



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

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

(11)



1-0026120

(51)⁷ C12N 15/82; A01H 5/00; C07K 14/325 (13) B

(21) 1-2013-03204

(22) 04/04/2012

(86) PCT/US2012/032086 04/04/2012

(87) WO2012/138703 11/10/2012

(30) 61/471,848 05/04/2011 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/02/2014 311A

(73) ATHENIX CORP (US)

3500 Paramount Parkway, Morrisville, NC 27560, United States of America

(72) LEHTINEN, Duane (US); DESAI, Nalini, Manoj (US); HEINRICHS, Volker (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP CÓ HOẠT TÍNH DIỆT SINH VẬT GÂY HẠI, THỰC VẬT CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO VỆ THỰC VẬT KHỎI SINH VẬT GÂY HẠI

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp sản xuất hoạt tính diệt sinh vật gây hại đối với vi khuẩn, thực vật, tế bào thực vật, mô và hạt. Trình tự mã hóa độc tố có thể được sử dụng trong cấu trúc ADN hoặc catxet biểu hiện để biểu hiện ở thực vật và vi khuẩn. Chế phẩm cũng bao gồm vi khuẩn, thực vật, tế bào thực vật, mô và hạt được biến nạp. Cụ thể là, sáng chế cũng đề xuất trình tự polynucleotit và protein độc tố được mã hóa. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với các trình tự axit amin này. Cụ thể là, sáng chế bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein dung hợp, cũng như các biến thể có hoạt tính sinh học và các mảnh của chúng, trong đó protein dung hợp chứa phần đầu C của trình tự nêu trong SEQ ID NO:43. Protein dung hợp cũng có thể chứa phần đầu N của trình tự nêu trong SEQ ID NO:45. Sáng chế cũng bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:47 và từ 1 đến 14 hoặc trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và từ 15 đến 31, gồm cả các biến thể có hoạt tính sinh học và các mảnh của chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử. Sáng chế đề cập đến các gen mới mã hóa protein diệt sinh vật gây hại. Các protein này và trình tự axit nucleic mã hóa chúng là hữu ích trong điều chế chế phẩm diệt sinh vật gây hại và trong việc tạo ra thực vật chuyển gen kháng sinh vật gây hại.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bacillus thuringiensis là vi khuẩn gram dương trong đất tạo ra bào tử mà đặc trưng bởi khả năng tạo ra các thể vùi dạng tinh thể gây độc đặc hiệu đối với một số bộ và loài côn trùng có hại đối với thực vật và các sinh vật không hướng đích khác. Vì vậy, các chế phẩm bao gồm các chủng *Bacillus thuringiensis* hoặc protein trừ sâu của chúng có thể được sử dụng làm thuốc trừ sâu có thể chấp nhận về mặt môi trường để phòng trừ các sinh vật gây hại là côn trùng hoặc vật truyền là côn trùng trong nông nghiệp đối với nhiều bệnh cho con người và động vật.

Các protein dạng tinh thể (Cry) (delta-nội độc tố) từ *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính trừ sâu hiệu lực đối với phần lớn Bộ cánh vảy, Bộ cánh nửa, Bộ côn trùng hai cánh và ấu trùng của loài cánh cứng. Các protein này cũng có hoạt tính diệt các bộ sinh vật gây hại *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* và *Acari*, cũng như các bộ động vật không có xương sống khác như *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* và *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) Cây họ The *Bacillus Thuringiensis*. Trong ấn phẩm: *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Protein dạng tinh thể không thể hiện hoạt tính trừ sâu cho đến khi nó được côn trùng ăn vào bụng và được hòa tan trong trung tràng của côn trùng. Các tiền độc tố mà được ăn vào này được thủy phân bởi proteaza trong đường tiêu hóa của côn trùng thành phân tử có độc tố hoạt tính. (Höfte and Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Độc tố này gắn kết với các thụ thể đường biên bụi đỉnh trong trung tràng của ấu trùng đích và lồng vào màng đỉnh tạo ra các kênh ion hoặc các lỗ, dẫn đến chết ấu trùng.

Ngoài các nội độc tố, *B. thuringiensis* cũng tạo ra các protein trừ sâu được tiết trong giai đoạn phát triển sinh dưỡng của nó, cụ thể là, các protein trừ sâu sinh dưỡng (Vip). Do sự phát hiện ra độc tố Vip thứ nhất, hai nhóm độc tố Vip chính đã được nhận biết trong *B. thuringiensis*. Một nhóm độc tố Vip bao gồm các độc tố nhị phân mà được tạo thành gồm hai thành phần, Vip1 và Vip2 đã được mô tả trong ấn phẩm: (Warren (1997) In N. B. Carozzi and M. G. Koziel (ed.), *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Taylor & Francis, London, United Kingdom). Sự kết hợp của Vip1 và Vip2 là thuốc trừ sâu ở mức mạnh đối với côn trùng quan trọng về mặt nông nghiệp, sâu hại rễ ngô phương Tây (*Diabrotica virgifera*), nhưng không thể hiện hoạt tính trừ sâu đối với các loài côn trùng cánh vảy bất kỳ (Han et al. (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:932-936). Nhóm khác bao gồm các độc tố Vip3, mà không có chung các trình tự tương đồng với Vip1 hoặc Vip2. Độc tố Vip3 được nhận biết đầu tiên, Vip3Aa1, có hoạt tính trừ sâu ở mức cao đối với loài sinh vật gây hại cánh vảy chính của ngô và bông, bao gồm tất cả các loài sâu đục thân *Spodoptera frugiperda* và sâu bông *Helicoverpa zea*, nhưng không thể hiện hoạt tính diệt sâu đục thân ngô châu Âu *Ostrinia nubilalis*, sinh vật gây hại chủ yếu của ngô (Estruch et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5389-5394). Loại bớt gen *vip3Aa1* ra khỏi chủng *B. thuringiensis* dẫn đến giảm đáng kể hoạt tính trừ sâu của chủng *B. thuringiensis*, điều này gợi ý rằng Vip3 góp phần vào đặc tính độc chung của các chủng *B. thuringiensis* (Donovan et al. (2001) *J. Invertebr. Pathol.* 78:45-51). Cũng quan sát được rằng Vip3Aa1 tiêu diệt côn trùng bằng cách làm tan tế bào trung tràng của côn trùng (Yu et al. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63:532-536) thông qua sự hình thành lỗ của màng tế bào (Lee et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4648-4657).

