

(11) Số bằng	1-0005225		
(45) Ngày công bố	25/11/2005	(51)' IPC	C12N 15/67 , C12P 13/04, C12N 9/02, C12P 13/14, C12P 19/38, C12N 15/52, C12N 9/10, C12N 1/21
(21) Số đơn	1-2000-00576	(22) Ngày nộp đơn	22/09/1999
(86) Số và ngày nộp đơn PCT	PCT/JP99/05175 22/09/1999	(87) Số và ngày công bố quốc tế	WO00/18935 06/04/2000
(30) Số đơn và ngày ưu tiên	10-271786 25.09.1998 JP 10-271787 25.09.1998 JP	(74) Đại diện	Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI
(73) Chủ bằng	AJINOMOTO CO., INC		
(72) Tác giả	Yoko Asakura Jun Nakamura Sohei Kanno Mikiko Suga Eiichiro Kimura Hisao Ito Kazuhiko Matsui Tsuyoshi Ohsumi Tsuyoshi Nakamatsu Osamu Kurahashi		
(54) Tên sáng chế	PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÁC CHỦNG VI KHUẨN SINH RA AXIT AMIN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT AXIT AMIN BẰNG CÁCH LÊN MEN NHỜ SỬ DỤNG VI KHUẨN NÀY		
(57) Tóm tắt	Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra vi khuẩn Coryneform có khả năng sinh ra axit amin hoặc axit nucleic cao hơn bao gồm các bước: gây đột biến trong trình tự đoạn khởi đầu của các gen sinh tổng hợp axit amin hoặc axit nucleic trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform để làm cho nó giống với trình tự liên ứng hoặc làm thay đổi trình tự đoạn khởi đầu của gen sinh tổng hợp axit amin hoặc axit nucleic trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform bằng cách tái tổ hợp gen để làm cho nó giống với trình tự liên ứng để thu được các thể đột biến của vi khuẩn Coryneform sinh ra axit amin hoặc axit nucleic, nuôi cấy các thể đột biến và chọn các thể đột biến có khả năng sinh ra một lượng lớn axit amin hoặc axit nucleic dự định. Phương pháp này có thể tạo ra thể đột biến có khả năng làm tăng hoặc kiểm soát mức độ biểu hiện của gen dự định mà không cần sử dụng plasmit và còn có khả năng sinh ra các axit amin với sản lượng cao bằng cách tái tổ hợp hoặc gây đột biến.		

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chủng đột biến có khả năng sinh ra axit amin với hiệu suất cao, và quy trình sản xuất các axit L-amin bằng cách lên men nhờ các thể đột biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp tạo ra các chủng đột biến dùng để sản xuất axit amin bằng cách lên men có thể được phân loại thành hai phương pháp. Phương pháp thứ nhất bao gồm việc gây các đột biến ngẫu nhiên trong ADN bằng tác nhân gây đột biến hóa học, và phương pháp thứ hai là phương pháp tái tổ hợp di truyền. Trong phương pháp tái tổ hợp di truyền, chủng có

khả năng sinh ra chất dự định được cải thiện có thể được phát triển bằng cách tăng cường chu trình trao đổi chất của gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp chất dự định, hoặc làm suy thoái gen của enzym liên quan đến quá trình phân hủy. Về điều này, để tăng cường gen dự định, plasmid có khả năng tự sao chép độc lập với nhiễm sắc thể trong tế bào chủ yếu được sử dụng.

Tuy nhiên, phương pháp tăng cường gen dự định bằng plasmid có các vấn đề. Cụ thể là, mức làm giàu gen dự định có thể biến đổi tùy thuộc vào số lượng bản sao của bản thân plasmid. Do đó, đối với một số kiểu gen dự định, số lượng bản sao thường quá nhiều và kết quả là quá trình biểu hiện trở nên quá mức, mức độ sinh trưởng bị kìm hãm hoặc khả năng sinh ra chất dự định bị giảm. Trong trường hợp như vậy, mặc dù mức độ tăng cường gen dự định có thể bị giảm bằng cách sử dụng plasmid có số lượng bản sao ít, nhưng tính đa dạng của plasmid bị giới hạn trong nhiều trường hợp, và không thể khống chế được mức độ biểu hiện của gen dự định.

Vấn đề nữa là vì quá trình sao chép của plasmid thường không ổn định, do đó plasmid dễ bị đào thải.

Ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 61-268185 (sau đây viết tắt là "J.P.KOKAI") đề cập đến ADN tái tổ hợp gồm đoạn ADN chứa gen sinh ra glutamat dehydrogenaza (GDH) (gen glutamat dehydrogenaza) thu được từ vi khuẩn *Corynebacterium* sinh ra glutamat, và đoạn ADN (plasmid) chứa gen cần cho quá trình tự sao chép trong tế bào. Trong công bố đơn này còn chỉ ra rằng bằng cách đưa ADN tái tổ hợp vào trong tế bào, chủng giàu GDH có thể được sinh trưởng để nâng cao mức độ sinh ra các chất (như các axit amin và các protein) bằng các vi sinh vật.

Mặt khác, trong Patent Nhật số 2520895, ADN tái tổ hợp nêu trên được đưa vào trong *Corynebacterium* để thu được chủng có hoạt tính enzym được cải thiện, và axit L-glutamic được sản xuất bằng cách lên men nhờ chủng này. Tuy nhiên, mức độ sản xuất và sản lượng của axit L-glutamic là chưa mỹ mãn. Vì vậy, cần tiếp tục nâng cao năng suất axit L-glutamic. Đã có thông báo rằng yêu cầu trên đã đạt được bằng cách đưa ADN tái tổ hợp có hai loại gen, đó là gen sinh ra glutamat-dehydrogenaza thu được từ vi khuẩn *Corynebacterium* sinh ra glutamat, và gen isoxitrat dehydrogenaza (ICDH), vào trong vi khuẩn *Corynebacterium* sinh ra glutamat.

Hơn nữa, JP KOKAI số 6-502548 còn đề cập đến hệ biểu hiện và hệ tiết của *Corynebacterium* gồm có chủng *Corynebacterium* và cắt xét tiết gồm trình tự ADN chức năng thứ nhất để biểu hiện trong chủng này, trình tự ADN thứ hai mã hóa các axit amin, các polypeptit và/hoặc các protein và trình tự ADN thứ ba được xen vào giữa trình tự ADN thứ nhất và trình tự ADN thứ hai, trong đó trình tự ADN thứ ba mã hóa thành phần protein được chọn từ PS1 và PS2 bảo đảm quá trình tiết các axit amin, các polypeptit và/hoặc các protein. Cụ thể là, quá trình tiết các polypeptit được chỉ ra ở đây và cụ thể là quá trình phát sinh đột biến NTG được tiến hành bằng *Corynebacterium* và thể đột biến kháng 4-floglutamat (4FG) là giống với glutamat được chọn và được tiến hành biến nạp với PCGL141. Đã chỉ ra rằng chủng có mức độ biểu hiện GDH được tăng cường có thể thu được từ vi khuẩn kháng tương tự. Cũng chỉ ra trong công bố này rằng quá trình đột biến được phát hiện trong trình tự nucleotit từ nucleotit 251 đến nucleotit 266 của đoạn khởi đầu GDH.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra thể đột biến có khả năng tăng cường hoặc kiểm soát thích hợp mức độ biểu hiện của gen dự định mà không cần sử dụng plasmid và còn có khả năng sinh ra các axit amin với sản lượng cao, bằng cách tái tổ hợp gen hoặc gây đột biến.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất đoạn khởi đầu của GDH có khả năng truyền khả năng sinh ra axit glutamic với sản lượng cao cho chủng *Corynebacterium* mà không làm tăng đáng kể lượng sản phẩm phụ là axit aspartic và alanin.

Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất gen GDH có trình tự đoạn khởi đầu của GDH nêu trên.

Một mục đích khác theo sáng chế là đề xuất chủng *Corynebacterium* có gen nêu trên và có khả năng sinh ra axit L-glutamic.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất axit amin bằng cách lên men trong đó vi sinh vật sinh ra axit amin được tạo ra như trên được sử dụng.

Mục đích tiếp theo của sáng chế là đề xuất quy trình lên men để sản xuất axit glutamic với giá thành thấp bằng cách tăng sản lượng của axit glutamic nhờ sử dụng vi khuẩn *Coryneform* sinh ra axit glutamic.

Sáng chế đã được hoàn thành trên cơ sở các phát hiện rằng các vấn đề nêu trên có thể được giải quyết một cách hữu hiệu bằng cách biến đổi đoạn khởi đầu của các gen sinh tổng hợp axit amin trên nhiễm sắc thể để kiểm soát mức độ biểu hiện của các gen dự định. Cụ thể, sáng chế được hoàn thành trên cơ sở các phát hiện rằng vấn đề nêu trên có thể được giải quyết một cách hữu hiệu bằng cách gây đột biến đặc hiệu trong vùng 35 hoặc vùng 10 là vùng đặc hiệu của đoạn khởi đầu.

Tóm lại, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất vi khuẩn *Coryneform* có khả năng sinh ra axit nucleic hoặc axit amin cao hơn, phương pháp này bao gồm các bước gây đột biến trong trình tự đoạn khởi đầu của các gen sinh tổng hợp axit nucleic hoặc axit amin trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn *Coryneform* để làm cho nó giống với trình tự liên ứng hoặc làm thay đổi trình tự đoạn khởi đầu các gen sinh tổng hợp axit nucleic hoặc axit amin trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn *Coryneform* bằng cách tái tổ hợp gen để làm cho nó giống với trình tự liên ứng, để thu được các thể đột biến của vi sinh vật *Coryneform* sinh ra axit nucleic hoặc axit amin, nuôi cấy các thể đột biến, và chọn thể đột biến có khả năng sinh ra axit amin hoặc axit nucleic dự định với lượng lớn.

Sáng chế cũng đề xuất đoạn khởi đầu của gen sinh ra glutamat dehydrogenaza (GDH), gen này có trình tự của (i) ít nhất một trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm có CGGTCA, TTGTCA, TTGACA và TTGCCA ở vùng 35, (ii) trình tự TATAAT hoặc trình tự tương tự TATAAT nhưng trong đó bazơ của ATAAT được thay bằng bazơ khác ở vùng 10 hoặc (iii) trình tự kết hợp giữa trình tự (i) và trình tự (ii), trong đó trình tự này không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu.

Sáng chế còn đề xuất gen sinh ra glutamat dehydrogenaza có đoạn khởi đầu nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất vi sinh vật *Coryneform* sinh ra L-glutamat có gen nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất axit amin bằng cách lên men, bao gồm các bước nuôi cấy vi khuẩn *Coryneform* được tạo ra bằng phương pháp nêu trên và có khả năng sinh ra axit amin cao hơn trong môi trường nuôi cấy để sinh ra và tích lũy axit amin dự định trong môi trường, và thu gom axit amin từ môi trường này.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất axit L-glutamic bằng cách lên men, bao gồm các bước nuôi cấy vi sinh vật sinh ra axit L-glutamic kháng axit 4- floglutamic trong môi trường lỏng để sinh ra và tích lũy axit L-glutamic trong môi trường này, và thu gom axit L-glutamic từ môi trường này.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sơ đồ cấu trúc gen GDH có đoạn khởi đầu đột biến.

Fig.2 thể hiện sơ đồ cấu trúc gen cs có đoạn khởi đầu đột biến.

Fig.3 thể hiện sơ đồ cấu trúc vật chủ hình thoi mang LacZ như gen báo cáo.

Phương án tốt nhất để thực hiện sáng chế

Thuật ngữ "vi sinh vật Coryneform sinh ra axit glutamic" như được sử dụng ở đây còn bao gồm vi khuẩn được phân loại trước đây là giống *Brevibacterium* nhưng hiện nay được hợp nhất vào trong giống *Corynebacterium* [Int.J.Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)] và vi khuẩn thuộc giống *Brevibacterium* có quan hệ mật thiết với giống *Corynebacterium*. Vì vậy, các thể đột biến được sử dụng trong sáng chế có thể thu được từ vi khuẩn Coryneform sinh ra axit glutamic của giống *Brevibacterium* hoặc *Corynebacterium* được thể hiện dưới đây. Vi khuẩn của giống *Corynebacterium* và *Brevibacterium* sẽ được gọi chung là "vi khuẩn Coryneform" miễn là chúng không liên quan đến khả năng sinh ra axit glutamic

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806 *Corynebacterium callunae* ATCC15991 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 *Corynebacterium lilium* ATCC15990 *Brevibacterium flavum* ATCC14067 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965

Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066 *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068 *Brevibacterium roseum* ATCC13825 *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC19240 *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354 *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ12310 (FERM 9246)

Các axit amin được sản xuất không bị giới hạn cụ thể miễn là các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp và các đoạn khởi đầu của nó được giải thích rõ ràng. Các ví dụ về các enzym hữu hiệu liên quan đến quá trình sinh tổng hợp bao gồm GDH, xitrat syntaza (CS), isoxitrat dehydrogenaza (ICDH), pyruvat dehydrogenaza (PDH) và aconitaza (ACO) để lên men axit glutamic.

Các enzym để lên men lyzin là các enzym sinh tổng hợp như aspartat kinaza (AK), dihydrodipicolinat syntaza, dihydrodipicolinat reductaza, diaminopimelat dehydrogenaza và diaminopimelat decarboxylaza cũng là hữu hiệu. Protein lysin không bị khủng hoảng (gen lysE) liên quan đến màng không bị khủng hoảng của lysin cũng là hữu hiệu.

Các enzym hữu hiệu để lên men arginin là N-axetylglutamat syntaza, N-axetylglutamat kinaza, N-axetylglutamyl phosphat reductaza, axetylornithin aminotransferaza, N-axetylornithinaza, ornithin carbamyltransferaza, argininosuccinat syntaza, và argininosuccinaza. Arginin được tạo ra bằng phản ứng được xúc tác bởi các enzym này. Các enzym này là hữu hiệu. Các enzym này lần lượt được mã hóa bởi các gen argA, argB, argC, argD, argE, argF, argG và argH.

Các enzym hữu hiệu để lên men serin là axit 3-phosphoglyxeric dehydrogenaza, phosphoserin transamylaza, phosphoserin phosphataza và enzym tương tự.

Các enzym hữu hiệu để lên men phenylalanin là các enzym sinh tổng hợp như deoxyarabinohepturonic phosphat synthetaza, 3-dehydrokinat synthetaza, axit 3-dehydrokinic dehydrataza, axit shikimic dehydrogenaza, kinaza shikimic, axit

5-enol pyruvylshikimic-3-phosphat synthetaza, axit chorismic enzym tổng hợp, chorismat synthetaza, chorismat mutaza, prephenat dehydrataza, và enzym tương tự. Các enzym

chuyển hóa đường như transketoraza, transaldolaza, axit phosphoenolpyruvic enzym tổng hợp cũng là hữu hiệu.

Các enzym hữu hiệu để lên men tryptophan là các enzym thuộc operon tryptophan, ngoài các enzym hữu hiệu khác trong quá trình lên men phenylalanin nêu trên và các enzym hữu hiệu trong quá trình lên men serin nêu trên.

Các enzym hữu hiệu để lên men prolin là γ -glutamylkinaza, γ -glutamylxemialdehyt dehydrogenaza, pyrolin-5-carboxylat reductaza, ngoài các enzym khác hữu hiệu trong quá trình lên men axit glutamic nêu trên.

Các enzym hữu hiệu để lên men glutamin là glutamin synthetaza, ngoài các enzym hữu hiệu khác trong quá trình lên men axit glutamic nêu trên.

Trong quá trình sản xuất inosin, được cho là hữu ích để tăng cường mức độ biểu hiện là 5-phosphoribosyl, 1-diphosphat synthetaza, 5-phosphoribosyl 1-diphosphat aminotransferaza, phosphoribosylaminoimidazolecarboxamit formyl transferaza và enzym tương tự.

Trong quá trình sản xuất guanosin, được cho là hữu ích để tăng cường mức độ biểu hiện là axit 5'-inosinic dehydrogenaza và axit 5'-xantyllic aminaza, ngoài 5-phospholibosyl 1-diphosphat synthetaza, 5-phospholibosyl 1-diphosphat aminotransferaza, phosphoribosylaminoimidazolecarboxamit formyltransferaza và enzym tương tự.

