công nghệ ADN tái tổ hợp, hoặc các kỹ thuật khác. Tốt hơn là, sự đột biến khuyết đoạn được đưa vào trong vùng dịch mã của gen kiểu dại x nhờ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng. Nếu toàn bộ vùng dịch mã bị loại bỏ, sự biểu hiện của gen dòng dưới có thể được kìm hãm bởi các tác dụng phân cực. Như vậy, tốt hơn là sự đột biến khuyết đoạn trong khung được đưa vào trong vùng dịch mã ở vị trí khác với đầu 5' và đầu 3' của vùng dịch mã. Theo cách khác, hoạt tính của enzym X có thể được loại bỏ bằng cách đưa sự đột biến thế đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit vào vị trí liền kề điểm khởi đầu sự dịch mã của gen x hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x. Ngoài ra, vùng khởi đầu sẵn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x có thể được thay thế bằng ADN của đoạn khởi đầu A như được xác định ở dấu hiệu (c), để đồng thời tạo ra dấu hiệu (b) và dấu hiệu (c).

Dấu hiệu (c) có thể được truyền bằng cách đưa ADN mã hóa protein của enzym hoạt tính X vào vị trí dòng dưới của đoạn khởi đầu A, sự phiên mã bị ức chế bởi chất kìm hãm R. Đoạn khởi đầu A là khác với đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x, và bất kỳ đoạn khởi đầu có thể được sử dụng, với điều kiện sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi chất kìm hãm R. Các ví dụ ưu tiên về đoạn khởi đầu A bị kìm hãm bởi chất kìm hãm R ở chủng *Escherichia coli* K-12 bao gồm đoạn khởi đầu pL hoặc đoạn khởi đầu pR, sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen cI857 của thể thực khuẩn λ , đoạn khởi đầu lac, sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen lacI, và đoạn khởi đầu operon gal, sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen galR. Các ví dụ về đoạn khởi đầu A, sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi chất kìm hãm R ở chủng ATCC13032 bao gồm: đoạn khởi đầu vanA, sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen vanR (cg2615) (sau đây được gọi là “gen vanR”) (sau đây được viết tắt là “chất kìm hãm VanR”); đoạn khởi đầu của gen rhcH (cg1309) (sau đây được gọi là “gen rhcH”), sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen rhcR (cg1308) (sau đây được gọi là “gen rhcR”) (sau đây được viết tắt là “chất kìm hãm RhcR”) (sau đây được viết tắt là “đoạn khởi đầu rhcH”); và đoạn khởi đầu của gen pcaI (cg2623) (sau đây được gọi là “gen pcaI”), sự phiên mã từ đó bị ức chế bởi sản phẩm gen pcaR (cg2624) (sau đây được gọi là “gen pcaR”) (sau đây được viết tắt là “chất kìm hãm PcaR”). Để làm gen x, gen có nguồn gốc từ vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng, hoặc gen thu được từ sinh vật có nhân điển hình hoặc chưa có nhân điển hình, mà khác với vi sinh vật

theo sáng chế, có thể được sử dụng.

Dưới các điều kiện thông thường, mức biểu hiện enzym X là thấp do có dấu hiệu (b) và dấu hiệu (c) ở các vi sinh vật của sáng chế. Tuy nhiên, các vi sinh vật này có sự đột biến để gia tăng lượng hợp chất P là do có dấu hiệu (a). Như vậy, các vi sinh vật này có thể tạo ra lượng sản phẩm chuyển hóa M mà cần thiết cho sự sinh trưởng. Khi lượng hợp chất P được tạo ra là rất nhỏ và các điều kiện sinh trưởng là kém, sự phiên mã bị ức chế được gây ra bởi chất kìm hãm R có thể được giảm bớt, và mức biểu hiện enzym X có thể được gia tăng. Như vậy, các điều kiện sinh trưởng của các vi sinh vật có thể được cải thiện.

Dấu hiệu (d) có thể được tạo ra bằng cách hình thành đơn vị biểu hiện gen z trong đó gen z được đặt ở dòng dưới của đoạn khởi đầu cảm ứng B mà khác với gen z đoạn khởi đầu, ngoài đơn vị biểu hiện kiểu đại của gen z mã hóa chất kìm hãm R. Ngoài đơn vị biểu hiện gen kiểu đại z, đơn vị biểu hiện gen z được định vị ở dòng dưới của đoạn khởi đầu cảm ứng B có thể được kết hợp vào trong các vi sinh vật theo sáng chế. Bất kỳ chất kìm hãm thu được từ sinh vật chưa có nhân điển hình có thể được sử dụng làm chất kìm hãm R. tốt hơn là sử dụng chất kìm hãm, sự ức chế của chất này có thể được giảm bớt khi, ví dụ, bổ sung chất gây cảm ứng hoặc sự thay đổi nhiệt độ. Khi chủng *Escherichia coli* K-12 được sử dụng làm vi sinh vật theo sáng chế, các ví dụ cụ thể của chất kìm hãm mà có thể được sử dụng bao gồm các chất kìm hãm được mã hóa bởi gen cI857 thể thực khuẩn λ được cảm ứng bởi sự nuôi cấy ở nhiệt độ 38°C hoặc nhiệt độ cao hơn, các chất kìm hãm được mã hóa bởi gen lacI được cảm ứng bằng sự bổ sung lactoza, các chất kìm hãm được mã hóa bởi gen galR được cảm ứng bằng sự bổ sung galactoza, và các chất kìm hãm được mã hóa bởi gen tetR được cảm ứng bằng sự bổ sung tetracyclin. Khi chủng ATCC13032 được sử dụng làm vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, chất kìm hãm VanR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ với sự bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin, chất kìm hãm RhoR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ với sự bổ sung resorcinol hoặc axit 2,4-dihydroxybenzoic, hoặc chất kìm hãm PcaR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ với sự bổ sung axit 4-dihydroxybenzoic có thể được sử dụng.

Bất kỳ đoạn khởi đầu có thể được sử dụng là đoạn khởi đầu B, với điều kiện nó là đoạn khởi đầu cảm ứng thu được từ sinh vật chưa có nhân điển hình.

Nếu gen z được biểu hiện trong chủng *Escherichia coli* K-12, cụ thể, đoạn khởi đầu pL thể thực khuẩn λ hoặc đoạn khởi đầu pR, đoạn khởi đầu lac, đoạn khởi đầu gal operon, đoạn khởi đầu trp operon, đoạn khởi đầu araBAD, hoặc các đoạn khởi đầu khác có thể được sử dụng. Nếu gen z được biểu hiện ở chủng ATCC13032, ví dụ, đoạn khởi đầu vanA được cảm ứng bởi sự bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin, đoạn khởi đầu rhcH được cảm ứng bởi sự bổ sung resorxinol hoặc axit 2,4-dihydroxybenzoic, đoạn khởi đầu pcaI được cảm ứng bởi sự bổ sung axit 4-hydroxybenzoic, gen khởi đầu nagI (cg3351) (sau đây được gọi là "gen nagI") được cảm ứng bởi sự bổ sung axit 3-hydroxybenzoic (sau đây được viết tắt là "đoạn khởi đầu nagI"), gen khởi đầu benA (cg2637) (sau đây được gọi là gen benA) được cảm ứng bởi sự bổ sung axit benzoic (sau đây được viết tắt là "đoạn khởi đầu benA"), hoặc gen khởi đầu cg2118 hoặc gen khởi đầu ptsS (cg2925) (sau đây được gọi là "gen ptsS") được cảm ứng bởi sự bổ sung fructoza hoặc sucroza có thể được sử dụng.

Nếu vi sinh vật theo sáng chế có hoạt tính enzym để chuyển hóa hợp chất P khác với hoạt tính enzym X và lượng hợp chất được tích tụ có thể được giảm khi tạo ra hợp chất P, hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa để chuyển hóa hợp chất P của vi sinh vật tốt hơn là có thể bị biến mất hoặc bị giảm do sự gây đột biến hoặc công nghệ ADN tái tổ hợp.

Tốt hơn là, các vi sinh vật theo sáng chế là sinh vật chưa có nhân điển hình của *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardioideae*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Amiclatopsis*, *Rhodococcus*, *Kineococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Klebsiella*, hoặc *Escherichia*. Tốt hơn nữa là, các vi sinh vật theo sáng chế là *Corynebacterium glutamicum* mà thường được sử dụng để sản sinh axit amin nhờ sự lên men hoặc *Escherichia coli*, các đặc tính của chúng đã được phân tích một cách cẩn thận.

Ví dụ về phương pháp sản xuất hợp chất P sử dụng vi sinh vật theo sáng chế là phương pháp trong đó hợp chất P hữu ích được tạo ra bằng cách tiến hành nuôi cấy trong môi trường chứa nguồn cacbon đồng thời ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A. Vì mức phiên mã của đoạn khởi đầu A mà điều hòa sự biểu hiện enzym X được duy trì ở mức thấp bởi chất kim hãm R trong vi sinh vật theo sáng chế, lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra được điều chỉnh, và hợp chất P có

thể được tạo ra một cách hữu hiệu (Fig.4).

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, nếu sự sinh trưởng của vi sinh vật là chậm do mức phiên mã thấp của đoạn khởi đầu A mà điều hòa mức biểu hiện enzym X, quy trình sản xuất hợp chất P có thể được tách thành hai giai đoạn; tức là, giai đoạn nuôi cấy sớm và giai đoạn nuôi cấy muộn. Như vậy, hợp chất P hữu ích có thể được tạo ra. Cụ thể, môi trường được bổ sung nguồn cacbon có thể được cấy các vi sinh vật, sự phiên mã được giải ức chế bằng cách bổ sung chất gây cảm ứng hoặc gia tăng/làm giảm nhiệt độ nuôi cấy theo các đặc tính của chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X được gia tăng, và sau đó quá trình nuôi cấy được tiếp tục. Tiếp theo, sự phiên mã lại bị ức chế bởi chất kìm hãm R ở thời điểm thích hợp, để kìm hãm mức biểu hiện enzym X. Như vậy, lượng hợp chất P được tạo ra có thể được gia tăng (Fig.5). Nếu đoạn khởi đầu A mà được cảm ứng với sự bổ sung chất gây cảm ứng được sử dụng, lượng chất gây cảm ứng cần được bổ sung được điều chỉnh để làm suy kiệt chất gây cảm ứng ở giai đoạn nuôi cấy muộn. Như vậy, sự phiên mã có thể lại bị ức chế bởi chất kìm hãm R. Nếu đoạn khởi đầu A mà được cảm ứng bằng cách tăng/giảm nhiệt độ nuôi cấy được sử dụng, nhiệt độ nuôi cấy có thể quay trở lại mức tại đó sự phiên mã bị ức chế bởi chất kìm hãm R. Như vậy, sự phiên mã có thể được ức chế lại bởi chất kìm hãm R.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế trong đó sự biểu hiện chất kìm hãm R được hướng bởi đoạn khởi đầu cảm ứng B, tốt hơn là, quy trình sản xuất hợp chất P được chia thành hai giai đoạn: tức là, giai đoạn nuôi cấy sớm và giai đoạn nuôi cấy muộn. Như vậy, hợp chất P hữu ích được tạo ra. Cụ thể, môi trường chứa nguồn cacbon được cấy các vi sinh vật, các vi sinh vật này phát triển, và chất gây cảm ứng được bổ sung hoặc nhiệt độ nuôi cấy được tăng hoặc giảm theo các đặc tính của đoạn khởi đầu cảm ứng B để hoạt hóa đoạn khởi đầu cảm ứng B và gia tăng lượng chất kìm hãm R được tạo ra. Như vậy, sự sản sinh sản phẩm chuyển hóa M bị ức chế, và lượng hợp chất P được tạo ra được gia tăng (Fig.6).

Theo phương pháp sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, như nêu trên, lượng hợp chất P được tạo ra có thể được tối đa hóa một cách dễ dàng nhờ phương pháp nuôi cấy khác bằng cách sử dụng các vi sinh vật theo sáng chế, theo điều kiện sinh trưởng của các vi sinh vật hoặc tác dụng của hợp chất P đối với các vi sinh vật.

Nguồn cacbon bất kỳ có thể được sử dụng, với điều kiện vi sinh vật theo sáng chế có thể sử dụng các nguồn cacbon này. Các ví dụ về nguồn cacbon mà có thể được sử dụng bao gồm: các sacarit như glucoza, sucroza, và fructoza; các rượu như etanol và metanol; các axit hữu cơ, như axit xitric, axit malic, và axit succinic; glyxerol; và mật đường đen.

Hợp chất P có thể là hợp chất hữu cơ bất kỳ, với điều kiện nó là sản phẩm chuyển hóa trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon. Các ví dụ bao gồm DHS, axit glutamic, axit aspartic, và serin.

DHS có thể được tạo ra bằng cách điều hòa mức biểu hiện của shikimat dehydrogenaza (enzym X) mà tạo ra axit shikimic (sản phẩm chuyển hóa M). Trong khi DHS là hữu ích làm chất chống oxy hóa (Patent Mỹ 5,821,266), nó có thể được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tạo ra axit protocatechuic, axit shikimic, hoặc các chất khác bằng cách sử dụng các vi sinh vật.

Axit amin hữu ích; tức là, axit glutamic, có thể được tạo ra bằng cách điều hòa mức biểu hiện của axit amin-N-axetyltransferaza (enzym X) mà tạo ra N-axetylglutamat (sản phẩm chuyển hóa M) hoặc γ -glutamylkinaza (enzym X) mà tạo ra γ -glutamyl phosphat (sản phẩm chuyển hóa M).

Axit amin hữu ích; tức là, axit aspartic, có thể được tạo ra bằng cách điều hòa mức biểu hiện của aspartokinaza (enzym X) mà tạo ra β -aspartyl phosphat (sản phẩm chuyển hóa M) hoặc asparagin synthetaza (enzym X) mà tạo ra asparagin (sản phẩm chuyển hóa M).

Axit amin hữu ích; tức là, serin, có thể được tạo ra bằng cách điều hòa mức biểu hiện của serin hydroxymetyltransferaza (enzym X) mà tạo ra glyxin (sản phẩm chuyển hóa M) hoặc serin transferaza (enzym X) mà tạo ra o-axetylserin (sản phẩm chuyển hóa M).

Về ví dụ cụ thể, chủng thu được từ chủng ATCC13032 tạo ra một cách hiệu quả DHS được mô tả chi tiết. Trình tự hệ gen của chủng ATCC13032 có thể thu được từ cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen (GenBank) (sau đây được viết tắt là "GB") của National Center for Biotechnology Information (sau đây được viết tắt là "NCBI") dưới số truy cập GB BX927147. Đồng thời, trình tự hệ gen mà về cơ bản giống như trình tự nêu trên có thể thu được dưới số truy cập GB NC_003450, ở

bản mô tả này, các vị trí nucleotit và danh pháp di truyền được mô tả với sự tham khảo các số nucleotit và danh pháp di truyền của số truy cập GB BX927147.

Các chủng thu được từ chủng ATCC13032 mà tạo ra DHS là các vi sinh vật có dấu hiệu (aa) đến (dd) được nêu dưới đây.

(aa) trong số các enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp DHS (Hợp chất P) từ nguồn cacbon mà có thể được sử dụng bởi chủng được xác định ở trên, hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được chọn từ đó được gia tăng so với chủng kiểu dại.

(bb) Hiệu suất chuyển hóa DHS thành axit shikimic bị hao hụt hoặc bị giảm bởi sự có mặt của sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã hoặc vùng điều hòa sự dịch mã của gen kiểu dại (gen X) mã hóa protein của shikimat dehydrogenaza (enzym X) mà chuyển hóa DHS thành axit shikimic (sản phẩm chuyển hóa M) hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen. Chủng ATCC13032 bao gồm, dưới dạng gen mã hóa shikimat dehydrogenaza hoạt tính, gen aroE3 (cg1835) (đoạn ADN bao gồm các nucleotit 1.726.078 đến 1.726.908 của sợi bổ trợ), gen aroE1 (cg1283) (đoạn ADN bao gồm các nucleotit 1.182.337 đến 1.183.143 của sợi bổ trợ), và gen qsuD (cg0504) (đoạn ADN bao gồm các nucleotit 446.537 đến 447.388). Sự đột biến được đưa vào trong gen aroE3 mà đóng vai trò chính trong quá trình chuyển hóa DHS thành axit shikimic, sự biểu hiện shikimat dehydrogenaza hoạt tính của gen bị hao hụt hoặc giảm, và dấu hiệu (bb) có thể được truyền như một hệ quả. Ngoài sự đột biến gen aroE3, sự đột biến mà dẫn đến sự hao hụt hoặc giảm mức biểu hiện shikimat dehydrogenaza hoạt tính có thể được đưa vào trong gen qsuD và/hoặc gen aroE1. Như vậy, dấu hiệu (bb) có thể được truyền.

(cc) Sự phiên mã của ADN mã hóa enzym hoạt tính X được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu A mà khác với đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x và trong đó sự phiên mã bị ức chế với sự trợ giúp của protein kìm hãm R.

(dd) Một hoặc nhiều bản sao của gen z mã hóa protein kìm hãm R có mặt, và sự phiên mã gen này được điều chỉnh bằng đoạn khởi đầu vốn có của gen và/hoặc đoạn khởi đầu cảm ứng B mà khác với đoạn khởi đầu vốn có.

Như nêu trên, đối với chất kìm hãm VanR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ bằng cách bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin, chất kìm hãm RhcR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ bằng cách bổ sung

resorxinol hoặc axit 2,4-dihydroxybenzoic, hoặc chất kìm hãm PcaR, sự ức chế của chất này có thể được giảm nhẹ bằng cách bổ sung axit 4-dihydroxybenzoic có thể được sử dụng làm chất kìm hãm R.

Các ví dụ về đoạn khởi đầu A mà bị ức chế bởi chất kìm hãm R ở chủng ATCC13032 bao gồm đoạn khởi đầu vanA, sự phiên mã từ đoạn khởi đầu này bị ức chế bởi chất kìm hãm VanR, đoạn khởi đầu rhcH, sự phiên mã từ đoạn khởi đầu này bị ức chế bởi chất kìm hãm RhcR, và đoạn khởi đầu của gen pcaI, sự phiên mã từ đoạn khởi đầu này bị ức chế bởi chất kìm hãm PcaR.

Các ví dụ về đoạn khởi đầu B mà có thể được sử dụng bao gồm đoạn khởi đầu vanA được cảm ứng bằng cách bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin, đoạn khởi đầu rhcH được cảm ứng bằng cách bổ sung resorxinol hoặc axit 2,4-dihydroxybenzoic, đoạn khởi đầu pcaI được cảm ứng bằng cách bổ sung axit 4-hydroxybenzoic, đoạn khởi đầu nagI được cảm ứng bằng cách bổ sung axit 3-hydroxybenzoic, đoạn khởi đầu benA được cảm ứng bằng cách bổ sung axit benzoic, và gen khởi đầu cg2118 hoặc đoạn khởi đầu ptsS được cảm ứng bằng cách bổ sung fructoza hoặc sucroza.

Vùng khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen aroE3 (gen x) mã hóa protein của shikimat dehydrogenaza (enzym X) có thể được thay thế bằng ADN của đoạn khởi đầu A như được mô tả liên quan đến dấu hiệu (cc), nhằm truyền đồng thời dấu hiệu (bb) và dấu hiệu (cc).

Để truyền dấu hiệu (aa), sự đột biến mà có khả năng thúc đẩy chu trình hình thành DHS từ DAHP hoặc sự đột biến mà gia tăng lượng DAHP được tạo ra có thể được đưa vào theo kỹ thuật thông thường.

DAHP được chuyển hóa thành axit 3-dehydroquinic (sau đây được viết tắt là “DHQ”) nhờ 3-dehydroquinate syntaza, và DHQ tiếp tục được chuyển hóa thành DHS nhờ DHQ dehydrataza. Như vậy, sự đột biến có thể được đưa vào trong vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen aroB (cg1827) mã hóa DHQ synthetaza (sau đây được gọi là “gen aroB”) và/hoặc gen aroD (cg0503) mã hóa DHQ dehydrataza (sau đây được gọi là “gen aroD”), để tăng cường mức biểu hiện của DHQ synthetaza và/hoặc DHQ dehydrataza và gia tăng lượng DHS. Ví dụ, đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen aroB và/hoặc gen aroD có thể được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu với hoạt tính đoạn khởi đầu cao hơn, để gia tăng

lượng DHS.

Theo cách khác, lượng DAHP có thể được gia tăng, để gia tăng lượng DHS. Lượng DAHP có thể được gia tăng bằng cách làm giảm mức ức chế phản hồi của DAHP syntaza nhờ các axit amin thơm, tăng cường mức biểu hiện DAHP syntaza, hoặc gia tăng lượng erythroza 4-phosphat (sau đây được viết tắt là “E4P”) hoặc axit phosphoenolpyruvic (sau đây được viết tắt là “PEP”), làm chất nền DAHP syntaza.

Tryptophan, tyrosin, hoặc phenylalanin thường gây ra sự ức chế phản hồi đối với DAHP syntaza. Vì đã biết rằng sự ức chế phản hồi có thể được giảm nhẹ bằng cách đưa sự đột biến, như sự thay thế axit amin, vào trong DAHP syntaza, sự đột biến này có thể được đưa vào trong gen DAHP syntaza như gen *aroF* (cg1129) (sau đây được gọi là “gen *aroF*”) hoặc gen *aroG* (cg2391) (sau đây được gọi là “gen *aroG*”), để gia tăng lượng DAHP.

Mức biểu hiện DAHP syntaza có thể được tăng cường bằng cách đưa sự đột biến vào trong vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen mã hóa DAHP syntaza. Ví dụ, đoạn khởi đầu vốn có mà thúc đẩy sự phiên mã của gen mã hóa DAHP syntaza có thể được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu, để gia tăng lượng DAHP.