Việc sử dụng tăng liều của thuốc trừ sâu được tạo thành chủ yếu từ *B. thuringiensis* đã tạo ra sức kháng trong các quần thể sâu tơ trên cánh đồng, *Plutella xylostella* (Ferré and Van Rie (2002) *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533). Cơ chế kháng phổ biến nhất là giảm sự gắn kết của độc tố vào (các) thụ thể trung tràng đặc hiệu của sâu. Điều này cũng tạo ra sự kháng chéo đối với các độc tố khác mà có cùng thụ thể giống nhau (Ferré and Van Rie (2002)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp sản xuất hoạt tính diệt sinh vật gây hại đối với vi khuẩn, thực vật, tế bào thực vật, mô và hạt. Các chế phẩm bao gồm các phân tử axit nucleic mã hóa các trình tự đối với các polypeptit diệt sinh vật gây hại và trừ sâu, các vector bao gồm các phân tử axit nucleic và tế bào chủ bao gồm các vector. Các chế phẩm cũng bao gồm các trình tự polypeptit diệt sinh vật gây hại. Các kháng thể kháng các polypeptit này được bộc lộ. Trình tự nucleotit có thể được sử dụng trong các cấu trúc ADN hoặc catxet biểu hiện để biến nạp và biểu hiện ở sinh vật, bao gồm vi sinh vật và thực vật. Các trình tự nucleotit hoặc axit amin có thể là các trình tự tổng hợp mà được thiết kế để biểu hiện trong sinh vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi sinh vật hoặc thực vật. Các chế phẩm cũng bao gồm vi khuẩn, thực vật, tế bào thực vật, mô và hạt bao gồm trình tự nucleotit của sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập mà mã hóa protein diệt sinh vật gây hại. Vì vậy, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6; (b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự khuyết đoạn hoặc sự cài xen axit amin so với các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu, và sâu bướm hại đậu mè. Ngoài ra, sáng chế cũng bao gồm các trình tự axit amin tương ứng với protein diệt sinh vật gây hại. Vì vậy, sáng chế cũng đề xuất polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự

axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè. Phân tử axit nucleic được phân lập hoặc tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein dung hợp, cũng như các biến thể có hoạt tính sinh học hoặc các mảnh của chúng, trong đó protein dung hợp bao gồm phần đầu C của trình tự nêu trong SEQ ID NO:43 cũng được bộc lộ. Trong các trường hợp khác, protein dung hợp bao gồm phần đầu N của trình tự nêu trong SEQ ID NO:45.

Theo các phương án cụ thể, phân tử axit nucleic được đề cập bởi sáng chế (bao gồm các vectơ, tế bào chủ, thực vật và hạt bao gồm phân tử axit nucleic) bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:1, 4, 5 hoặc 6, hoặc trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, 18, 19 hoặc 20. Các trình tự nucleotit mà bổ trợ với trình tự nucleotit của sáng chế hoặc lai với trình tự của sáng chế hoặc phần bổ sung của nó cũng được bộc lộ. Các protein dung hợp được phân lập hoặc tái tổ hợp được mã hóa bởi phân tử axit nucleic của sáng chế cũng được đề cập trong sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất:

- vectơ bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế, tốt hơn là còn bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit khác loại;
- tế bào chủ chứa axit nucleic tái tổ hợp theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế, tốt hơn là tế bào chủ này là tế bào chủ vi khuẩn hoặc tế bào thực vật;
- thực vật chuyển gen bao gồm tế bào chủ thực vật theo sáng chế, tốt hơn là trong đó thực vật này được chọn từ nhóm bao gồm ngô, lúa miến, lúa mì, cải bắp, hướng dương, cà chua, họ cải, hồ tiêu, khoai tây, bông, lúa, đậu nành, củ cải đường, mía, thuốc lá, lúa mạch và cây cải dầu;
- hạt chuyển gen bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế.
- chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế và sử dụng các polypeptit này để phòng trừ hoặc tiêu diệt sinh vật gây hại thuộc Bộ cánh vảy, Bộ cánh nửa, Bộ bọ cánh cứng, giun tròn hoặc côn trùng hai cánh.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để phòng trừ hoặc diệt sinh vật gây hại, trong đó phương pháp này (a) phòng trừ quần thể sinh vật gây hại thuộc bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bọ cánh cứng, giun tròn hoặc cánh vảy, bao gồm bước cho quần thể này tiếp xúc với lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại của polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế; hoặc (b) diệt sinh vật gây hại thuộc bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bọ cánh cứng, giun tròn hoặc hai cánh, bao gồm bước cho sinh vật gây hại này tiếp xúc với hoặc cho sinh vật gây hại này ăn, lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại của polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện mà biểu hiện phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit, tốt hơn là trong đó thực vật đã nêu là tế bào thực vật cũng được đề xuất.