Trong quá trình sản xuất adenosin, được cho là hữu ích để tăng cường mức độ biểu hiện là adenirosucxinat syntaza, ngoài enzym tổng hợp axit 5-phosphoribosyl 1-diphosphoic, axit 5-phosphoribosyl 1-diphosphoric amino transferaza, phosphoribosylaminoimidazolecarboxamit formyltransferaza và enzym tương tự.

Trong quá trình sản xuất nucleotit, được coi là hữu ích để tăng cường sự biểu hiện là phosphoribosyl transferaza, inosin kinaza, guanosin kinaza và adenosin kinaza.

Theo sáng chế, thể đột biến của các vi khuẩn Coryneform sinh ra axit amin được thu bằng cách gây đột biến trong trình tự đoạn khởi đầu của các gen sinh tổng hợp axit amin dự định trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn Coryneform sinh ra axit amin, như trình tự đoạn khởi đầu nêu trên của GDH, làm cho nó giống với trình tự liên ứng bằng phương pháp hóa học hoặc gây đột biến bằng cách tái tổ hợp di truyền để thu được thể đột biến của vi sinh vật Coryneform sinh ra axit amin.

Thuật ngữ "trình tự liên ứng" là trình tự xuất hiện thường xuyên trong các trình tự đoạn khởi đầu khác. Các trình tự liên ứng này là, ví dụ, trình tự của E. coli và Bacillus subtilis. Trình tự liên ứng của E. coli được mô tả trong bài báo Diane K. Hawley and William R. McClure Nucleic Acid. Res. 11:2237-2255 (1983), và trình tự liên ứng của B. subtilis được mô tả trong bài báo: Charles và các đồng tác giả. Mol. Gen. Genet 186:339-346 (1982).

Quá trình đột biến có thể được gây ra trong hoặc chỉ ở một trình tự đoạn khởi đầu như đoạn khởi đầu của GDH hoặc hai hoặc nhiều trình tự đoạn khởi đầu như các đoạn khởi đầu của GDH, xitrat syntaza (enzym tổng hợp xitrat) (CS) và isoxitrat syntaza (isoxitrat dehydrogenaza) (ICDH).

Theo sáng chế, thể đột biến thu được như vậy được nuôi cấy để thu thể đột biến có khả năng sinh ra axit amin dự định với lượng lớn.

Đã giải thích rằng trong quá trình lên men axit glutamic, GDH thu được từ vi sinh vật Coryneform sinh ra glutamat có sẵn trình tự đoạn khởi đầu ở phía đầu trên của nó [Sahm và các đồng tác giả., Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326].

Ví dụ, đoạn khởi đầu của GDH theo sáng chế, gen GDH có trình tự đoạn khởi đầu của GDH và chủng *Corynebacterium* sinh ra L-glutamat có gen này có thể thu được, ví dụ, theo các phương pháp sau:

Cụ thể, chủng được xử lý gây phát sinh đột biến như chiếu tia uv, tia X hoặc bức xạ, hoặc xử lý bằng tác nhân gây đột biến để thu được chủng kháng axit 4-floglutamic trên môi trường nuôi cấy đĩa thạch chứa axit 4-floglutamic. Đó là, các tế bào được gây đột biến được dàn đều trên các đĩa môi trường nuôi cấy thạch chứa axit 4-floglutamic với nồng độ ức chế quá trình sinh trưởng của chủng bố mẹ, và thể đột biến được sinh trưởng như vậy được phân lập.

Hơn nữa, trình tự đoạn khởi đầu của các gen GDH có thể được thay thế bằng các trình tự được biến đổi khác nhau bằng cách phát sinh đột biến định hướng điểm, và mối quan hệ giữa các trình tự tương ứng và hoạt tính GDH được thử nghiệm để chọn các gen có khả năng sinh ra L-glutamat cao.

Được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế trình tự ADN ở vùng 35 của đoạn khởi đầu của gen sinh ra GDH là ít nhất một trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm CGGTCA, TTGTCA, TTGACA và TTGCCA và/hoặc trình tự ADN ở vùng 10 của đoạn khởi đầu là TATAAT, hoặc các bazơ của ATAAT trong trình tự TATTAT ở vùng 10 được thay bằng bazơ khác, khi đó chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Nguyên nhân mà chủng trong đó các bazơ của ATAAT trong trình tự TATA AT ở vùng 10 được thay thế bằng bazơ khác và chức năng của đoạn khởi đầu không bị ức chế có thể được chọn là như sau: Vì mức độ hoạt tính đặc hiệu của GDH tăng đáng kể được quan sát bằng cách chỉ thay "C" đầu tiên của CATAAT bằng "T" trong trình tự lo kiểu đại (được ký hiệu là p6-4 trong bảng 1), nên đã cho rằng có khả năng thay thế bằng bazơ khác.

Trình tự đoạn khởi đầu của gen GDH được mô tả trong, ví dụ bài báo: Sahm et al., *Molecular Microbiology* (1992), 6, 317-326 nêu trên. Trong bài báo này, trình tự đoạn khởi đầu được mô tả là Seq ID No.1. Trình tự của chính gen GDH cũng được mô tả trong bài báo: Sahm et al., *Molecular Microbiology* (1992), 6, 317-326 là Seq ID No.1.

Tương tự, sự đột biến có thể được tạo ra trong đoạn khởi đầu của enzym tổng hợp xitrat (CS) hoặc isoxitrat dehydrogenaza (ICDH).

Như vậy, các đoạn khởi đầu của GDH là các đoạn có ít nhất một trình tự ADN ở vùng 10 được chọn từ nhóm bao gồm CGGTCA, TTGTCA, TTGACA và TTGCCA ở vùng 35 và/hoặc trình tự TATAAT hoặc trình tự TATAAT nhưng trong đó bazơ của ATAAT được thay bằng bazơ khác, ở đây chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Các gen sinh ra glutamat dehydrogenaza có đoạn khởi đầu nêu trên cũng được đề xuất trong sáng chế.

Các đoạn khởi đầu của cs là các đoạn có trình tự TTGACA ở vùng 35 và/hoặc trình tự TATAAT ở vùng 10, mà chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Các gen cs có đoạn khởi đầu nêu trên cũng được đề xuất trong sáng chế.

Các đoạn khởi đầu của ICDH là các đoạn có trình tự TTGCCA hoặc TTGACA trong đoạn khởi đầu thứ nhất hoặc đoạn khởi đầu thứ hai ở vùng 35 và/hoặc trình tự TATA AT trong đoạn khởi đầu thứ nhất hoặc thứ hai ở vùng 10 mà chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Các gen icd có đoạn khởi đầu nêu trên cũng được đề xuất trong sáng chế.

Các đoạn khởi đầu của PDH là các đoạn có trình tự TTGCCA ở vùng 35 và/hoặc trình tự TATA AT ở vùng 10, mà chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Các gen PDH có đoạn khởi đầu nêu trên cũng được đề xuất trong sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vi khuẩn *Coryneform* sinh ra L-glutamat có các gen nêu trên.

Các đoạn khởi đầu của algininosuccinat syntaza là các đoạn có ít nhất một trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm TTGCCA, TTGCTA, và TTGTCA ở vùng 35 và/hoặc trình tự TATAA ở vùng 10, hoặc bazơ của ATAAT trong đoạn TATAAT được thay bằng bazơ khác, mà chúng không ức chế chức năng của đoạn khởi đầu. Gen argininosuccinat syntaza có đoạn khởi đầu nêu trên cũng được đề xuất trong sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vi khuẩn Coryneform sinh ra arginin có các gen nêu trên.

Các axit amin có thể được thu nhận bằng cách nuôi cấy vi khuẩn Coryneform theo sáng chế, vi khuẩn này sinh ra axit amin, tốt hơn là axit L-glutamic, trong môi trường nuôi cấy lỏng để tạo ra và tích lũy axit amin dự định, tốt hơn là axit L-glutamic, và thu gom axit amin từ môi trường nuôi cấy. -li-

Môi trường nuôi cấy lỏng được sử dụng để nuôi cấy chủng nêu trên của vi khuẩn theo sáng chế là môi trường dinh dưỡng thông thường chứa nguồn cacbon, các nguồn nitơ, các muối vô cơ, các nhân tố sinh trưởng, V.V..

Các nguồn cacbon bao gồm các hydratcacbon như glucoza, fructoza, sucroza, ri đường và các dịch thủy phân tinh bột, các rượu như etanol và glyxerol; và các axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn nitơ bao gồm amoni sulfat, amoni nitrat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni axetat, amoniac, pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men và nước ngô luộc. Khi các thể đột biến khuyết dưỡng được sử dụng, các chất cần thiết được bổ sung vào môi trường này như các chất phản ứng hoặc các chất tự nhiên chứa chúng.

Vi khuẩn Coryneform thường sinh ra axit L-glutamic trong điều kiện biotin được giảm. Do đó, lượng biotin trong môi trường bị giới hạn hoặc chất ức chế tác dụng của biotin như chất hoạt động bề mặt hoặc penixilin được bổ sung.

Tốt hơn là, quá trình lên men được tiến hành bằng cách khuấy môi trường hoặc lắc môi trường này để thông khí, trong khi độ pH của dịch nuôi cấy được giữ nằm trong khoảng từ 5 đến 9 trong thời gian 2 đến 7 ngày. Tốt hơn là, độ pH được điều chỉnh bằng urê, canxi cacbonat, khí amoniac, nước amoniac hoặc chất tương tự. Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 24 đến 37°C.

Axit L-glutamic được sinh ra và tích lũy như vậy trong dịch nuôi cấy được thu gom bằng phương pháp thông thường như phương pháp nhựa trao đổi ion hoặc phương pháp kết tinh. Cụ thể, axit L-glutamic được tách bằng cách hấp phụ lên nhựa trao đổi anion hoặc bằng cách kết tinh trung hòa.

Theo sáng chế, axit amin dự định có thể thu được với sản lượng cao bằng cách gây đột biến trong đoạn khởi đầu của các gen sinh tổng hợp axit amin của vi khuẩn Coryneform sinh ra axit amin để kiểm soát mức độ biểu hiện của các gen dự định. Ngoài ra, không có sự đào thải của các gen dự định trong vi khuẩn theo sáng chế, trái với các trường hợp có sử dụng plasmid, nên axit amin dự định có thể thu được với sản lượng cao. Như vậy, khả năng áp dụng công nghiệp của sáng chế là lớn.

Sáng chế đề xuất các đoạn khởi đầu khác, cụ thể là các đoạn khởi đầu của GDH, có thể mang lại khả năng sinh ra các axit amin, cụ thể là axit glutamic, với sản lượng cao cho các chủng Corynebacterium mà không làm tăng lượng sản phẩm phụ axit aspartic và alanin.

Theo sáng chế, vi khuẩn Coryneform sinh ra L-glutamat được gây đột biến, chủng đột biến trong đoạn khởi đầu của gen GDH và kháng axit 4-floglutamic được thu gom, và chủng này được nuôi cấy để thu được axit glutamic với sản lượng cao. Như vậy, sáng chế rất hữu ích trong ngành công nghiệp lên men.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ I: Tạo ra đoạn khởi đầu GDH đột biến

Đoạn khởi đầu GDH đột biến được tạo ra bằng phương pháp phát sinh đột biến định hướng điểm như sau:

(1) Tạo ra các gen GDH có các đoạn khởi đầu đột biến khác nhau

Trình tự kiểu dại ở vùng 35 và vùng 10 của đoạn khởi đầu của gen GDH của vi khuẩn *Coryneform* được thể hiện trên trình tự 1. Trình tự đoạn khởi đầu của trình tự kiểu dại đã được công bố [Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326].

Phương pháp tạo ra plasmit mang gen GDH có đoạn khởi đầu đột biến là như sau:

Như được thể hiện trên Fig. I, gen của nhiễm sắc thể của chủng kiểu dại của vi khuẩn *Coryneform* ATCC13869 được tạo ra bằng "kit tinh chế ADN của hệ gen vi khuẩn" (Advanced Genetic Technologies Corp.) được sử dụng làm khuôn mẫu cho kỹ thuật PCR. Quá trình khuếch đại gen được tiến hành bằng kỹ thuật PCR có sử dụng các trình tự phía đầu trên và phía đầu dưới của gen GDH. Cả hai đầu đều được làm bằng đầu. Sản phẩm thu được như vậy được xen vào vị trí SmaI của plasmit pHSK 399 (sản phẩm của Takara Shuzo Co., Ltd). Sau đó điểm khởi đầu sao chép thu được từ plasmit pSAK4 có điểm khởi đầu sao chép có khả năng sao chép trong vi khuẩn *Coryneform* được đưa vào vị trí SalI của plasmit để thu được plasmit pGDH. Theo phương pháp này, các gen GDH có từng đoạn khởi đầu nêu trên có thể thu được nhờ sử dụng đoạn mỗi có từng trình tự trong số các trình tự Seq ID No. 1 đến Seq ID No.6 lần lượt được thể hiện trong Danh mục trình tự là đoạn mỗi phía đầu trên của gen GDH. Đã xác nhận bằng cách xác định trình tự đoạn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR được rằng không có sự đột biến khác ngoài sự đột biến được tạo ra trong trình tự đoạn khởi đầu, trong đoạn được khuếch đại. pSAK4 được tạo ra như sau: plasmit pSK4 thu được trước đây [J.P.KOKAI số 5-7491) có điểm khởi đầu tự sao chép thu được từ plasmit pHM 1519 [Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1989)], nó có thể tự sao chép trong vi sinh vật *Corynebacterium*, được cắt bằng các enzym giới hạn BamHI và KpnI để thu được trình tự ADN có điểm khởi đầu sao chép. Tiếp theo, đoạn thu được như vậy được làm bằng đầu bằng kit làm bằng đầu ADN (kit làm bằng đầu do Takara Shuzo Co. Ltd. sản xuất). Sau khi ghép nối với đoạn nối Sail, sản phẩm thu được như vậy được xen vào vị trí Sail của pHSK299 (sản phẩm của Takara Shuzo Co., Ltd.) để thu được plasmit pSAK4.

(2) So sánh mức độ biểu hiện của GDH có từng trình tự đoạn khởi đầu

Mỗi plasmit được tạo ra như nêu trên được đưa vào trong chủng kiểu dại của vi khuẩn *Coryneform* ATCC13869 bằng phương pháp xung điện (xem J.P.KOKAI số 2-207791). Để so sánh mức độ biểu hiện của GDH của các chủng này, hoạt tính đặc hiệu của GDH được xác định bằng phương pháp nêu trên của Sahm và các đồng tác giả. Các kết quả được thể hiện trong Bảng I.

Bảng I Chủng

Trình tự đoạn khởi đầu

Hoạt tính đặc hiệu của GDH

Giá trị tương đối 35 10 ATCC13869 TGGTCA CATAAT 7,7 0,1 /pGDH TGGTCA CATAAT 82,7 1,0 /p6-2 CGGTCA CATAAT 33,1 0,4 /p6-4 TGGTCA TATAAT 225,9 2,7 /p6-3 TTGACA TATAAT 327,2 4,0 /p6-7 TTGCCA TATAAT 407,0 4,9 /p6-8 TTGTCA TATAAT 401,3 4,9

Từ ATCC13869/ p6-2 đến ATCC13869/p6-8 lần lượt tương ứng với các trình tự từ Seq ID No.2 đến Seq ID No.6. Các trình tự này là tương tự với trình tự số 1 (kiểu đại) ngoại trừ các phần được gạch dưới được thay đổi như sau:

Trình tự

No. 1 5'-TTAATTCTTTGTGGTCATATCTGCGACACTGCCATAATTTGAACGT-3'

No.2 CGGTCA CATAAT

No.3 TGGTCA TATAAT

No.4 TTGACA TATAAT

No.5 TTGCCA TATAAT

No.6 TTGTCA TATAAT

Các trình tự này là trình tự ADN sợi kép mạch thẳng tổng hợp. Ví dụ 2: Tạo ra các chủng đột biến (I) Tạo ra các chủng đột biến kháng axit 4-floglutamic

AJ13029 là chủng đột biến sinh ra axit glutamic và được công bố trong WO96/06180. Mặc dù nó không sinh ra axit glutamic ở nhiệt độ nuôi cấy là 31,5°C, nhưng nó vẫn sinh ra axit glutamic dù thiếu tác nhân ức chế biotin khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên 37°C. Trong ví dụ này, chủng *Brevibacterium lactofermentum* AU 3029 được sử dụng làm chủng bố mẹ để tạo ra các chủng đột biến. Như thường lệ, bất kỳ chủng nào trong số các chủng sinh ra axit glutamic khác AJ13029 có thể được sử dụng làm chủng bố mẹ để tạo ra các chủng đột biến kháng axit 4-floglutamic.