Ví dụ, lượng E4P, là chất nền DAHP syntaza, có thể được gia tăng bằng cách đưa sự đột biến vào trong vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen enzym liên quan đến chu trình pentoza phosphat, như gen *tkt* (cg1774) mã hóa transketolaza (sau đây được gọi là “gen *tkt*”), gen *tal* (cg1776) mã hóa transaldolaza (sau đây được gọi là “gen *cg1776*”), hoặc gen *zwf* (cg1778) mã hóa glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza, để gia tăng mức biểu hiện của gen này.

Lượng PEP, là chất nền DAHP syntaza, có thể được gia tăng bằng cách đưa sự đột biến vào trong vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen *pps* (cg0644) mã hóa PEP synthetaza hoặc gen *pck* (cg3169) mã hóa PEP carboxykinaza, để gia tăng mức biểu hiện của gen này.

Hơn nữa, sự đột biến có thể được đưa vào trong vùng dịch mã hoặc gen điều hòa phiên mã/dịch mã của, ví dụ, gen *pyk* (cg2291) mã hóa pyruvat kinaza, gen *ppc* (cg1787) mã hóa PEP carboxylaza, hoặc gen mã hóa phosphotransferaza liên quan đến sự hấp thu đường như glucoza, (ví dụ, các gen cg2117). Như vậy, sự chuyển hóa PEP có thể bị ức chế, và lượng PEP có thể được gia tăng.

Sự đột biến có thể được đưa vào vào trong một gen duy nhất để truyền dấu hiệu (aa). Để tiếp tục gia tăng lượng DHS được tạo ra, tốt hơn là các sự đột biến được đưa vào trong nhiều gen nêu trên.

Chủng thu được từ chủng ATCC13032 có các dấu hiệu (aa) đến (dd) nêu trên có thể sản sinh DHS từ nguồn cacbon như glucoza. Gen *aroD* mã hóa DHQ dehydrataza tạo ra operon có gen *qsuB* (cg0502) mã hóa DHS dehydrataza mà chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic (sau đây được gọi là “gen *qsuB*”). Nếu mức biểu hiện gen *aroD* được gia tăng nhờ sự thể đoạn khởi đầu để truyền dấu hiệu (aa), do vậy, mức biểu hiện gen *qsuB* cũng được tăng cường, và một phần của DHS được tích tụ được chuyển hóa một cách bất lợi thành axit protocatechuic. Để kìm hãm sự chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic, tốt hơn là sự đột biến được đưa vào trong vùng dịch mã hoặc vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen *qsuB*.

Nếu các vi sinh vật theo sáng chế có dấu hiệu (e) được nêu dưới đây ngoài các dấu hiệu (a) đến (d) nêu trên, hợp chất P trong chu trình sinh tổng hợp từ nguồn cacbon cho sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng có thể được chuyển hóa thành hợp chất Q bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Như vậy, hợp chất Q hữu ích có thể được tạo ra một cách hữu hiệu.

(e) Hiệu suất chuyển hóa hợp chất P thành hợp chất Q được gia tăng hoặc mức biểu hiện gen *y* được điều chỉnh khác với gen kiểu đại bởi vì sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen *y* mã hóa protein của enzym Y, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen *y*.

Về dấu hiệu (e), mức biểu hiện enzym Y thường không đủ ở dạng chủng kiểu đại. Như vậy, sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit được đưa vào trong vùng điều hòa sự dịch mã của gen *y* hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen *y*, để gia tăng mức biểu hiện enzym Y hoặc điều hòa sự phiên mã gen *y* theo cách khác với đoạn khởi đầu kiểu đại. Như vậy, dấu hiệu (e) có thể được truyền. Enzym thứ nhất ở chu trình phân nhánh thường trải qua sự ức chế phản hồi bởi sản phẩm cuối. Do vậy, sự đột biến được đưa vào trong vùng dịch mã của gen *y*, để làm giảm mức ức chế phản hồi và gia tăng hoạt tính của enzym Y. Như vậy, dấu hiệu (e) có thể được truyền.

Tốt hơn là, một phần hoặc toàn bộ vùng khởi đầu mà thúc đẩy gen *y* sự

phiên mã được thay thế bằng ADN của đoạn khởi đầu C, mà khác với đoạn khởi đầu vốn có và đoạn khởi đầu A mà thúc đẩy sự phiên mã gen y. Như vậy, dấu hiệu (e) có thể được truyền.

Đoạn khởi đầu mà khác với đoạn khởi đầu giành cho gen y hoặc đoạn khởi đầu A có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu C. Đồng thời đoạn khởi đầu biểu hiện kết cấu cũng có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu C, việc sử dụng đoạn khởi đầu cảm ứng là được ưu tiên. Bất kỳ đoạn khởi đầu được lấy làm ví dụ làm đoạn khởi đầu B được dùng để truyền dấu hiệu (d) ở trên có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu cảm ứng.

Các ví dụ về đoạn khởi đầu C mà có thể được sử dụng bao gồm đoạn khởi đầu pL thể thực khuẩn λ hoặc đoạn khởi đầu pR, đoạn khởi đầu lac, đoạn khởi đầu gal operon, đoạn khởi đầu trp operon, đoạn khởi đầu araBAD, đoạn khởi đầu vanA được cảm ứng bằng cách bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin, đoạn khởi đầu rhcH được cảm ứng bằng cách bổ sung resorxinol hoặc axit 2,4-dihydroxybenzoic, đoạn khởi đầu pcaI được cảm ứng bằng cách bổ sung axit 4-hydroxybenzoic, đoạn khởi đầu nagI được cảm ứng bằng cách bổ sung axit 3-hydroxybenzoic, đoạn khởi đầu benA được cảm ứng bằng cách bổ sung axit benzoic, và gen khởi đầu cg2118 hoặc đoạn khởi đầu ptsS được cảm ứng bằng cách bổ sung fructoza hoặc sucroza.

Đoạn khởi đầu C được sử dụng để truyền dấu hiệu (e) có thể là giống như đoạn khởi đầu B được sử dụng để truyền dấu hiệu (d). Sự phiên mã của đoạn khởi đầu C có thể được điều hòa nhờ protein mà điều hòa sự phiên mã đoạn khởi đầu B.

Nếu lượng hợp chất P đã tích tụ có thể được giảm trong quy trình sản xuất hợp chất này bởi vì hoạt tính enzym của vi sinh vật theo sáng chế để chuyển hóa hợp chất Q, hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa hợp chất P của vi sinh vật tốt hơn là bị hao hụt hoặc bị giảm nhờ sự gây đột biến hoặc công nghệ ADN tái tổ hợp.

Theo phương pháp sản xuất hợp chất Q sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, sự nuôi cấy được tiến hành trong môi trường chứa nguồn cacbon đồng thời ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A. Như vậy, hợp chất Q là được tạo ra. Trong vi sinh vật theo sáng chế, mức phiên mã của đoạn khởi đầu A mà điều hòa mức biểu hiện enzym X được duy trì ở mức thấp bởi chất kìm hãm R. Như vậy, lượng sản

phẩm chuyển hóa M được tạo ra được điều chỉnh, và hợp chất Q có thể được tạo ra một cách hữu hiệu từ hợp chất P (Fig.7).

Nếu vi sinh vật phát triển chậm bởi vì mức phiên mã thấp của đoạn khởi đầu A mà điều hòa mức biểu hiện enzym X trong quy trình sản xuất theo sáng chế, quy trình sản xuất hợp chất Q tốt hơn là được chia thành hai giai đoạn; tức là, giai đoạn nuôi cấy sớm và giai đoạn nuôi cấy muộn. Cụ thể, môi trường chứa nguồn cacbon có thể được cấy các vi sinh vật, sự phiên mã được ức chế bằng cách bổ sung chất gây cảm ứng hoặc tăng/giảm nhiệt độ nuôi cấy theo các đặc tính của chất kìm hãm R, mức biểu hiện enzym X được gia tăng, và sự nuôi cấy được tiếp tục. Sau đó, sự phiên mã lại bị kìm hãm bởi chất kìm hãm R ở thời điểm thích hợp để kiểm soát mức biểu hiện enzym X. Như vậy, lượng hợp chất Q được tạo ra từ hợp chất P có thể được gia tăng (Fig.8). Nếu đoạn khởi đầu A mà được cảm ứng bằng cách bổ sung chất gây cảm ứng được sử dụng, lượng chất gây cảm ứng được bổ sung được điều chỉnh để làm tiêu hao hết chất gây cảm ứng ở giai đoạn nuôi cấy muộn. Như vậy, sự phiên mã có thể được ức chế lại bởi chất kìm hãm R. Nếu đoạn khởi đầu A mà được cảm ứng bằng cách tăng/giảm nhiệt độ nuôi cấy được sử dụng, nhiệt độ nuôi cấy có thể được đưa trở lại mức ở đó sự phiên mã bị ức chế bởi chất kìm hãm R. Như vậy, sự phiên mã có thể được ức chế lại bởi chất kìm hãm R.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế trong đó sự biểu hiện chất kìm hãm R được định hướng bởi đoạn khởi đầu cảm ứng B, tốt hơn là, quy trình sản xuất hợp chất Q được tách thành hai giai đoạn: tức là, giai đoạn nuôi cấy sớm và giai đoạn nuôi cấy muộn, để tạo ra hợp chất Q. Cụ thể, môi trường chứa nguồn cacbon được cấy các vi sinh vật, các vi sinh vật được cho sinh trưởng, và chất gây cảm ứng được bổ sung hoặc nhiệt độ nuôi cấy được tăng hoặc giảm theo các đặc tính của đoạn khởi đầu cảm ứng B để hoạt hóa đoạn khởi đầu cảm ứng B. Như vậy, lượng chất kìm hãm R được tạo ra được gia tăng, bằng cách đó kìm hãm sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa M và gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra từ hợp chất P (Fig.9).

Nếu hợp chất Q ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi sinh vật theo sáng chế trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là hợp chất Q được tạo ra bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế trong đó sự biểu hiện enzym Y được định vị ở dòng dưới của đoạn khởi đầu cảm ứng C bằng cách chia quy trình sản xuất hợp

chất Q thành hai giai đoạn: tức là, giai đoạn nuôi cấy sớm và giai đoạn nuôi cấy muộn. Cụ thể, môi trường chứa nguồn cacbon được cấy các vi sinh vật, các vi sinh vật được cho sinh trưởng, và chất gây cảm ứng được bổ sung hoặc nhiệt độ nuôi cấy được tăng hoặc giảm theo các đặc tính của đoạn khởi đầu cảm ứng C để hoạt hóa đoạn khởi đầu cảm ứng C và gia tăng lượng enzym Y được tạo ra. Như vậy, lượng hợp chất Q được tạo ra từ hợp chất P có thể được gia tăng (Fig.10). Hơn nữa, sự phiên mã của đoạn khởi đầu cảm ứng C được hoạt hóa ở giai đoạn nuôi cấy muộn để gia tăng lượng enzym Y được tạo ra, và đoạn khởi đầu cảm ứng B cũng được hoạt hóa để gia tăng lượng chất kim hãm R được tạo ra. Như vậy, sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa M có thể được kim hãm, và lượng hợp chất Q được tạo ra từ hợp chất P có thể được gia tăng (Fig.11).

Trong trường hợp này, các đoạn khởi đầu được sử dụng làm đoạn khởi đầu C và đoạn khởi đầu B, sao cho đoạn khởi đầu C và đoạn khởi đầu B có thể được cảm ứng ở cùng một thời điểm. Nếu đoạn khởi đầu C và đoạn khởi đầu B được chọn từ các đoạn khởi đầu nêu trên, sự phiên mã của các đoạn khởi đầu này được điều chỉnh bởi protein điều hòa, đoạn khởi đầu C và đoạn khởi đầu B có thể được cảm ứng ở cùng một thời điểm ngay cả khi chúng khác nhau.

Theo phương pháp sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, như nêu trên, lượng hợp chất Q được tạo ra có thể được tối đa hóa một cách dễ dàng nhờ phương pháp nuôi cấy khác bằng cách sử dụng các vi sinh vật này, theo điều kiện sinh trưởng của các vi sinh vật hoặc ảnh hưởng của hợp chất Q đối với các vi sinh vật.

Bất kỳ hợp chất có thể được tạo ra dưới dạng hợp chất Q mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, với điều kiện hợp chất Q có thể được tạo ra thông qua chu trình được phân nhánh từ hợp chất P trong chu trình sinh tổng hợp hoặc chu trình trao đổi chất trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon thông qua hợp chất P.

Hợp chất P có thể là hợp chất hữu cơ bất kỳ, với điều kiện đây là sản phẩm chuyển hóa trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon. Các ví dụ của nó bao gồm DHS, axit chorismic, axit prephenic, axit 2-oxoisovaleric, axit glutamic, axit aspartic, aspartat β -semialdehyt, homoserin, và serin. Hợp chất Q có thể là hợp

chất hữu cơ bất kỳ, với điều kiện nó có thể được chuyển hóa từ hợp chất P với sự trợ giúp của enzym Y. Các ví dụ của nó bao gồm axit protocatechuic, axit anthranilic, axit 4-hydroxyphenylpyruvic, axit arogenic, axit phenylpyruvic, axit 2-isopropylmalic, valin, γ -glutamyl phosphat, N-axetylglutamat, asparagin, axit 2,3-dihydrodipicolinic, và o-axetylhomoserin.

Nếu hợp chất P là DHS, axit shikimic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của shikimat dehydrogenaza (enzym X), và axit protocatechuic (Hợp chất P) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của DHS dehydrataza (enzym Y). Đồng thời, axit protocatechuic có vai trò làm nguyên liệu khởi đầu cho dược phẩm, sản phẩm nông nghiệp, hoặc hợp chất thơm, nó cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tạo ra axit 2-pyron-4,6-dicarboxylic, mà được trông mong là chất liệu dẻo mới, bằng cách sử dụng vi sinh vật.

Nếu hợp chất P là axit chorismic, axit prephenic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit chorismic mutaza (enzym X), và axit anthranilic (hợp chất P) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit anthranilic synthetaza (enzym Y). Axit anthranilic có vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp tryptophan, là axit amin thơm. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp tryptophan, tryptophan có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit prephenic, axit phenylpyruvic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrataza (enzym X). Nếu vi sinh vật theo sáng chế là chủng *Escherichia coli* K-12, ví dụ, axit 4-hydroxyphenylpyruvic (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrogenaza (enzym Y). Axit 4-hydroxyphenylpyruvic có vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp tyrosin, là axit amin thơm. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp tyrosin từ axit 4-hydroxyphenylpyruvic, do vậy, tyrosin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit prephenic, axit phenylpyruvic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrataza (enzym X). Nếu vi sinh vật theo sáng chế là *Corynebacterium glutamicum*, ví dụ, axit arogenic (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic aminotransferaza (enzym Y). Axit arogenic đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp tyrosin, là axit amin thơm. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp tyrosin từ axit arogenic,

theo đó, tyrosin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit prephenic và vi sinh vật theo sáng chế là chủng *Escherichia coli* K-12, ví dụ, axit 4-hydroxyphenylpyruvic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrogenaza (enzym X). Nếu vi sinh vật theo sáng chế là *Corynebacterium glutamicum*, ví dụ, axit arogenic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrogenaza (enzym X), và axit phenylpyruvic (hợp chất Q) cũng có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit prephenic dehydrataza (enzym Y). Axit phenylpyruvic đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp phenylalanin, là axit amin thơm. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp phenylalanin, theo đó, phenylalanin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, valin (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit amin mạch nhánh aminotransferaza (enzym X), và axit 2-isopropylmalic (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit 2-isopropylmalic synthetaza (enzym Y). axit 2-isopropylmalic đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp loxin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp loxin, theo đó, loxin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, axit 2-isopropylmalic (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit 2-isopropylmalic synthetaza (enzym X), và valin (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit amin mạch nhánh aminotransferaza (enzym Y).

Nếu hợp chất P là axit glutamic, N-axetylglutamat (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của axit amin-N-axetyltransferaza (enzym X), và γ -glutamyl phosphat (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của γ -glutamylkinaza (enzym Y). γ -Glutamyl phosphat đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp prolin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp prolin, theo đó, prolin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit glutamic, γ -glutamyl phosphat (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của γ -glutamylkinaza (enzym X), và N-axetylglutamat (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của axit amin-N-axetyltransferaza (enzym Y). N-axetylglutamat đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp arginin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp arginin, theo đó,

arginin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là axit aspartic, β -aspartyl phosphat (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của aspartokinaza (enzym X), và asparagin (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của asparagin synthetaza (enzym Y).

Nếu hợp chất P là aspartat β -semialdehyt, homoserin (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của homoserin dehydrogenaza (enzym X), và axit 2,3-dihydrodipicolinic (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của dihydroxypyrophosphat synthetaza (enzym Y). Axit 2,3-dihydrodipicolinic đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp lysin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp trong đó lysin được tổng hợp từ axit 2,3-dihydrodipicolinic, theo đó, lysin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là homoserin, homoserin phosphat (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của homoserin kinaza (enzym X), và o-axetylhomoserin (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của homoserin axetyltransferaza (enzym Y). o-Axetylhomoserin đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp methionin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp methionin, theo đó, methionin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là homoserin, o-axetylhomoserin (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của homoserin axetyltransferaza (enzym X), và homoserin phosphat (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của homoserin kinaza (enzym X). Homoserin phosphat đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp threonine hoặc isoleuxin. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp isoleuxin, theo đó, threonin hoặc isoleuxin có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Nếu hợp chất P là serin, glyxin (sản phẩm chuyển hóa M) được tạo ra với sự trợ giúp của serin hydroxymetyltransferaza (enzym X), và o-axetylserin (hợp chất Q) có thể được tạo ra với sự trợ giúp của serin transferaza (enzym Y). o-axetylserin đóng vai trò là nguyên liệu thô để tổng hợp xystein. Nếu vi sinh vật có chu trình sinh tổng hợp xystein, theo đó, xystein có thể được tạo ra một cách trực tiếp.

Gen mã hóa enzym Y liên quan đến sự tạo ra hợp chất Q có thể thu được từ vi sinh vật theo sáng chế hoặc có thể thu được từ sinh vật có nhân điển hình hoặc chưa có nhân điển hình mà khác với vi sinh vật theo sáng chế. Khi tạo ra axit

protocatechuic bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, chủng ATCC13032 có gen DHS dehydrataza, và, do vậy, sản phẩm gen của nó có thể được sử dụng để tạo ra axit protocatechuic. Ngược lại, chủng *Escherichia coli* K-12 không có gen DHS dehydrataza. Điều này cần phải sử dụng gen DHS dehydrataza thu được từ vi sinh vật khác.

Để làm ví dụ cụ thể hơn, chủng có khả năng tạo ra một cách hiệu quả axit protocatechuic, chủng này có thể được tạo ra bằng cách truyền dấu hiệu (ee) cho chủng sản sinh DHS thu được từ chủng ATCC13032, được mô tả chi tiết.

Chủng thu được từ chủng ATCC13032 có khả năng sản sinh axit protocatechuic có dấu hiệu (ee) được mô tả dưới đây, ngoài các dấu hiệu (aa) đến (dd) ở trên.

(ee) Sự phiên mã của gen qsuB được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu C, mà khác với đoạn khởi đầu vốn có thúc đẩy sự phiên mã của gen qsuB (gen y: các nucleotit 444.184 đến 446.040) mã hóa protein của DHS dehydrataza (enzym Y) chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic, và khác với đoạn khởi đầu A.

Chủng thu được từ chủng ATCC13032 có các dấu hiệu (aa) đến (ee) nêu trên có khả năng sản sinh axit protocatechuic từ nguồn cacbon như glucoza; tuy nhiên, chủng này có axit protocatechuic dioxygenaza. Như vậy, axit protocatechuic mà đã được tạo ra có thể bị suy biến, và lượng axit protocatechuic có thể được giảm. Do vậy, tốt hơn là sự đột biến thế đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit được đưa vào trong vùng dịch mã hoặc vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen pcaG (cg2630) mã hóa protein có cấu trúc siêu phân tử alpha protocatechuat 4,5-dioxygenaza (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.511.382 đến 2.511.996) và/hoặc gen pcaH (cg2631) mã hóa protein có cấu trúc siêu phân tử beta protocatechuat 4,5-dioxygenaza (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.512.008 đến 2.512.700), để loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính của enzym để suy biến.

Ngoài ra, chủng có axit p-hydroxybenzoic hydroxylaza mà hydroxyl hóa vị trí 5 của axit protocatechuic và xúc tác sự chuyển hóa của nó thành axit gallic. Như vậy, một phần của axit protocatechuic được tạo ra có thể được chuyển hóa thành axit gallic. Do vậy, tốt hơn là sự đột biến thế đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit được đưa vào trong vùng dịch mã hoặc vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của gen pobB (cg1226) (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.126.301

đến 1.127.488) mã hóa protein axit p-hydroxybenzoic hydroxylaza, để loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính hydroxyl hóa của axit p-hydroxybenzoic hydroxylaza.

Sau đây, các phương pháp nhân dòng ADN và sản xuất các thể đột biến được mô tả với sự tham khảo quá trình sản xuất vi sinh vật theo sáng chế. Nếu vi sinh vật theo sáng chế thuộc *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardiodaceae*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Rhodococcus*, *Kineococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Klebsiella*, hoặc *Escherichia*, như nêu trên, bất kỳ vi sinh vật nào trong số vi sinh vật nêu trên có thể được sử dụng. Phương pháp gây đột biến trong chủng ATCC13032 được mô tả chi tiết. Chủng *Escherichia coli* K-12 được đem đi nhân dòng ADN hoặc gây đột biến làm chủng chủ.