Sáng chế còn đề xuất thực vật có cấu trúc ADN được hợp nhất ổn định vào bộ gen của nó bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bảo vệ thực vật khỏi sinh vật gây hại, bao gồm bước biểu hiện ở thực vật hoặc tế bào của nó phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự axit amin bất kỳ

trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu, và sâu bướm hại đậu mèo, tốt hơn là trong đó thực vật này tạo ra polypeptit diệt sinh vật gây hại có hoạt tính diệt sinh vật gây hại đối với bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, giun tròn hoặc sinh vật gây hại hai cánh.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng sản lượng ở thực vật, bao gồm bước trồng trong thực địa thực vật hoặc hạt của nó có cấu trúc ADN được hợp nhất ổn định vào bộ gen của nó bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo.

Các chế phẩm và phương pháp của sáng chế là hữu ích để tạo ra các sinh vật có sự kháng và dung nạp với sinh vật gây hại được tăng cường. Các sinh vật này và các chế phẩm bao gồm sinh vật là mong muốn cho các mục đích trong nông nghiệp. Các chế phẩm của sáng chế cũng là hữu ích để tạo ra các protein thay đổi hoặc được cải thiện mà có hoạt tính diệt sinh vật gây hại hoặc để phát hiện sự có mặt của protein hoặc axit nucleic diệt sinh vật gây hại trong các sản phẩm hoặc sinh vật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện biểu đồ các cấu trúc dung hợp.

Fig.2 thể hiện các kết quả của thử nghiệm sinh học đĩa lá *in vitro*. pAG6585 chứa optAxmi115v01 (N=14) và pAG6141 chứa optAxmi115v02.01.01 (N=8).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm và phương pháp để điều chỉnh sự kháng và sự dung nạp ở sinh vật đối với sinh vật gây hại, cụ thể là thực vật hoặc tế bào thực vật. Thuật ngữ “sự kháng” chỉ sinh vật gây hại (ví dụ, côn trùng) bị tiêu diệt ngay khi ăn hoặc tiếp xúc khác với polypeptit của sáng chế. Thuật ngữ “sự dung nạp” chỉ sự làm suy yếu hoặc làm giảm sự vận động, ăn, sinh sản hoặc các chức năng khác của sinh vật gây hại. Các phương pháp này bao gồm biến nạp các sinh vật với trình tự nucleotit mã hóa protein diệt sinh vật gây hại của sáng chế. Cụ thể là, trình tự nucleotit theo sáng chế là hữu ích để tạo ra thực vật và vi sinh vật mà có hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Do đó, vi khuẩn, thực vật, tế bào thực vật, mô thực vật và hạt được biến nạp được tạo ra. Các chế phẩm là các axit nucleic và protein diệt sinh vật gây hại của *Bacillus* hoặc các loài khác. Các trình tự tìm thấy sử dụng trong tạo cấu trúc các vectơ biểu hiện đối với sự biến nạp tiếp theo vào sinh vật quan tâm, như các đầu dò để phân lập các gen tương đồng (hoặc tương đồng riêng phần) khác và để tạo ra các protein diệt sinh vật gây hại thay đổi bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này, như miền hoán đổi hoặc ADN sắp xếp lại, ví dụ, với các thành viên của họ Vip1, Vip2 hoặc Vip3 hoặc độc tố. Các protein tìm thấy sử dụng trong phòng trừ hoặc tiêu diệt các quần thể sinh vật gây hại là bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, côn trùng hai cánh và giun tròn và để tạo ra các chế phẩm có hoạt tính diệt sinh vật gây hại.

Thuật ngữ “độc tố diệt sinh vật gây hại” hoặc “protein diệt sinh vật gây hại” chỉ độc tố mà có hoạt tính độc diệt một hoặc nhiều sinh vật gây hại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thành viên của bộ *Lepidoptera*, *Diptera* và *Coleoptera*, hoặc ngành *Nematoda* hoặc protein mà có tính tương đồng với protein này. Protein diệt sinh vật gây hại được phân lập từ các sinh vật bao gồm, ví dụ, *Bacillus* sp., *Clostridium bifermentans* và *Paenibacillus popilliae*. Protein diệt sinh vật gây hại bao gồm các trình tự axit amin được suy diễn từ toàn bộ chiều dài trình tự nucleotit được bộc lộ theo sáng chế và các trình tự axit amin mà ngắn hơn so với toàn bộ chiều dài trình tự, do sử dụng vị trí xuôi chiều khác nhau hoặc do xử lý mà tạo ra protein ngắn hơn có

hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Việc xử lý có thể xảy ra ở sinh vật, protein được biểu hiện trong hoặc ở sinh vật gây hại sau khi ăn protein.

Do đó, được đề xuất theo sáng chế là các trình tự nucleotit được phân lập hoặc tái tổ hợp mới mà tạo ra hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit với tính tương đồng với các độc tố đã được biết đến. Cũng được đề xuất là các trình tự axit amin của protein diệt sinh vật gây hại. Protein thu được từ việc dịch mã gen này cho phép tế bào phòng trừ hoặc tiêu diệt sinh vật gây hại mà ăn protein này.