AU 3029 được nuôi cấy trên môi trường thạch CM2B (Bảng 2) ở 31,5°C trong 24 giờ để thu các tế bào vi khuẩn. Các tế bào được xử lý bằng dung dịch nước N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin 250µg/ml ở 30°C trong 30 phút. Sau đó huyền phù tế bào có tỷ lệ sống sót là 1% được dàn đều lên môi trường nuôi cấy đĩa thạch (Bảng 3) chứa axit 4-floglutamic (4FG). Các khuẩn lạc được tạo ra sau khi ủ đĩa ở 31,5°C trong thời gian từ 20 đến 30 giờ. Trong thử nghiệm này, môi trường thạch nghiêng chứa 1mg/ml 4FG được chuẩn bị lúc đầu, và sau đó một lớp môi trường tương tự không chứa 4FG được tạo ra trên đó theo chiều ngang. Như vậy, thu được gradien nồng độ 4FG trên bề mặt của môi trường thạch. Khi đĩa được cấy các tế bào đột biến thu được như đã mô tả, đường giới hạn được tạo ra ở đường biên giới hạn sinh trưởng của chúng. Các chủng vi khuẩn tạo ra các khuẩn lạc nằm trong vùng chứa 4FG có nồng độ cao hơn nồng độ của đường giới hạn được tạo ra. Như vậy, thu được khoảng 50 chủng kháng 4FG từ khoảng 10.000 tế bào được gây đột biến.

Bảng 2: Môi trường thạch CM2B

Thành phần

Nồng độ

Polypepton (Nippon Seiyaku Co.) 1,0%

Dịch chiết nấm men (Difco. Co.) 1,0% NaCl 0,5% d-biotin 10µg/l Thạch 1,5%

(độ pH = 7,2: được điều chỉnh bằng KOH)

Bảng 3. Môi trường thạch

Thành phần

Hàm lượng trong một lít nước Glucoza 10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,01g

Thiamin hydroclorua 0,2mg d-Biotin 0,05mg

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 5g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7,1g KH_2PO_4 1,36g Thạch 15g

(2) Xác định khả năng sinh ra axit L-glutamic của các chủng đột biến kháng 4FG

Khả năng sinh ra axit glutamic của khoảng 50 chủng đột biến thu được theo điểm (1) trên đây và chủng bố mẹ AJ13029 được xác định như được mô tả dưới đây.

Chủng AJ13029 và chủng đột biến, mỗi chủng được nuôi cấy trên môi trường thạch CM2B ở 31,5°C trong thời gian từ 20 đến 30 giờ. Môi trường lỏng có thành phần được thể hiện là "môi trường A" trong Bảng 4 được cấy các tế bào thu được như vậy, và quá trình nuôi cấy lắc được bắt đầu ở nhiệt độ là 31,5°C. Khoảng 22 giờ sau đó, môi trường mới được bổ sung vào sao cho nồng độ cuối cùng của môi trường B sẽ được thể hiện trong Bảng 4. Nhiệt độ được tăng lên 37°C và sau đó tiếp tục nuôi cấy trong khoảng 24 giờ. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, dịch nuôi cấy được kiểm tra bằng thiết bị Biotic Analyzer (sản phẩm của Asahi Chemical Industry, Co., Ltd) để xác định xem axit L-glutamic có được tạo ra hay không. Đã phát hiện ra rằng, khi 50 chủng được nuôi cấy, hai chủng có sản lượng axit glutamic cao hơn sản lượng thu được từ các chủng bố mẹ và hoạt tính GDH cao được phân lập (chủng A và chủng B). Hoạt tính GDH của từng chủng trong số các chủng được xác định để tìm ra hoạt tính GDH đặc hiệu của hai chủng trong số đó được gia tăng (Bảng 5). Hoạt tính GDH được xác định bằng phương pháp của E.R. Bormann và các đồng tác giả. [Molecular Microbiol., 6, 317-326 (1996)]. Bằng cách xác định trình tự các gen GDH, đã nhận thấy rằng các điểm đột biến chỉ được tìm thấy trong vùng khởi đầu của GDH (Bảng 6).

Bảng 4

Thành phần

Môi trường A

Môi trường B Glucoza 3g/dl 5g/dl KH_2PO_4 0,14g/dl 0,14g/dl

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04g/dl 0,04g/dl

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001g/dl 0,001g/dl

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001g/dl 0,001g/dl

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,5g/dl 2,5g/dl

Dung dịch thủy phân protein đậu tương 1,5ml/dl 0,38ml/dl

Thiamin hydroclorua 0,2mg/l 0,2mg/l Biotin 0,3mgA 0,3mg/l

Tác nhân khử bọt 0,05ml/l 0,05ml/l CaCO_3 5gdA 5gd/l

Độ pH

7,0 (được điều chỉnh bằng KOH)

Bảng 5. Khả năng tạo ra axit glutamic và hoạt tính GDH của các chủng đột biến Chủng

Giữ (g/dl)

Hoạt tính đặc hiệu GDH

Giá trị tương đối AJ13029 2,6 7,7 1,0 FGR1 2,9 23,1 3,0 FGR2 3,0 25,9 3,4

Bảng 6. Trình tự ADN trong vùng khởi đầu GDH của các chủng đột biến Chủng

Trình tự đoạn khởi đầu GDH 35 10

AU 3029 TGGTCA TTCTGTGCGACACTGC CATAAT FGR1 TGGTCA TTCTGTGCGACACTGC
TATAAT FGR2 TTGTCA T-CTGTGCGACACTGC TATAAT

Ví dụ 3. Gây đột biến trong vùng khởi đầu của gen cs của vi khuẩn Coryneform sinh ra glutamat

Trong ví dụ này, chủng có đoạn khởi đầu của các gen được tăng cường các gen này mã hóa glutamat dehydrogenaza (GDH) và enzym tổng hợp xitrat (CS) được tạo ra

(1) Tách dòng gen gltA

Trình tự gen gltA của vi khuẩn Coryneform mã hóa enzym tổng hợp xitrat đã được làm sáng tỏ [Microbial. 140, 1817-1828 (1994)]. Trên cơ sở trình tự này, các đoạn mã được thể hiện trong Seq ID No.7 và Seq ID No.8 được tổng hợp. Mặt khác, ADN nhiễm sắc thể thu được từ Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 được tạo ra nhờ sử dụng **kit** tinh chế ADN hệ gen vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.). Nước đã được khử trùng được bổ sung vào hỗn hợp gồm 0,5 μ g ADN nhiễm sắc thể, 10 μ mol của từng oligonucleotit, 5 μ l hỗn hợp dNTP (2,5mM), 5 μ l dung dịch đệm 10 X La Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) và 2U La Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) để thu được 50 μ l hỗn hợp phản ứng PCR. Hỗn hợp phản ứng này được tiến hành PCR. Các điều kiện của phản ứng PCR là tiến hành 30 chu kỳ làm biến tính ở 94 $^{\circ}$ C trong 30 giây, ủ ở 55 $^{\circ}$ C trong 15 giây và duỗi thẳng ở 72 $^{\circ}$ C trong 3 giây nhờ sử dụng thiết bị Thermal Cycler TP240 (Takara Shuzo Co., Ltd.) để khuếch đại khoảng 3Kbp các đoạn ADN chứa gen gltA và đoạn khởi đầu của chúng. Các đoạn khuếch đại thu được như vậy được tinh chế bằng thiết bị SUPREC02 (Takara Shuzo Co., Ltd.) và sau đó được làm bằng đầu. Quá trình làm bằng đầu được tiến hành bằng **kit** làm bằng đầu của Takara Shuzo Co., Ltd. Đoạn được làm bằng đầu được trộn với pHS399 (Takara Shuzo Co., Ltd.) được cắt hoàn toàn bằng SmaI để tiến hành ghép nối. Phản ứng ghép nối được tiến hành bằng **kit** ghép nối ADN (ADN Ligation **Kit** ver 2) (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của E. coli JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L (chứa 10g/l bactotrypton, 5g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl và 15g/l thạch; độ pH=7,2) chứa 10 μ g/ml IPTG (isopropyl-P-D-thiogalactopyranosit), 40 μ g/ml X-Gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-P-D-galactosit) và 40 μ g/ml cloramphenicol. Sau đó, chúng được nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc trắng được lấy ra để thu được các chủng biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn.

Từ các chủng đã được biến nạp, các plasmit được tạo ra bằng phương pháp kiểm hóa (Seibutsu Kogaku Jikken-sho do Nippon Seibutsu Kogaku-kai xuất bản và do Baifukan công

bổ, trang 105, 1992). Các bản đồ enzym giới hạn được chuẩn bị, và plasmid có bản đồ giới hạn tương tự như bản đồ được thể hiện trên Fig.2 được gọi là "pHSG399CS".

(2) Gây đột biến trong đoạn khởi đầu *gltA*

Mutan-Super Express Km (Takara Shuzo Co., Ltd.) được sử dụng để gây đột biến trong đoạn khởi đầu *gltA*. Phương pháp này được mô tả cụ thể dưới đây. pHSG399CS được cắt hoàn toàn bằng *EcoRI* và *SalI* để thu được đoạn *EcoRI-SalI* chứa các gen *gltA*, các đoạn này được ghép nối với đoạn thu được bằng cách cắt hoàn toàn pKF 19KM (Takara Shuzo Co., Ltd.) bằng *EcoRI* và *SalI*. Sau khi hoàn thành việc ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L chứa

10 μ g/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc trắng được lấy ra và thu được các thể biến nạp bằng cách phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, các plasmid được tạo ra và plasmid chứa gen *gltA* được gọi là pKF19CS.

Phản ứng PCR được tiến hành nhờ sử dụng pKF19CS làm khuôn mẫu và ADN tổng hợp được phosphoryl hóa ở đầu 5 được thể hiện trong trình tự của Seq ID No.9, Seq ID No.10 và Seq ID No. 11 cùng với việc chọn đoạn mỗi từ Mutan super Express Km. Tiến hành quá trình biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* MV1184 (Takara Shuzo Co., Ltd.) nhờ sử dụng sản phẩm của phản ứng PCR. Các tế bào này được dàn lên các môi trường L chứa 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, ADN của plasmid được tạo ra. Trình tự vùng khởi đầu *gltA* được xác định bằng phương pháp của Sanger [J.Mol. Biol. 143, 161 (1980)] nhờ sử dụng ADN tổng hợp có trình tự Seq ID No. 12. Cụ thể là, trình tự này được xác định bằng Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) và được phân tích bằng thiết bị Genetic Analyzer ABI310 (Applied Systems). Các plasmid trong đó vùng khởi đầu *gltA* được thay bằng trình tự được thể hiện trong Bảng 7 lần lượt được gọi là pKF19CS1, pKF19CS2 và pKF19CS4.

Bảng 7 vùng 35 vùng 10 pKF19CS ATGGCT TATAGC pKF19CS1 ATGGCT TATAAC pKF19CS2 ATGGCT TATAAT pKF19CS4 TTGACA TATAAT

(3) Cấu trúc plasmid *gltA* đột biến pKF19CS, pKF19CS1, pKF19CS2 và pKF19CS4 được tạo ra ở bước (2) được cắt hoàn toàn bằng *SalI* và *EcoRI* (Takara Shuzo Co., Ltd.). Mặt khác, plasmid pSFK6 (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 11-69896) có điểm khởi đầu sao chép thu được từ plasmid pAM330 có thể tự sao chép trong vi khuẩn *Coryneform* [Công bố Patent Nhật cho mục đích giải quyết khiếu nại (sau đây được gọi là "J.P.KOKAI") số 58-67699] được cắt hoàn toàn bằng *EcoRI* và *SalI*. Đoạn thu được được ghép nối với đoạn dài khoảng 2,5kb chứa *gltA*. Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành quá trình biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* JM109. Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 10 μ g/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi ủ qua đêm, khuẩn lạc được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, plasmid được tạo ra. Các plasmid này chứa gen *gltA* được gọi lần lượt là pSFKC, pSFKC1, pSFKC2 và pSFKC4.

(4) Xác định mức độ biểu hiện cs từ plasmid *gltA* đột biến trong vi khuẩn *Coryneform*

Plasmid được tạo ra ở bước (3) nêu trên được đưa vào trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Cụ thể, quá trình xử lý này được tiến hành bằng phương pháp xung điện (J.p. KOKAI No. 2-07791). Các thể biến nạp này được chọn ở nhiệt độ 3 $^{\circ}$ C với đĩa môi trường CM2B (chứa 10g/l bactotrypton, 10g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl, 10 μ g/l biotin và 15g/l thạch, độ pH là 7,0) chứa 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy trong hai ngày, các khuẩn lạc được thu gom và các thể biến nạp chứa pSFKC, pSFKC1, pSFKC2, và pSFKC4 lần

lượt được gọi là BLCS, BLCS1, BLCS2 và BLCS4, sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Môi trường có thành phần như được thể hiện trong Bảng 8 được cấy thể biến nạp. Quá trình nuôi cấy được tiếp tục ở nhiệt độ 31°C và kết thúc quá trình nuôi cấy trước khi glucoza được tiêu thụ hoàn toàn. Dịch nuôi cấy này được ly tâm để tách các tế bào. Các tế bào này được rửa bằng dung dịch đệm Tris 50mM (độ pH = 7,5) chứa 200mM natri glutamat và sau đó được tạo huyền phù trong dung dịch đệm này. Sau khi xử lý bằng siêu âm bằng thiết bị UD-201 (TOMY), tiếp theo ly tâm ($10.000g-100000m/s^2$), các tế bào không vỡ còn lại được loại bỏ để thu được dung dịch enzym thô. Hoạt tính của xitrat syntaza có thể được xác định theo bài báo nêu trong Methods Enzymol. 13,3 - li (1969). Cụ thể, dung dịch enzym thô được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng chứa 100mM Tris-HCl (độ pH=8), 0,1mM DTNB, 200mM natri glutamat và 0,3mM axetyl CoA, và giá trị gốc được xác định theo mức gia tăng mức độ hấp thụ ở bước sóng 412nm ở nhiệt độ 30°C được xác định bằng máy đo ảnh phổ Hitachi U-3210. Hơn nữa, axit axaloaxetic được bổ sung vào với lượng sao cho nồng độ cuối của nó sẽ là 0,5mM. Mức gia tăng mức độ hấp thụ ở bước sóng 412nm được xác định, từ đó giá trị gốc được suy ra để xác định hoạt tính của xitrat syntaza. Nồng độ protein trong dung dịch enzym thô được xác định bằng phương pháp Protein Assay (BIO-RAD). Albumin huyết thanh của bò được sử dụng làm protein chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 9. Đã khẳng định được rằng hoạt tính xitrat syntaza của các đoạn khởi đầu gltA đột biến được gia tăng so với đoạn khởi đầu gltA kiểu dại.