Chủng *Escherichia coli* K-12 và chủng ATCC13032 được nuôi cấy theo kỹ thuật thông thường mà thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Escherichia coli* và *Corynebacterium*. Sau khi nuôi cấy, các ADN nhiễm sắc thể của các vi sinh vật được phân tách và tinh lọc theo kỹ thuật thông thường (ví dụ, phương pháp được mô tả trong Current Protocols in Molecular Biology). Nhờ các kỹ thuật như cắt bằng các enzym giới hạn, phản ứng chuỗi polymerazas (PCR), hoặc sự lai bằng cách sử dụng ADN tổng hợp, các đoạn chứa các ADN mã hóa các đoạn khởi đầu hoặc các enzym chuyển hóa có thể thu được từ các ADN nhiễm sắc thể.

Để làm vật truyền *Escherichia coli* được sử dụng để ghép nối ADN nhằm nhân dòng ADN hoặc gây đột biến, vật truyền plasmit, vật truyền thể thực khuẩn, hoặc vật truyền khác có thể được sử dụng, với điều kiện nó có khả năng sao chép tự trị trong, ví dụ, chủng *Escherichia coli* K-12. Các ví dụ cụ thể về các vật truyền mà có thể được sử dụng bao gồm pUC19 (Gene, 33, 103, 1985), pUC18, và pBR322.

Bất kỳ vi sinh vật *Escherichia coli* có thể được sử dụng làm vật chủ cho vật truyền. Các ví dụ cụ thể bao gồm *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (do Stratagene sản xuất, Strategies, 5, 81, 1992), *Escherichia coli* JM109, và *Escherichia coli* BL21.

Nếu ADN được đưa vào trong vi sinh vật *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardiodaceae*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Rhodococcus*, *Kineococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*,

Klebsiella, hoặc *Escherichia*, vật truyền mà có khả năng sao chép tự trị trong đó được sử dụng. Tốt hơn là, vật truyền hình thoi mà có khả năng sao chép tự trị cả trong vi sinh vật bất kỳ nêu trên lẫn trong chủng *Escherichia coli* K-12 được sử dụng để đưa ADN tái tổ hợp vào trong vi sinh vật chủ.

Các ví dụ về vật truyền hình thoi có khả năng sao chép tự trị trong các vi sinh vật *Corynebacterium* bao gồm pAM330 (JP S58-67699 A (1983)) và pHM1519 (JP S58-77895 A (1983)). Ngoài ra, đoạn ADN mã cho phép plasmit sao chép tự trị trong *Corynebacterium* được lấy ra khỏi vật truyền này và xen vào trong vật truyền hình thoi *Escherichia coli*-*Corynebacterium*. Vật truyền thu được có thể được sử dụng làm vật truyền mà có khả năng sao chép tự trị cả trong *Escherichia coli* và *Corynebacterium*. Ví dụ, vùng sao chép của plasmit pHM1519 của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13058 được xen vào trong vật truyền *Escherichia coli*, pHSG298 (Takara Bio Inc.), làm vùng sao chép mã cho phép plasmit được sao chép trong chủng *Corynebacterium*. Như vậy, vật truyền hình thoi có thể được tạo ra và được bảo toàn. Chủng ATCC13032 và chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13058 có thể thu được từ Biological Resource Center, the National Institute of Technology và Evaluation (sau đây được viết tắt là "NITE").

ADN có thể được đưa vào bằng phương pháp bất kỳ đưa ADN vào trong tế bào chủ. Các ví dụ về phương pháp bao gồm phương pháp liên quan đến việc sử dụng ion canxi (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110, 1972) và phương pháp xung điện (Nucleic Acids Res., 16, 6127, 1988). ADN có thể được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum* nhờ phương pháp của van der Rest et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 541, 1999).

ADN có thể được chiết từ thể biến nạp thu được như vậy, và trình tự nucleotit của ADN theo sáng chế có thể được xác định. Trình tự nucleotit có thể được xác định bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit thông thường như phương pháp dideoxy (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463, 1977), hoặc bằng cách sử dụng máy phân tích trình tự nucleotit như máy phân tích 3730xl DNA (do Applied Biosystems sản xuất).

Trên cơ sở trình tự nucleotit của ADN được xác định ở trên, ADN đích có thể được tổng hợp theo cách hóa học bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp 8905

DNA (do PerSeptive Biosystems, Inc. sản xuất).

Chúng có kiểu hình có ích có thể thu được bằng cách đưa sự đột biến vào thông qua, ví dụ, quá trình xử lý liên quan đến việc sử dụng các chất gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin hoặc etylmetan sulfonat, ứng dụng tia UV hoặc bức xạ, hoặc sự đột biến tự phát. Theo cách khác, chúng có thể thu được bằng cách nhân dòng ADN của vùng mà sự đột biến được đưa vào và đưa sự đột biến vào trong ADN in vitro. Nếu mức đột biến thể đoạn được đưa vào là lớn, plasmit mang ADN được thể bằng vật truyền có khả năng sao chép trong chủng được tạo ra đầu tiên, và plasmit được đưa vào trong chủng này, hoặc plasmit và ADN nhiễm sắc thể được đem đi xử lý bằng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng để đưa sự đột biến thể đoạn vào. Miễn là xuất hiện kiểu hình có lợi, sự đột biến được đưa vào có thể là sự thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của các nucleotit, hoặc có thể là sự đột biến thể đoạn bằng đoạn và lớn. Ngoài ra, sự đột biến của một hoặc nhiều nucleotit là đủ. Sau đây, sự đột biến được đưa vào theo cách nêu trên, trừ phi được chỉ định khác.

Nếu cần điều hòa mức biểu hiện gen khác với đoạn khởi đầu hoặc protein điều hòa phiên mã ở vi sinh vật theo sáng chế, khoảng cách giữa chuỗi liên kết ribosom và codon khởi đầu dịch mã có thể được điều chỉnh, chuỗi nằm gần kề codon khởi đầu dịch mã có thể được cải biến, hoặc trình tự nucleotit ở vùng dịch mã có thể được cải biến. Như vậy, hiệu suất của sự khởi đầu dịch mã gen có thể được điều chỉnh.

Nói chung, ADN được sử dụng để đưa vào sự đột biến thu được như vậy được xen đầu tiên vào trong plasmit có khả năng sao chép trong *Escherichia coli* và sau đó được đưa vào trong chủng chủ, *Corynebacterium glutamicum*, bằng phương pháp đưa ADN vào nêu trên. Nếu plasmit là vật truyền miễn cảm nhiệt độ, thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn được lựa chọn nhờ sự nuôi cấy ở nhiệt độ cao. Nếu plasmit có gen đánh dấu kháng kháng sinh như gen đánh dấu kháng kanamycin, mà có thể được biểu hiện trong chủng chủ, thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn được chọn dựa vào tính kháng kháng sinh. Để thu được thể đột biến trong đó ADN đã được thay thế nhờ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép ở vùng nhiễm sắc thể tương đồng với đoạn ADN, nói chung, phương pháp liên quan đến

việc sử dụng gen levansucraza (gen sacB) của chủng *Bacillus subtilis* 168 được phát triển bởi W. Jäger et al. (J. Bacteriol. 174, 5462, 1992) có thể được sử dụng. Chủng được chọn dựa vào tính kháng sucroza. Theo phương pháp này, *Corynebacterium glutamicum* trong đó gen sacB của chủng *Bacillus subtilis* 168 được biểu hiện có khả năng gây chết trong môi trường chứa sucroza. Như vậy, thể đột biến mà bị mất gen levansucraza nhờ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép có thể được chọn dựa vào tính kháng sucroza.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng chung chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, muối vô cơ, các vitamin khác nhau, và các chất khác. Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm: sacarit như glucoza, sucroza, và fructoza; rượu như etanol và metanol; axit hữu cơ như axit xitric, axit malic, và axit succinic; glyxerol; và mật đường đen. Các ví dụ về nguồn nitơ bao gồm amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni nitrat, và ure, và các chất này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với nhau. Các ví dụ về muối vô cơ bao gồm kali monohydro phosphat, kali dihydro phosphat, và magie sulfat. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng như pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, nước ngô, axit casamin, và các vitamin khác như biotin, có thể được bổ sung vào môi trường.

Sự nuôi cấy được tiến hành dưới các điều kiện hiếu khí như nuôi cấy thông khí và sự nuôi cấy có khuấy hoặc điều kiện nuôi cấy rung lắc. Nhiệt độ nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện vi sinh vật theo sáng chế có thể phát triển. Trong khi nuôi cấy, mức pH không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện vi sinh vật theo sáng chế có thể phát triển. Trong khi nuôi cấy, mức pH có thể được điều chỉnh với sự bổ sung axit hoặc kiềm.

Sau khi kết thúc quá trình nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được đem đi ly tâm hoặc được xử lý bằng các quá trình khác, nếu cần, để loại bỏ các thành phần không hòa tan như vi khuẩn, khỏi dung dịch nuôi cấy. Sau đó, dung dịch nuôi cấy được đem đi, ví dụ, chiết bằng dung môi hữu cơ như etyl axetat, phương pháp bao gồm việc sử dụng than hoạt tính, phương pháp bao gồm việc sử dụng nhựa trao đổi ion, kết tủa nhờ sự kết tinh hoặc sự kết tủa bằng muối, hoặc pha loãng. Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách riêng rẽ hoặc kết hợp với nhau. Như vậy, có thể thu được hợp chất hữu cơ hữu ích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sự tạo ra vi sinh vật theo sáng chế, là chủng ATCC13032 sản sinh một cách hiệu quả DHS làm hợp chất P, và phương pháp sản xuất DHS bằng cách sử dụng vi sinh vật này được mô tả chi tiết hơn với sự tham khảo các ví dụ. Ngoài ra, sự tạo ra vi sinh vật theo sáng chế, là chủng ATCC13032 sản sinh một cách hiệu quả axit protocatechuic làm hợp chất Q, và phương pháp sản xuất axit protocatechuic bằng cách sử dụng vi sinh vật này được mô tả chi tiết hơn với sự tham khảo các ví dụ.

Ví dụ 1: So sánh khả năng sản sinh DHS giữa chủng Pben-vanR và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng Pben-vanR, mà đã mất khả năng chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic do sự đột biến khuyết đoạn trong khung của gen qsuB và trong đó mức biểu hiện gen aroE3 bị ức chế bởi chất kìm hãm VanR được mã hóa bởi gen vanR được định vị ở dòng dưới của đoạn khởi đầu benA (tức là, Ví dụ tham khảo 11), và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD, mà đã mất khả năng chuyển hóa DHS thành axit shikimic và khả năng chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic do sự đột biến khuyết đoạn trong khung của gen qsuB, gen qsuD, và gen aroE3 (tức là, Ví dụ tham khảo 10), được nuôi cấy trong bình lên men có dung tích 3 lít, và khả năng sản sinh DHS được thử nghiệm. Lượng DHS được tạo ra bởi chủng này được cải thiện so với kiểu đại chủng bởi vì sự phiên mã của 4 kiểu gen (tức là, các gen aroF, aroG, aroB, và aroD) liên quan đến sự tổng hợp DHS từ DAHP được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu Tu.

Về môi trường được sử dụng để nuôi cấy sơ bộ và sự nuôi cấy sơ bộ các chủng này, môi trường CGXII (20g/L amoni sulfat, 5g/L ure, 1g/L kali dihydro phosphat, 1g/L dikali hydro phosphat, 0,25g/L magie sulfat heptahydrat, 10mg/L canxi clorua, 10mg/L sắt sulfat heptahydrat, 10mg/L mangan sulfat pentahydrat, 1mg/L kẽm sulfat heptahydrat, 0,2mg/L đồng sulfat, 0,02mg/L niken clorua hexahydrat, 0,2mg/L biotin, 20g/L glucoza, và 30mg/L axit protocatechuic, độ pH = 7,0) được sử dụng. 1% dung dịch nuôi cấy sơ bộ của các chủng được cấy vào dung dịch tiền nuôi cấy, và sau đó quá trình nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau khi dung dịch tiền nuôi cấy được pha loãng bằng môi trường CGXII để điều chỉnh mức hấp thụ ở 600nm đến 3,0, 1% dung dịch này được cấy có chọn lọc vào trong môi trường cho quá trình nuôi cấy chính (0,9L)

trong bình lên men có dung tích 3 lít (BMS-03NP2, do ABLE Corporation sản xuất). Về môi trường cho quá trình nuôi cấy chính, môi trường CGCF là môi trường CGXII chứa 2,1g/L axit xitric khan và 1,0g/L sắt sulfat $7H_2O$, được sử dụng. Sau đây, các thử nghiệm về sự sản xuất DHS và axit protocatechuic được thực hiện theo cách nêu trên, trừ phi được chỉ định khác.

Vì chủng $NSH\Delta aroE3\Delta qsuB\Delta qsuD$ phát triển rất kém trong môi trường CGXII và môi trường CGCF, 0,5g/L tryptophan, 0,4g/L phenylalanin, 0,45g/L tyrosin, 17mg/L axit shikimic, 45mg/L vitamin K2, và 14mg/L axit p-aminobenzoic được bổ sung vào các môi trường này, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong đó. Sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, dung dịch nuôi cấy được lấy mẫu ở thời gian thích hợp, được pha loãng 1000 lần bằng dung dịch nước axetonitril 5%, và sau đó được phân tích bằng cách sắc kí lỏng hiệu năng cao (LCT Premier XE, do Waters sản xuất) dưới các điều kiện phân tách được thể hiện ở bảng 1. Sau đó, tỷ lệ của vùng đỉnh DHS so với dung dịch nước DHS với nồng độ đã biết (DHS bán tại Sigma) được xác định. Sau đây, quantification of DHS was carried out theo cách nêu trên.

Về chủng $Pben\text{-}vanR$, axit benzoic (nồng độ cuối: 5mM) được bổ sung khi quá trình nuôi cấy chính được bắt đầu, sự bổ sung glucoza ở tốc độ 4,0g/giờ được bắt đầu 38 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong 48 giờ nữa. Về chủng $NSH\Delta aroE3\Delta qsuB\Delta qsuD$, sự bổ sung glucoza ở tốc độ 6,0g/giờ được khởi đầu 45,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong 16,5 giờ tiếp nữa. Các lượng DHS được tạo ra bởi chủng $Pben\text{-}vanR$ và chủng $NSH\Delta aroE3\Delta qsuB\Delta qsuD$ đạt mức tối đa 86 giờ và 62 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và lượng DHS lớn nhất được tạo ra bởi các chủng này là 15,4g/L và 7,7g/L. Các kết quả này cho thấy rằng, ngay cả khi chủng $Pben\text{-}vanR$ trong đó mức biểu hiện gen $aroE$ có thể được điều chỉnh nhờ chất kìm hãm $VanR$ được nuôi cấy trong môi trường không chứa axit amin thơm, chủng này thể hiện khả năng sản sinh DHS tốt hơn so với hiệu suất thu được bởi chủng $NSH\Delta aroE3\Delta qsuB\Delta qsuD$ mà đã được nuôi cấy trong môi trường chứa axit amin thơm và tương tự.

[Bảng 1]

Bảng 1: Các điều kiện phân tích HPLC cho LCT Premier XE

Cột phân tách HPLC	Acquity UPLC HSS Tc (i.d.: 2,1 mm; chiều dài: 50mm, Waters)
Nhiệt độ cột	40°C
Tốc độ dòng dung môi	0,4 ml/phút
Pha động A	Nước
Pha động B	Axetonitril
Các điều kiện gradien	0 phút (bắt đầu) 2% Pha động B
	0,75 phút 5% Pha động B
	1,75 phút 30% Pha động B
	1,76 phút 5% Pha động B
	2,50 phút 5% Pha động B

Ví dụ 2: Sản xuất axit protocatechuic bằng cách sử dụng chủng NSHΔaroE3 và chủng NSHΔaroE3_vanE3

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng NSHΔaroE3 có sự đột biến khuyết đoạn trong khung ở gen aroE3 (xem Ví dụ tham khảo 7) và chủng NSHΔaroE3_vanE3 được cải biến trong đó mức biểu hiện gen aroE3 được điều chỉnh bởi chất kìm hãm VanR (xem Ví dụ tham khảo 8) được nuôi cấy trong bình lên men có dung tích 3 lít, và các lượng axit protocatechuic được tạo ra được so sánh.

Dung dịch nuôi cấy thu được từ quá trình nuôi cấy các chủng này trong môi trường CGXII được pha loãng bằng môi trường CGXII để điều chỉnh mức hấp thu ở 600nm đến 3,0, và 1% môi trường được cấy có chọn lọc vào trong môi trường CGCF (0,9L) trong bình lên men có dung tích 3 lít. Bởi vì sự đột biến khuyết đoạn gen aroE3, chủng NSHΔaroE3 phát triển rất kém trong môi trường CGXII và môi trường CGCF. Như vậy, 50mg/L tryptophan, 50mg/L phenylalanin, 50mg/L tyrosin,

và 17mg/L axit shikimic được bổ sung vào các môi trường này, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong đó. Sự bổ sung glucoza ở tốc độ 2,0g/giờ được bắt đầu 24 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong 62,5 giờ nữa. Sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, dung dịch nuôi cấy được lấy mẫu ở thời gian thích hợp, được pha loãng 1000 lần bằng dung dịch nước axetonitril 5%, và sau đó được phân tích bằng cách sắc kí lỏng hiệu năng cao (LCT Premier XE, do Waters sản xuất) dưới các điều kiện phân tách được thể hiện ở bảng 1. Sau đó, tỷ lệ của vùng đỉnh axit protocatechuic so với dung dịch nước axit protocatechuic với nồng độ đã biết (axit protocatechuic được bán tại Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) được xác định. Sau đây, sự định lượng axit protocatechuic được thực hiện theo cách nêu trên. Các kết quả cho thấy rằng các lượng axit protocatechuic được tạo ra bởi chủng NSH Δ aroE3 và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 đạt mức tối đa 48 giờ và 62,5 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và lượng axit protocatechuic lớn nhất được tạo ra bởi các chủng này là 0,5g/L và 16,6g/L. Nếu chủng trong đó mức biểu hiện gen aroE được điều chỉnh bằng chất kìm hãm VanR được nuôi cấy trong môi trường không chứa axit amin thơm hoặc axit shikimic, theo đó, chủng này được phát hiện sản sinh axit protocatechuic với lượng gấp khoảng 33 lần so với lượng axit protocatechuic được tạo ra chủng NSH Δ aroE3, mà được nuôi cấy trong môi trường chứa axit amin thơm và axit shikimic.

Ví dụ 3: Sản xuất axit protocatechuic bằng cách sử dụng chủng NSH Δ aroE3_vanE3, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB, và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB-vanR

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 (xem Ví dụ tham khảo 8), chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB mà đã được cải biến để cảm ứng sự biểu hiện gen qsuB bằng cách bổ sung axit benzoic (xem Ví dụ tham khảo 12), và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB-vanR mà đã được cải biến để cảm ứng sự biểu hiện gen qsuB và gen vanR bằng cách bổ sung axit benzoic (xem Ví dụ tham khảo 13) được nuôi cấy trong bình lên men có dung tích 3 lít, và các lượng axit protocatechuic được tạo ra được so sánh. Đối với chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB, axit benzoic (nồng độ cuối: 5mM) được bổ sung 14,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính để cảm ứng sự biểu hiện gen qsuB. Đối với chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB-vanR, axit

benzoic (nồng độ cuối: 5mM) được bổ sung 15,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính để cảm ứng sự biểu hiện gen *qsuB* và gen *vanR*. Đối với chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB*, chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR*, và chủng *NSHΔaroE3_vanE3*, sự bổ sung glucoza ở tốc độ 3,5g/giờ lần lượt được bắt đầu 14,5 giờ, 15,5 giờ, và 18,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được kết thúc 62 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính. Các kết quả cho thấy rằng các lượng axit protocatechuic được tạo ra bởi chủng *NSHΔaroE3_vanE3*, chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB*, và chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR* đạt mức tối đa ở 43,8 giờ, 43,8 giờ, và 38,5 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và lượng axit protocatechuic lớn nhất được tạo ra bởi các chủng này là 8,5g/L, 8,6g/L, và 15,2g/L. Kết quả là, chủng trong đó mức biểu hiện gen *aroE3* được điều chỉnh bởi chất kim hãm *VanR* được phát hiện là có khả năng tích tụ lượng axit protocatechuic đáng kể. Ngoài ra, khả năng sản sinh axit protocatechuic được nhận thấy là được cải thiện bằng cách kim hãm mức biểu hiện gen *aroE3* nhờ gia tăng lượng chất kim hãm *VanR*.

Ví dụ 4: Sản xuất axit protocatechuic bằng cách chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR* và chủng tkt

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng

NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR (Ví dụ tham khảo 13) và chủng tkt được cải biến nhờ gia tăng mức biểu hiện transketolaza (Ví dụ tham khảo 14) được nuôi cấy trong bình lên men có dung tích 3 lít, và các lượng axit protocatechuic được tạo ra được so sánh. Đối với cả hai chủng, axit benzoic (nồng độ cuối: 5mM) được bổ sung ở 17 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, sự bổ sung glucoza với tốc độ 4,5g/giờ được bắt đầu 24 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được kết thúc ở 64 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Các kết quả cho thấy rằng các lượng axit protocatechuic được tạo ra bởi chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR* và chủng tkt đạt mức tối đa ở 40 giờ và 45 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và lượng axit protocatechuic lớn nhất được tạo ra bởi các chủng này là 14,8g/L và 20,0g/L. Kết quả là, hiệu suất axit protocatechuic được nhận thấy là được cải thiện nhờ gia tăng sự biểu hiện transketolaza, ngoài sự điều hòa mức biểu hiện gen *aroE* bởi chất kim hãm *VanR*.