Phân tử axit nucleic được phân lập và các biến thể và các mảnh của phân tử này

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6; (b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự khuyết đoạn hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu, và sâu bướm hại đậu mè. Cũng được bộc lộ theo sáng chế là trình tự nucleotit có khả năng lai với trình tự nucleotit của sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt như được xác định theo sáng chế. Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “phân tử axit nucleic” chỉ bao gồm phân tử ADN (ví dụ, ADN tái tổ hợp, ADN bổ trợ hoặc ADN bộ gen) và các phân tử ARN (ví dụ, ARN thông tin) và các chất tương tự ADN hoặc ARN được tạo ra bằng cách sử dụng các chất tương tự nucleotit. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Trình tự axit nucleic “được phân lập” hoặc “tái tổ hợp” (hoặc ADN) được sử dụng theo sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic (hoặc ADN) mà không dài hơn

trong môi trường tự nhiên của nó, ví dụ trong *in vitro* hoặc vi khuẩn tái tổ hợp hoặc tế bào chủ thực vật. Theo một số phương án, axit nucleic được phân lập hoặc tái tổ hợp là không có trình tự (tốt hơn là protein mã hóa trình tự) mà ở bên sườn axit nucleic tự nhiên (nghĩa là, trình tự được định vị ở các đầu 5' và 3' của axit nucleic) trong ADN bộ gen của sinh vật mà từ đó axit nucleic thu được. Đối với các mục đích của sáng chế, “được phân lập” đề cập đến phân tử axit nucleic ngoại trừ nhiễm sắc thể được phân lập. Ví dụ, theo các phương án khác nhau, delta-nội độc tố được phân lập mã hóa phân tử axit nucleic có thể chứa ít hơn khoảng 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0,5kb hoặc 0,1kb trình tự nucleotit mà ở bên sườn phân tử axit nucleic tự nhiên trong ADN bộ gen của tế bào mà từ đó axit nucleic thu được. Theo các phương án khác nhau, protein delta-nội độc tố mà hầu như không có nguyên liệu tế bào bao gồm các chế phẩm protein có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10% hoặc 5% (theo khối lượng khô) protein không phải delta-nội độc tố (theo sáng chế cũng được gọi là “protein lẫn tạp chất”).

Trình tự nucleotit mã hóa protein của sáng chế bao gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, 5, và 6. Các trình tự axit amin tương ứng đối với protein diệt sinh vật gây hại được mã hóa bởi các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 15, 18, 19 và 20.

Theo các phương án khác nhau, trình tự nucleotit là trình tự mà mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6; (b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự khuyết đoạn hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu, và sâu bướm hại đậu mè.

Theo một phương án, hoạt tính diệt sinh vật gây hại là hoạt tính diệt sinh vật gây hại cánh cứng. Theo phương án khác, hoạt tính diệt sinh vật gây hại là hoạt tính diệt sinh vật gây hại cánh vảy. Theo phương án khác, hoạt tính diệt sinh vật gây hại là hoạt tính diệt giun tròn. Theo phương án khác, hoạt tính diệt sinh vật gây hại hai cánh. Theo phương án khác, hoạt tính diệt sinh vật gây hại hoạt tính diệt sinh vật gây hại cánh nửa. Các phương pháp đo hoạt tính diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews *et al.* (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và US 5,743,477.

Để xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng của hai trình tự axit amin hoặc hai axit nucleic, trình tự được sắp hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu. Tỷ lệ phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số lượng vị trí giống nhau được chia sẻ bởi các trình tự (nghĩa là, phần trăm độ tương đồng = số lượng vị trí giống nhau / tổng số lượng vị trí (ví dụ, các vị trí trùng nhau) x 100). Theo một phương án, hai trình tự có chiều dài bằng nhau. Theo một trường hợp khác, tỷ lệ phần trăm độ tương đồng được tính theo toàn bộ trình tự tham chiếu (nghĩa là, trình tự được bộc lộ theo sáng chế như trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, 5 hoặc 6). Tỷ lệ phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật tương tự với các kỹ thuật được mô tả dưới đây, có hoặc không cho phép các khe hở. Trong tính toán tỷ lệ phần trăm độ tương đồng, thông thường, các kết hợp chính xác được đếm. Khe hở, nghĩa là vị trí trong sắp hàng trong đó gốc có mặt trong một trình tự, nhưng không có mặt trong trình tự khác, được xem như vị trí có các gốc không giống nhau.

Việc xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán. Ví dụ không hạn chế về thuật toán được sử dụng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin và Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, được thay đổi như trong ấn phẩm: Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Thuật toán này được kết hợp vào các chương trình BLASTN và BLASTX của Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Các tra cứu BLAST nucleotit được thực hiện bằng chương trình BLASTN, điểm số = 100, độ dài chuỗi ký tự = 12, để thu được trình tự nucleotit tương đồng với phân tử axit nucleic

tương tự diệt sinh vật gây hại của sáng chế. Các tra cứu BLAST protein có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTX, điểm số = 50, độ dài chuỗi ký tự = 3, để thu được các trình tự axit amin tương đồng với phân tử protein diệt sinh vật gây hại của sáng chế. Để thu được các thuật toán có khe dùng cho mục đích so sánh, Gapped BLAST (trong BLAST 2.0) có thể được sử dụng như được mô tả trong ấn phẩm: Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Theo cách khác, PSI-Blast có thể được sử dụng để thực hiện tra cứu lặp lại mà phát hiện các mối quan hệ xa giữa các phân tử. Xem ấn phẩm: Altschul *et al.* (1997) ,nêu trên. Khi sử dụng các chương trình BLAST, Gapped BLAST và PSI-Blast, các tham số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, BLASTX và BLASTN) có thể được sử dụng. Sự sắp hàng cũng có thể được thực hiện thủ công.