Bảng 8

Thành phần

Hàm lượng Glucoza 50g/l KH_2PO_4 1g/l

$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4mg/l

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg/l

Dịch thủy phân protein đậu tương 20ml/l Biotin 0,5mg/l

Tiamin hydroclorua 2mg/l 2mg/l

Bảng 9 Chủng dABS/phút/mg

Hoạt tính tương đối

Hoạt tính tương đối kiểu dại 4 6,8 1,0 BLCS00 38,8 5,7 1,0 BLCS01 57,1 8,4 1,21 BLCS02 92,5 13,6 1,9 BLCS04 239,5 35,2 4,8

(5) Đưa gen gltA biến thể vào trong plasmit mẫn cảm nhiệt độ

Để sáp nhập các trình tự của đoạn khởi đầu gltA đột biến vào trong nhiễm sắc thể, theo phương pháp đã biết trong đó plasmit mà quá trình sao chép của nó trong vi khuẩn Coryneform là mẫn cảm nhiệt độ được sử dụng (J.P.KOKAI No.5-7491). pSFKT2 (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 11-81693) được sử dụng làm vật truyền plasmit, mà quá trình sao chép của nó trong vi khuẩn Coryneform là mẫn cảm nhiệt độ. pKFCSI, pKFCS2 và pKFCS3 được cắt hoàn toàn bằng Sail và BstPI và làm bằng đầu được sử dụng làm các trình tự của đoạn khởi đầu gltA đột biến. Chúng được ghép nối với pSFKT2 đã được cắt hoàn toàn bằng SmaI. Sau khi hoàn thành việc ghép nối, tiến hành quá trình biến nạp với các tế bào khả biến của E. coli JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 10 μ g/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 25fj/g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được tạo ra và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn

lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, các plasmid được tạo ra. Các vật truyền hình thai mẫn cảm nhiệt độ chứa gen *gltA* lần lượt được gọi là pSFKTC1, pSFKTC2 và pSFKTC4.

(6) Đưa gen khởi đầu *gltA* đột biến vào trong nhiễm sắc thể

Từng plasmid pSFKTC1, pSFKTC2 và pSFKTC4 được đưa vào trong chủng *Brevibacterium lactofermentum* FGR2 bằng phương pháp xung điện. Các thể biến nạp này được chọn trên các đĩa môi trường CM2B chứa 25jj.g/ml kanamycin ở nhiệt độ 25°C. Sau khi đưa từng plasmid vào chủng vi khuẩn, mỗi chủng thu được được nuôi cấy trong môi trường lỏng CM2B, được dần lên các đĩa CM2B chứa 25lj.g/ml kanamycin, sau đó pha loãng đến nồng độ nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^5 cùì trên đĩa và được nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C. Chủng có plasmid mẫn cảm nhiệt độ trở nên mẫn cảm với kanamycin vì quá trình sao chép của plasmid được ức chế ở nhiệt độ này, và do vậy nó sẽ không hình thành các khuẩn lạc. Mặt khác, chủng có ADN plasmid được sáp nhập vào trong nhiễm sắc thể có thể được chọn vì nó tạo ra khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thu được như vậy được thu gom và được phân lập để thành các khuẩn lạc tương ứng. ADN nhiễm sắc thể được chiết từ chủng này. Phản ứng PCR được tiến hành nhờ sử dụng ADN nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu và các đoạn mồi của trình tự được thể hiện trong Seq ID No.8 và Seq ID No. 13. Khoảng 3kb đoạn được khuếch đại được xác định. Điều đó chứng tỏ rằng trong chủng này, gen *gltA* đột biến thu được từ plasmid mẫn cảm nhiệt độ được sáp nhập gần gen *gltA* trong nhiễm sắc thể của vật chủ bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Các chủng thu được từ pSFKTC1, 2 và 4 lần lượt được gọi là BLCS11, BLCS12 và BLCS14.

(7) Tạo ra các gen khởi đầu *gltA* được thể

Đầu tiên, các chủng mẫn cảm kanamycin thu được từ các chủng BLCS11, BLCS12 và BLCS14 có gen *gltA* đột biến được sáp nhập vào trong đó bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Các chủng có plasmid được sáp nhập trong đó được pha loãng và được dần lên các đĩa CM2B và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C. Sau khi hình thành các khuẩn lạc, các bản sao của các đĩa này được tạo ra nhờ sử dụng các đĩa CM2B chứa 25ljg/ml kanamycin và được nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C. Như vậy, thu được các chủng mẫn cảm kanamycin.

Nhiễm sắc thể được chiết từ chủng mẫn cảm kanamycin, và phản ứng PCR được tiến hành với các đoạn mồi có trình tự được thể hiện trong Seq ID No.7 và Seq ID No.8 để tạo ra các đoạn gen *gltA*. Các đoạn khuếch đại thu được như vậy được tinh chế bằng thiết bị SUPREC02 (Takara Shuzo Co., Ltd.) và sau đó được xác định trình tự nhờ sử dụng đoạn mồi có Seq ID No. 13 để xác định trình tự trong vùng khởi đầu của nó. Kết quả là, chủng có trình tự đoạn khởi đầu tương tự như của pKF19CS1 trong Bảng 7 được gọi là GB01, chủng có trình tự đoạn khởi đầu tương tự như của pKF19CS2 được gọi là GB02 và chủng có trình tự đoạn khởi đầu tương tự như của PKF19CS4 được gọi là GB03. Điều đó chứng tỏ rằng trong các chủng này, gen *gltA* thu được từ kiểu đại được định vị ban đầu trên nhiễm sắc thể đã được cắt ra cùng với vật truyền plasmid trong khi gen *gltA* đột biến được đưa vào bằng plasmid được giữ lại trên nhiễm sắc thể khi plasmid này và gen *gltA* được sao chép được cắt ra khỏi nhiễm sắc thể này.

(8) Xác định hoạt tính xitrat syntaza của các chủng có đoạn khởi đầu *gltA* đột biến

Các hoạt tính của xitrat syntaza được xác định bằng cách xử lý các chủng FGR2, GB01, GB02, GB03 và FGR2/pSFKC thu được ở bước (7) theo cách tương tự như ở bước (4). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10. Đã xác nhận được rằng hoạt tính xitrat syntaza của chủng có đoạn khởi đầu *gltA* được thể cao hơn hoạt tính của các chủng bố mẹ của nó.

Bảng 10 Chủng dABS/phút/mg

Hoạt tính tương đối FGR2 7,9 1,0 GB01 9,5 1,2 GB02 15,0 1,9 GB03 31,6 4,0 FGR2/pSFKC 61,6 7,8

(9) Các kết quả nuôi cấy của các chủng có đoạn khởi đầu gltA được thể

Từng chủng trong số các chủng thu được ở bước (7) nêu trên được cấy vào trong môi trường nhân giống có thành phần được thể hiện trong Bảng 11, và dịch nuôi cấy được lắc ở nhiệt độ 31,5°C trong 24 giờ. 300ml môi trường nuôi cấy chính có thành phần được thể hiện trong Bảng 11 được chuyển vào trong bình lên men thủy tinh dung tích 500ml và sau đó được khử trùng bằng cách gia nhiệt và được cấy 40ml giống được nuôi cấy như nêu trên. Quá trình nuôi cấy được bắt đầu ở nhiệt độ nuôi cấy là 31,5°C trong đó tốc độ khuấy và tốc độ thông khí lần lượt được kiểm soát để nằm trong khoảng từ 800 đến 1200 vòng/phút, và để nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/1 thể tích/phút. Độ pH của dịch nuôi cấy được giữ ở 7,5 bằng khí amoniac. Nhiệt độ được nâng lên 37°C sau 8 giờ kể từ khi bắt đầu nuôi cấy. Quá trình nuôi cấy kết thúc khi đường glucoza đã được tiêu thụ hoàn toàn trong thời gian từ 20 đến 40 giờ, và lượng axit L-glutamic được tạo ra và tích lũy trong dịch nuôi cấy được xác định.

Kết quả là, sản lượng axit L-glutamic của từng chủng GB02 và GB03 lớn hơn so với các chủng GB01 và FGR2/pSFKC như được thể hiện trong Bảng 12. Từ các số liệu này, đã nhận thấy rằng kết quả tốt thu được bằng cách gây đột biến trong đoạn khởi đầu gltA để gia tăng hoạt tính cs từ 2 đến 4 lần nhằm cải thiện sản lượng axit L-glutamic do các chủng đó tạo ra.

Bảng 11

Thành phần

Hàm lượng

Môi trường cấy giống

Môi trường cấy chính Glucoza 50g/l 150g/l K₂P0₄ 1g/l 2g/l

MgSO₄. 7H₂O 0,4g/l 1g/l

FeSO₄. 7H₂O 10mg/l 15mg/l

MnSO₄. 4H₂O 10mg/l 15mg/l

Dịch thủy phân protein đậu tương 20ml/l 50ml/l Biotin 0,5mg/l 2mg/l

Tiamin hydroclorua 2mg/l 3mg/l

Bảng 12 Chủng

Axit L-glutamic (g/l) FGR2 8,9 GB01 9,1 GB02 9,4 GB03 9,4 FGR2/pSFKC 9,1

Ví dụ 4. Gây đột biến trong vùng khởi đầu của gen ICDH của vi khuẩn Coryneform sinh ra glutamat

Trong ví dụ này, các chủng có các đoạn khởi đầu được tăng cường của các gen mã hóa glutamat dehydrogenaza, xitrat syntaza và isoxitrat dehydrogenaza được sản xuất.

(1) Tách dòng gen icd

Trình tự ADN của gen icd của vi khuẩn Coryneform mã hóa xitrat syntaza đã được giải thích rõ ràng [J. Bacterid. 177, 774-782 (1995)]. Trên cơ sở trình tự này, các đoạn môi được thể hiện trong Seq ID No. 14 và Seq ID No. 15 được tổng hợp. Phản ứng PCR được tiến hành

nhờ sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 làm khuôn mẫu để khuếch đại khoảng 3Kbp của đoạn ADN chứa gen *icd* và đoạn khởi đầu của nó. Đoạn khuếch đại thu được như vậy được cắt hoàn toàn bằng *EcoRI*, và được kết hợp với đoạn thu được bằng cách cắt hoàn toàn pHSG 399 (Takara Shuzo Co., Ltd.) bằng *EcoRI* để tiến hành ghép nối. Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành biến nạp nhờ sử dụng các tế bào khả biến của *E. coli* JM109. Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 10ng/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 40fig/ml cloramphenicol. Sau khi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn.

Plasmid mang gen *icd* được gọi là pHSG399*icd*.

(2) Gây đột biến trong gen khởi đầu *icd*

Chưa hoàn toàn định vị chính xác đoạn khởi đầu của gen *icd*. Khả năng gia tăng mức phiên mã của gen *icd* được kiểm tra bằng cách biến đổi nhân tạo trình tự ở phía đầu trên của gen mã hóa ICDH đổi thành trình tự giống với đoạn khởi đầu. Cụ thể, các đột biến được gây ra trong vùng tương tự 10 tổn tại trong trình tự ADN cách ATG đầu tiên của protein ICDH khoảng 190bp ở phía đầu trên (đoạn khởi đầu thứ nhất) và khoảng 70bp (đoạn khởi đầu thứ hai) ở phía đầu dưới.

Mutan-Super Express Km (Takara Shuzo Co., Ltd.) được sử dụng để gây đột biến trong vùng phía đầu trên của gen *icd*. Phương pháp này được mô tả cụ thể dưới đây. pHSG399 được cắt hoàn toàn bằng *PstI* để thu được đoạn *PstI* chứa đoạn khởi đầu của gen *icd*. Các đoạn này được ghép nối với đoạn thu được bằng cách cắt hoàn toàn pKF18kM (Takara Shuzo Co., Ltd.) bằng *PstI*. Sau khi hoàn thành việc ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào này được dàn lên môi trường L chứa 10 μ g/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 25fxg/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng tạo đổi thành được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, plasmid được tạo ra, và plasmid chứa đoạn khởi đầu của gen *icd* được gọi là pKF18*icd*.

PCR được tiến hành nhờ sử dụng pKF18*icd* làm khuôn mẫu và ADN tổng hợp được phosphoryl hóa ở đầu 5 được thể hiện trong trình tự của Seq ID No. 16, Seq ID No. 17, Seq ID No.18, Seq ID No.19, Seq ID No.20 và Seq ID No.21 và đoạn mỗi chọn lọc. Các sản phẩm PCR được sử dụng để biến nạp các tế bào khả biến của *E. coli* JM109. Các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc được lấy ra và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, ADN plasmid được tạo ra, và trình tự của vùng khởi đầu *icd* được xác định nhờ sử dụng ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.22 bằng phương pháp của Sanger [J.Mol.Biol. 143, 161 (1980)]. Cụ thể, trình tự ADN được xác định bằng Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems), và được phân tích bằng thiết bị Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems). Các đoạn đó thu được bằng cách thay vùng khởi đầu *icd* bằng trình tự được thể hiện trong Bảng 7 lần lượt được gọi là PKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5 và pKF18ICD6. Trong số đó, pKF18ICD2 được cắt hoàn toàn bằng *PstI* để thu được đoạn *PstI* chứa đoạn khởi đầu của gen *icd*. Đoạn này được ghép nối với đoạn thu được bằng cách cắt hoàn toàn pKF18kM bằng *PstI* (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào này được dàn lên trên các đĩa môi trường L chứa 10 μ g/ml IPTG, 40 μ g/ml X-Gal và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được lấy ra và thu được các chủng được biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các chủng được biến nạp này, plasmid được tạo ra, và plasmid này chứa đoạn khởi đầu của gen *icd* được gọi là pKF18 ICDM2. Phản ứng PCR được tiến hành nhờ sử dụng pKF18ICDM2 làm khuôn mẫu và ADN tổng hợp được phosphoryl hóa ở đầu 5 được thể hiện trong Seq ID No.20 và Seq ID No.21 và đoạn mỗi được lựa chọn. Quá trình biến nạp của các tế bào khả biến của *E. coli* JM109 được tiến hành với sản phẩm của phản ứng PCR.

Các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 25|0.g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc tạo đối thành như vậy được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, ADN của các plasmit được tạo ra, và trình tự của vùng khởi đầu icd được xác định nhờ sử dụng ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.22. Thu được các đoạn này bằng cách thay vùng khởi đầu icd bằng trình tự được thể hiện trong Bảng 13 lần lượt được gọi là pKF18ICD25 và pKF18ICD26.

Bảng 13 Plasmit

Đoạn khởi đầu thứ nhất

Đoạn khởi đầu thứ hai 35 10 35 10 PKF18ICD GCGACT GAAAGT TTTCCA CACCAT
PKF18ICD01 GCGACT TATAAT T1TCCA CACCAT PKF18ICD02 TTGACA TATAAT T1TCCA
CACCAT pKF18ICD03 TTGACT TAAAGT T1TCCA CACCAT pKF18ICD04 GCGACT GAAAGT
T1TCCA TATAAT PKF18ICD05 GCGACT GAAAGT TTGCCA TATAAT PKF18ICD06 GCGACT
GAAAGT TTGACA TATAAT PKF18ICD25 TTGACA TATAAT TTGCCA TATAAT pKF18ICD26
TTGACA TATAAT TTGACA TATAAT

(3) Tạo ra plasmit để xác định hoạt tính của đoạn khởi đầu

Để dễ dàng xác định hoạt tính của đoạn khởi đầu, phương pháp có thể là xác định gián tiếp hoạt tính của đoạn khởi đầu nhờ sử dụng gen báo cáo. Các tính chất mong muốn cần có của gen báo cáo là hoạt tính có thể dễ dàng được xác định, thậm chí cả khi axit amin được bổ sung vào đầu tận cùng N, hoạt tính cũng không bị giảm một cách đáng kể, phản ứng cơ bản không xảy ra và có enzym giới hạn cắt vị trí thích hợp để thao tác gen. Vì P-galactosidaza (LacZ) của E. coli được sử dụng rộng rãi làm gen báo cáo và vi khuẩn thuộc loài *Corynebacterium* không có khả năng đồng hóa lactoza [J. Gen. Appl. Microbio., 18, 399-416 (1972)], LacZ được xác định là gen báo cáo tối ưu. Sau đó, plasmit pNEOL mang LacZ làm gen báo cáo được tạo ra (xem Fig.3). Quy trình thực hiện được mô tả chi tiết dưới đây. Phản ứng PCR được thực hiện nhờ sử dụng ADN nhiễm sắc thể thu được từ E. coli ME8459 (ME8459 được lưu giữ tại National Institute of Genetics (Nhật)) làm khuôn mẫu với ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.23 và Seq ID No. 24 làm đoạn mồi. Sản phẩm của phản ứng PCR được cắt hoàn toàn bằng SmaI và BamHI và sau đó được ghép nối với các đoạn thu được bằng cách cắt pKF3 (Takara Shuzo Co., Ltd.) bằng HindIII và được làm bằng đầu. Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của E. coli JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 25|ig/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc được tạo ra như vậy được thu gom và được phân lập thành các khuẩn lạc tương ứng để thu được chủng được biến nạp. Plasmit thu được từ chủng được biến nạp được gọi là pKF3nptII. Sau đó, plasmit này được cắt bằng SmaI. Mặt khác, pSAK4 được mô tả trong ví dụ I (1) được cắt hoàn toàn bằng SmaI và Sail và được làm bằng đầu. Các đoạn này được ghép nối với nhau để tạo ra vật chủ hình thoi pNEO, vật chủ này có thể sao chép trong vi khuẩn *Coryneform*. Plasmit này có khả năng truyền tính kháng cloramphenicol và kháng kanamycin cho vật chủ..Hơn nữa, pNEO được cắt hoàn toàn bằng SmaI và Sse8387I. Các đoạn thu được này được ghép nối với các đoạn thu được bằng cách cắt hoàn toàn pMC1871 (Farmacia Biotech) bằng PstI và SmaI. Như vậy, vật chủ hình thoi pNEOL có thể được sao chép trong vi khuẩn *Coryneform* và có LacZ thiếu 8 axit amin ở đầu tận cùng N làm gen báo cáo được tạo ra (xem Fig.3).