Ví dụ 5: Sản xuất axit protocatechuic bằng cách sử dụng hệ điều hòa chất kim hãm RhoR

Trong các thử nghiệm sản xuất được tiến hành ở các ví dụ nêu trên, mức biểu hiện gen *aroE3* được điều chỉnh bởi chất kim hãm VanR. Trong ví dụ này, các sự chênh lệch về hiệu suất axit protocatechuic được xem xét dựa vào sự cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu *nagI* theo cách được mô tả dưới đây, bằng cách sử dụng chủng *Pnag-qsuB-rhoR* (Ví dụ tham khảo 17) trong đó mức biểu hiện gen *aroE3* được điều chỉnh bởi chất kim hãm RhoR thay cho chất kim hãm VanR và sự biểu hiện gen *qsuB* và gen *rhoR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *nagI*. Nếu sự phiên mã đoạn khởi đầu *nagI* của chủng *Pnag-qsuB-rhoR* được tiến hành, axit 3-hydroxybenzoic được bổ sung đến nồng độ 5mM ở thời điểm 16,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, sự bổ sung glucoza ở tốc độ 4,9g/giờ được bắt đầu 20,5 giờ sau khi bắt đầu quá trình nuôi cấy chính, và quá trình nuôi cấy được kết thúc ở 62,5 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. nếu sự phiên mã đoạn khởi đầu *nagI* của chủng *Pnag-qsuB-rhoR* không được thực hiện, axit 3-hydroxybenzoic không được bổ sung, và quá trình nuôi cấy được kết thúc ở thời điểm 62,5 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Các kết quả cho thấy rằng các lượng axit protocatechuic được tạo ra bởi chủng *Pnag-qsuB-rhoR* trong đó sự phiên mã đoạn khởi đầu *nagI* đã được tiến hành và chủng *Pnag-qsuB-rhoR* trong đó sự phiên mã đoạn khởi đầu *nagI* không được thực hiện đạt mức tối đa ở 47,5 giờ và 43,5 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, và lượng axit protocatechuic lớn nhất được tạo ra bởi các chủng này là 11,2g/L và 8,4g/L. Các kết quả cho thấy rằng lượng axit protocatechuic đáng kể được tạo ra khi sự biểu hiện gen *aroE3* và *qsuB* được điều chỉnh bởi chất kim hãm RhoR. Ngoài ra, hiệu suất axit protocatechuic được nhận thấy là được nâng cao nhờ gia tăng lượng chất kim hãm RhoR ở giai đoạn nuôi cấy muộn.

Ví dụ tham khảo 1: Tạo ra vật truyền hình thoi pHCG298 *E. coli*-*Corynebacterium*

Chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13058 mang plasmit pHM1519 thu được từ NITE và plasmit pHM1519 được tách theo kỹ thuật thông thường. Sau đó, hai loại ADN (các SEQ ID NO: 1 và 2) được tổng hợp để thêm các vị trí enzym giới hạn BglII và NcoI vào vật truyền pHSG298 *E. coli* (do Takara Bio Inc. sản xuất) mang gen kháng kanamycin có chức năng trong chủng ATCC13032. Các ADN này được chèn vào vị trí ở giữa vị trí KpnI và vị trí PstI của pHSG298, để tạo

ra plasmit pHSG298BN. Sau đó, đoạn BglII có kích cỡ khoảng 3,1kb chứa vùng sao chép plasmit được cắt từ plasmit pHM1519 nhờ sự cắt bằng BglII, và đoạn được cắt được chèn vào trong vị trí BglII của pHSG298BN, để tạo ra plasmit pHCG100. Sau khi pHCG100 được cắt bằng các enzym giới hạn BglII và NcoI, các đầu được cắt bằng các enzym giới hạn này được làm bằng đầu bằng cách sử dụng bộ Blunting High Kit (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất). Sau đó, đoạn BglII (được làm bằng đầu)-NcoI (được làm bằng đầu) có kích cỡ khoảng 1,9kb thu được từ pHCG100 được tinh lọc, và đoạn này được chèn vào vị trí StuI của pHSG298, sao cho vật truyền hình thoi pHCG298 *E. coli-Corynebacterium* được hình thành.

Ví dụ tham khảo 2: Tạo ra plasmit pHKPsacB1 để biểu hiện chủ yếu levansucraza

Plasmit pHKPsacB1 biểu hiện chủ yếu gen levansucraza được sử dụng khi kết hợp đoạn ADN đích vào vùng nhiễm sắc thể cụ thể của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium* nhờ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép được tạo thành theo cách được mô tả dưới đây.

1. Nhân dòng gen levansucraza

Để chọn chủng trong đó đoạn ADN đích đã được kết hợp vào trong vùng nhiễm sắc thể cụ thể nhờ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép, gen sacB của chủng *Bacillus subtilis* 168 mã hóa levansucraza trở nên độc đối với tế bào chủ được sử dụng dưới dạng gen đánh dấu chọn lọc. Chủng *Bacillus subtilis* 168 thu được dưới dạng chủng IAM2118 từ Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical và Chemical Research. Ngoài ra, thông tin trình tự hệ gen của chủng *Bacillus subtilis* 168 (số truy cập GB: NC_000964) thu được từ NCBI nhờ mạng internet. ADN nhiễm sắc thể của chủng *Bacillus subtilis* 168 được tinh lọc bằng kit chiết tách ADN nhiễm sắc thể (do RBC Bioscience sản xuất). PCR được tiến hành bằng cách sử dụng 100ng ADN nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu và hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 3 và 4) để thu đoạn ADN được khuếch đại chứa gen sacB. Sau đó, gốc A được bổ sung vào đầu 3' của đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng Taq ADN polymeraza. Đoạn ADN được khuếch đại được đem đi điện di gel, thu hồi, tinh chế, và sau đó kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T. Như vậy, plasmit pTBSACB1 mang gen sacB được tạo ra.

2. Tạo ra plasmit pHKPsacB1

Sau 8 ADN tổng hợp được thể hiện trong các SEQ ID NO: 5 đến 12 được

tổng hợp, các ADN tổng hợp thu được được kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T. Như vậy, plasmit pTRKD2 biểu hiện chủ yếu gen *sacB* được tạo ra. Sau đó, đoạn gen *sacB* trên plasmit pTBSACB1 thu được ở bước 1. nêu trên được cắt bằng các enzym giới hạn HindIII và KpnI, và các enzym giới hạn KpnI và XbaI, và thu được đoạn HindIII-KpnI có kích cỡ 1,0-kb và đoạn KpnI-XbaI có kích cỡ 0,4-kb thu được từ các gen *sacB*. Hai đoạn ADN này được chèn vào vị trí nằm giữa vị trí SphI và vị trí XbaI của vật truyền nhân dòng *E. coli* pHSG298 (Takara Bio., Co. Ltd.) cùng với đoạn HindIII-SphI có kích cỡ 0,2-kb thu được từ pTRKD2 thu được ở trên. Như vậy, plasmit pHKPsacB1 để biểu hiện chủ yếu gen *sacB* được tạo ra. Nếu plasmit pHKPsacB1 vận chuyển ADN mà có độ tương đồng cao với ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium*, kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng được tiến hành giữa ADN nhiễm sắc thể và plasmit, và toàn bộ plasmit được kết hợp vào trong nhiễm sắc thể. Như vậy, chủng thu được thể hiện các kiểu hình tính kanamycin và kiểu hình miễn cảm sucroza. Sau đó, đoạn ADN thu được từ plasmit được lấy ra khỏi nhiễm sắc thể dựa vào kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép. Kết quả là, chủng thể hiện các kiểu hình nhạy kanamycin và kháng sucroza.

Ví dụ tham khảo 3: Tạo ra chủng HT23 bằng cách làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn của chủng ATCC13032

1. Tạo ra plasmit làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng HT23 được tạo ra từ chủng ATCC13032 nhờ sự làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn. Chủng ATCC13032 thu được là chủng NBRC12168 từ NITE. Số nucleotit được thể hiện trong các ví dụ dưới đây là số nucleotit của trình tự hệ gen của chủng ATCC13032, và thông tin trình tự hệ gen thu được dưới số truy cập NC_006958 từ cơ sở dữ liệu NCBI GB nhờ mạng internet. Vi khuẩn thuộc giống *Corynebacterium* bao gồm chủng ATCC13032 được nuôi cấy trong môi trường CGYE (20g/L amoni sulfat, 5g/L ure, 1g/L KH_2PO_4 , 1g/L K_2HPO_4 , 0,25g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L dịch chiết nấm men, 10mg/L CaCl_2 , 10mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg/L CuSO_4 , 0,02mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg/L biotin, và 20g/L glucoza, độ pH = 7), trừ phi được chỉ định khác.

Gen *cglIM* (cg1996) mã hóa enzym cải biến ADN của chủng ATCC13032

(số nucleotit: 1.879.784 đến 1.880.875) và gen *cglIR* (cg1997) (số nucleotit: 1.880.884 đến 1.881.960) và gen *cglIIR* (cg1998) (số nucleotit: 1.881.962 đến 1.883.860) mã hóa hai enzym giới hạn có mặt trên hệ gen. Để loại bỏ sự biểu hiện của 3 gen này, một phần của ADN nhiễm sắc thể của chủng (số nucleotit: 1.879.784 đến 1.883.860) được làm đứt gãy theo cách được mô tả dưới đây.

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen cải biến ADN/enzym giới hạn (số nucleotit: 1.878.625 đến 1.879.745), hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 13 và 14) được tổng hợp. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được chuẩn bị ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5'. Sau khi gốc A được bổ sung vào đầu 3' của đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng Taq ADN polymeraza, đoạn ADN được khuếch đại được tinh lọc bằng cách điện di gel, và phần thu được được kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T. Như vậy, plasmit pTUSR1F mang vùng cạnh sườn 5' được tạo ra. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen cải biến ADN/enzym giới hạn (số nucleotit: 1.883.891 đến 1.885.298), sau đó, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 15 và 16) được tổng hợp. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được chuẩn bị ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 3'. Sau khi gốc A được bổ sung đến đầu 3' của đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng Taq ADN polymeraza, đoạn ADN được khuếch đại được tinh lọc bằng cách điện di gel, và đoạn thu được được kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T. Như vậy, plasmit pTDSR1R mang vùng cạnh sườn 3' được tạo ra. Do đó, đoạn BamHI-XhoI có kích cỡ khoảng 1,1kb chứa vùng cạnh sườn 5' được tạo ra từ plasmit pTUSR1F. Ngoài ra, đoạn XbaI-XhoI có kích cỡ khoảng 1,4kb chứa vùng cạnh sườn 3' được tạo ra từ plasmit pTUSR1R. Hơn nữa, đoạn BamHI-SphI có kích cỡ khoảng 1,6kb chứa vùng biểu hiện chủ yếu gen *sacB* được tạo ra từ plasmit pHKPsacB1 (Ví dụ tham khảo 2-2). Ba đoạn này được chèn vào vị trí nằm giữa vị trí BamHI và vị trí XbaI của vật truyền nhân dòng *E. coli* pHSG298. Như vậy, plasmit pHKSD0977-9 để làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn được tạo ra.

2. Tạo ra thể đột biến chủng nhờ sự làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKSD0977-9 được đưa vào trong chủng ATCC13032, và chủng SCR được chọn

trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng SCR được phân tích bằng PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 13 và 16) và các đoạn mồi nhận dạng gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và đạt được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng SCR được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKSD0977-9 đã được đưa vào trong vùng của gen cải biến ADN/enzym giới hạn.

Chủng SCR được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB (10g/L trypton, 5g/L dịch chiết nấm men, và 10g/L natri clorua) trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được tiến hành trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng HT23. Thông qua quá trình PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 13 và 14), chủng HT23 được phát hiện là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen cải biến ADN/enzym giới hạn, như mong muốn.

Ví dụ tham khảo 4: Tạo ra thể đột biến chủng bằng cách làm đứt gãy gen *pcaH·pcaG*

Theo cách được mô tả dưới đây, chủng DRHG khuyết một phần của ADN nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.511.382 đến 2.512.700) được tạo ra từ chủng HT23 được tạo ra ở ví dụ tham khảo 3, để làm đứt gãy gen *pcaH·pcaG* mã hóa protocatechuat 4,5-dioxygenaza.

1. Tạo ra plasmit để làm đứt gãy gen *pcaH·pcaG*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *pcaH·pcaG* của chủng HT23 (số nucleotit: 2.512.743 đến 2.513.990), hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 17 và 18) được tổng hợp. Quá trình PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể (100ng) của chủng HT23 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5'. Sau khi gốc A được bổ sung đến đầu 3' của đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng Taq ADN polymeraza, thì đoạn ADN được khuếch đại được tinh lọc bằng cách điện di gel, và đoạn thu được được kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T (do Novagen sản xuất). Như vậy, plasmit pTPCAUSR1F mang vùng cạnh sườn 5' được tạo ra. Tương tự, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 19 và 20) để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của chủng HT23 (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.510.015 đến 2.511.377) được tổng hợp. Quá trình PCR

được tiến hành có sử dụng ADN nhiễm sắc thể được tinh chế của chủng HT23 làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 3'. Sau khi gốc A được bổ sung đến đầu 3' của đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng Taq ADN polymeraza, đoạn ADN được khuếch đại được tinh lọc bằng cách điện di gel, và đoạn thu được được kết hợp vào trong vật truyền pT7Blue-T. Như vậy, plasmit pTPCADSR1R mang vùng cạnh sườn 3' được tạo ra. Tiếp đó, đoạn EcoRI-MluI có kích cỡ khoảng 1,3kb chứa vùng cạnh sườn 5' được tạo ra từ pTPCAUSR1F bằng cách cắt bằng các enzym giới hạn. Ngoài ra, đoạn MluI-BamHI có kích cỡ khoảng 1,4 kb chứa vùng cạnh sườn 3' được tạo ra từ pTPCADSR1R bằng cách cắt bằng các enzym giới hạn. Hơn nữa, đoạn BamHI-SphI có kích cỡ khoảng 1,6kb chứa đoạn gen sacB được tạo ra từ plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2) bằng cách cắt bằng các enzym giới hạn. Sau đó, 3 đoạn này được chèn vào vào trong vùng nằm giữa vị trí EcoRI và vị trí SphI của vật truyền nhân dòng E. coli pHSG298. Như vậy, plasmit pHKSDPHG1 làm đứt gãy gen được tạo ra.

2. Tạo ra chủng DRHG

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKSDPHG1 được kết hợp vào trong chủng HT23, và chủng SCRHG được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng SCRHG được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 21 và 22) và các đoạn môi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và đạt được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng SCRHG được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKSDPHG1 đã được đưa vào trong đoạn gen *pcaH-pcaG*.

Chủng SCRHG được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng DRHG. Thông qua kỹ thuật PCR sử dụng một bộ gồm các đoạn môi (các SEQ ID NO: 23 và 24), chủng DRHG được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen *pcaH-pcaG*, như mong muốn. Một cách khác, kỹ thuật PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 25 và 26), và không thu được đoạn

ADN được khuếch đại. Như vậy, chủng DRHG cũng được nhận thấy là khuyết gen sacB.

Ví dụ tham khảo 5: Tạo ra thể đột biến chủng bằng cách làm đứt gãy gen pobB

Để làm đứt gãy gen pobB mã hóa p-hydroxybenzoat hydroxygenaza và ức chế sự sản xuất axit gallic từ axit protocatechuic, chủng DRHG145 khuyết một phần ADN nhiễm sắc thể (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.126.301 đến 1.127.488b) được tạo ra từ chủng DRHG được tạo ra ở ví dụ tham khảo 4 theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra plasmit để làm đứt gãy gen pobB

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen pobB (số nucleotit: 1.125.101 đến 1.126.300) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn SphI và XbaI đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 27 và 28) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen pobB. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen pobB (số nucleotit: 1.127.505 đến 1.128.687) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn XbaI và SalI vào cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, sau đó, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 29 và 30) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen pobB. Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' được cắt bằng các enzym giới hạn SphI và XbaI, đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' được cắt bằng các enzym giới hạn XbaI và SalI, và các đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí nằm giữa vị trí SphI và vị trí SalI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB Δ pobB.

2. Tạo ra thể đột biến chủng bằng cách làm đứt gãy gen pobB

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB Δ pobB được kết hợp vào trong chủng DRHG, và chủng DRHG_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng DRHG_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 27 và 30) và các đoạn mồi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và thu được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng DRHG_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được

từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB Δ pobB đã được đưa vào trong đoạn gen pobB.

Chủng DRHG_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng DRHG145. Thông qua kỹ thuật PCR sử dụng bộ đoạn môi (các SEQ ID NO: 27 và 30), chủng DRHG145 được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen pobB, như mong muốn.

Ví dụ tham khảo 6: Tạo ra chủng NSH trong đó sự phiên mã của các gen aroF, aroG, aroB, và aroD được định hướng bởi đoạn khởi đầu Tu

Trong 4 quy trình được nêu sau đây, sự phiên mã của 4 kiểu gen liên quan đến sự tổng hợp DHS từ DAHP (tức là, các gen aroF, aroG, aroB, và aroD) được định hướng bởi đoạn khởi đầu Tu của chủng ATCC13032 (số nucleotit: 526.013 đến 526.374). Như vậy, tạo ra chủng NSH có hiệu suất DHS được nâng cao.

1. Tạo ra chủng NUA bằng cách thay thế các đoạn khởi đầu của gen qsuB, gen aroD, và gen qsuD, bằng Tu đoạn khởi đầu

Gen qsuB, gen aroD, và gen qsuD của chủng ATCC13032 tạo thành operon (sau đây được gọi là aro operon), và các mức biểu hiện của chúng được điều hòa bởi cùng một chất điều hòa (tức là, sản phẩm gen cg0500). Trên cơ sở chủng DRHG145 được tạo ra ở ví dụ tham khảo 5, chủng NUA được tạo ra bằng cách thay thế vùng khởi đầu của aro operon (số nucleotit: 441.597 đến 442.756) bằng Tu đoạn khởi đầu có hoạt tính phiên mã cao theo cách được mô tả dưới đây.

(1) Tạo ra plasmit để thay thế đoạn khởi đầu aro của gen cg0500 bằng đoạn khởi đầu Tu

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen cg0500 (số nucleotit: 440.437 đến 441.596) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn SphI và RsrII vào cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 31 và 32) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của đoạn khởi đầu aro (số nucleotit: 442.757 đến 443.916) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn PfoI và SbfI vào cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 33 và 34) được tổng hợp. Để khuếch đại đoạn khởi đầu Tu và bổ sung các vị trí enzym giới

hạn RsrII và PfoI vào cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 35 và 36) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và 3 bộ đoạn môi, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen cg0500, vùng cạnh sườn 3' của đoạn khởi đầu aro operon, và đoạn khởi đầu Tu.

Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen cg0500 được cắt bằng các enzym giới hạn SphI và RsrII, đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của đoạn khởi đầu aro operon được cắt bằng các enzym giới hạn PfoI và SbfI, và đoạn ADN được khuếch đại của đoạn khởi đầu Tu được cắt bằng các enzym giới hạn RsrII và PfoI. Sau đó, 3 kiểu của các đoạn ADN thu được nhờ xử lý bằng enzym giới hạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_aro-Ntu.

(2) Tạo ra thể tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng plasmit pHKPsacB_aro-Ntu

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, pHKPsacB_Ntu-aro được kết hợp vào trong chủng DRHG145, và chủng DRHG145_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng DRHG145_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 31 và 34) và các đoạn môi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng DRHG145_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Ntu-aro đã được đưa vào trong đoạn gen cg0500.

Chủng DRHG145_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NUA. Đoạn môi được thể hiện trong SEQ ID NO: 37 được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng bộ đoạn môi (các SEQ ID NO: 37 và 36) và bộ đoạn môi (các SEQ ID NO: 31 và 34), và chủng DRHG145 được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó gen cg0500 và đoạn khởi đầu aro đã được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu,

như mong muốn.

2. Tạo ra NDSGU chủng bằng cách thay thế gen khởi đầu aroG bằng đoạn khởi đầu Tu

Vùng khởi đầu của gen aroG mã hóa DAHP syntaza được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu để tạo ra chủng NDSGU từ chủng NUA theo cách được mô tả dưới đây.

(1) Tạo ra plasmit để thay thế đoạn khởi đầu aroG

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu aroG (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.280.842 đến 2.282.206) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn SphI và RsrII đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 38 và 39) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroG (số nucleotit của sợi bổ trợ: 2.279.366 đến 2.280.754) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn PfoI và SbfI đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 40 và 41) được tổng hợp. Hơn nữa, kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroG. Theo cách khác, PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 36), để khuếch đại đoạn khởi đầu Tu.

Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu aroG được cắt bằng các enzym giới hạn SphI và RsrII, đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroG được cắt bằng các enzym giới hạn PfoI và SbfI, và đoạn ADN được khuếch đại của đoạn khởi đầu Tu được cắt bằng các enzym giới hạn RsrII và PfoI. Sau đó, 3 kiểu của các đoạn ADN thu được nhờ quá trình xử lý bằng enzym giới hạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_aroG-Ntu.

(2) Tạo ra thể tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng plasmit pHKPsacB_aroG-Ntu

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_aroG-Ntu được kết hợp vào trong chủng NUA, và chủng NUA_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng NUA_Km được phân tích nhờ

kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 38 và 41) và các đoạn mồi để nhận diện gen *sacB* (các SEQ ID NO: 3 và 4), và thu được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng NUA_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmid pHKPsacB_aroG-Ntu đã được đưa vào trong đoạn gen *aroG*.

Chủng NUA_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NDSGU. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 38 và 41) và các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 36), và chủng NDSGU được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn khởi đầu *aroG* đã được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu, như mong muốn. Hơn nữa, đoạn mồi ADN được định vị bên ngoài vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 42) và đoạn mồi ADN được định vị bên ngoài vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 43) của gen *aroG* được tổng hợp. Theo cách khác, kỹ thuật PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi được điều chế ở trên, và chủng NDSGU được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn khởi đầu *aroG* đã được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu.

3. Tạo ra chủng NSU bằng cách thay thế gen khởi đầu *aroB* bằng đoạn khởi đầu Tu

Chủng NSU được tạo ra từ chủng NDSGU theo cách được mô tả dưới đây bằng cách thay thế vùng khởi đầu của gen *aroB* mã hóa DHQ synthetaza bằng đoạn khởi đầu Tu.