Ví dụ không hạn chế khác về thuật toán được sử dụng để so sánh các trình tự là thuật toán ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW so sánh các trình tự và sắp hàng toàn bộ trình tự axit amin hoặc ADN và do đó có thể tạo ra dữ liệu về sự bảo tồn trình tự của toàn bộ trình tự axit amin. Thuật toán ClustalW được sử dụng trong vài gói phần mềm phân tích trình tự ADN/axit amin hiện có trên thị trường, như mô đun ALIGNX của Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Sau khi sắp hàng các trình tự axit amin với ClustalW, tỷ lệ phần trăm độ tương đồng của axit amin được đánh giá. Ví dụ không hạn chế về chương trình phần mềm hữu ích để phân tích sự sắp hàng ClustalW là GENEDOCTM. GENEDOCTM (Karl Nicholas) cho phép đánh giá axit amin (hoặc ADN) tương tự và giống nhau giữa nhiều protein. Ví dụ không hạn chế khác về thuật toán được sử dụng để so sánh các trình tự là thuật toán của Myers và Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Thuật toán này được kết hợp vào chương trình ALIGN (version 2.0), mà là một phần của gói phần mềm GCG Wisconsin Genetics, phiên bản 10 (hiện có tại Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA). Khi sử dụng chương trình ALIGN để so sánh các trình tự axit amin, bảng gốc khối lượng PAM120, điểm phạt chiều dài khe hở 12 và điểm phạt khe hở 4 có thể được sử dụng.

Trừ phi có quy định khác, GAP phiên bản 10, mà sử dụng thuật toán của Needleman và Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, sẽ được sử dụng để xác định tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất của trình tự bằng cách sử dụng các tham số sau

đây: % độ tương đồng và % độ đồng nhất đối với trình tự nucleotit bằng cách sử dụng khối lượng theo khe hở 50 và khối lượng theo chiều dài 3 và ma trận ghi điểm số nwsgapdna.cmp; % giống nhau hoặc % tương tự đối với trình tự axit amin bằng cách sử dụng khối lượng theo khe hở 8 và khối lượng theo chiều dài 2 và chương trình ghi điểm số BLOSUM62. Các chương trình tương đương cũng có thể được sử dụng. Thuật ngữ “chương trình tương đương” chỉ chương trình so sánh chỉ trình tự bất kỳ mà, đối với hai trình tự bất kỳ được kể đến, tạo ra sự sắp hàng có các hợp nhau về gốc nucleotit đồng nhất và phần trăm độ tương đồng khi được so với sắp hàng tương ứng được tạo ra bởi GAP phiên bản 10.

Sáng chế cũng bao gồm phân tử axit nucleic cải biến. Trình tự nucleotit cải biến theo sáng chế là trình tự nucleotit mà mã hóa polypeptit chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự khuyết đoạn hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè. “Sự cải biến” protein diệt sinh vật gây hại mã hóa trình tự nucleotit bao gồm các trình tự mà mã hóa protein diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế, nhưng khác nhau về mặt bảo tồn do sự thoái hóa của mã di truyền cũng như các trình tự mà có đủ độ đồng nhất như được mô tả trên đây. Các biến thể alen xuất hiện tự nhiên có thể được nhận diện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã được biết đến, như phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR) và các kỹ thuật lai như được nêu dưới đây. Trình tự nucleotit biến thể cũng bao gồm trình tự nucleotit có nguồn gốc về mặt tổng hợp mà đã được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng đột biến định hướng điểm, nhưng vẫn mã hóa protein diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế như được mô tả dưới đây. Các protein biến thể được bao gồm bởi sáng chế có hoạt tính về mặt sinh học, tức là chúng tiếp tục có hoạt tính sinh học mong muốn bẩm sinh, tức là, hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Thuật ngữ “duy trì hoạt tính” chỉ rằng biến thể sẽ có ít nhất hoạt tính diệt sinh vật gây hại được cải thiện tương ứng với polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện

so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo. Theo một số phương án, hoạt tính được cải thiện hoặc được mở rộng so với protein tham chiếu có trình tự SEQ ID NO: 43 như được xác định theo sáng chế. Các phương pháp xác định hoạt tính diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Czapla and Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; và US 5,743,477.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ còn đáng giá cao rằng các thay đổi có thể được đưa vào bởi sự đột biến của trình tự nucleotit theo sáng chế, mà dẫn đến các thay đổi trong trình tự axit amin của protein diệt sinh vật gây hại được mã hóa, nhưng không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Do đó, phân tử axit nucleic được phân lập biến thể có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều thay thế, bổ sung hoặc loại bớt nucleotit vào trình tự nucleotit tương ứng được bộc lộ theo sáng chế, sao cho một đến năm thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin được đưa vào protein được mã hóa tương ứng với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo. Các đột biến có thể được đưa vào bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như đột biến định hướng điểm và đột biến thông qua PCR. Trình tự nucleotit biến thể cũng được thuộc phạm vi bộc lộ bởi sáng chế.

Ví dụ, các thay thế axit amin bảo tồn có thể được tạo ra ở một đến năm gốc axit amin không thiết yếu được dự báo. Gốc axit amin “không thiết yếu” là gốc mà có thể được thay đổi từ trình tự kiểu hoang dại của protein diệt sinh vật gây hại mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học, trong khi đó gốc axit amin “thiết yếu” là cần thiết đối với hoạt tính sinh học. “Thay thế axit amin bảo tồn” là thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi phụ tương tự. Các họ của gốc axit amin có chuỗi phụ tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm các axit amin với các chuỗi phụ bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), chuỗi phụ axit (ví dụ, axit

aspartic, axit glutamic), các chuỗi phụ có cực không mang điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein), các chuỗi phụ không có cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các chuỗi phụ mạch nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi phụ thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin).