(4) Xác định hoạt tính của đoạn khởi đầu icd đột biến

Các plasmit có đoạn khởi đầu icd đột biến được tạo ra ở bước (2) nêu trên, nghĩa là PKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, PKF18ICD6, PKF18ICD25, pKF18ICD26 và pKF18ICD, được cắt hoàn toàn bằng SacII và PstI và sau đó được làm bằng đầu. Chúng được ghép nối với các đoạn thu được bằng cách cắt pNEOL bằng SmaI. Sau khi hoàn thành quá trình ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của E. coli

JM109. Các tế bào này được dàn lên trên các đĩa môi trường L chứa IPTG, X-Gal và 40 µg/ml chloramphenicol. Sau khi ủ qua đêm, các khuẩn lạc màu xanh được thu gom và thu được các chủng biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn.

Từ các chủng đã được biến nạp, các plasmid được tạo ra. Plasmid có cấu trúc có khả năng sinh ra protein dung hợp của ICDH và LacZ lần lượt được gọi là pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26, và pNEOICD. Từng plasmid này hoặc pNEOL được đưa vào trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 bằng phương pháp xung điện. Các thể biến nạp này được chọn bằng cách sử dụng các đĩa môi trường CM2B (chứa 10g/l bactotrypton, 10g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl, 10 µg/l biotin và 15g/l thạch và có độ pH là 7,0) chứa 25 µg/ml kanamycin và 40 µg/ml X-Gal ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Sau khi đưa vào, các khuẩn lạc được tạo ra như vậy được thu gom và được phân lập dưới dạng các khuẩn lạc đơn. Các thể biến nạp chứa pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26 và pNEOICD lần lượt được gọi là BLAC1, BLAC2, BLAC3, BLAC4, BLAC5, BLAC6, BLAC25, BLAC26, BLAC và BNEOL. Tất cả các thể biến nạp khác BNEOL đều tạo ra các khuẩn lạc màu xanh. Các dung dịch enzyme thô được tạo ra từ các thể biến nạp này theo cách tương tự như ở bước (4) trong ví dụ 3 chỉ khác là "dung dịch đệm Z" (chứa 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 270 µg/100 mM 2-ME và NaPi và có độ pH = 7,5) được sử dụng làm dung dịch đệm để rửa và tạo huyền phù. Hoạt tính của LacZ được xác định như sau: Dung dịch đệm z được trộn với dung dịch enzyme thô, ONPG trong dung dịch đệm z có nồng độ cuối là 8mg/ml được bổ sung vào hỗn hợp thu được, và mức độ gia tăng khả năng hấp thụ ở bước sóng 420nm ở nhiệt độ 30°C được xác định bằng máy đo ảnh phổ Hitachi U-3210 làm hoạt tính của LacZ. Lượng protein trong dung dịch enzyme thô được xác định bằng thử nghiệm protein (BIO-RAD) Albumin huyết thanh bò được sử dụng làm protein chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1*4. Đã khẳng định được rằng hoạt tính LacZ của chúng có đột biến trong đoạn khởi đầu icd và biểu hiện protein dung hợp ICDH-LacZ cao hơn so với hoạt tính của chúng biểu hiện protein dung hợp ICDH-LacZ kiểu dại.

Bảng 14 Chủng dABS/phút/mg

Hoạt tính tương đối BNEOL không phát hiện được 0,0 BNEOL1 42 1,0 BNEOL1-1 84 2,0 BNEOL1-2 4,0 BNEOL1-3 80 1,9 BNEOL1-4 3,0 BNEOL1-5 3,3 BNEOL1-6 84 2,0 BNEOL1-25 4,0 BNEOL1-26 4,0

(5) Đưa gen icd đột biến vào trong plasmid miễn cảm nhiệt độ

Vật chủ plasmid pSFKT2 (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 11-81693) mà quá trình sao chép của nó trong vi khuẩn *Corynebacterium* là miễn cảm nhiệt độ được sử dụng. PKF18ICD1, PKF18ICD2, PKF18ICD3, PKF18ICD4, PKF18ICD5, PKF18ICD6, PKF18ICD25 và PKF18ICD26 được cắt hoàn toàn bằng PstI và các đoạn thu được được sử dụng làm các trình tự khởi đầu icd đột biến. Các đoạn thu được như vậy được ghép nối với pSFKT2 được cắt hoàn toàn bằng PstI. Sau khi hoàn thành việc ghép nối, tiến hành biến nạp với các tế bào khả biến của *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L chứa 10 µg/ml IPTG, 40 µg/ml X-Gal và 25 µg/ml kanamycin. Sau khi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được thu gom và thu được các chủng đã được biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các chủng đã được biến nạp, plasmid được tạo ra. Vật chủ hình thoi miễn cảm nhiệt độ chứa gen khởi đầu icd lần lượt được gọi là pSFKT11, pSFKT12, pSFKTB, pSFKTM, pSFKT15, pSFKTO, pSFKT125, và pSFKT126.

(6) Sáp nhập đoạn khởi đầu icd đột biến vào trong nhiễm sắc thể

Các plasmid được tạo ra ở bước (5) nêu trên được đưa vào trong chủng *Brevibacterium lactofermentum* GB02 bằng phương pháp xung điện. Các thể biến nạp được chọn nhờ các đĩa môi trường CM2B (chứa 10g/l bactotrypton, 10g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl, 10 µg/l biotin và 15g/l thạch và có độ pH là 7,0) chứa 25 µg/ml kanamycin ở nhiệt độ 25°C.

Sau khi đưa vào, các chủng thu được được nuôi cấy trong các đĩa môi trường lỏng CM2B, dàn lên các đĩa CM2B chứa 25⁵ig/ml kanamycin sau khi pha loãng đến nồng độ nằm trong khoảng từ 10³ đến 10⁵ cfu/đĩa và được nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C. Chủng có plasmid mẫn cảm nhiệt độ trở nên mẫn cảm kanamycin vì quá trình sao chép của plasmid bị ức chế ở nhiệt độ này và vì vậy, nó không thể tạo ra khuẩn lạc. Mặt khác, chủng có ADN plasmid được sáp nhập vào trong nhiễm sắc thể có thể được chọn vì nó có thể tạo ra khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thu được như vậy được thu gom và được tách thành các khuẩn lạc riêng. ADN nhiễm sắc thể được chiết từ chủng này và tiến hành phản ứng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu với các đoạn mồi được thể hiện trong Seq ID No.13 và Seq ID No. 15. Khoảng 3kb các đoạn khuếch đại được xác định. Như vậy, đã chứng tỏ được rằng trong chủng này, gen icd đột biến thu được từ plasmid mẫn cảm nhiệt độ được sáp nhập gần gen icd trong nhiễm sắc thể của vật chủ bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

(7) Tạo ra các chủng có đoạn khởi đầu icd được thể

Trước tiên, chủng mẫn cảm kanamycin thu được từ các chủng có gen icd đột biến được sáp nhập vào đó bằng cách tái tổ hợp tương đồng như nêu ở bước (6). Các chủng có plasmid được sáp nhập vào đó được pha loãng và được dàn lên các đĩa CM2B và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C. Sau khi tạo ra các khuẩn lạc, các bản sao được tạo ra trên các đĩa CM2B chứa 25⁵ig/ml kanamycin, và chúng được ủ ở nhiệt độ 34°C. Như vậy, thu được các chủng mẫn cảm kanamycin.

Nhiễm sắc thể được tách ra từ chủng kháng kanamycin, và phản ứng PCR được tiến hành nhờ sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong Seq ID No. 14 và Seq ID No. 15 để tạo ra các đoạn gen icd. Các đoạn gen khuếch đại thu được như vậy được làm sạch bằng thiết bị SUPREC02 (Takara Shuzo Co., Ltd.) và sau đó được tiến hành xác định trình tự nhờ sử dụng đoạn mồi được thể hiện trong Seq ID No.22 để xác định trình tự vùng khởi đầu của nó. Kết quả là, các chủng có các trình tự khởi đầu icd thu được từ pSFKTII, pSFKTI2, pSFKTD, pSFKTI4, pSFKTI5, pSFKTI6, pSFKTI25 và pSFKTI26 lần lượt được gọi là GC01, GC02, GC03, GC04, GC05, GC06, GC25 và GC26. Trong các chủng này, khi plasmid và gen icd sao chép được cắt khỏi nhiễm sắc thể, gen icd kiểu dại ban đầu định vị trên nhiễm sắc thể này được cắt cùng với vật truyền plasmid, trong khi gen icd đột biến được đưa vào plasmid còn lại trên nhiễm sắc thể.

(8) Xác định hoạt tính isoxitrat-dehydrogenaza của các chủng đột biến có gen khởi đầu icd đột biến

Dung dịch enzyme thô ICDH được tạo ra bằng cách sử dụng từng chủng trong số 8 chủng thu được ở bước (7) nêu trên, và chủng GB02 theo cách tương tự như ở bước (7) trong ví dụ 3. Các hoạt tính ICDH được xác định như sau: dung dịch enzyme thô được bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa 35mM Tris-HCl (độ pH=7,5), 1,5mM MnSO₄, 0,1mM NADP và 1,3mM axit isoxitric, và mức độ tăng khả năng hấp thụ ở bước sóng 340nm ở nhiệt độ 30°C được xác định bằng máy đo ảnh phổ Hitachi U-3210 là hoạt tính của ICDH. Lượng protein trong dung dịch enzyme thô được xác định bằng thử nghiệm protein (BIO-RAD). Albumin huyết thanh bò được sử dụng làm protein chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 15. Đã khẳng định được rằng hoạt tính isoxitrat dehydrogenaza của các chủng có gen khởi đầu icd được thể cao hơn so với hoạt tính của chủng bố mẹ.

Bảng 15 Chủng dABS/phút/mg

Hoạt tính tương đối GB02 3,9 1,0 GC01 8,2 2,1 GC02 19,1 4,9 GC03 7,0 1,8 GC04 12,5 3,2 GC05 19,1 4,9 GC06 10,5 2,7 GC25 30,4 7,8 GC26 24,2 6,2 9) Các kết quả nuôi cấy các chủng chứa gen khởi đầu icd được thể

Từng chủng trong số 8 chủng thu được ở bước (7) nêu trên được nuôi cấy theo cách tương tự như ở bước (9) trong ví dụ 3. Kết quả là, sản lượng axit L-glutamic được gia tăng khi một

chúng bất kỳ trong số các chủng GC02, GC04, GC05, GC25 và GC26 được sử dụng như được thể hiện trong Bảng 16. Đã nhận thấy rằng có thể đạt được những kết quả như mong muốn bằng cách gây đột biến trong gen khởi đầu *icd* để gia tăng hoạt tính ICDH lên ít nhất 3 lần.

Bảng 16 Chủng

Axit L-glutamic (g/dl) GB02 9,2 GC01 9,0 GC02 9,5 GC03 9,1 GC04 9,4 GC05 9,6 GC06 9,2 GC25 9,9 GC26 9,8

Ví dụ 5. Gây đột biến trong vùng khởi đầu của gen PDH của vi khuẩn *Coryneform* sinh ra glutamat

(1) Tách dòng gen *pdhA* từ vi khuẩn *Coryneform*

Các đoạn mỗi được thể hiện trong Seq ID No.25 và Seq ID No.26 được tổng hợp bằng cách chọn các đoạn có độ tương đồng cao trong số các cấu trúc siêu phân tử EI của pyruvat dehydrogenaza (PDH) của *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Mycobacterium tuberculosis*. Phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, được tạo ra bằng **kit** làm sạch ADN của hệ gen vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.) làm khuôn mẫu trong các điều kiện phản ứng chuẩn được đề cập ở trang 8 của tạp chí PCR Technology (tác giả là H.Erich và do Stockton Press xuất bản, 1989). Dung dịch phản ứng được tiến hành điện di trên gel agarosa để phát hiện khoảng 1,3 kilobazơ các đoạn ADN khuếch đại. Trình tự của cả hai đầu của ADN thu được này được xác định bằng ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.25 và Seq ID No.26. Trình tự này được xác định bằng phương pháp của Sanger [J.Mol.Biol, 143, 161 (1980)] nhờ **kit** xác định trình tự ADN (Applied Biosystems Co.). Trình tự được xác định được suy luận thành các axit amin, và được so với các cấu trúc siêu phân tử EI của pyruvat dehydrogenaza thu được từ các loài *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Mycobacterium tuberculosis* để phát hiện độ tương đồng cao trong số chúng. Tiếp theo, đã xác định được rằng trình tự ADN được khuếch đại bằng phản ứng PCR là một phần của gen *pdhA* mã hóa cấu trúc siêu phân tử EI của pyruvat dehydrogenaza của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Tiến hành tách dòng vùng ở phía đầu trên và vùng ở phía đầu dưới của gen. Phương pháp tách dòng là như sau: nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 được cắt bằng các enzym giới hạn *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *SaiI* và *XbaI* (Takara Shuzo Co., Ltd.) để thu được các đoạn ADN. **Kit** tách dòng in vitro LA PCR (Takara Shuzo Co., Ltd) được sử dụng để tách dòng-, nhờ sử dụng các trình tự được thể hiện trong Seq ID No.27 và Seq ID No.28 trong Danh mục trình tự dưới dạng các đoạn mỗi để tách dòng vùng ở phía đầu trên, và các trình tự được thể hiện trong Seq ID No.29 và Seq ID No.30 dưới dạng các đoạn mỗi để tách dòng vùng ở phía đầu dưới. Sau phản ứng PCR nhờ sử dụng **kit** này, các trình tự ADN dài khoảng 0,5, 2,5, 3,0, 1,5 và 1,8 kilobazơ được khuếch đại vùng ở phía đầu trên từ các đoạn thu được bằng cách lần lượt cắt bằng *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SaiI* và *XbaI*; và các đoạn ADN dài khoảng 1,5, 3,5 và 1,0 kilobazơ được khuếch đại vùng ở phía đầu dưới từ các đoạn thu được bằng cách lần lượt cắt bằng *BamHI*, *HindIII* và *PstI*. Các trình tự của các đoạn ADN này được xác định theo cách tương tự như nêu trên. Đã phát hiện được rằng các đoạn ADN được khuếch đại còn chứa khung đọc mở dài khoảng 920 axit amin và còn phát hiện được rằng vùng được cho là vùng khởi đầu có mặt ở vùng phía đầu trên. Vì trình tự axit amin được suy ra từ trình tự ADN của khung đọc mở có độ tương đồng cao đối với cấu trúc siêu phân tử EI đã biết của pyruvat dehydrogenaza như của *E. coli*, nên dĩ nhiên khung đọc mở là gen *pdhA* mã hóa cấu trúc siêu phân tử EI của pyruvat dehydrogenaza của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Trình tự ADN của khung đọc mở được thể hiện trong Seq ID No.31 trong Danh mục trình tự. Trong Seq ID No.31 trong Danh mục trình tự, trình tự axit amin được suy ra từ trình tự ADN cũng được thể hiện. Do gốc metionin ở đầu tận cùng N của protein thu được từ ATG là đơn vị mã khởi đầu nó không phải là nhóm chức thiết yếu của protein, và cũng biết rằng gốc metionin được loại bỏ do ảnh hưởng của peptidaza sau khi dịch mã. Vì vậy, trong protein nêu trên, có thể gốc metionin ở đầu tận cùng N đã được loại bỏ. Tuy nhiên,

trình tự GTG có mặt 6 gốc phía đầu trên của ATG được thể hiện trong Seq ID No.31 trong Danh mục trình tự, và cũng có thể rằng các axit amin được dịch mã từ điểm này. Pyruvat dehydrogenaza của các vi sinh vật khác như E. coli gồm có 3 cấu trúc siêu phân tử là E1, E2 và E3, và các gen mã hóa chúng cấu tạo thành operon trong một số trường hợp. Tuy nhiên, không có khung đọc mở nào được xem là cấu trúc siêu phân tử E2 và E3 của pyruvat dehydrogenaza trong khoảng 3 kilobazơ phía đầu dưới của gen pdhA. Thay vào đó, đã cho thấy rằng trình tự được cho là gen kết thúc có mặt ở phía đầu dưới của khung đọc mở. Từ các thực tế này, đã giả định rằng các cấu trúc siêu phân tử E2 và E3 của pyruvat dehydrogenaza của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 có mặt trong vùng khác trên nhiễm sắc thể.