(1) Tạo ra plasmid để thay thế đoạn khởi đầu *aroB*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu *aroB* (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.720.573 đến 1.721.670) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn *SphI* và *RsrII* đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 44 và 45) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu *aroB* (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.719.404 đến 1.720.501) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn *PfoI* và *SbfI* đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 46 và 47) được tổng hợp. Hơn nữa, PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn

mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu *aroB*. Theo cách khác, kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 16), để khuếch đại đoạn khởi đầu Tu.

Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu *aroB* được cắt bằng các enzym giới hạn *SphI* và *RsrII*, đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu *aroB* được cắt bằng các enzym giới hạn *PfoI* và *SbfI*, và đoạn ADN được khuếch đại của đoạn khởi đầu Tu được cắt bằng các enzym giới hạn *RsrII* và *PfoI*. Sau đó, 3 kiểu của các đoạn ADN thu được bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *SphI* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_aroB-Ntu.

(2) Tạo ra thể tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng plasmit pHKPsacB_aroB-Ntu

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_aroB-Ntu được kết hợp vào trong chủng NDSGU, và chủng NDSGU_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để xác nhận rằng chủng NDSGU_Km là thể biến nạp hữu ích thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 48 và 49) được tổng hợp dựa vào đoạn dòng trên của vùng cạnh sườn 5' và đoạn dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu *aroB*. Chủng NDSGU_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng NDSGU_Km làm khuôn mẫu, các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 48 và 49), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 36), và các đoạn mồi để nhận diện gen *sacB* (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng NDSGU_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_aroB-Ntu đã được đưa vào trong đoạn gen *aroB*.

Chủng NDSGU_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSU. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 44 và 47), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 48 và 49), và các đoạn

môi (các SEQ ID NO: 35 và 36), và chủng NSU được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn khởi đầu aroB đã được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu, như mong muốn.

4. Tạo ra chủng NSH bằng cách thay thế gen khởi đầu aroF bằng đoạn khởi đầu Tu

Chủng NSH được tạo ra từ chủng NSH theo cách được mô tả dưới đây bằng cách thay thế vùng khởi đầu của gen aroF mã hóa DHQ synthetaza bằng vùng khởi đầu Tu.

(1) Tạo ra plasmit để thay thế đoạn khởi đầu aroF

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu aroF (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.046.619 đến 1.047.863) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn SphI và RsrII đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 50 và 51) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroF (số nucleotit của sợi bổ trợ: 1.046.619 đến 1.047.863) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn PfoI và SbfI đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 52 và 53) được tổng hợp. Hơn nữa, kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroF. Theo cách khác, kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 35 và 36), để khuếch đại đoạn khởi đầu Tu.

Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen khởi đầu aroF được cắt bằng các enzym giới hạn SphI và RsrII, đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroF được cắt bằng các enzym giới hạn PfoI và SbfI, và đoạn ADN được khuếch đại của đoạn khởi đầu Tu được cắt bằng các enzym giới hạn RsrII và PfoI. Sau đó, 3 kiểu của các đoạn ADN thu được bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_aroF-Ntu.

(2) Tạo ra thể tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng plasmit pHKPsacB_aroF-Ntu

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_aroF-Ntu được kết hợp vào trong chủng NSU, và chủng NSU_Km

được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để xác nhận rằng chủng NSU_Km là thể biến nạp hữu ích thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 54 và 55) được tổng hợp dựa vào đoạn dòng trên của vùng cạnh sườn 5' và đoạn dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu *aroF*. Chủng NSU_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng NSU_Km làm khuôn mẫu, các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 54 và 55), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 36), và các đoạn mồi để nhận diện gen *sacB* (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng NSU_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmid *pHKPsacB_aroF-Ntu* đã được đưa vào trong đoạn gen *aroF*.

Chủng NSU_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 50 và 53), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 54 và 55), và các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 35 và 36), và chủng NSU được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn khởi đầu *aroB* đã được thay thế bằng đoạn khởi đầu Tu, như mong muốn.

Ví dụ tham khảo 7: Tạo ra thể đột biến chủng nhờ sự làm đứt gãy trong khung của gen *aroE1* và gen *aroE3* mã hóa shikimat dehydrogenaza

Sự đột biến khuyết đoạn trong khung được kết hợp vào trong gen *aroE1* và gen *aroE3*, mà có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, trong số 3 kiểu của shikimat dehydrogenaza được mang bởi chủng ATCC13032, để tạo ra chủng đột biến theo cách được mô tả dưới đây (sau đây, chủng đột biến được gọi là “chủng có sự làm đứt gãy trong khung”). Thuật ngữ “sự đột biến khuyết đoạn trong khung;” tức là, thuật ngữ “sự làm đứt gãy trong khung,” để chỉ sự đột biến thu được từ sự đưa sự khuyết đoạn một số nucleotit là bội số ba vào trong vùng dịch mã.

1. Tạo ra plasmid để làm đứt gãy trong khung của gen *aroE1*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *aroE1* (số nucleotit: 1.183.128 đến 1.184.160), hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 56 và 57) được tổng hợp. Vị trí enzyme giới hạn *SphI* được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện

trong SEQ ID NO: 56. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen aroE1. Sau đó, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 58 và 59) được tổng hợp để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen khởi đầu aroE1 (số nucleotit: 1.181.390 đến 1.182.365). Vị trí enzym giới hạn SbfI được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO: 59.

ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' và ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen aroE1 thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại nhờ quá trình PCR lặp sử dụng đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 56 và 59), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn SphI và SbfI. Đoạn ADN thu được được kết hợp vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacBΔaroE1. Plasmit pHKPsacBΔaroE1 được lấy ra khỏi đoạn bao gồm các nucleotit từ 1.181.390 đến 1.184.160 của sợi bổ trợ từ đoạn gen aroE1.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung của gen aroE1

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacBΔaroE1 được kết hợp vào trong chủng NSH, và chủng NSH_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để xác nhận rằng chủng NSH_Km là thể biến nạp hữu ích thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 60 và 61) được tổng hợp dựa vào đoạn dòng trên của vùng cạnh sườn 5' và đoạn dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' của gen aroE1. Chủng NSH_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 56 và 59) và các đoạn mồi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và thu được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng NSH_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacBΔaroE1 đã được đưa vào trong đoạn gen aroE1.

Chủng NSH_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSHΔaroE1. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 60 và 61), và chủng NSHΔaroE1 được nhận thấy là thể biến nạp

thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen *aroE1*, như mong muốn.

3. Tạo ra plasmit để làm đứt gãy trong khung của gen *aroE3*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *aroE3* (số nucleotit: 1.726.887 đến 1.727.845), hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 62 và 63) được tổng hợp. Vị trí enzyme giới hạn *SphI* được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO: 62. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *aroE3*. Sau đó, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 64 và 65) được tổng hợp để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen *aroE3* (số nucleotit: 1.725.101 đến 1.726.094). Vị trí enzyme giới hạn *SbfI* được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO: 65. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' và ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen *aroE3* thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 62 và 65), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzyme giới hạn *SphI* và *SbfI*. Đoạn ADN thu được được kết hợp vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *SphI* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit *pHKPsacB1* (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit *pHKPsacBΔaroE3*. Plasmit *pHKPsacBΔaroE3* được lấy ra khỏi đoạn bao gồm các nucleotit 1.726.095 đến 1.726.886 của sợi bổ trợ từ đoạn gen *aroE3*.

4. Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung của gen *aroE3*

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit *pHKPsacBΔaroE3* được kết hợp vào trong chủng *NSH*, và chủng *NSH_Km2* được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để xác nhận rằng chủng *NSH_Km2* là thể biến nạp hữu ích thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 66 và 67) được tổng hợp dựa vào đoạn dòng trên của vùng cạnh sườn 5' và đoạn dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' của gen *aroE3*. Chủng *NSH_Km* được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 62 và 65), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 66 và 67), và các đoạn mồi để nhận diện gen *sacB* (các SEQ ID NO: 3 và 4), và thu được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng *NSH_Km2* được nhận thấy là thể biến nạp thu được

từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB Δ aroE3 đã được đưa vào trong đoạn gen aroE3.

Chủng NSH_Km2 được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của dung dịch nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH Δ aroE3. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 66 và 67), và chủng NSH Δ aroE3 được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi của gen aroE3, như mong muốn.

5. Tạo ra chủng đột biến nhờ sự làm đứt gãy kép gen aroE1 và gen aroE3

Theo cách giống như được nêu ở phần “Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung của gen aroE3” ở trên, chủng có sự làm đứt gãy kép được tạo ra từ chủng NSH Δ aroE1 nhờ sự làm đứt gãy trong khung của gen aroE3 (chủng thu được được kí hiệu là “chủng NSH Δ aroE1 Δ aroE3”).

6. Thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin thơm của chủng NSH Δ aroE1, chủng NSH Δ aroE3, và chủng NSH Δ aroE1 Δ aroE3

Chủng NSH, chủng NSH Δ aroE1, chủng NSH Δ aroE3, và chủng NSH Δ aroE1 Δ aroE3 được tạo ra theo cách nêu trên được thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin thơm theo cách được mô tả dưới đây.

Các chủng nêu trên được cấy vào trong môi trường LB để nuôi cấy sơ bộ, quá trình nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ 30°C qua đêm, và 2% sản phẩm nuôi cấy được chuyển đến môi trường CGXII. Thử nghiệm nuôi cấy khác được tiến hành đồng thời trong môi trường được điều chế bằng cách bổ sung axit shikimic, tryptophan, phenylalanin, và tyrosin vào môi trường CGXII ở nồng độ cuối 50mg/L cho mỗi chất. Kết quả là, chủng NSH và chủng NSH Δ aroE1 được phát hiện là sinh trưởng bình thường trong môi trường CGXII trong khi chủng NSH Δ aroE3 và chủng NSH Δ aroE1 Δ aroE3 không phát triển trong môi trường này. Ngoài ra, chủng NSH Δ aroE3 và chủng NSH Δ aroE1 Δ aroE3 được nhận thấy là có khả năng sinh trưởng trở lại với sự bổ sung axit shikimic, tryptophan, phenylalanin, và tyrosin vào môi trường CGXII. Như vậy, gen aroE3 được nhận thấy là gen chính mã hóa shikimat dehydrogenaza.

Ví dụ tham khảo 8: Tạo ra chủng NSH Δ aroE3_vanE3 mà sản sinh axit

protocatechuic trong đó mức biểu hiện gen *aroE3* được điều chỉnh bằng đoạn khởi đầu *vanA*

Các gen mã hóa axit vanilic demethylaza của chủng ATCC13032 là gen *cg2616* (sau đây được viết tắt là “gen *vanA*,” số nucleotit 2.496.775 đến 2.497.905; kích cỡ 1,131bp) và gen *cg2617* (sau đây được viết tắt là “gen *vanB*,” số nucleotit 2.497.909 đến 2.498.886; kích cỡ 978bp). Đoạn bao gồm các nucleotit 2.496.775 đến 2.498.886 được viết tắt là “đoạn gen *vanAB*.” Chất kim hãm đã biết mà điều hòa gen *vanA* và gen *vanB* là gen *cg2615* (sau đây được viết tắt là “gen *vanR*,” số nucleotit 2.496.013 đến 2.496.591 của sợi bổ trợ; kích cỡ 579bp). Gen *aroE3* được kết hợp vào trong đoạn gen *vanA* và đoạn gen *vanB* với sự trợ giúp của gen *vanR*, và gen *aroE3* được thay thế ở đoạn phía dưới của gen *vanR*. Chủng NSHΔ*aroE3* như được nêu trong ví dụ tham khảo 7 được sử dụng làm chủng cha mẹ.

1. Tạo ra vật truyền để thay thế *vanAB* gene region with gen *aroE3*

Để thay thế đoạn gen *vanAB* của chủng ATCC13032 bằng gen *aroE3*, vật truyền cho sự thay thế được tạo ra theo cách được mô tả dưới đây. Đầu tiên, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 68 và 69) được tổng hợp, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen *vanAB* (số nucleotit: 2.495.799 đến 2.496.774; kích cỡ 976kp) trên cơ sở trình tự hệ gen của chủng ATCC13032. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của đoạn gen *vanAB* (số nucleotit: 2.498.887 đến 2.499.870; kích cỡ 984kp), hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 70 và 71) được tổng hợp. kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn môi được điều chế ở trên và ADN nhiễm sắc thể của chủng NSH làm khuôn mẫu, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *vanAB* và vùng cạnh sườn 3' của gen *vanAB*. Vùng cạnh sườn 5' của gen *vanAB* được khuếch đại, và vị trí enzym giới hạn *SphI* được kết hợp vào trong đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 68). Vùng cạnh sườn 3' của gen *vanAB* được khuếch đại, và vị trí enzym giới hạn *SbfI* được kết hợp vào trong đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 71). Ngoài ra, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 72 và 73) được tổng hợp để khuếch đại gen *aroE3*. Gen *aroE3* được khuếch đại, đoạn có đầu kết thúc 3' kích cỡ 15-bp của vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen *vanAB* được bổ sung cho đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 72), và đoạn có đầu cuối 5' kích cỡ 15-bp của vùng cạnh sườn 3' của đoạn gen *vanAB* được bổ sung cho đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 73), sau

đó là khuếch đại. Vùng cạnh sườn 5' được khuếch đại được trộn với gen aroE3. Đoạn và thu được được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 68 và 73), làm khuôn mẫu. Theo cách khác, vùng cạnh sườn 3' được khuếch đại được trộn với gen aroE3, và đoạn ADN thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 72 và 71). Các đoạn ADN được khuếch đại được cắt bằng enzym giới hạn SphI kết hợp với vị trí enzym giới hạn bên trong, AscI, của gen aroE3 và enzym giới hạn SbfI kết hợp với vị trí enzym giới hạn bên trong, AscI, của gen aroE3. Các đoạn thu được được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_vanR_Pvan-aroE3.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách thay thế đoạn gen vanAB bằng gen aroE3

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_vanR_Pvan-aroE3 được kết hợp vào trong chủng NSH Δ aroE3, và thu được chủng NSH Δ aroE3 kháng kanamycin. Để xác nhận rằng đoạn bao gồm các nucleotit 2.496.775 đến 2.498.886 trong một vùng (số nucleotit: 2.495.799 đến 2.499.870; kích cỡ 4071bp) trên ADN nhiễm sắc thể của chủng kháng kanamycin thu được đã được thay thế bằng gen aroE3, thử nghiệm sau đây được thực hiện. Đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 74 và 75) được tạo ra ở đoạn có kích cỡ 112-bp nằm bên ngoài vùng cạnh sườn 5' và đoạn có kích cỡ 106-bp nằm bên ngoài vùng cạnh sườn 3' của gen vanAB. Bằng cách sử dụng các đoạn mỗi ADN và đoạn mỗi ADN được sử dụng để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen vanAB (các SEQ ID NO: 68 và 71), kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng, làm khuôn mẫu trực tiếp, khuẩn lạc của chủng NSH Δ aroE3 kháng kanamycin. Kích cỡ của đoạn ADN được khuếch đại thu được bằng kỹ thuật PCR trong đó ADN nhiễm sắc thể của chủng NSH Δ aroE3 kháng kanamycin làm khuôn mẫu được khuếch đại với sự trợ giúp của đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 74 và 71) là 4194bp, và kích cỡ của đoạn ADN được khuếch đại thu được bằng kỹ thuật PCR trong đó sự khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 68 và 75) là 2905bp. Hoặc, kích cỡ của đoạn ADN được khuếch đại thu được bằng PCR trong đó sự khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mỗi ADN (các SEQ ID NO: 74 và 71) là 2913bp, và kích cỡ của đoạn ADN được khuếch đại thu được bằng kỹ thuật PCR trong đó sự khuếch đại được thực hiện với sự trợ giúp

của đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 68 và 75) là 4186bp. Vì đoạn gen sacB được dò bằng kỹ thuật PCR hoặc phương pháp phân tích khác, chủng NSH Δ aroE3 được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn.

Thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn của chủng NSH Δ aroE3 được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, lượng sản phẩm nuôi cấy nhỏ được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Trong nhiễm sắc thể ADN của chủng NSH Δ aroE3 đã phát triển, dự đoán rằng đoạn gen sacB, đoạn gen kháng kanamycin, và đoạn gen vanAB được thay thế bằng gen aroE3, và chủng này được kí hiệu là chủng NSH Δ aroE3_vanE3. Chủng NSH Δ aroE3_vanE3 được đem đi PCR sử dụng hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 74 và 75) và được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn gen vanAB đã được thay thế bằng gen aroE3, như mong muốn.

3. Xác nhận sự phát triển của chủng NSH Δ aroE3_vanE3

Bằng cách sử dụng môi trường CGXII được bổ sung 17,5mg/L axit shikimic, 50mg/L tryptophan, 50mg/L phenylalanin, 50mg/L tyrosin, 10mg/L axit p-hydroxybenzoic, và 10mg/L axit p-aminobenzoic (sau đây được gọi là “6 loại chất phụ gia”) và môi trường CGXII không được bổ sung 6 loại chất phụ gia, các điều kiện sinh trưởng của chủng NSH Δ aroE3_vanE3 và chủng NSH Δ aroE3 được đánh giá. Trong khi chủng NSH Δ aroE3_vanE3 được nhận thấy là phát triển bình thường trong môi trường được bổ sung 6 loại chất phụ gia, tốc độ sinh trưởng là chậm ở giai đoạn nuôi cấy lúc giữa trong môi trường không được bổ sung 6 loại chất phụ gia. Trong khi chủng NSH Δ aroE3 được nhận thấy là phát triển được trong môi trường được bổ sung 6 loại chất phụ gia, nhưng nó không phát triển trong môi trường không được bổ sung 6 loại chất phụ gia. Nếu chủng NSH Δ aroE3_vanE3 được nuôi cấy trong môi trường được điều chế bằng cách bổ sung axit ferulic, axit vanilic, hoặc vanilin ở lượng bằng hoặc lớn hơn 50 μ M vào môi trường CGXII không được bổ sung 6 loại chất phụ gia, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 được nhận thấy là phát triển một cách bình thường.

Ví dụ tham khảo 9: Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung gen

DHS dehydrataza

Sự đột biến khuyết đoạn trong khung được kết hợp vào trong gen *qsuB* của chủng NSH, chủng NSH Δ aroE3, và chủng NSH Δ aroE3_ *vanE3* được nêu trong các Ví dụ tham khảo 6, 7, và 8, làm chủng cha mẹ, và các chủng trong đó sự chuyển hóa DHS thành axit protocatechuic bị ngăn chặn được tạo ra theo cách được nêu dưới đây.

1. Tạo ra plasmit để làm đứt gãy gen *qsuB*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen *qsuB* (số nucleotit: 443.184 đến 444.207) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn *SbfI* và *XbaI* đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 76 và 77) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen *qsuB* (số nucleotit: 446.032 đến 447.053) và thêm các vị trí enzym giới hạn *XbaI* và *SalI* đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, ngoài ra, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 78 và 79) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng NSH làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen *qsuB*. Sản phẩm được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' được cắt bằng các enzym giới hạn *SbfI* và *XbaI*, và sản phẩm được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' được cắt bằng các enzym giới hạn *XbaI* và *SalI*. Sau đó, các đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *SalI* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB Δ *qsuB* để làm đứt gãy gen *qsuB*.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy gen *qsuB*

Plasmit pHKPsacB Δ *qsuB* được kết hợp vào trong chủng NSH, chủng NSH Δ aroE3, và chủng NSH Δ aroE3_ *vanE3*, và chủng NSH_ *qsuB*_Km, chủng NSH Δ aroE3_ *qsuB*_Km, và chủng NSH Δ aroE3_ *vanE3*_ *qsuB*_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để phân tích các chủng thu được bằng kỹ thuật PCR, đoạn mồi ADN giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 80) và đoạn mồi ADN giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 81) của gen *qsuB* được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng bộ đoạn mồi (các SEQ ID NO: 79 và 80) và bộ đoạn mồi (các SEQ ID NO: 76 và 81). Các kết quả như mong muốn thu được nhờ sự phân tích PCR sử dụng một trong hai bộ đoạn mồi. Như vậy, các chủng này được nhận thấy là các thể biến nạp thu được từ

kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB Δ qsuB đã được đưa vào trong đoạn gen qsuB.

Chủng NSH Δ qsuB_Km, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km, và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH Δ qsuB, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB, và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 80 và 81) và các đoạn mồi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các chủng này được nhận thấy là các thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi đoạn bao gồm các nucleotit 444.208 đến 446.031 trong gen qsuB.

Ví dụ tham khảo 10: Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung của gen axit shikimic dehydrataza

Các chủng đột biến được tạo ra như được mô tả dưới đây từ chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB bằng cách đưa sự đột biến khuyết đoạn trong khung vào trong gen qsuD mã hóa axit shikimic dehydrataza, để làm giảm hoạt tính của axit shikimic dehydrataza còn lại.

1. Tạo ra plasmit để làm đứt gãy trong khung của gen qsuD

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen qsuD (số nucleotit: 443.644 đến 446.553; đoạn bao gồm các nucleotit 444.199 đến 446.031 là đoạn đứt gãy trong khung của gen qsuB), hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 82 và 83) được tổng hợp. Vị trí enzym giới hạn SbfI được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO: 82. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng NSH Δ qsuB làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen qsuD. Sau đó, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 84 và 85) được tổng hợp để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen qsuD đoạn khởi đầu (số nucleotit: 447.385 đến 448.441). Vị trí enzym giới hạn XhoI được kết hợp vào trong đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO: 85. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' và ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen aroE thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại nhờ kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn mồi ADN

(các SEQ ID NO: 82 và 85), và đoạn thu được này sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn SbfI và XhoI. Đoạn ADN thu được được kết hợp vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SphI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB Δ qsuD. Plasmit pHKPsacB Δ qsuD được lấy ra khỏi đoạn bao gồm các nucleotit 446.554 đến 447.384 từ đoạn gen qsuD.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy trong khung của gen qsuD

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB Δ qsuD được kết hợp vào trong chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB, và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Để xác nhận rằng chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_km là các thể biến nạp hữu ích thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn, hai kiểu đoạn mồi (các SEQ ID NO: 86 và 87) được tổng hợp dựa vào đoạn dòng trên của vùng cạnh sườn 5' và đoạn dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' của gen qsuD. Chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 86 và 85), các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 82 và 87), và các đoạn mồi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và thu được các kết quả như mong muốn. Như vậy, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_km được nhận thấy là các thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB Δ qsuD đã được đưa vào trong đoạn gen qsuD.

Chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB_Km và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 86 và 87), và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE và chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD được nhận thấy là các thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen aroE, như mong muốn.

3. Thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin thơm của chủng

NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD

Chủng NSH, chủng NSH Δ aroE3, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE1, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB, và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD được tạo ra theo cách nêu trên được thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin thơm theo cách được mô tả dưới đây.

Các chủng được cấy vào trong môi trường CGXII tiền nuôi cấy được bổ sung 17,5mg/L axit shikimic, 50mg/L tryptophan, 50mg/L phenylalanin, và 50mg/L tyrosin, quá trình nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ 30°C qua đêm, và các chủng được nuôi cấy được rửa hai lần và sau đó được chuyển sang môi trường CGXII để nuôi cấy chính, đồng thời điều chỉnh OD 600 ở khoảng 0,05. Thử nghiệm nuôi cấy khác đồng thời được tiến hành trong môi trường được điều chế bằng cách bổ sung 17,5mg/L axit shikimic, 50mg/L tryptophan, 50mg/L phenylalanin, và 50mg/L tyrosin vào môi trường CGXII cho quá trình nuôi cấy chính. Kết quả là, chỉ có chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD trong số chủng NSH, chủng NSH Δ aroE3, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB, chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE1, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB, và chủng NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD được nhận thấy là chỉ phát triển khi axit shikimic, tryptophan, phenylalanin, và tyrosin được bổ sung. Điều này chỉ ra rằng hoạt tính của axit shikimic dehydrataza còn lại về cơ bản là không còn nhờ sự loại bỏ gen qsuD.

Ví dụ tham khảo 11: Tạo ra chủng sản sinh DHS có khả năng điều hòa mức biểu hiện gen aroE3 bằng cách cảm ứng sự biểu hiện của chất kìm hãm VanR

Đoạn gen benABCD của chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD được tạo ra ở ví dụ tham khảo 10 được thay thế bằng gen vanR. Như vậy, chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen vanR được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu benA được tạo ra.

1. Tạo ra plasmit để thay thế đoạn gen benABCD bằng gen vanR

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen benABCD (số nucleotit: 2.515.963 đến 2.516.969), hai kiểu đoạn nối ADN (các SEQ ID NO: 88 và 89) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của đoạn gen benABCD (số nucleotit: 2.521.372 đến 2.522.498), ngoài ra, hai kiểu đoạn nối ADN (các SEQ ID NO: 90 và 91) được tổng hợp. Các đoạn nối được thể hiện trong các SEQ ID

NO: 88 và 91, mỗi trình tự có các vị trí enzym giới hạn Sall và SbfI. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 (Ví dụ tham khảo 3) làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen benABCD. Hơn nữa, để khuếch đại gen vanR, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 92 và 93) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 làm khuôn mẫu và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 92 và 93), để khuếch đại đoạn gen vanR. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen benABCD thu được như vậy và ADN được khuếch đại của đoạn gen qsuB được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại nhờ kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 88 và 93), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn Sall và NarI. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí Sall trong đoạn môi (SEQ ID NO: 88) và vị trí NarI ở gen vanR. Ngoài ra, ADN được khuếch đại của đoạn gen vanR được kết hợp với ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen benABCD. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 91 và 92), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn NarI và SbfI. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí NarI ở gen vanR và vị trí SbfI ở đoạn môi (SEQ ID NO: 91). 2 loại đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí Sall và vị trí SbfI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_Pben-vanR.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách thay thế đoạn gen benABCD bằng gen vanR

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_Pben-vanR được kết hợp vào trong chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD, và thu được chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD_Km kháng kanamycin. Để phân tích chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD_Km bằng kỹ thuật PCR, thì đoạn môi giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 94) và đoạn môi giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 95) của gen vanR được tổng hợp. Sau đó, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 94 và 91) và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 88 và 95). Các kết quả như mong muốn thu được bằng cách phân tích PCR sử dụng các bộ đoạn môi. Như vậy, chủng

NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Pben-vanR đã được đưa vào trong đoạn gen benABCD.

Chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB Δ qsuD_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng Pben-vanR. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 94 và 95), và chủng Pben-vanR được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn gen benABCD đã được thay thế bằng gen vanR.

Ví dụ tham khảo 12: Tạo ra chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB_Pben-qsuB sản sinh axit protocatechuic trong đó sự biểu hiện gen qsuB được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu benA

Theo cách được mô tả dưới đây, đoạn gen operon benABCD của chủng NSH Δ aroE3_vanE3 Δ qsuB được tạo ra ở ví dụ tham khảo 9 được thay thế bằng gen qsuB. Như vậy, chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen qsuB được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu benA được tạo ra.

1. Tạo ra plasmit để thay thế đoạn gen benABCD bằng gen qsuB

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen benABCD, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 88 và 89) được sử dụng, và hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 90 và 91) được sử dụng để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của đoạn gen benABCD. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 (Ví dụ tham khảo 3) làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của gen benABCD. Ngoài ra, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 96 và 97) được tổng hợp để khuếch đại gen qsuB. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại đoạn gen qsuB. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của gen benABCD và ADN được khuếch đại của đoạn gen qsuB thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại nhờ kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 88 và 97), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn SalI và NarI. Như vậy, thu được

đoạn ADN được cắt bằng vị trí Sall ở đoạn môi (SEQ ID NO: 88) và vị trí NarI ở gen qsuB. Ngoài ra, ADN được khuếch đại của đoạn gen qsuB được trộn với ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của gen benABCD. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại nhờ kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 91 và 96), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn NarI và SbfI. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí NarI ở gen qsuB và vị trí SbfI ở đoạn môi (SEQ ID NO: 91). 2 kiểu đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí Sall và vị trí SbfI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách thay thế đoạn gen benABCD bằng gen qsuB

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB được kết hợp vào trong chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB, và thu được chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Km kháng kanamycin. Để phân tích chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Km bằng kỹ thuật PCR, đoạn môi giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 98) và đoạn môi giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 99) của gen qsuB được tổng hợp. Sau đó, chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 88 và 99) và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 91 và 98). Các kết quả như mong muốn thu được bằng cách phân tích PCR sử dụng bộ đoạn môi nêu trên. Như vậy, chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB đã được đưa vào trong đoạn gen benABCD.

Chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 88 và 99) và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 91 và 98), và chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó đoạn gen benABCD đã được thay thế bằng gen qsuB.

Ví dụ tham khảo 13: Tạo ra chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR* sản sinh axit protocatechuic trong đó sự biểu hiện gen *qsuB* và *vanR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *benA*

Gen *vanR* được kết hợp vào trong chủng *NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB* được tạo ra ở ví dụ tham khảo 12 trong khi cho phép gen *vanR* tạo ra operon với gen *qsuB*. Chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen *qsuB* và *vanR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *benA* bởi vì operon được tạo ra với gen *qsuB* được tạo ra theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra plasmit để chèn gen *vanR* vào dòng dưới của gen *qsuB*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của vùng chèn gen *vanR* (số nucleotit: 2.520.333 đến 2.521.374), hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 100 và 101) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của vùng chèn gen *vanR* (số nucleotit: 2.521.372 đến 2.522.498), ngoài ra, hai kiểu đoạn môi (các SEQ ID NO: 102 và 103) được tổng hợp. Các đoạn môi được thể hiện trong các SEQ ID NO: 100 và 103 đều có các vị trí enzym giới hạn *Sall* và *SbfI*. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng

NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của vùng chèn gen *vanR*. Hơn nữa, để khuếch đại gen *vanR*, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 104 và 105) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 (Ví dụ tham khảo 3) làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại đoạn gen *vanR*. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của vùng chèn gen *vanR* và ADN được khuếch đại của đoạn gen *vanR* thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 100 và 105), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn *Sall* và *BamHI*. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí *Sall* trong đoạn môi (SEQ ID NO: 100) và vị trí *BamHI* ở gen *vanR*. Ngoài ra, ADN được khuếch đại của đoạn gen *vanR* được trộn với ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của vùng chèn gen *vanR*. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 104 và 103), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn *BamHI* và *SbfI*. Như vậy, thu được

đoạn ADN được cắt bằng vị trí BamHI ở gen vanR và vị trí SbfI ở đoạn mồi (SEQ ID NO: 103). 2 kiểu đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SalI và vị trí SbfI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB-vanR.

2. Tạo ra chủng đột biến nhờ sự chèn gen vanR vào dòng dưới của gen qsuB

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB-vanR được kết hợp vào trong chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB, và chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB_Km kháng kanamycin thu được. Để phân tích chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB_Km bằng kỹ thuật PCR, đoạn mồi giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 106) và đoạn mồi giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 107) của vùng chèn gen vanR được tổng hợp. Sau đó, chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 100 và 103). Các kết quả như mong muốn thu được bằng cách phân tích PCR sử dụng các bộ đoạn mồi nêu trên. Như vậy, chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Pben-qsuB-vanR đã được đưa vào trong vùng chèn gen vanR.

Chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng

NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 106 và 107). Như vậy, chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó gen vanR đã được đưa vào trong đoạn dòng dưới của gen qsuB trong đoạn gen benABCD.

Ví dụ tham khảo 14: Tạo ra tkt chủng sản sinh axit protocatechuic mà biểu hiện chủ yếu gen tkt

Bằng cách sử dụng chủng NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB-vanR được tạo ra trong ví dụ tham khảo 13 làm chủng cha mẹ, bộ phiên mã bao gồm gen

tkf liên quan đến sự tổng hợp erythroza-4-phosphat được nối với đoạn khởi đầu Tu (Ví dụ tham khảo 6) (sau đây, được viết tắt là “bộ phiên mã Ptu-tkf”) được chèn vào trong vị trí làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn để tạo ra chủng tkf theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra plasmit để hình thành bộ phiên mã Ptu-tkf

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của vị trí làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn (số nucleotit: 1.885.120 đến 1.883.861), hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 108 và 109) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của vị trí làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn (số nucleotit: 1.879.744 đến 1.878.664), ngoài ra, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 110 và 111) được tổng hợp. Hơn nữa, đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 112 và 36) được tổng hợp để khuếch đại đoạn khởi đầu Tu, và hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 113 và 114) được tổng hợp để khuếch đại gen tkf. Các đoạn mồi được thể hiện trong các SEQ ID NO: 108 và 111 đều có các vị trí enzym giới hạn SbfI và SalI.

Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 (Ví dụ tham khảo 3) làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3' của vị trí làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' được trộn với ADN được khuếch đại của gen tkf. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 108 và 113), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn SbfI và PfoI. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí SbfI trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 108) và vị trí PfoI trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 113). Ngoài ra, ADN được khuếch đại của đoạn khởi đầu Tu được trộn lẫn với ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3'. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 36 và 111), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn PfoI và SalI. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí PfoI trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 36) và vị trí SalI trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 111). 2 kiểu đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí SbfI và vị trí SalI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit pHKPsacB_Ptu-tkf.

2. Tạo ra chủng đột biến chứa bộ phiên mã Ptu-*tk*t được kết hợp trong đó

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB_Ptu-*tk*t được kết hợp vào trong chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR, và thu được chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR_Km kháng kanamycin. Để phân tích chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR_Km bằng kỹ thuật PCR, thì đoạn môi giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 115) và đoạn môi giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 116) được tổng hợp. Sau đó, chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 115 và 116) và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 108 và 111). Các kết quả như mong muốn thu được nhờ sự phân tích PCR sử dụng các bộ đoạn môi. Như vậy, chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Ptu-*tk*t đã được đưa vào.

Chủng NSHΔaroE3_vanE3Δ*qsuB*_Pben-*qsuB*-vanR_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng *tk*t. Nhờ kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 115 và 116) và các đoạn môi (các SEQ ID NO: 108 và 111) và cắt đoạn được khuếch đại bằng các enzym giới hạn, chủng được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó bộ phiên mã Ptu-*tk*t đã được kết hợp vào trong vị trí làm đứt gãy gen cải biến ADN/enzym giới hạn.

Ví dụ tham khảo 15: Tạo ra chủng đột biến trong đó mức biểu hiện gen *aroE3* được điều chỉnh bằng đoạn khởi đầu *rhcH*

Đoạn từ gen *cg1309* đến gen *cg1311* (sau đây, được viết tắt là “đoạn gen *rhcHMD*”) được thay thế bằng gen *aroE3* để tạo ra chủng đột biến theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra plasmit làm đứt gãy gen *genH*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' (số nucleotit: 3.201.424 đến 3.202.403) của gen *cg3354* mã hóa 3-hydroxybenzoat 6-hydroxylaza (sau đây được gọi là gen

genH) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn KpnI và SbfI cho cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 117 và 118) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của gen genH. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen genH (số nucleotit: 3.203.894 đến 3.204.901) và bổ sung các vị trí enzym giới hạn SbfI và SalI đến cả hai đầu của đoạn được khuếch đại, thì hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 119 và 120) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng DRHG làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' của gen genH. Đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' được cắt bằng các enzym giới hạn KpnI và SbfI, và đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' được cắt bằng các enzym giới hạn SbfI và SalI. Sau đó, các đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí KpnI và vị trí SalI ở vị trí đa nhân dòng của plasmit pHKPsacB1 (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, plasmit pHKPsacB Δ genH thu được.

2. Tạo ra chủng đột biến bằng cách làm đứt gãy gen genH

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit pHKPsacB Δ genH được kết hợp vào trong chủng NSH Δ aroE3, và chủng NSH Δ aroE3_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng NSH Δ aroE3_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 117 và 120) và các đoạn môi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng NSH Δ aroE3_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB Δ genH đã được đưa vào trong đoạn gen genH.

Chủng NSH Δ aroE3_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH Δ aroE3 Δ genH. Nhờ kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 117 và 120), chủng NSH Δ aroE3 Δ genH được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép mà đã bị lấy đi gen genH, như mong muốn.

3. Tạo ra vật truyền để thay thế đoạn gen *rhcHMD* bằng gen *aroE3*

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' (số nucleotit: 1.213.341 đến 1.214.736) của đoạn gen *rhcHMD*, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 121 và 122) được tổng hợp. Vị trí enzym giới hạn *SbfI* được kết hợp vào trong đoạn môi được thể hiện trong SEQ ID NO: 121. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *NSH* làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen *rhcHMD*. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' (số nucleotit: 1.218.296 đến 1.219.545) của gen *rhcHMD*, thì hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 123 và 124) được tổng hợp. Vị trí enzym giới hạn *SalI* được kết hợp vào trong đoạn môi được thể hiện trong SEQ ID NO: 124.

Để khuếch đại gen *aroE3*, ngoài ra, đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 125 và 126) được tổng hợp. ADN được khuếch đại các đoạn của vùng cạnh sườn 5' của đoạn gen *rhcHMD* và gen *aroE3* làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 121 và 126). ADN được khuếch đại các đoạn của vùng cạnh sườn 3' và gen *aroE3* làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 125 và 124). Các đoạn ADN được khuếch đại được cắt bằng các enzym giới hạn, *SbfI* kết hợp với *AvrII* hoặc *AvrII* kết hợp với *SalI*, và các đoạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *SalI* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit *pHKPsacB1* (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit *pHKPsacB_rhcR_Prhc-rhcE3*.

4. Tạo ra chủng đột biến bằng cách thay thế đoạn gen *rhcHMD* bằng gen *aroE3*

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit *pHKPsacB_rhcR_Prhc-rhcE3* được kết hợp vào trong chủng *NSHΔaroE3ΔgenH*, và chủng *NSHΔaroE3ΔgenH_Km* được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng *NSHΔaroE3ΔgenH_Km* được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 127 và 128), các đoạn môi (các SEQ ID NO: 121 và 124), và các đoạn môi để nhận diện gen *sacB* (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng *NSHΔaroE3ΔgenH_Km* được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit *pHKPsacB_rhcR_Prhc-rhcE3* đã được đưa vào trong đoạn gen *rhcHMD*.

Thế biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn của chủng NSH Δ aroE3 Δ genH được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3. Nhờ kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 127 và 128), sự thay thế đoạn gen rhcHMD bằng gen aroE3 được dò tìm trong chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3, và chủng được nhận thấy là thế biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép, như mong muốn.

5. Thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin của chủng NSH Δ aroE3_vanE3 và chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3

Chủng NSH, chủng NSH Δ aroE3, chủng NSH Δ aroE3_vanE3, và chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3 được tạo ra theo cách nêu trên được thử nghiệm về sự khuyết dưỡng axit amin thơm theo cách được mô tả dưới đây.

Các chủng được cấy vào trong môi trường CGXII cho quá trình tiền nuôi cấy, quá trình nuôi cấy này được tiến hành ở nhiệt độ 30°C qua đêm, và các chủng được nuôi cấy được rửa hai lần và sau đó được chuyển sang môi trường CGXII để nuôi cấy chính, đồng thời điều chỉnh OD600 đến khoảng 0,1. Thử nghiệm nuôi cấy khác đồng thời được tiến hành trong môi trường được điều chế bằng cách bổ sung 17,5mg/L axit shikimic, 50mg/L tryptophan, 50mg/L phenylalanin, và 50mg/L tyrosin vào môi trường CGXII. Các kết quả cho thấy rằng chủng NSH phát triển bình thường trong môi trường CGXII nhưng chủng NSH Δ aroE3 phát triển rất chậm. Đối với chủng NSH Δ aroE3_vanE3 và chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3, sự sinh trưởng của chúng trở nên chậm từ giai đoạn nuôi cấy sớm đến giai đoạn nuôi cấy giữa, và khả năng sinh trưởng của chúng được hồi phục ở giai đoạn nuôi cấy muộn. Ngoài ra, chủng NSH Δ aroE3_vanE3 và chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3 được nhận thấy là hồi phục khả năng sinh trưởng với sự bổ sung axit shikimic, tryptophan, phenylalanin, và tyrosin vào môi trường CGXII. Như vậy, chất kim hãm VanR và chất kim hãm RhcR được nhận thấy là có khả năng điều hòa mức biểu hiện gen aroE3.

Ví dụ tham khảo 16: Tạo ra chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen rhcR được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu nagI

Để hình thành hệ điều chỉnh sự phiên mã gen *aroE3* nhờ chất kìm hãm RhoR được mã hóa bởi gen *rhoR*, chủng đột biến trong đó mức biểu hiện gen *rhoR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *nagI* được tạo ra theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra vật truyền để thay thế đoạn operon gen *nagIKL* bằng gen *rhoR*

Đoạn operon gen *nagIKL* của chủng *NSHΔaroE3ΔgenH* được tạo ra ở trên được thay thế bằng gen *rhoR* theo cách được mô tả dưới đây. Như vậy, chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen *rhoR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *nagI* được tạo ra.

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' (số nucleotit của sợi bổ trợ: 3.199.996 đến 3.200.904) của đoạn operon gen *nagIKL*, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 129 và 130) được tổng hợp. Vị trí enzym giới hạn *SbfI* được kết hợp vào trong đoạn môi được thể hiện trong SEQ ID NO: 129. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *NSH* làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' của đoạn operon gen *nagIKL*. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' (số nucleotit của sợi bổ trợ: 3.196.321 đến 3.197.306) của đoạn operon gen *nagIKL*, sau đó, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 131 và 132) được tổng hợp. Vị trí enzym giới hạn *Sall* được kết hợp vào trong đoạn môi được thể hiện trong SEQ ID NO: 132.

Ngoài ra, để khuếch đại gen *rhoR*, đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 133 và 134) được tổng hợp. Các đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của đoạn operon gen *nagIKL* và gen *rhoR* làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 133 và 134). Các đoạn ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' và gen *rhoR* làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 132 và 133). Các đoạn ADN được khuếch đại được cắt bằng các enzym giới hạn, *SbfI* kết hợp với *AvrII* hoặc *AvrII* kết hợp với *Sall*, và các đoạn được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *Sall* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit *pHKPsacB1* (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit *pHKPsacB_Pnag-rhoR*.

2. Tạo ra chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen *rhoR* được điều chỉnh bằng đoạn khởi đầu *nagI*

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit

pHKPsacB_Pnag-rhcR được kết hợp vào trong chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3, và chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3_Km được chọn trên cơ sở tính kháng kanamycin. Chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3_Km được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 135 và 136), các đoạn môi (các SEQ ID NO: 129 và 132), và các đoạn môi để nhận diện gen sacB (các SEQ ID NO: 3 và 4), và các kết quả như mong muốn thu được. Như vậy, chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3_Km được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit pHKPsacB_Pnag-rhcR đã được đưa vào trong đoạn operon gen nagIKL.

Thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn của chủng NSH Δ aroE3 Δ genH_rhcE3 được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng Pnag-rhcR. Nhờ kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn môi (các SEQ ID NO: 135 và 136), sự thay thế đoạn gen nagIKL bằng gen rhcR được dò tìm trong chủng Pnag-rhcR, và chủng được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép, như mong muốn.

Ví dụ tham khảo 17: Tạo ra chủng Pnag-qsuB-rhcR sản sinh axit protocatechuic trong đó sự biểu hiện gen qsuB và rhcR được điều chỉnh bằng đoạn khởi đầu nagI

Chủng đột biến trong đó gen qsuB đã được đưa vào dưới sự điều khiển của đoạn khởi đầu nagI của chủng Pnag-rhcR được tạo ra theo cách được mô tả dưới đây.