Các thay thế axit amin có thể được tạo ra trong các vùng không bảo tồn mà giữ lại chức năng. Nói chung, các thay thế này sẽ không được tạo ra đối với các gốc axit amin được bảo tồn hoặc đối với các gốc axit amin cư trú trong motif được bảo tồn, trong đó gốc này là thiết yếu đối với hoạt tính protein. Các ví dụ về các gốc mà được bảo tồn và có thể là thiết yếu đối với hoạt tính protein bao gồm, ví dụ, các gốc mà đồng nhất trong các protein được so sánh trình tự đối với các độc tố tương tự hoặc có liên quan với các trình tự của sáng chế (ví dụ, các gốc đồng nhất khi so sánh các protein tương đồng). Các ví dụ về các gốc mà được bảo tồn, nhưng có thể cho phép thay thế axit amin bảo tồn mà vẫn giữ lại hoạt tính bao gồm, ví dụ, các gốc mà chỉ có các thay thế bảo tồn giữa tất cả protein được chứa trong sự sắp hàng của các độc tố tương tự hoặc có liên quan với các trình tự của sáng chế (ví dụ, các gốc mà chỉ có các thay thế bảo tồn giữa tất cả protein được chứa trong các protein tương đồng được so sánh). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các biến thể chức năng có thể có các thay đổi bảo tồn hoặc không bảo tồn nhỏ hơn trong các gốc được bảo tồn.

Theo cách khác, trình tự nucleotit biến thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các đột biến ngẫu nhiên cùng với tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa, như bằng cách đột biến bão hòa và các đột biến thu được có thể được sàng lọc đối với khả năng tạo ra hoạt tính diệt sinh vật gây hại để nhận dạng các đột biến mà vẫn giữ được hoạt tính. Các đột biến sau đây, protein được mã hóa có thể được biểu hiện về mặt tái tổ hợp và hoạt tính của protein có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thử nghiệm tiêu chuẩn.

Bằng cách sử dụng các phương pháp như PCR, lai và tương tự, các trình tự diệt sinh vật gây hại tương ứng có thể được nhận dạng, các trình tự này về cơ bản đồng nhất với các trình tự theo sáng chế. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Sambrook and Russell

(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) và Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

Trong phương pháp lai, tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit diệt sinh vật gây hại có thể được sử dụng để sàng lọc các thư viện ADN bổ trợ hoặc bộ gen. Thông thường, các phương pháp tạo cấu trúc các thư viện ADN bổ trợ và bộ gen là đã được biết đến trong lĩnh vực này và được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook and Russell, 2001, nêu trên. Cũng được gọi là các đầu dò lai có thể là các mảnh ADN bộ gen, các mảnh ADN bổ trợ, các mảnh ARN hoặc các oligonucleotit khác mà có thể được đánh dấu bằng nhóm có thể phát hiện như ^{32}P hoặc chất đánh dấu có thể phát hiện bất kỳ khác, như các đồng vị phóng xạ khác, hợp chất huỳnh quang, enzym hoặc đồng yếu tố enzym. Các đầu dò để lai có thể được tạo ra bằng cách đánh dấu các oligonucleotit tổng hợp dựa trên protein diệt sinh vật gây hại đã được biết đến-mã hóa trình tự nucleotit được bộc lộ theo sáng chế. Các đoạn môi thoái hóa được thiết kế dựa trên các nucleotit được bảo tồn hoặc gốc axit amin trong trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin được mã hóa còn có thể được sử dụng. Thông thường, đầu dò bao gồm vùng trình tự nucleotit mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với ít nhất khoảng 12, ít nhất khoảng 25, ít nhất khoảng 50, 75, 100, 125, 150, 175 hoặc 200 nucleotit bảo tồn của trình tự nucleotit mã hóa protein diệt sinh vật gây hại theo sáng chế hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Thông thường, các phương pháp sản xuất đầu dò để lai là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook and Russell, 2001, nêu trên.

Ví dụ, toàn bộ trình tự diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế hoặc một hoặc nhiều phần của nó, có thể được sử dụng làm đầu dò có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự tương tự protein diệt sinh vật gây hại tương ứng và ARN thông tin. Để đạt được việc lai đặc hiệu trong nhiều điều kiện, các đầu dò này bao gồm các trình tự mà đơn nhất và tốt hơn là có chiều dài ít nhất khoảng 10 nucleotit hoặc có chiều dài ít nhất khoảng 20 nucleotit. Các đầu dò này có thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự diệt sinh vật gây hại tương ứng từ sinh vật được chọn bởi PCR. Kỹ thuật này có thể được sử dụng để phân lập các trình tự mã hóa bổ sung từ sinh vật mong muốn hoặc như thử nghiệm chẩn đoán để xác định sự có mặt của các trình tự mã hóa trong sinh vật. Các kỹ thuật lai bao gồm lai sàng lọc các thư viện ADN được bộc (hoặc các mảng