(2) Cấu trúc plasmit để khuếch đại gen pdhA

Rõ ràng là chúng thu được bằng cách đưa gen mã hóa ba cấu trúc siêu phân tử cấu tạo thành PDH của E. Coli vào trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 tạo ra sản lượng axit glutamic cao hơn (JP. No. 10-360619). Tuy nhiên, trong PDH của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, chỉ có gen pdhA mã hóa cấu trúc siêu phân tử E1 đã được tách dòng, và không có thử nghiệm nào là không được thực hiện để tìm hiểu sự khuếch đại chỉ của một gen là hữu hiệu trong việc nâng cao sản lượng của axit glutamic. Trong các trường hợp này, thử nghiệm tập trung tìm hiểu xem quá trình khuếch đại chỉ của một gen pdhA có hữu hiệu trong việc nâng cao năng suất của axit glutamic hay không.

Các đoạn mồi trong Seq ID No.33 và Seq ID No.34 được tổng hợp dựa vào các trình tự ADN được tách dòng trên đây. Phản ứng PCR được tiến hành nhờ sử dụng nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, được tạo ra bằng **kit** làm sạch ADN của hệ gen vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.), làm khuôn mẫu trong các điều kiện phản ứng chuẩn được đề cập ở trang 8 của tạp chí PCR Technology (tác giả là H. Erlich và do Stockton Press ấn hành, 1989) để khuếch đại gen pdhA. Trong số các đoạn mồi được tổng hợp này, Seq ID No.33 tương ứng với trình tự của các bazơ No.1397 đến No.1416 trong gen pdhA được thể hiện trong Seq ID No.32 trong Danh mục trình tự. Seq ID No.34 là sợi bổ trợ của trình tự ADN tương ứng với trình tự của các bazơ No.5355 đến No.5374 trong Seq ID No.32 trong Danh mục trình tự, được thể hiện từ đầu 5'.

Sản phẩm PCR thu được này được làm sạch bằng phương pháp thông thường và được cho phản ứng với enzyme giới hạn Sail và Eco T22I. Đoạn này được ghép nối với pSFK (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật No. 11-69896), được cắt bằng các enzyme cắt Sail và PstI, nhờ **kit** ghép nối (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi biến nạp với các tế bào khả biến (Takara Shuzo Co., Ltd) của E. coli JM109, các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L (để 10g/l bacto trypton, 5g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl và 15g/l thạch và có độ pH là 7,2) chứa 10ng/ml IPTG (isopropyl-P-D-thiogalactopyranosit), 40!g/ml X-Gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-(3-D-galactosit) và 25!0.g/ml kanamycin. Sau khi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được tạo ra và thu được các chủng biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn.

Từ các chủng biến nạp này, các plasmit được tạo ra bằng phương pháp kiểm hóa (Seibutsu Kogaku Jikken-sho do Nippon Seibutsu Kogaku kai xuất bản và do Baifukan phát hành, trang 105, 1992). Các bản đồ enzyme giới hạn của các đoạn ADN được xen vào trong các vật truyền được tạo ra và được so với bản đồ enzyme giới hạn của gen pdhA được công bố trong trình tự No.32 của Danh mục trình tự. Plasmit chứa các đoạn ADN được xen vào trong đó có bản đồ enzyme giới hạn tương tự như bản đồ enzyme giới hạn của gen pdhA được gọi là pSFKBPDHA.

(3) Đưa pASFKBPDHA vào trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 và GC25 và đánh giá các thử nghiệm men

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 và GC25 được biến nạp với plasmit pSFKBPDHA bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791) để thu được các chủng đã được biến

nap. Quá trình nuôi cấy để sản xuất axit L-glutamic được tiến hành với chủng đã được biến nạp ATCC13869/pSFKBPDHA và GC25/pSFKBPDHA thu được bằng cách đưa plasmit pSFKBPDHA vào trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 và GC25 như sau: các tế bào của ATCC13869/pSFKBPDHA và GC25/pSFKBPDHA thu được do nuôi cấy trên các đĩa môi trường CM2B chứa 25|j.g/ml kanamycin cấy vào trong môi trường (lít nước cất chứa 80g glucoza, lg KH_2PO_4 , 0,4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15ml dịch thủy phân protein đậu tương, 200|ig tiamin hydroclorua, 60\|xg biotin, 25mg kanamycin và 50g CaCO_3 ; và độ pH được điều chỉnh đến 8,0 bằng KOH). Tiếp theo, nuôi cấy có lắc ở nhiệt độ 31,5°C cho đến khi đường trong môi trường này được tiêu thụ hết. Các sản phẩm thu được được cấy vào trong môi trường có thành phần giống như nêu trên (đối với GC25/pSFK6 và GC25/pSFKBDH) hoặc môi trường được loại bỏ biotin ra khỏi thành phần như nêu trên (đối với ATCC13869/pSFK6 và ATCC13869/pSFKBPDHA) với lượng khoảng 5%, và quá trình nuôi cấy lắc được tiến hành ở 37°C cho đến khi đường trong môi trường này được tiêu thụ hết. Để làm đối chứng, các chủng thu được bằng cách biến nạp *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 và GC25 với plasmit pSFK6 thu được trên đây có khả năng tự sao chép trong vi khuẩn *Coryneform* bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791), được cấy theo cách tương tự như nêu trên. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, lượng axit L-glutamic được tích lũy trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng thiết bị Biotin Analyzer AS-210 (sản phẩm của Asahi Chemical Industry Co., Ltd.). Các kết quả này được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17 Chủng

Sản lượng axit L-glutamic (g/dl)

ATCC13869/ Psfk 3,6 ATCC13869/pSFKBPDHA 3,8 GC25/pSFK6 5,1 GC25/pSFKBPDHA 5,3

Từ các kết quả này thấy rằng, quá trình khuếch đại gen *pdhA* đơn lẻ rất có hiệu quả trong việc nâng cao sản lượng axit glutamic trong *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 và GC25.

(4) Cấu trúc plasmit để xác định hoạt tính của đoạn khởi đầu *pdhA* đột biến

Để tạo ra thể đột biến đoạn khởi đầu của pyruvat dehydrogenaza (PDH), việc xác định vùng khởi đầu được tách dòng trên đây của gen *pdhA* của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 được tiến hành và việc xác định mức chênh lệch về mức độ biểu hiện do sự biến đổi của vùng khởi đầu được tiến hành bằng cách xác định hoạt tính của [3-galactosidaza.

Vùng khởi đầu của gen *pdhA* được cho là từ trình tự ADN đã được làm sáng tỏ bằng cách tách dòng. Kết quả là, đã giả định rằng có thể các bazơ No.2252 đến No.2257 và No.2279 đến No.2284 trong Seq ID No.32 trong Danh mục trình tự lần lượt là vùng 35 và vùng 10. Vì vậy, các đoạn môi được thể hiện chẳng hạn như Seq ID No.35 và Seq ID No.36 trong Danh mục trình tự được tổng hợp, và các đoạn ADN chứa vùng khởi đầu của gen *pdhA* được khuếch đại bằng phương pháp PCR nhờ sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 làm khuôn mẫu. Trong số các đoạn môi được tổng hợp, Seq ID No.35 tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2194 đến bazơ No.2221 trong Seq ID No.32, nhưng bazơ No.2198 đã được thay thế bằng c, và bazơ No.2200 và No.2202 được thay thế bằng G, và trình tự nhận dạng enzym giới hạn *SmaI* được xen vào. Seq ID No.36 tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2372 đến bazơ No.2398 trong Seq ID No.32; nhưng bazơ No.2393 và No.2394 được thay thế bằng G; sợi bổ trợ của trình tự ADN có trình tự nhận dạng của enzym giới hạn *SmaI* xen vào trong đó được thể hiện từ đầu 5'. PCR được tiến hành nhờ sử dụng nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, được tạo ra nhờ kit làm sạch ADN hệ gen của vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.), làm khuôn mẫu trong các điều kiện phản ứng chuẩn được đề cập ở trang 8 của tạp chí PCR Technology (tác giả là H. Erlich và do Stockton Press phát hành, 1989) để khuếch đại vùng khởi đầu của gen *pdhA*. Sản phẩm PCR thu được này được làm

sạch bằng phương pháp thông thường và được cho phản ứng với enzyme giới hạn SmaI. Các đoạn này được ghép nối với pNEOL khuyết vùng khởi đầu của gen LacZ có thể được sao chép trong vi khuẩn Coryneform và được cắt bằng các enzyme giới hạn SmaI (Ví dụ 4 (3) nhờ kit ghép nối (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi biến nạp với các tế bào khả biến (Takara Shuzo Co., Ltd.) của E. coli JM109, các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L (để 10g/l bacto trypton, 5g/l dịch chiết nấm men, 5g/l NaCl và 15g/l thạch và có độ pH là 7,2) chứa AOigImi X-Gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-galactosit) và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu xanh được tạo ra và thu được các chủng đã được biến nạp được sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, các plasmid được tạo ra bằng phương pháp kiềm hóa (Seibutsu Kogaku Jikken-shodo Nippon Seibutsu Kogaku-kai xuất bản và Baifukan phát hành, trang 105, 1992). Sau đó xác định trình tự của các trình tự ADN được xen vào trong vật truyền bằng phương pháp thông thường, plasmid này chứa trình tự ADN được xen vào trong đó được gọi là pNEOLBPDHaprol.

Hơn nữa, các đoạn môi được chỉ ra như Seq ID No.37, Seq ID No.38 và Seq ID No.39 trong Danh mục trình tự được tổng hợp để cấu trúc các plasmid trong đó vùng được giả định là đoạn khởi đầu được thay đổi thành trình tự liên ứng của các gen khởi đầu của vi khuẩn Coryneform. Bằng cách sử dụng từng đoạn môi và đoạn môi được thể hiện trong Seq ID No.36, các đoạn ADN trong đó vùng khởi đầu của gen pdhA được thay đổi thành trình tự liên ứng được khuếch đại bằng phản ứng PCR nhờ sử dụng ADN nhiễm sắc thể của Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 làm khuôn mẫu. Trong số các đoạn môi đã được tổng hợp này, Seq ID No.37 tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2244 đến bazơ No.2273 trong Seq ID No.32; nhưng bazơ No.2255 được thay bằng c, và bazơ No.2257 được thay bằng A; như vậy chỉ có vùng 35 được thay bằng đoạn trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform. Seq ID No.38 tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2249 đến bazơ No.2288 trong Seq ID No.32, nhưng các bazơ No.2279 và No.2281 được thay bằng T; như vậy chỉ có vùng 10 được thay bằng đoạn trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform. Trình tự No.39 tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2249 đến bazơ No.2288 trong Seq ID No.32, nhưng bazơ No.2255 được thay bằng c, bazơ

No.2257 được thay bằng A, và bazơ No.2279 và bazơ No.2281 được thay bằng T; như vậy cả vùng 35 lẫn vùng 10 đều được thay đổi thành trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, được tạo ra nhờ kit làm sạch ADN hệ gen của vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.) làm khuôn mẫu trong các điều kiện phản ứng chuẩn được đề cập ở trang 8 của tạp chí PCR Technology (tác giả là H. Erlich và do Stockton Press phát hành, 1989) để khuếch đại vùng khởi đầu của gen pdhA với các đoạn môi này sao cho vùng khởi đầu được thay đổi thành trình tự liên ứng. Các sản phẩm PCR thu được như vậy được làm sạch bằng phương pháp thông thường và được cho phản ứng với enzyme giới hạn SmaI. Các đoạn này được ghép nối với pNEOL không có vùng khởi đầu của gen lacZ, mà có thể sao chép trong vi khuẩn Coryneform và được cắt bằng enzyme giới hạn SmaI, với kit ghép nối (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi biến nạp với các tế bào khả biến (Takara Shuzo Co., Ltd) của E. coli JM109, các tế bào được dàn lên các đĩa môi trường L (để 10g/l bacto trypton, 5g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl và 15g/l thạch và có độ pH là 7,2) chứa X-Gal 40 μ g/ml (5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-galactosit) và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu xanh được thu gom và thu được các chủng biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các chủng biến nạp này, các plasmid được tạo ra bằng phương pháp kiềm hóa (Seibutsu Kogaku Tikken-sho do Nippon Seibutsu Kogaku kai xuất bản và do Baifukan công bố, trang 105, 1992). Sau khi xác định trình tự các đoạn ADN được xen vào trong vật truyền bằng phương pháp thông thường, plasmid chứa các đoạn ADN, trong đó chỉ có trình tự ở vùng 35 được thay đổi thành trình tự liên ứng, được xen vào trong đó được gọi là pNEOLBPDHA pro35; plasmid chứa các đoạn ADN, trong đó chỉ có trình tự trong vùng lo được thay đổi thành trình tự liên ứng, được xen vào trong đó được gọi là pNEOLBPDHA pro10; và plasmid chứa các đoạn ADN, trong đó các trình tự ở cả vùng 35 lẫn vùng 10 đều được thay đổi thành trình tự liên ứng, được xen vào trong đó được gọi là pNEOLBPDHA pro3510.

(5) Đánh giá hoạt tính gen khởi đầu *pdhA* đột biến:

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 được biến nạp với các plasmid gọi là pNEOLBPDH_{pro}I, pNEOLBPDH_{pro}IO và pNEOLBPDH_{pro}3510 bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791) để thu được các chủng biến nạp. Hoạt tính I₃-galactosidaza của các thể biến nạp thu được được xác định bằng phương pháp được đề cập trong Ví dụ 4 (4). Sau khi thay đổi trình tự ở vùng khởi đầu đổi thành trình tự liên ứng, hoạt tính I₃-galactosidaza được thể hiện trong Bảng 18, trong đó hoạt tính của enzym I₃-galactosidaza có vùng khởi đầu của gen *pdhA* được cho là I.

Bảng 18 Chủng

Hoạt tính P⁺galactosidaza

(giá trị tương đối) ATCC13869/pNEOLBPDH_{pro}I 1

ATCC13869/pNEOLBPDH_{pro}IO 6 ATCC13869/pNEOLBPDH_{pro}3510 7,5

Các kết quả này cho thấy rằng vùng khởi đầu đề xuất là đoạn khởi đầu của gen *pdhA* và mức độ biểu hiện của *pdhA* có thể được thay đổi (cao hơn) bằng cách thay đổi trình tự trong vùng này thành trình tự liên ứng. Thực tế này cho thấy rằng mức độ biểu hiện có thể được thay đổi mà không cần sử dụng plasmid bằng cách thay đổi vùng khởi đầu của gen *pdhA*.