1. Tạo ra plasmit để chèn gen qsuB vào dòng dưới của đoạn khởi đầu nagI

Để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' (số nucleotit: 3.199.996 đến 3.200.904) của vùng chèn gen qsuB, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 137 và 138) được tổng hợp. Để khuếch đại vùng cạnh sườn 3' (số nucleotit: 3.198.925 đến 3.199.995; đoạn này đã được thay thế bằng gen rhcR) của vùng chèn gen qsuB, ngoài ra, hai kiểu đoạn môi ADN (các SEQ ID NO: 139 và 140) được tổng hợp. Các đoạn môi được thể hiện trong các SEQ ID NO: 137 và 140 đều chứa các vị trí enzym giới hạn SbfI và SphI. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng Pnag-rhcR (Ví dụ tham khảo 16) làm khuôn mẫu và các đoạn môi được điều chế ở trên, để khuếch đại vùng cạnh sườn 5' và vùng cạnh sườn 3'

của vùng chèn gen *qsuB*. Hơn nữa, để khuếch đại gen *qsuB*, hai kiểu đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 141 và 142) được tổng hợp. Kỹ thuật PCR được tiến hành sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng HT23 (Ví dụ tham khảo 3) làm khuôn mẫu và các đoạn mồi được điều chế ở trên, để khuếch đại đoạn gen *qsuB*. ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 5' của vùng chèn gen *qsuB* và ADN được khuếch đại của đoạn gen *qsuB* thu được như vậy được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 137 và 142), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn *SbfI* và *XhoI*. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí *SbfI* trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 137) và vị trí *XhoI* ở gen *qsuB*. Ngoài ra, ADN được khuếch đại của đoạn gen *qsuB* được trộn với ADN được khuếch đại của vùng cạnh sườn 3' của vùng chèn gen *qsuB*. Hỗn hợp thu được làm khuôn mẫu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lặp sử dụng đoạn mồi ADN (các SEQ ID NO: 140 và 141), và đoạn thu được sau đó được cắt bằng các enzym giới hạn *XhoI* và *SphI*. Như vậy, thu được đoạn ADN được cắt bằng vị trí *XhoI* trong gen *qsuB* và vị trí *SphI* trong đoạn mồi (SEQ ID NO: 140). 2 kiểu đoạn ADN này được đưa vào trong vị trí ở giữa vị trí *SbfI* và vị trí *SphI* ở vị trí đa nhân dòng của plasmit *pHKPsacB1* (xem Ví dụ tham khảo 2). Như vậy, thu được plasmit *pHKPsacB_Pnag-qsuB-rhcR*.

2. Tạo ra chủng đột biến trong đó sự biểu hiện gen *qsuB* và *rhcR* được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu *nagI*

Thông qua kỹ thuật biến nạp bằng phương pháp xung điện, plasmit *pHKPsacB_Pnag-qsuB-rhcR* được kết hợp vào trong chủng *Pnag-rhcR*, và thu được chủng *Pnag-rhcR_Km* kháng kanamycin. Để phân tích chủng *Pnag-rhcR_Km* bằng kỹ thuật PCR, thì đoạn mồi giống với chuỗi dòng trên của vùng cạnh sườn 5' (SEQ ID NO: 143) và đoạn mồi giống với chuỗi dòng dưới của vùng cạnh sườn 3' (SEQ ID NO: 144) của vùng chèn gen *qsuB* được tổng hợp. Chủng *Pnag-rhcR_Km* sau đó được phân tích bằng kỹ thuật PCR sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 137 và 140). Các kết quả như mong muốn thu được nhờ sự phân tích PCR sử dụng các bộ đoạn mồi nêu trên. Như vậy, chủng *Pnag-rhcR_Km* được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo đơn trong đó plasmit *pHKPsacB_Pnag-qsuB-rhcR* đã được đưa vào trong đoạn dòng dưới của đoạn khởi đầu *nagI*.

Chủng Pnag-rhcR_Km được nuôi cấy trong 1mL môi trường lỏng LB trong 24 giờ, một phần của sản phẩm nuôi cấy được phủ lên môi trường thạch LB chứa 10% sucroza, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường đó. Như vậy, thu được chủng Pnag-qsuB-rhcR. Nhờ tiến hành kỹ thuật PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 143 và 144), chủng được nhận thấy là thể biến nạp thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng trao đổi chéo kép trong đó gen qsuB đã được đưa vào trong đoạn dòng dưới của đoạn khởi đầu nagI.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sinh vật chưa có nhân điển hình có tất cả các dấu hiệu (a) đến (d) sau đây để tích tụ hợp chất P bằng cách điều hòa mức biểu hiện của enzym X mà chuyển hóa hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng được tạo ra từ nguồn cacbon:

(a) hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được chọn từ các enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp hợp chất P từ nguồn cacbon mà có thể được sử dụng bởi sinh vật chưa có nhân điển hình được gia tăng so với sinh vật chưa có nhân điển hình kiểu đại;

(b) hoạt tính của enzym X bị mất hoặc bị giảm bởi sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen kiểu đại x mã hóa protein của enzym X, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x;

(c) sự phiên mã ADN mã hóa enzym hoạt tính X được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu A, mà khác với đoạn khởi đầu vốn có thúc đẩy sự phiên mã của gen x và trong đó sự phiên mã bị ức chế với sự trợ giúp của protein kìm hãm R; và

(d) sự phiên mã của một hoặc nhiều bản sao của gen z mã hóa protein kìm hãm R được điều chỉnh bởi đoạn khởi đầu dành cho gen và/hoặc đoạn khởi đầu cảm ứng B mà khác với đoạn khởi đầu vốn có;

trong đó sinh vật chưa có nhân điển hình tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Escherichia coli*.

2. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm 1, trong đó sự đột biến thể đoạn ở vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen x như được xác định ở dấu hiệu (b) là sự đột biến thể đoạn của toàn bộ hoặc một phần của vùng khởi đầu với ADN của đoạn khởi đầu A như được xác định ở dấu hiệu (c).

3. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa khác với enzym X trong số các enzym của sinh vật chưa có nhân điển hình mà chuyển hóa hợp chất P bị mất hoặc giảm.

4. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gen z mã hóa protein kìm hãm R là gen vanR (cg2615), gen pcaR

(cg2624), hoặc gen *rhcR* (cg1308) của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và trong đó đoạn khởi đầu A tốt hơn là gen khởi đầu *vanA* (cg2616), gen khởi đầu *pobA* (cg1226), gen khởi đầu *pcaH* (cg2631), hoặc gen khởi đầu *rhcH* (cg1309) của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

5. Phương pháp sản xuất hợp chất P từ nguồn cacbon, trong đó hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian được chuyển hóa bằng enzym X thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M, phương pháp này bao gồm hai giai đoạn nuôi cấy:

i) giai đoạn nuôi cấy sớm, trong đó mức biểu hiện của enzym X cho phép sự chuyển hóa của hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp mà trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng;

ii) giai đoạn nuôi cấy muộn, trong đó sự biểu hiện của enzym X được ức chế bằng cách ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon và tốt hơn là cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kim hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và hợp chất P được tạo ra được tích tụ.

6. Phương pháp sản xuất hợp chất P từ nguồn cacbon, trong đó hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian được chuyển hóa bằng enzym X thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M không thể thiếu cho sự sinh trưởng, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 trong môi trường mà không được bổ sung sản phẩm chuyển hóa M hoặc sản phẩm cuối được tạo ra từ sản phẩm chuyển hóa M, phương pháp này bao gồm hai giai đoạn nuôi cấy:

i) giai đoạn nuôi cấy sớm, trong đó mức biểu hiện của enzym X cho phép sự chuyển hóa của hợp chất P là sản phẩm chuyển hóa trung gian thành sản phẩm chuyển hóa M trong chu trình sinh tổng hợp trong đó sản phẩm chuyển hóa M

không thể thiếu cho sự sinh trưởng;

ii) giai đoạn nuôi cấy muộn, trong đó sự biểu hiện của enzym X được ức chế bằng cách giải ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kim hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra, và hợp chất P được tạo ra được tích tụ.

7. Phương pháp sản xuất hợp chất P theo điểm 5 hoặc 6, trong đó sự kết hợp của hợp chất P và sản phẩm chuyển hóa M là sự kết hợp bất kỳ của các mục từ (f) đến (i) dưới đây:

(f) hợp chất P là axit 3-dehydroshikimic và sản phẩm chuyển hóa M là axit shikimic;

(g) hợp chất P là axit glutamic và sản phẩm chuyển hóa M là N-axetylglutamat hoặc γ -glutamyl phosphat;

(h) hợp chất P là axit aspartic và sản phẩm chuyển hóa M là β -aspartyl phosphat; và

(i) hợp chất P là serin và sản phẩm chuyển hóa M là glyxin.

8. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó sinh vật chưa có nhân điển hình này có dấu hiệu (e) sau đây ngoài các dấu hiệu (a) đến (d), để chuyển hóa hợp chất P được tích tụ thành hợp chất Q với sự trợ giúp của enzym Y:

(e) hiệu suất chuyển hóa hợp chất P thành hợp chất Q được gia tăng hoặc mức biểu hiện gen y được điều chỉnh khác với gen kiểu dại bởi vì sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit ở vùng dịch mã của gen y mã hóa protein của enzym Y, vùng điều hòa sự dịch mã của gen, hoặc vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen y.

9. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm 8, trong đó hoạt tính của một hoặc nhiều enzym chuyển hóa trong số các enzym của sinh vật chưa có nhân điển hình mà chuyển hóa hợp chất Q bị mất hoặc giảm.

10. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm 8 hoặc 9, trong đó sự đột biến thể đoạn ở vùng khởi đầu mà thúc đẩy sự phiên mã của gen y như được xác định ở dấu hiệu (e) là sự đột biến thể đoạn của toàn bộ hoặc một phần của vùng khởi đầu có

ADN của đoạn khởi đầu C mà khác với đoạn khởi đầu vốn có thúc đẩy sự phiên mã gen hoặc đoạn khởi đầu A.

11. Sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm 10, trong đó đoạn khởi đầu C là giống đoạn khởi đầu B hoặc sự phiên mã đoạn khởi đầu C được điều chỉnh bởi protein mà điều chỉnh sự phiên mã protein B, trong đó đoạn khởi đầu C tốt hơn là đoạn khởi đầu cảm ứng, trong đó đặc biệt là đoạn khởi đầu C được cảm ứng bằng cách bổ sung hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm axit ferulic, axit vanilic, vanilin, axit benzoic, axit 3-hydroxybenzoic, resorxinol, axit 4-hydroxybenzoic, axit 2,4-dihydroxybenzoic, fructoza, và sucroza.

12. Phương pháp sản xuất hợp chất Q bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, đồng thời ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và tốt hơn là cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kìm hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra và gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra.

13. Phương pháp sản xuất hợp chất Q bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, đồng thời giải ức chế sự phiên mã đoạn khởi đầu A với sự có mặt của nguồn cacbon, và cảm ứng sự phiên mã đoạn khởi đầu B để gia tăng mức biểu hiện của protein kìm hãm R, nhờ đó làm giảm lượng sản phẩm chuyển hóa M được tạo ra và gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra.

14. Phương pháp sản xuất hợp chất Q theo điểm 12 hoặc 13, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy sinh vật chưa có nhân điển hình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11 với sự có mặt của nguồn cacbon và sau đó cảm ứng sự phiên mã của đoạn khởi đầu C để gia tăng mức biểu hiện enzyme Y, bằng cách đó gia tăng lượng hợp chất Q được tạo ra.

15. Phương pháp sản xuất hợp chất Q theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14, trong đó sự kết hợp của hợp chất P, hợp chất Q, và sản phẩm chuyển hóa M là sự kết hợp bất kỳ của các mục từ (j) đến (w) sau đây:

(j) hợp chất P là 3-dehydroaxit shikimic, hợp chất Q là axit protocatechuic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit shikimic, và trong đó tốt hơn là enzyme X là

shikimat dehydrogenaza và enzym Y là 3-dehydroshikimat dehydrataza;

(k) hợp chất P là axit chorismic, hợp chất Q là axit anthranilic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit prephenic;

(l) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit 4-hydroxyphenylpyruvic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit phenylpyruvic;

(m) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit arogenic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit phenylpyruvic;

(n) hợp chất P là axit prephenic, hợp chất Q là axit phenylpyruvic, và sản phẩm chuyển hóa M là axit 4-hydroxyphenylpyruvic hoặc axit arogenic;

(o) hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, hợp chất Q là axit 2-isopropylmalic, và sản phẩm chuyển hóa M là valin;

(p) hợp chất P là axit 2-oxoisovaleric, hợp chất Q là valin, và sản phẩm chuyển hóa M là axit 2-isopropylmalic;

(q) hợp chất P là axit glutamic, hợp chất Q là γ -glutamyl phosphat, và sản phẩm chuyển hóa M là N-axetylglutamat;

(r) hợp chất P là axit glutamic, hợp chất Q là N-axetylglutamat, và sản phẩm chuyển hóa M là γ -glutamyl phosphat;

(s) hợp chất P là axit aspartic, hợp chất Q là asparagin, và sản phẩm chuyển hóa M là β -aspartyl phosphat;

(t) hợp chất P là aspartat β -semialdehyt, hợp chất Q là axit 2,3-dihydrodipicolinic, và sản phẩm chuyển hóa M là homoserin;

(u) hợp chất P là homoserin, hợp chất Q là o-axetylhomoserin, và sản phẩm chuyển hóa M là homoserin phosphat;

(v) hợp chất P là homoserin, hợp chất Q là homoserin phosphat, và sản phẩm chuyển hóa M là o-axetylhomoserin; và

(w) hợp chất P là serin, hợp chất Q là o-axetylserin, và sản phẩm chuyển hóa M là glyxin.

16. Phương pháp sản xuất axit protocatechuic như được mô tả trong mục (j) của điểm 15, trong đó hoạt tính chuyển hóa axit protocatechuic bị mất hoặc bị giảm nhờ đưa sự đột biến thể đoạn, khuyết đoạn, hoặc xen đoạn của một hoặc nhiều nucleotit vào trong vùng dịch mã hoặc vùng điều hòa phiên mã/dịch mã của một

hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa protocatechuat 2,3-dioxygenaza, gen mã hóa protocatechuat 3,4-dioxygenaza, gen mã hóa protocatechuat 4,5-dioxygenaza, và gen mã hóa protocatechuat decarboxylaza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genaris	
<120> Sinh vật chưa có nhân điển hình để sản xuất hợp chất chuyển hóa trung gian (P) và phương pháp sản xuất hợp chất chuyển hóa trung gian (P)	
<130> 131493A	
<160> 144	
<170> PatentIn version 3.5	
<210> 1	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 1	
catgggatcc tctagatctg acctgca	27
<210> 2	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 2	
ggtcagatct agaggatccc atggtac	27
<210> 3	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 3	
aagcttaa at gaacatcaaa aagtttgcaa aacaag	36
<210> 4	
<211> 30	

<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 4	
gcgttttat ttgttaactg ttaattgtcc	30
<210> 5	
<211> 45	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 5	
ttcgatttat tcaacaaagc cacgttgtgt ctcaaaatct ctgat	45
<210> 6	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 6	
gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat aa	42
<210> 7	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 7	
aactgtctgc ttacataaac agtaatacaa ggagctcaca	40
<210> 8	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 8

catgactatc aacaaattgg aagcttaaat gtggtagcat ga

42

<210> 9

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 9

agattttgag acacaacgtg gctttgttga ataaatcgaa a

41

<210> 10

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 10

tcatgatgat atatttttat cttgtgcaat gtaacatcag

40

<210> 11

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 11

ctccttgat tactgtttat gtaagcagac agttttattg t

41

<210> 12

<211> 47

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 12	
catgctacca catttaagct tccaatttgt tgatagtcac gtgtgag	47
<210> 13	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 13	
gcattgacag aggcgaagaa tg	22
<210> 14	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 14	
ctcgagtgtg tetattacac aggtaccgat gg	32
<210> 15	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 15	
ctcgagccac caccaaaaaa catacaaaca c	31
<210> 16	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 16	
agcagacaat gaaatcgtct ctgtaga	27

<210> 17	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 17	
ttgaattcaa tccagagagt cacatcaact tc	32
<210> 18	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 18	
ataacgcgtg atgattgagg ccgttgac	28
<210> 19	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 19	
ataacgcgta cccgatcttt atactccgac c	31
<210> 20	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 20	
aaggatcccg atggttcct gatcc	25
<210> 21	
<211> 20	

<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 21	
tcccgtggaa tcatgaaagc	20
<210> 22	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 22	
aagcttaaat gaacatcaaa aagtttgcaa aacaag	36
<210> 23	
<211> 46	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 23	
ttgacgtccg gaccgaaacg atctgttcta aacagccgcc atgagc	46
<210> 24	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 24	
aagcatgcaa gttttcgacg ccgacatcat c	31
<210> 25	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 25	
catgggatcc tctagatctg acctgca	27
<210> 26	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 26	
ggtcagatct agaggatccc atggtac	27
<210> 27	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 27	
ttgcatgcgt tggcactgac aagcagacc	29
<210> 28	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 28	
aatctagaac gctcgtgtca acgaccac	28
<210> 29	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	

<400> 29	
tttctagatg acccactgga ggtgaagtc	29
<210> 30	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 30	
ttgtcgaccg tagaaacgcc ctcacagaa c	31
<210> 31	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 31	
aagcatgcaa gtttctgacg ccgacatcat c	31
<210> 32	
<211> 46	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 32	
ttgacgtccg gaccgaaacg atctgttcta aacagccgcc atgagc	46
<210> 33	
<211> 46	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 33	
aagacgtctc caggaggaca tacaatgagc gaacaacttc aggggtg	46

<210> 34	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 34	
aacctgcagg gcgaaaccaa tctgagttcc aa	32
<210> 35	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 35	
ttcgggtccga aggaaaacgt c	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 36	
cctcctggac ttcgtggtgg c	21
<210> 37	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 37	
ggtgaactcg atgctgtgat gc	22
<210> 38	
<211> 29	

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 38

aagcatgcac ctacgccaga agcaattgc

29

<210> 39

<211> 47

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 39

ttgacgtccg gaccgaaacg atctctaaga gacgcgatcc cttttac

47

<210> 40

<211> 47

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 40

aagacgtctc caggaggaca tacagtgagt tggacagttg atatccc

47

<210> 41

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 41

ttctcgagct aagagacgcg atcccttt

28

<210> 42

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 42	
tccacgcaca gattggtag c	21
<210> 43	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 43	
gctgacaaca attgtgtca gc	22
<210> 44	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 44	
ttgcatgctg attgtgaag gcctgcc	27
<210> 45	
<211> 49	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 45	
ttgacgtccg gaccgaaacg atctttaatc gatttctaga tgatgcaac	49
<210> 46	
<211> 45	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	

<400> 46	
aagacgtctc caggaggaca tacaatgagc gcagtgcaga ttttc	45
<210> 47	
<211> 34	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 47	
ttcctgcagg ttagtggctg attgcctcat aagc	34
<210> 48	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 48	
aagacgctga agaatccatg atc	23
<210> 49	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 49	
tatcagccaa agccatgttc tc	22
<210> 50	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 50	
aagcatgcat gaaacacgtg agtgggtctac	30

<210> 51	
<211> 46	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 51	
ttgacgtccg gaccgaaacg atctttaaag gaagcccttt ttggac	46
<210> 52	
<211> 45	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 52	
aagacgtctc caggaggaca tacaatgagt tctccagtct cactc	45
<210> 53	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 53	
aacctgcagg acacatgatg gcaacgtgac c	31
<210> 54	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 54	
aatcgagttg gtcacctata c	21
<210> 55	
<211> 22	

<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 55	
acgtctacat catcacacca gc	22
<210> 56	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 56	
ttgcatgctg cggtagatca gttcacgtgc	30
<210> 57	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 57	
cgacgtagtt gaccatgaca g	21
<210> 58	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 58	
tggtcaacta cgtcgtcatt gctgcggagg agttctc	37
<210> 59	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 59

ttcctgcagg tgattacggg gaatgaggtg agc

33

<210> 60

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 60

tgctcaggta gcaaggaacc

20

<210> 61

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 61

aagtatctcc ggtatttccg agc

23

<210> 62

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 62

aagcatgcaa ctcagcggtc caaacagc

28

<210> 63

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 63	
ggtgagtgat gtgagaaccc	20
<210> 64	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 64	
tcacatcact cacctctcag aagaacacta agtcc	35
<210> 65	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 65	
ttcctgcagg tacatcatcg ttttacacag c	31
<210> 66	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 66	
tctatatcgg ttagccacc tc	22
<210> 67	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 67	
tttcgcagac caatccgaac	20

<210> 68	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 68	
aagcatgcac aaggtcacgt tgaagaac	28
<210> 69	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 69	
catggtgaac tcctaaagaa c	21
<210> 70	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 70	
aggagcctgg catggatatac	20
<210> 71	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 71	
ttcctgcagg tgaaggtcat cagtgtgttt cg	32
<210> 72	
<211> 36	

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 72

ctttaggagt tcacatggg ttctcacatc actcac

36

<210> 73

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 73

ccatgccagg ctccttagt gttcttctga gatgcc

36

<210> 74

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 74

aacctggata agctgctcat gc

22

<210> 75

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 75

acacaacat tgatcagcat gc

22

<210> 76

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 76	
aacctgcagg agtccagtgc gatttcggtt tc	32
<210> 77	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 77	
aatctagaaa cagtggcaat ggatgtacg	29
<210> 78	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 78	
aatctagacc aaactagcat cccgaactag c	31
<210> 79	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 79	
ttgtcgactg ttgatgacat ctgccagtgc	30
<210> 80	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	