hoặc khuôn lặc; xem, ví dụ, ấn phẩm: Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Do đó, các đầu dò để lai, cũng như trình tự nucleotit có khả năng lai với tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit của sáng chế (ví dụ, ít nhất khoảng 300 nucleotit, ít nhất khoảng 400, ít nhất khoảng 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 hoặc tối đa đến toàn bộ chiều dài của trình tự nucleotit được bộc lộ theo sáng chế) cũng được bộc lộ. Việc lai của các trình tự này có thể được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” hoặc “các điều kiện lai nghiêm ngặt” chỉ các điều kiện trong đó đầu dò sẽ lai với trình tự đích của nó đến mức độ có thể phát hiện lớn hơn so với các trình tự khác (ví dụ, ít nhất gấp 2 lần so với nền). Các điều kiện nghiêm ngặt là phụ thuộc trình tự và sẽ khác nhau trong các trường hợp khác nhau. Bằng cách kiểm soát tính nghiêm ngặt của các điều kiện lai và/hoặc rửa, các trình tự đích mà là phần bù 100% với đầu dò có thể được nhận dạng (dò tương đồng). Theo cách khác, các điều kiện nghiêm ngặt có thể được điều chỉnh để cho phép một số ghép đôi không xứng trong trình tự sao cho các mức tương tự thấp hơn được phát hiện (dò khác loại). Thông thường, đầu dò có chiều dài ít hơn khoảng 1000 nucleotit, tốt hơn là có chiều dài ít hơn 500 nucleotit.

Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt sẽ là các điều kiện trong đó nồng độ muối ít hơn khoảng 1,5M ion Na, thông thường nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0M ion Na (hoặc các muối khác) ở độ pH bằng từ 7,0 đến 8,3 và nhiệt độ thấp nhất khoảng 30°C trong các đầu dò ngắn (ví dụ, từ 10 đến 50 nucleotit) và thấp nhất khoảng 60°C đối với các đầu dò dài (ví dụ, lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt cũng có thể đạt được bằng cách bổ sung các chất làm mất ổn định như formamit. Các điều kiện nghiêm ngặt thấp lấy làm ví dụ bao gồm lai với dung dịch chất đệm chứa khoảng từ 30 đến 35% formamit, 1M NaCl, SDS 1% (natri dodecyl sulphat) ở 37°C và rửa trong từ 1X đến 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3M trisnatri xitrat) ở từ 50 đến 55°C. Các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải lấy làm ví dụ bao gồm lai trong từ 40 đến 45% formamit, 1,0M NaCl, SDS 1% ở 37°C và rửa trong từ 0,5X đến 1X SSC ở từ 55 đến 60°C. Các điều kiện nghiêm ngặt cao lấy làm ví dụ bao gồm lai trong 50% formamit, 1M NaCl, SDS 1% ở 37°C và rửa trong 0,1X SSC ở từ 60 đến 65°C. Tùy ý

là, các chất đệm rửa có thể bao gồm SDS khoảng từ 0,1% đến 1%. Thông thường, thời gian lai ít hơn khoảng 24 giờ, thường là nằm trong khoảng từ 4 đến 12 giờ.

Thông thường, tính đặc hiệu là chức năng rửa sau lai, các yếu tố tối ưu là cường độ ion và nhiệt độ của dung dịch rửa cuối. Đối với sự lai ADN-ADN, T_m có thể được xác định gần đúng theo phương trình của Meinkoth và Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\text{dạng theo } \%) - 500/L$; trong đó M là nồng độ phân tử gam của các cation có hóa trị một, $\%GC$ là phần trăm của các nucleotit guanosin và xytosin trong ADN, dạng theo $\%$ là phần trăm của formamit trong dung dịch lai và L là chiều dài của lai trong các cặp bazơ. T_m là nhiệt độ (trong cường độ ion và độ pH được xác định) ở đó 50% trình tự đích phân bù lai với đầu dò hợp nhau một cách hoàn hảo. T_m giảm khoảng 1°C đối với mỗi 1% ghép đôi không đối xứng; do đó, T_m , lai và/hoặc các điều kiện rửa có thể được điều chỉnh để lai với các trình tự có sự giống nhau mong muốn. Ví dụ, nếu các trình tự có sự giống nhau $\geq 90\%$ là được tìm thấy, thì T_m có thể được giảm 10°C . Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn là khoảng 5°C hoặc thấp hơn so với điểm nóng chảy do nhiệt (T_m) đối với trình tự đặc hiệu và phân bù của nó ở cường độ ion và độ pH được xác định. Tuy nhiên, các điều kiện nghiêm ngặt khắt khe có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 1, 2, 3 hoặc 4°C thấp hơn so với điểm nóng chảy do nhiệt (T_m); các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 6, 7, 8, 9 hoặc 10°C thấp hơn so với điểm nấu chảy do nhiệt (T_m); các điều kiện nghiêm ngặt thấp có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 11, 12, 13, 14, 15 hoặc 20°C thấp hơn so với điểm nóng chảy do nhiệt (T_m). Bằng cách sử dụng phương trình, lai và các chế phẩm rửa và T_m mong muốn, các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các biến thể trong tính nghiêm ngặt của dung dịch lai và/hoặc rửa vốn đã được mô tả. Nếu mức độ mong muốn của ghép đôi không đối xứng dẫn đến T_m thấp hơn 45°C (dung dịch trong nước) hoặc 32°C (dung dịch formamit), thì được ưu tiên để làm tăng nồng độ SSC sao cho nhiệt độ cao hơn có thể được sử dụng. Chỉ dẫn mở rộng đối với sự lai của các axit nucleic được tìm thấy trong ấn phẩm: Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York); và Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York).

Xem ấn phẩm: Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Protein được phân lập và các biến thể và các mảnh của protein này

Protein diệt sinh vật gây hại cũng được bao gồm trong sáng chế. Thuật ngữ “protein diệt sinh vật gây hại” chỉ protein có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20. Sáng chế đề xuất polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và (b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo. Thuật ngữ “protein được phân lập” hoặc “protein tái tổ hợp” được sử dụng để cập đến protein mà không dài hơn trong môi trường tự nhiên của nó, ví dụ trong *in vitro* hoặc trong vi khuẩn tái tổ hợp hoặc tế bào chủ thực vật.