(6) Cấu trúc plasmid để tạo ra chủng biến đổi gen khởi đầu

Do đã chứng minh được rằng mức độ biểu hiện của *pdhA* có thể được thay đổi bằng cách gây các đột biến trong gen khởi đầu, nên plasmid để tạo ra chủng biến đổi gen khởi đầu *pdhA* được cấu trúc. Ba cấu trúc của các plasmid của các chủng biến đổi gen khởi đầu *pdhA*. Chúng là các plasmid trong đó vùng 35, vùng lo và cả hai vùng lần lượt được thay đổi thành trình tự liên ứng.

Các đoạn mỗi được thể hiện trong Seq ID No.40 và Seq ID No.41 mới được tổng hợp dựa vào trình tự ADN đã được tách dòng. Trong số các đoạn mỗi được tổng hợp, Seq ID No.40 là sợi bổ trợ của trình tự ADN tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.2491 đến bazơ No.2521 trong Seq ID No.32, được thể hiện từ đầu 5', và đến đoạn bao gồm ba A sau bốn T ở đầu cuối 5'. Seq ID No.33 là sợi bổ trợ của trình tự ADN tương ứng với trình tự nằm trong khoảng từ bazơ No.5020 đến bazơ No.5039 của gen *pdhA* trong Seq ID No.32, được thể hiện từ đầu 5'. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng Seq ID No.33 và Seq ID No.40 như các đoạn mỗi và nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, được tạo ra bằng kit làm sạch ADN hệ gen của vi khuẩn (Advanced Genetic Technologies Corp.). làm khuôn mẫu trong các điều kiện phản ứng chuẩn được đề cập ở trang 8 của tạp chí PCR Technology (do H. Erlich xuất bản và Stockton Press công bố, 1989). Hơn nữa, phương pháp PCR được tiến hành bằng cách sử dụng Seq ID No.39 và Seq ID No.41 và nhiễm sắc thể của *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 làm khuôn mẫu. Các sản phẩm của phản ứng PCR thu được như vậy được làm sạch bằng phương pháp thông thường. Phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các sản phẩm PCR thu được nhờ sử dụng Seq ID No.33 và No.40, các sản phẩm PCR thu được nhờ sử dụng Seq ID No.39 và Seq ID No.41 và Seq ID No.33 và 41 làm các đoạn mỗi. Điều kiện của phản ứng PCR là như sau: Nồng độ của bốn trình tự ADN này có thể là 10⁰ trong hỗn hợp phản ứng và La tag (Takara Shuzo Co., Ltd.) được sử dụng mà không cần khuôn mẫu. Các sản phẩm của phản ứng PCR được làm sạch bằng phương pháp thông thường, và được cho phản ứng với enzym giới hạn Sail và XhoI. Các đoạn thu được này được ghép nối với các đoạn thu được bằng cách cắt plasmid miễn cảm nhiệt độ pSFKT2 bằng Sail, mà nó có thể sao chép trong vi khuẩn *Corynebacterium*, nhờ sử dụng kit ghép nối (Takara Shuzo Co., Ltd.). Sau khi biến nạp với các tế bào khả biến (Takara Shuzo Co., Ltd.) của *E. coli* JM109, các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường L (để 10g/l bactotrypton, 5g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl và 15g/l thạch và có độ

pH là 7,2) chứa 10ng/ml IPTG (isopropyl-P-D-tiogalactopyranosit), 40 μ g/ml X-Gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-galactosit) và 25 μ g/ml kanamycin. Sau khi cấy qua đêm, các khuẩn lạc màu trắng được thu gom và thu được các thể biến nạp sau khi phân lập khuẩn lạc đơn. Từ các thể biến nạp này, plasmid được tạo ra bằng phương pháp kiềm hóa (Seibutsu Kogaku Jikken-sho do Nippon Seibutsu Kogaku-kai xuất bản và Baifukan công bố, trang 105, 1992). Sau khi xác định trình tự các đoạn ADN được xen vào vật truyền, trình tự bazơ được so với trình tự của gen pdhA được công bố trong trình tự No.32. Plasmid này chứa các đoạn ADN, trong đó chỉ có các trình tự ở vùng 35 và vùng 10 của gen khởi đầu được thay đổi thành trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform, được xen vào trong đó được gọi là pSFKTPDHApr3510.

Plasmid trong đó vùng 35 của đoạn khởi đầu của gen pdhA được thay đổi thành đoạn trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform và cả plasmid trong đó vùng 10 của đoạn khởi đầu của gen pdhA được thay đổi thành đoạn trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform được tạo ra theo cách tương tự như nêu trên chỉ khác là Seq ID No.39 trong Danh mục trình tự lần lượt được thay bằng Seq ID No.37 và 38. Các plasmid này lần lượt được gọi là pSFKTPDHApr35 và pSFKTPDHApr10.

(7) Tạo ra các chủng biến đổi gen khởi đầu

Chủng có gen khởi đầu pdhA biến đổi được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng plasmid để tạo ra chủng biến đổi gen khởi đầu được cấu trúc ở bước (6) nêu trên.

Trước tiên, GC25 được biến nạp với plasmid pSFKTPDHApr3510 để tạo ra chủng biến đổi đoạn khởi đầu bằng phương pháp xung điện (xem J.P.KOKAI No.2-207791). Các tế bào này được dàn lên các đĩa môi trường CM2B (chứa 10g/l polypepton, 10g/l dịch chiết nấm men bacto, 5g/l NaCl, 10 μ g/ml biotin và 15g/l thạch, và có độ pH là 7,2) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C để thu được các chủng biến nạp. Các thể biến nạp này được nuôi cấy trong môi trường lỏng CM2B trong ống thử nghiệm qua đêm và sau đó được dàn lên các đĩa môi trường CM2B chứa 25 μ g/ml kanamycin và được nuôi cấy ở 34°C để thu được chủng biến nạp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp chủng chứa plasmid pSFKTPDHApr3510 trên nhiễm sắc thể của nó được xen vào bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Sau khi phân lập khuẩn lạc đơn, chủng này được nuôi cấy trong môi trường lỏng CM2B trong ống thử nghiệm qua đêm. Sau khi pha loãng thích hợp, nó được dàn lên các đĩa môi trường CM2B và được nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C. Sau khi các khuẩn lạc bắt đầu xuất hiện, các bản sao được tạo ra trên các đĩa môi trường CM2B chứa 25 μ g/ml kanamycin để thu được các chủng miễn cảm kanamycin. Hai trong số các chủng này, đó là chủng có trình tự của chủng kiểu đại đối với đoạn khởi đầu của gen pdhA và chủng khác có sự đột biến trong đó, có thể xảy ra, vùng này đã được xác định trình tự. Nhờ vậy, thu được chủng biến đổi gen khởi đầu, trong đó đột biến được tạo ra ở vùng khởi đầu của gen pdhA. Trong chủng này, vùng 35 và vùng 10 của đoạn khởi đầu của gen pdhA được thay bằng trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform. Chủng này được gọi là GD3510.

Các chủng trong đó vùng 35 và vùng 10 của đoạn khởi đầu của gen pdhA được thay đổi thành đoạn trình tự liên ứng của vi khuẩn Coryneform thu được theo cách tương tự như được nêu trên ngoại trừ plasmid pSFKTPDHApr3510 nêu trên để tạo ra chủng biến đổi gen khởi đầu được thay bằng plasmid pSFKTPDHApr35 và pSFKTPDHApr10 để tạo ra các chủng biến đổi gen khởi đầu và chúng lần lượt được gọi là GD35 và GD10.

(8) Đánh giá hiệu quả của quá trình nuôi cấy các chủng biến đổi đoạn khởi đầu của gen pdhA trong bình tam giác

Quá trình nuôi cấy lỏng để sản xuất axit L-glutamic được tiến hành với ba chủng biến đổi đoạn khởi đầu của gen pdhA thu được như nêu trên. Mỗi tế bào trong số các tế bào của chủng biến đổi gen khởi đầu GD3510, GD35, GD10 và GC25 thu được bằng cách nuôi cấy

trên các đĩa môi trường CM2B được cấy vào trong môi trường (l 1 lít nước cất chứa 30g glucoza, 1g KH_2PO_4 , 0,4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15ml dịch thủy phân đậu tương, 200 μg thiamin hydroclorua, 60 μg biotin và 50g CaCO_3 ; và độ pH được điều chỉnh đến 8,0 bằng KOH). Sau đó nuôi cấy có lắc ở nhiệt độ 31,5°C cho đến khi đường trong môi trường này được tiêu thụ hết. Sản phẩm thu được được cấy vào trong môi trường có thành phần tương tự như nêu trên với lượng là 5%, và quá trình nuôi cấy có lắc được tiến hành ở 37°C cho đến khi đường trong môi trường này được tiêu thụ hết. Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng axit L-glutamic tích lũy được trong dịch nuôi cấy được xác định bằng thiết bị Biotic

Analyzer AS-210 (sản phẩm của Asahi Chemical Industry Co., Ltd.). Các kết quả này được thể hiện trong Bảng 19.

Bảng 19 Chứng

Axit L-glutamic (g/dl) GC25 1,9 7GD35 2,0 GD10 2,0 GD3510 2,1

Từ các kết quả này chứng tỏ rằng chủng biến đổi gen khởi đầu thu được có sản lượng axit glutamic cao hơn.

Ví dụ 6. Gây đột biến trong vùng khởi đầu của gen arginosuccinat syntaza

1. Xác định trình tự ADN trong dòng trên của gen argG

Để khuếch đại gen argG của *Brevibacterium flavum* bằng phương pháp PCR, các trình tự ADN ở phía đầu trên và phía đầu dưới của ORF được xác định. Việc xác định các trình tự ADN được tiến hành bằng cách tổng hợp đoạn mỗi dựa trên trình tự ADN đã biết (Gel Bank accession AF030520) của ORF của gen argG của *Corynebacterium glutamicum* và sử dụng **kit** tách dòng in vitro LA PCR (Takara Shuzo Co., Ltd.) theo chỉ dẫn có trong **kit** này. Để làm các đoạn mỗi, chúng được sử dụng oligonucleotit (các đoạn mỗi 1 và 2) có trình tự ADN như được thể hiện trên Seq ID No.42 và Seq ID No.43 đối với phía đầu trên, và oligonucleotit (đoạn mỗi 3 và 4) có trình tự ADN như được thể hiện trên Seq ID No.44 và Seq ID No.45 đối với phía đầu dưới. Các trình tự ADN ở phía đầu trên và phía đầu dưới của gen argG được xác định bằng cách cắt hoàn toàn ADN nhiễm sắc thể của chủng 2247 (ATCC14067), nghĩa là chủng kiểu dại *Brevibacterium flavum*, bằng enzym giới hạn EcoRI, tiến hành phản ứng PCR đầu tiên với đoạn mỗi 2 hoặc 3 (có trình tự No.43 hoặc 44), và tiến hành phản ứng PCR thứ hai với đoạn mỗi 1 hoặc 2 (có trình tự No.42 hoặc 45).

2. Dự đoán vùng khởi đầu

Đoạn tương tự đoạn khởi đầu ở phía đầu trên của ORF của gen argG được nghiên cứu về các trình tự nêu trên bằng phần mềm có bán trên thị trường (GENETYX). Gây đột biến trong vùng có số điểm cao nhất (khoảng 120bp ở phía đầu trên của ATG thứ nhất). Sau đó, đo hoạt tính của đoạn khởi đầu này.

3. Gây đột biến trong trình tự khởi đầu và xác định hoạt tính của các gen khởi đầu đột biến

Các đoạn mỗi gây đột biến 9, 10, 11, 12 hoặc 13 và 7 (có trình tự lần lượt là No. 50, 51, 52, 53, 54 hoặc 48) của vùng có số điểm cao nhất được sử dụng, và phản ứng PCR thứ nhất được tiến hành với ADN nhiễm sắc thể của chủng AJ12092 làm khuôn mẫu. Phản ứng PCR thứ hai được tiến hành với ADN nhiễm sắc thể của chủng AJ12092 làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng sản phẩm PCR làm đoạn mỗi của đầu 3' và cũng bằng cách sử dụng đoạn mỗi 8 có trình tự No.49 làm đoạn mỗi ở đầu 5' để thu được các đoạn ADN có đột biến ở vùng khởi đầu mong muốn. Để xác định hoạt tính của các đoạn khởi đầu đột biến, các đoạn ADN này được xen vào vị trí SmaI của vật truyền lai thử của đoạn khởi đầu pNEOL sao cho chúng

cũng hướng với gen báo cáo lacZ để thu được các plasmit PNEOL-1, PNEOL-2, PNEOL-3, PNEOL-4 và PNEOL-7. Để làm đối chứng về hoạt tính, plasmit PNEOL-0 được tạo ra bằng cách xen đoạn ADN thu được bằng phản ứng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng AJ12092 và các đoạn mồi 7 và 8 vào phía đầu trên của gen lacZ của pNEOL.

PNEOL-0, pNEOL-1, pNEOL-2, pNEOL-3, pNEOL-4 và pNEOL-7 lần lượt được đưa vào trong chủng AJ12092. Các plasmit này được đưa vào bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791). Các thể biến nạp được chọn trên các đĩa môi trường CM2G (1 lít nước cất chứa 10g polypepton, 10g dịch chiết nấm men, 5g glucoza, 5g NaCl và 15g thạch, và có độ pH là 7,2) chứa 4 µg/ml chloramphenicol, là các chủng kháng chloramphenicol.

Các chủng này được dàn lên trên môi trường thạch (chứa 0,5g/dl glucoza, 1g/dl polypepton, 1g/dl dịch chiết nấm men, 0,5g/dl NaCl và 5 µg/l chloramphenicol), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong 20 giờ. Một trong số các tế bào thu được này được cấy vào trong môi trường [chứa 3g/dl glucoza, 1,5g/dl amoniasulfat,

0,1g/dl KH₂PO₄, 0,04g/dl MgSO₄, 0,001g/dl FeSO₄, 0,01g/dl MnSO₄, 5ng/dl VB₁₂, 5 µg/dl biotin và 45mg/dl (tính theo N) dịch thủy phân đậu tương]. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong 18 giờ, hoạt tính β-galactosidaza của các tế bào thu được được xác định như đã được đề cập trong Ví dụ 4 (4).

Vì hoạt tính p-galactosidaza được phát hiện trong chủng AJ12092/pNEOL-0 như được thể hiện trong Bảng 20 đã phát hiện ra rằng đoạn ADN được xen vào phía đầu trên của gen cấu trúc lacZ có chức năng như đoạn khởi đầu. Hơn nữa, hoạt tính β-galactosidaza của từng chủng trong số các chủng được đưa plasmit vào cao hơn so với chủng AJ12092/pNEOL-0. Vì vậy, đã phát hiện ra rằng hoạt tính phiên mã được gia tăng bằng cách gây đột biến trong trình tự tương tự đoạn khởi đầu, như được thể hiện trong Bảng 20.

Bảng 20 Chủng

Hoạt tính tương đối (AJ12092/pNEOL-0 = 1) AU2092 nd AJ12092/pNEOL-0 1,0
AJ12092/pNEOL-1 2,8 AJ12092/pNEOL-2 2,7 AJ12092/pNEOL-3 1,8 AJ12092/pNEOL-4 0,8
AJ12092/pNEOL-7 3,0

4. Cấu trúc plasmit để gây đột biến

Phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi 14 và 15 (có trình tự Seq ID No.55 và Seq ID No.56) với ADN nhiễm sắc thể của chủng AJ12092 làm khuôn mẫu. Các đoạn ADN này được xen vào trong vị trí SmaI trong vị trí tách dòng nhiều lần của vật truyền tách dòng pHSg-398 (sản phẩm của Takara) để cấu trúc plasmit pO. Sau đó, pO được cắt bằng các enzym giới hạn EcoRV và BspHI, và pNEOL-3 và pNEOL-7 cũng được cắt bằng các enzym giới hạn EcoRV và BspHI. Các đoạn ADN thu được như vậy được ghép nối với nhau để thu được các plasmit gây đột biến P3 (thể đột biến thu được từ đoạn mồi có đột biến 11) và p7 (thể đột biến thu được từ đoạn mồi được gây đột biến 13).