<400> 80	
atcaggtcgg ttacttggct c	21
<210> 81	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 81	
ttcagtttcg atgggcatgt ac	22
<210> 82	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 82	
aacctgcagg actgattgcg attcctttgt c	31
<210> 83	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 83	
agaatactgt cgttcatatt ttgg	25
<210> 84	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 84	
gaacgacagt attctctaaa agagtcagta aaacctcgac	40

<210>	85	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	ADN tổng hợp	
<400>	85	
aactcgagaa atggcagagt gatgtgtcc		29
<210>	86	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	ADN tổng hợp	
<400>	86	
ttgctgggtc cagttgttgc		20
<210>	87	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	ADN tổng hợp	
<400>	87	
acgggtcgaat ccaacaggta gc		22
<210>	88	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	ADN tổng hợp	
<400>	88	
ttgtcgactg cagggctcttg atcttgtagc		30
<210>	89	
<211>	24	

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 89

gtgaacctcc aagagagtga aaag

24

<210> 90

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 90

taacccttgg tcaatcttag gg

22

<210> 91

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 91

ttcctgcagg tttggatcaa ttgcagcaaa tg

32

<210> 92

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 92

ctcttggagg ttcacatgac tctacgatct gcattac

37

<210> 93

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 93

gattgaccaa ggggttaaagg gtatcgagta gtttc

35

<210> 94

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 94

atcatgaggg atctggttaag gc

22

<210> 95

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 95

agtctaccc aacgcatatc c

21

<210> 96

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 96

ctcttgagg ttcacatgcg tacatccatt gccactg

37

<210> 97

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 97	
gattgaccaa gggtagttt gggattcccc gctc	34
<210> 98	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 98	
atcatgaggg atctggttaag gc	22
<210> 99	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 99	
agtcctaccc aacgcatac c	21
<210> 100	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 100	
ttcctgcagg ttgggtgac ttgacgatac tgc	33
<210> 101	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 101	
ggtgcagttt agctattagt ttccgaacac gtccgtac	39

<210> 102	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 102	
gaagcaggtt taacgatggg ttctcacatc actcacc	37
<210> 103	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 103	
ttgcatgctg atatctcgac attgctgtgt c	31
<210> 104	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 104	
tagctaaact gcaccactta cc	22
<210> 105	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 105	
cgttaaacct gcttccttgt tac	23
<210> 106	
<211> 21	

<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 106	
ttggttgga gatcagacct g	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 107	
agtctaccc aacgcatatc c	21
<210> 108	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 108	
ttcctgcagg tgcctactg gttcataggt tgc	33
<210> 109	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 109	
ggctttaagc acatctgtgt ctattacaca ggtaccg	37
<210> 110	
<211> 38	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 110

cttcggatct aaacgatacc tcgccaccac caaaaaac

38

<210> 111

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 111

ttgtcgactc aggtgagcga catgttgtag

30

<210> 112

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 112

atcgtttaga tccgaaggaa aa

22

<210> 113

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 113

aagtcagga ggacatacaa tgaccacctt gacgctgt

38

<210> 114

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 114	
gatgtgctta agacccttg tac	23
<210> 115	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 115	
atctgtcga aacggtgacg c	21
<210> 116	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 116	
acgaggggat aaggtgttc tgc	23
<210> 117	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 117	
aaggatcctg tgcatttget ccaaacc	27
<210> 118	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 118	
aacctgcagg ttgaaaaagg gggtagc	28

<210> 119	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 119	
aacctgcagg agcttgaggt attggaacc	29
<210> 120	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 120	
aagtcgacaa aaacatgctc cctgc	25
<210> 121	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 121	
ttcctgcagg agctcatcaa catagaacgc gac	33
<210> 122	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 122	
aacctggga tctaaccctt ctggaatag	29
<210> 123	
<211> 25	

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 123

ttccatgggt tctcacatca ctcac

25

<210> 124

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 124

ctacttagac attgccttag tgttctctg agatgcc

37

<210> 125

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 125

ttccatgggt tctcacatca ctcac

25

<210> 126

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 126

ctacttagac attgccttag tgttctctg agatgcc

37

<210> 127

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 127

agagcgttct tgacaacctg c

21

<210> 128

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 128

ttggcaacca tcgtgatggc c

21

<210> 129

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 129

aacctgcagg cgtgactctg gaagtttgac c

31

<210> 130

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 130

tggttgagtc ctcctttacg

20

<210> 131

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 131	
ctggctgtag ttccacaca ttc	23
<210> 132	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 132	
tagtcgacat catcttgccg ctgattgc	28
<210> 133	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 133	
ggaggactcc aacaatgccc acgccttcgc ag	32
<210> 134	
<211> 34	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 134	
ggaaactaca gccagttact gcggtttgac tggg	34
<210> 135	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 135	
tgtcgacatt gcattgcagc tc	22

<210> 136	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 136	
acacttttga cactgtggtg c	21
<210> 137	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 137	
aacctgcagg cgtgactctg gaagtttgac c	31
<210> 138	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 138	
tgttggagtc ctcctttacg	20
<210> 139	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 139	
aaaaaaagga ttgattcat gcccacgcct tcgcag	36
<210> 140	
<211> 30	

<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 140	
aagcatgcac accttggaac acctagtagc	30
<210> 141	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 141	
ggaggactcc aacaatgcgt acatccattg ccactg	36
<210> 142	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 142	
caaatccttt tttattagt ttgggattcc ccgct	35
<210> 143	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> ADN tổng hợp	
<400> 143	
tgtcgacatt gcattgcagc tc	22
<210> 144	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> ADN tổng hợp

<400> 144

atgacgcatt gcgtcatacc

20

Fig. 1

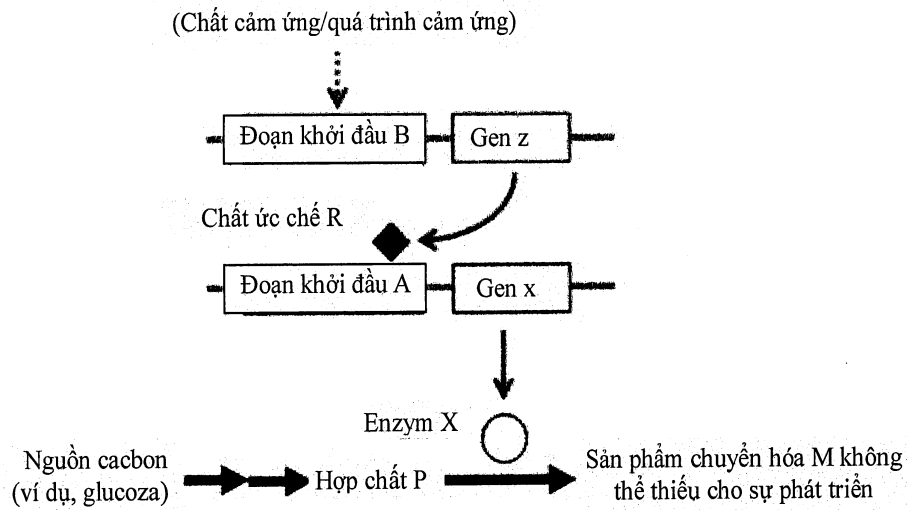


Fig. 2

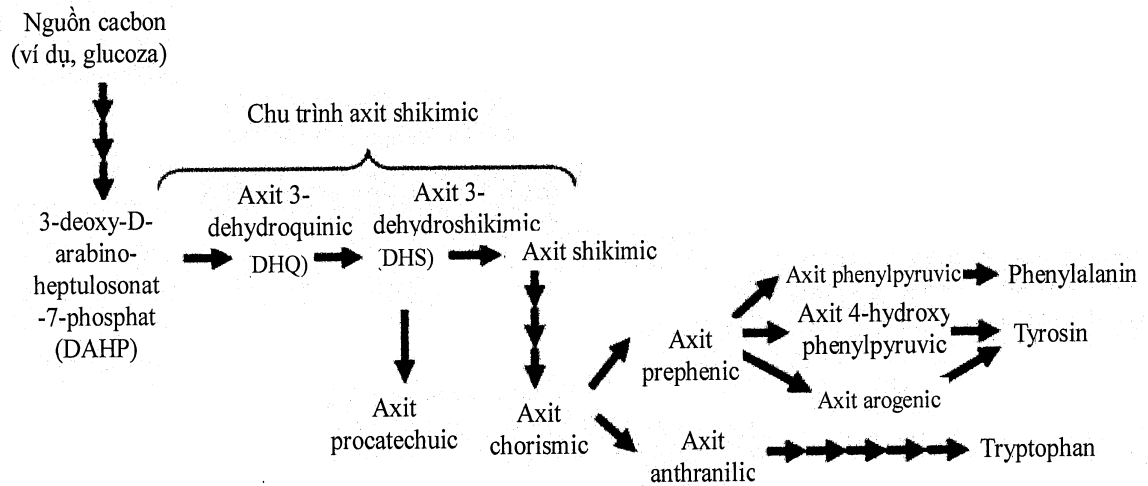


Fig. 3

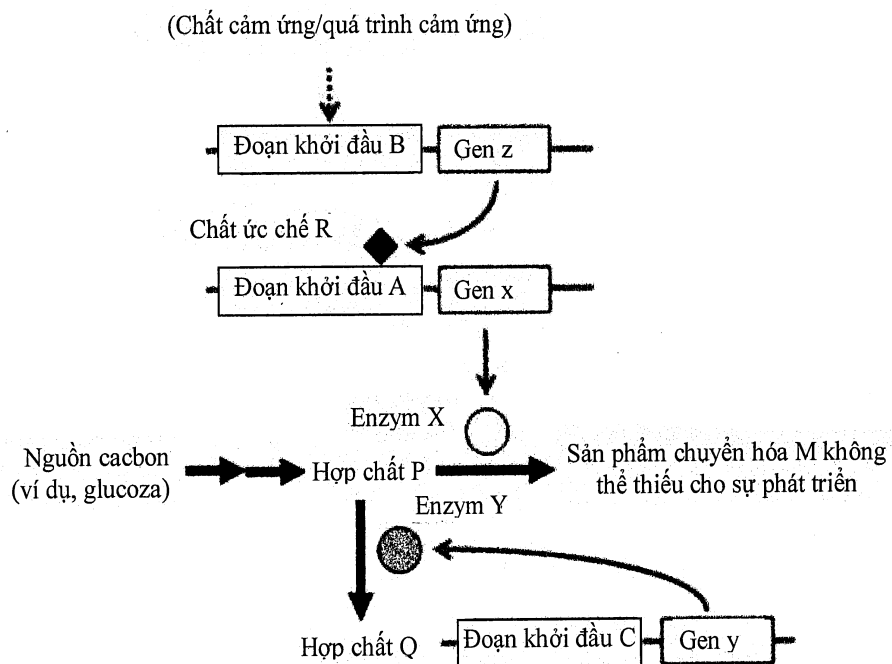


Fig. 4

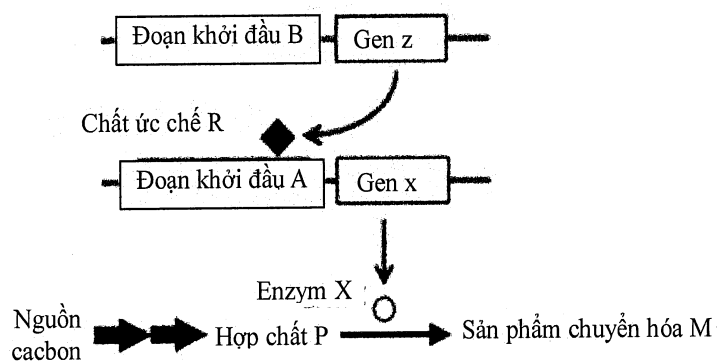


Fig. 5

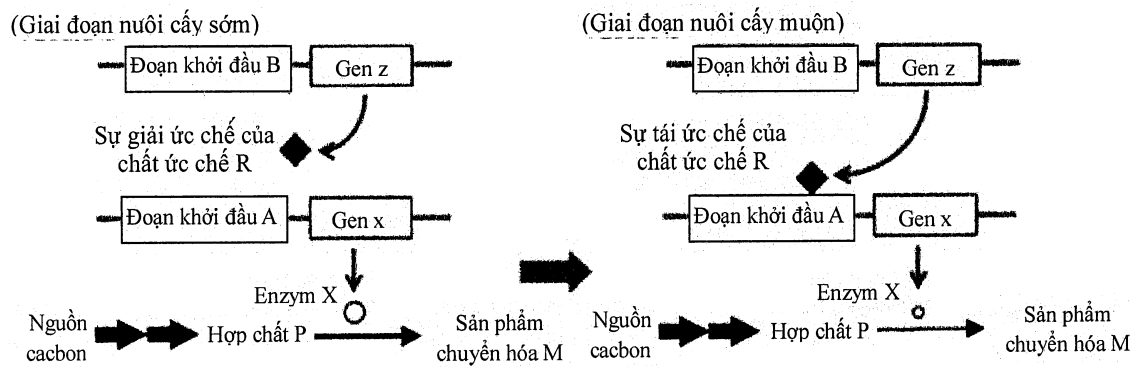


Fig. 6

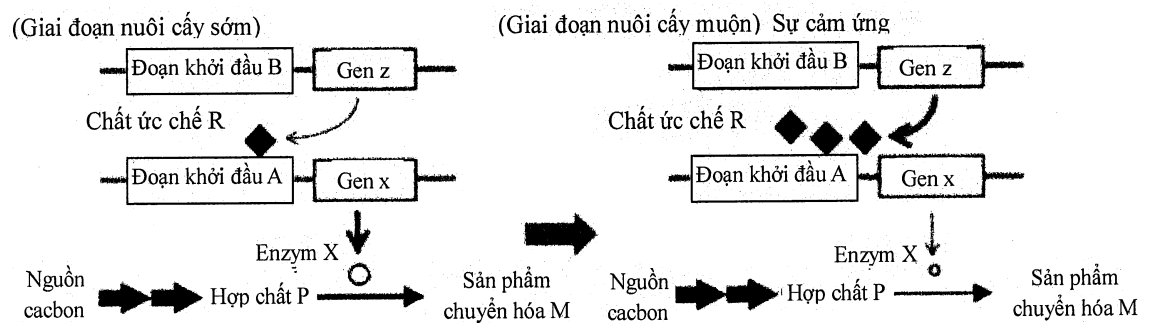


Fig. 7

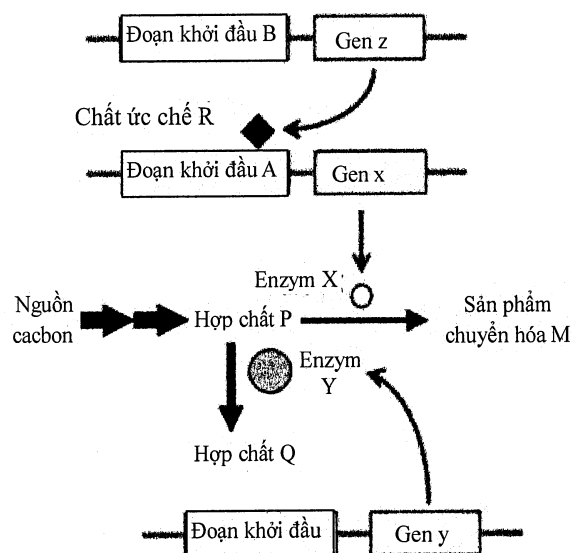


Fig. 8

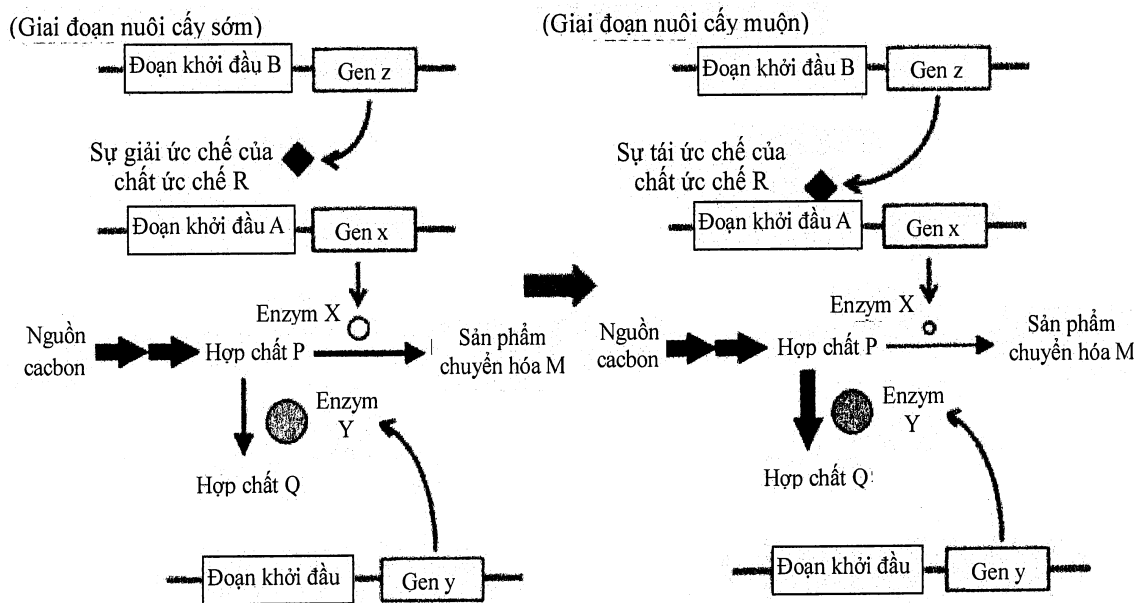


Fig. 9

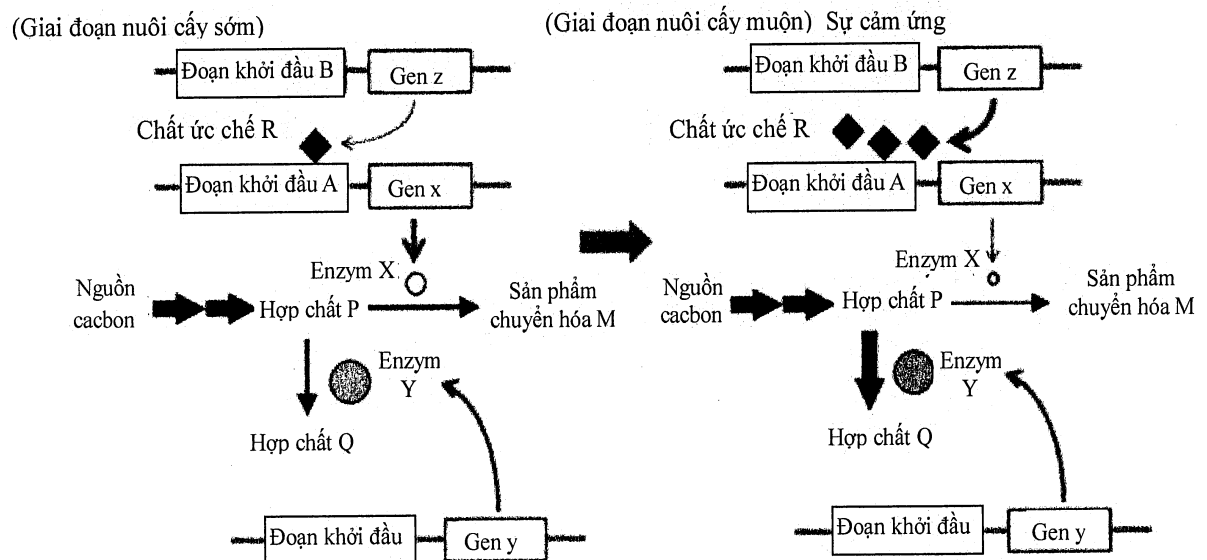


Fig. 10

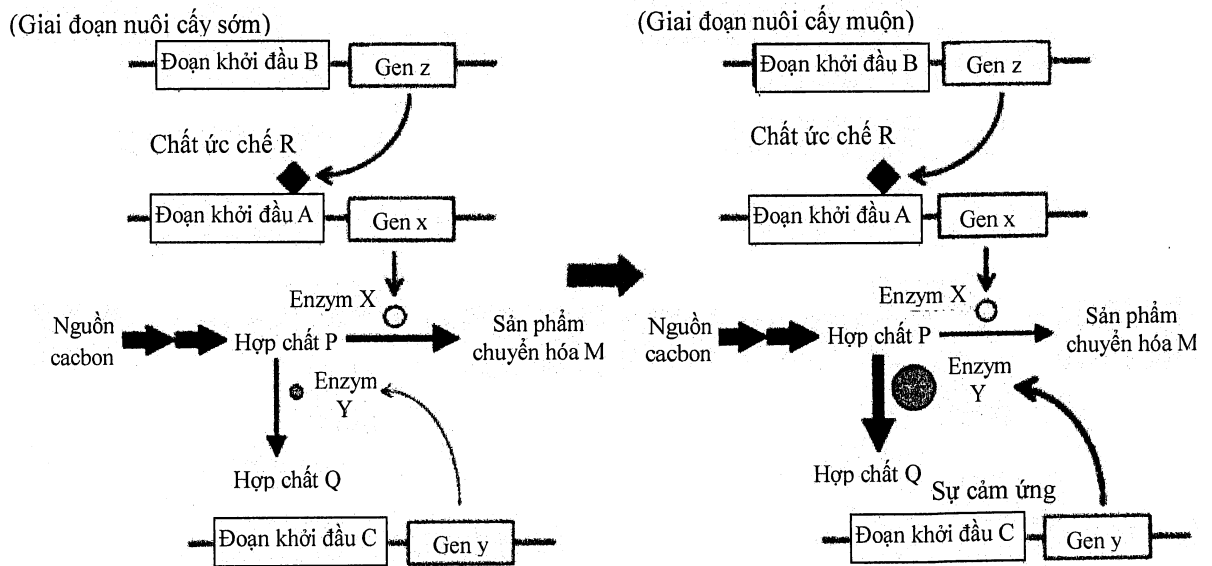


Fig. 11