5. Đưa các plasmit gây đột biến trong vi khuẩn sinh ra arg

Mỗi plasmit trong số các plasmit thu được như trên được đưa vào trong vi khuẩn sinh ra arg của chủng *Brevibacterium lactofermentum* AJ12092 bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791). Vì các plasmit này không thể tự sao chép trong *Brevibacterium*, nên chỉ có các chủng thu được bằng cách sáp nhập các plasmit này vào trong nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng có thể được chọn là các chủng kháng Cm. Các chủng vi khuẩn trong đó plasmit có đột biến được sáp nhập vào trong nhiễm sắc thể được chọn là các chủng kháng chloramphenicol trên các đĩa môi trường CM2G, (1 lít nước cất chứa 10g polypepton, 10g dịch chiết nấm men, 5g glucoza, 5g NaCl và 15g thạch, và có độ pH là 7,2)

chứa 5µg/ml chloramphenicol. Sau đó, các chủng mất cảm Cm được chọn trong đó vùng khởi đầu của gen *argG* được thay bằng trình tự biến đổi mong muốn.

Kết quả là, thu được chủng được thay trình tự P3(AJ12092-P3) và chủng được thay trình tự P7 (AJ12092-P7).

6. Tách dòng gen *argG*

Dựa vào trình tự ADN xác định được như ở bước (1), các oligonucleotit (các đoạn mỗi 5 và 6) có trình tự ADN được thể hiện trong Seq ID No.46 và Seq ID No.47 được tổng hợp để tiến hành phản ứng PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Brevibacterium flavum* làm khuôn mẫu. Phản ứng PCR được tiến hành trong 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ở 55°C trong một giây và ở 72°C trong 2 phút 30 giây. Đoạn ADN thu được như vậy được tách dòng tại vị trí *SmaI* trong đoạn tách dòng nhiều lần của vật truyền tách dòng pSTV29 (Takara Shuzo Co., Ltd.) để thu được pSTVargG. Hơn thế nữa, pargG được tạo ra bằng cách xen vào vị trí *SacI* của pSTVargG một đoạn chứa điểm khởi đầu sao chép thu được bằng cách xử lý pSAK4 được trình bày trong Ví dụ 1 với *SacI*.

7. Đưa pargG vào trong Brev pargG được đưa vào trong chủng *Brevibacterium lactofermentum* AJ12092.

Plasmid được đưa vào bằng phương pháp xung điện (J.P.KOKAI No.2-207791). Thể biến nạp được chọn là chủng kháng chloramphenicol trên các đĩa môi trường CM2G (1 lít nước cất chứa 10g polypepton, 10g dịch chiết nấm men, 5g glucoza, 5g NaCl và 15g thạch, và có độ pH là 7,2) chứa 4µg/ml chloramphenicol.

8. Hoạt tính ArgG của các chủng biến đổi đoạn khởi đầu

Hoạt tính ArgG của hai chủng biến đổi đoạn khởi đầu và chủng thu được bằng cách khuếch đại *argG* với plasmid (AJ12092/pargG) nêu trên được xác định. Các chủng này được dàn lên trên môi trường thạch (chứa 0,5g/dl glucoza, 1g/dl polypepton, 1g/dl dịch chiết nấm men, 0,5g/dl NaCl và 5µg/dl chloramphenicol), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 20 giờ. Một aze tế bào thu được như vậy được cấy vào trong môi trường [chứa 3g/dl glucoza, 1,5g/dl amoni sulfat, 0,1g/dl KH₂PO₄, 0,04g/dl MgSO₄, 0,001g/dl FeSO₄, 0,01g/dl MnSO₄, 5µg/dl VB₁₂, 5µg/dl biotin và 45mg/dl (tính theo N) dịch thủy phân đậu tương]. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong 18 giờ, hoạt tính ArgG của các tế bào thu được được xác định bằng phương pháp nêu trên [Journal of General Microbiology (1990), 136, 1177-1183]. Hoạt tính ArgG của hai chủng biến đổi đoạn khởi đầu ArgG nêu trên và chủng (AJ12092/pargG) thu được bằng cách khuếch đại *argG* với plasmid được nêu trong bảng 21. Từ Bảng 21 thấy rằng, bằng cách gây đột biến trong đoạn khởi đầu, hoạt tính ArgG của AJ12092-P3 được tăng lên hai lần so với chủng bố mẹ, và hoạt tính của AJ12092-P7 được tăng lên ba lần so với chủng bố mẹ. Hoạt tính ArgG của AJ12092/pargG tăng khoảng 4,5 lần so với chủng bố mẹ.

Bảng 21 Chủng

Hoạt tính tương đối (AJ12092 = 1) AJ12092 1,0 AJ12092-P3 2,1 AJ12092-P7 2,9 AJ12092/pargG 4,4

9. Tạo ra ArgG bằng các chủng được biến đổi bằng đoạn khởi đầu

Tiến hành nuôi cấy trong bình tam giác từng chủng được biến đổi bằng đoạn khởi đầu ArgG. Để làm đối chứng, chủng bố mẹ AU2092 và AJ12092/pargG cũng được nuôi cấy. Mỗi chủng được cấy vào trong môi trường [chứa 0,1g/dl KH₂PO₄, 0,04g/dl MgSO₄, 0,001g/dl FeSO₄, 0,01g/dl MnSO₄, 5ng/dl VB₁₂, 5µg/dl biotin và 45mg/dl (tính theo N) dịch thủy phân đậu tương]; và sau đó được dàn lên môi trường thạch (chứa 0,5g/dl glucoza, 1g/dl polypepton,

lg/dl dịch chiết nấm men, 0,5g/dl NaCl và 5M-g/dl cloramphenicol), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 31,5°C trong 20 giờ. Một aze tế bào này được nuôi cấy trong bình chứa 4g/dl glucoza và 6,5g/dl amoni sulfat ở nhiệt độ 31,5°C cho đến khi glucoza được tiêu thụ hoàn toàn. Độ hấp thụ (CD620) của dịch nuôi cấy được pha loãng đến tỉ lệ 1/51 bằng dung dịch HC1 0,2N, lượng arginin được tạo ra (hàm lượng: g/dl) và thời gian nuôi cấy được thể hiện trong Bảng 22.

Từ Bảng 22 thấy rằng khi chủng được biến đổi bằng đoạn khởi đầu argG được sử dụng, sản lượng arg được gia tăng đến mức tương đương với lượng argG được khuếch đại bằng plasmit. Như vậy, các chủng được biến đổi bằng đoạn khởi đầu, cả chủng AJ12092 - P3 lẫn AJ12092-P7 đều có thời gian nuôi cấy tương đương với chủng bố mẹ trong khi thời gian nuôi cấy của chủng khuếch đại plasmit tăng lên. Như vậy rõ ràng rằng hiệu suất tạo ra arg của chủng được biến đổi bằng đoạn khởi đầu cao hơn so với của chủng khuếch đại bằng plasmit.

Bảng 22 Chủng OD

Arg (g/dl)

Thời gian nuôi cấy GO

Hiệu suất (g/dl/h) AJ12092 0,502 1,25 48 0,026 AJ12092-P3 0,510 1,47 48 0,031 AJ12092-P7 0,514 1,43 48 0,030 AJ12092/pargG 0,520 1,47 52 0,028

Ví dụ 7. Gây đột biến trong đoạn khởi đầu gen GDH của vi khuẩn Coryneform sinh ra glutamat

1. Cấu trúc các plasmit pdh đột biến Các plasmit có trình tự đoạn khởi đầu GDH của chủng FGR1 và chủng FGR2 được đề cập trong Ví dụ 2 được cấu trúc bằng cách phát sinh đột biến định hướng điểm. Để thu được trình tự đoạn gen khởi đầu GDH của chủng FGR1, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.57 và cấu trúc ADN tổng hợp được thể hiện trong No.60 dưới dạng các đoạn mồi và ADN nhiễm sắc thể của ATCC13869 làm khuôn mẫu; và mặt khác, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.58 và trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.59 làm các đoạn mồi với ADN nhiễm sắc thể của ATCC13869 làm khuôn mẫu. Hơn nữa, phản ứng PCR còn được tiến hành bằng cách sử dụng các trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.57 và Seq ID No.58 làm các đoạn mồi và hỗn hợp của các sản phẩm PCR này làm khuôn mẫu. Sản phẩm PCR thu được như vậy được xen vào trong vị trí SmaI của pSFKT2 (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 11-69896) để cấu trúc pSFKTGII. Để thu được trình tự gen khởi đầu GDH của chủng FGR2, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.57 và trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.62 làm các đoạn mồi và ADN nhiễm sắc thể của ATCC13869 làm khuôn mẫu, và mặt khác, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.58 và trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.61 làm các đoạn mồi và ADN nhiễm sắc thể của ATCC13869 làm khuôn mẫu. Hơn thế nữa, phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.57 và Seq ID No.5'8 làm các đoạn mồi và hỗn hợp của các sản phẩm PCR này làm khuôn mẫu. Sản phẩm PCR thu được như vậy được xen vào trong vị trí SmaI của pSFKT2 (Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 11-69896) để cấu trúc pSFKTG07. Các trình tự ADN của các đoạn này được xen vào trong các vị trí SmaI của pSFKTGII và pSFKTG07 được xác định để xác nhận rằng không gây đột biến trong các đoạn khác ngoài đoạn khởi đầu trong GDH.

2. Cấu trúc các chủng biến đổi gen khởi đầu gdh

Tiếp theo, pSFKTGII và pSFKTG07 được đưa vào trong chủng AU 3029 bằng phương pháp xung điện, và các thể biến nạp được nuôi cấy trên các đĩa môi trường CM2B chứa 25lg/ml

kanamycin ở nhiệt độ 25°C được chọn. Các thể biến nạp được nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C để chọn các chủng kháng kanamycin ở nhiệt độ 34°C. Thực tế cho thấy rằng các chủng kháng kanamycin pSFKTGII và pSFKTG07 được đánh trên nhiễm sắc thể của chủng AJ13029. Các chủng mất cảm kanamycin thu được từ các chủng trong đó plasmid được đánh lên trên nhiễm sắc thể. Trình tự gen khởi đầu GDH của các chủng này được xác định. Các chủng có trình tự gen khởi đầu GDH tương tự như trình tự của pSFKTGI I và pSFKTG07 lần lượt được gọi là GAO I và GA02.

3. Xác nhận hiệu suất sinh ra axit L-glutamic của các chủng biến đổi gen khởi đầu gdh

Hiệu suất sinh ra axit glutamic của các chủng GAO I và GA02 và chủng bố mẹ được xác định theo cách tương tự như trong Ví dụ 2 (2) nêu trên. Kết quả là, mức độ tích lũy axit glutamic tăng đáng kể được ghi nhận trong GAO I và GA02 như được thể hiện trong Bảng 23.

Bảng 23 Chủng

Giữ (g/dl)

Hoạt tính đặc hiệu của GDH

Giá trị tương đối AJ13029 2,6 7,7 1,0 GA01 3,0 22,3 2,9 GA02 2,9 27,0 3,5

4. Cấu trúc plasmid gdh kiểu tự tách dòng

Đầu tiên, tạo ra vật truyền pAJ220 tự tách dòng, pAJ226 (J.P.KOKAI No.61-152289) được xử lý bằng EcoRV và PstI để tạo ra đoạn chứa vùng có thể tự sao chép trong vi khuẩn Coryneform. Đoạn được ghép nối với đoạn ADN dài 0,7kb thu được bằng cách xử lý pAJ224 (J.P.KOKAI No. Sho 61-152289) bằng EcoRV và SstI để thu được plasmid pAJ220. Plasmid này có thể tự sao chép trong vi khuẩn Coryneform, và nó có thể truyền tính kháng trimethoprim cho vật chủ.

Phản ứng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp được thể hiện trong Seq ID No.63 và Seq ID No.64 làm các đoạn mồi và ADN nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn Coryneform kiểu đại ATCC13869 làm khuôn mẫu. Đoạn gen gdh thu được như vậy được xen vào vị trí Ball của pAJ220 để cấu trúc pAJ220G. Đoạn khởi đầu nằm gần vị trí Ball của pAJ220, và mức độ biểu hiện của gen được xen vào được gia tăng tùy thuộc vào hướng gen xen vào trong vị trí Ball. PAJ220G và pGDH được đưa vào trong chủng ATCC13869 bằng phương pháp xung điện. Hoạt tính GDH của chủng được cấu trúc như vậy được xác định bằng phương pháp nêu ở bước (1) nêu trên. Kết quả là, hoạt tính GDH của chủng trong đó pAJ220G được đưa vào cao hơn khoảng 1,5 lần so với hoạt tính của chủng trong đó dGDH được đưa vào như được thể hiện trong Bảng 24.

Bảng 24 Chủng

Hoạt tính đặc hiệu của GDH

Giá trị tương đối ATCC13869 7,7 1,0 ATCC13869/pGDH 82,7 10,7 ATCC13869/pAJ220G 120,1 15,6

5. Đánh giá ảnh hưởng của hoạt tính gdh lên sản lượng và sản phẩm phụ Asp pGDH và pAJ220G được đưa vào trong AJ13029 bằng phương pháp xung điện. Từng chủng trong số các chủng này và các chủng thu được ở bước (2) nêu trên được cấy vào trong môi trường nhân giống có thành phần được thể hiện trong Bảng 25, và tiến hành nuôi cấy có lắc ở nhiệt độ 31,5°C trong 24 giờ để thu được dịch nuôi cấy. 300ml môi trường chính có thành phần được thể hiện trong Bảng 25 được chuyển vào trong các bình lên men thủy tinh có dung tích

500ml và sau đó được thanh trùng bằng cách gia nhiệt. 40ml dịch nhân giống nêu trên được cấy vào trong môi trường này. Quá trình nuôi cấy được bắt đầu ở nhiệt độ 31,5°C trong khi tốc độ khuấy và tốc độ thông khí lần lượt được điều chỉnh với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1300 vòng/phút và từ 1/2 đến 1/1 thể tích/phút. Độ pH của dịch nuôi cấy được giữ ở 7,5 bằng khí amoniac. Nhiệt độ được nâng lên 37°C sau 8 giờ kể từ lúc bắt đầu nuôi cấy. Quá trình nuôi cấy kết thúc khi glucoza được tiêu thụ hoàn toàn trong thời gian từ 20 đến 40 giờ, và lượng axit L-glutamic được tạo ra và tích lũy trong dịch nuôi cấy được xác định (Bảng 26). Hoạt tính GDH để đạt được sản lượng cao nhất là cao hơn khoảng 3 lần. Tiếp tục tăng hoạt tính GDH thì thấy sản lượng giảm. Khi hoạt tính GDH tăng lên đến 16 lần thì sản lượng giảm khá nhiều. Các axit amin được tạo ra là các sản phẩm phụ được phân tích bằng thiết bị Hitachi Amino Acid Analyzer L-8500 phát hiện ra rằng vì hoạt tính GDH gia tăng, nên lượng axit aspartic và alanin tích lũy được cũng gia tăng. Từ các kết quả này thấy rằng: để gia tăng sản lượng axit glutamic, cần phải gia tăng hoạt tính GDH sao cho phù hợp, tránh gia tăng lượng axit aspartic và alanin. Một trong số các phương pháp hữu hiệu bao gồm việc gây đột biến trong gen khởi đầu *gdh* để kiểm soát hoạt tính GDH cao gấp 3 lần so với hoạt tính của chủng bố mẹ.

Bảng 25

Thành phần

Hàm lượng

Môi trường nhân giống

Môi trường chính Glucoza 50g/l 150g/l KH_2PO_4 1g/l 2g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4g/l 1,5g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l 15mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l 15mg/l

Dịch thủy phân đậu tương 20ml/l 50ml/l Biotin 0,5mg/l 2mg/l

Thiamin hydroclorua 2mgA 3mg/l

Bảng 26 Chủng

Giũ (g/dl)

Asp (mg/dl)

Ala (mg/dl)

Hoạt tính tương đối của GDH

Giá trị tương đối AJ13029 8,3 49 60 7,7 1,0 GA01 9,0 22,3 2,9 GA02 8,9 27,0 3,5
AJ13029/pGDH 8,8 82,7 10,7 AJ13029/pAJ220G 7,5 120,12 15,6