Các phương pháp xác định hoạt tính diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và US 5,743,477.

Thuật ngữ “biến thể” chỉ trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu, và sâu bướm hại đậu mèo. Các phương pháp xác định hoạt tính diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.*

83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và US 5,743,477.

Các gen của vi khuẩn, như gen *axmi* theo sáng chế, thường có nhiều codon khởi đầu methionin ở trạng thái gần với điểm khởi đầu của khung đọc mở. Thông thường, sự khởi đầu dịch mã ở một hoặc nhiều codon khởi đầu này sẽ dẫn đến tạo ra protein có chức năng. Các codon khởi đầu này có thể bao gồm các condon ATG. Tuy nhiên, vi khuẩn như *Bacillus* sp. cũng nhận biết codon GTG như condon khởi đầu và protein mà khởi đầu dịch mã ở các condon GTG chứa methionin ở axit amin thứ nhất. Đôi khi sự dịch mã ở các hệ vi khuẩn có thể khởi đầu ở codon TTG, mặc dù trong sự kiện này, TTG mã hóa methionin. Hơn nữa, không thường được xác định theo cách suy diễn mà các codon này được sử dụng tự nhiên trong vi khuẩn. Do đó, cần phải hiểu rằng việc sử dụng một trong số các condon methionin khác nhau cũng có thể dẫn đến tạo ra protein diệt sinh vật gây hại. Các protein diệt sinh vật gây hại này được bao gồm trong sáng chế và có thể được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế. Cần hiểu rằng, khi được biểu hiện ở thực vật, sẽ cần phải thay đổi condon khởi đầu khác với ATG đối với sự dịch mã đúng.

Các kháng thể kháng polypeptit của sáng chế hoặc kháng các biến thể hoặc mảnh của nó, cũng được bộc lộ. Các phương pháp sản xuất kháng thể là đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, ấn phẩm: Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; U.S. Patent No. 4,196,265).

Các biến thể được cải biến hoặc được cải thiện

Đã nhận biết được rằng các trình tự ADN của protein diệt sinh vật gây hại có thể được cải biến bằng các phương pháp khác nhau và các thay đổi này có thể dẫn đến các trình tự ADN mã hóa protein với các trình tự axit amin khác với trình tự được mã hóa bởi protein diệt sinh vật gây hại của sáng chế. Sáng chế đề xuất trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ

tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo. Vì vậy, protein này có thể được thay đổi theo các cách khác nhau bao gồm sự thay thế, khuyết đoạn, cắt cụt và cài xen của một đến năm axit amin của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, 18, 19 hoặc 20, bao gồm đến tối đa khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4 hoặc 5 sự thay thế, khuyết đoạn hoặc cài xen axit amin vào phần đầu C hoặc phần đầu N hoặc cả hai. Thông thường, các phương pháp để thao tác đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, các biến thể trình tự axit amin của protein diệt sinh vật gây hại có thể được tạo ra bằng các đột biến trong ADN. Điều này cũng có thể được hoàn thành bởi một trong số vài dạng đột biến và/hoặc trong tiến hóa định hướng. Theo một số khía cạnh, các thay đổi được mã hóa trong trình tự axit amin hầu như sẽ không tác động đến chức năng của protein. Các biến thể này sẽ có hoạt tính diệt sinh vật gây hại mong muốn. Tuy nhiên, sẽ được hiểu rằng khả năng của protein diệt sinh vật gây hại để tạo ra hoạt tính diệt sinh vật gây hại có thể được cải thiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật này nhờ chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, kỹ thuật có thể biểu hiện protein diệt sinh vật gây hại ở tế bào chủ mà thể hiện tốc độ kết hợp sai bazơ ở mức cao trong khi sao chép ADN, như XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Sau khi nhân giống trong các chủng này, kỹ thuật có thể phân lập ADN (ví dụ bằng cách tạo ra ADN plasmit hoặc bằng cách khuếch đại bởi PCR và tạo dòng vô tính mảnh PCR thu được vào vector), nuôi cấy các đột biến protein diệt sinh vật gây hại trong chủng không đột biến và nhận biết các gen đột biến với hoạt tính diệt sinh vật gây hại, ví dụ bằng cách tiến hành thử nghiệm để thử nghiệm đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Nói chung, protein được trộn và được sử dụng trong các thử nghiệm nạp. Xem, ví dụ ấn phẩm: Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Các thử nghiệm này có thể bao gồm cho thực vật tiếp xúc với một hoặc nhiều sinh vật gây hại và xác định khả năng của thực vật đối với sống sót và/hoặc gây chết sinh vật gây hại. Các ví dụ về đột biến mà dẫn đến tính độc tăng được tìm thấy trong ấn phẩm: Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Theo cách khác, các trình tự protein được bổ sung vào có thể bao gồm toàn bộ trình tự mã hóa protein, như các trình tự thường được sử dụng trong lĩnh vực này để tạo ra các dung hợp protein. Các protein dung hợp này thường được sử dụng để (1) làm tăng sự biểu hiện của protein quan tâm (2) đưa vào miền gắn kết, hoạt tính enzym

hoặc epitop để tạo thuận lợi cho tinh chế protein, phát hiện protein hoặc các sử dụng thử nghiệm khác đã được biết đến trong lĩnh vực này (3) việc tiết hoặc dịch mã protein đích thành hạt cơ quan dưới mức tế bào, như khoảng trống chất bao của vi khuẩn gam âm hoặc màng lưới nội chất của tế bào có nhân thật, sau cùng trong số chúng thường dẫn đến glycosyl hóa protein.

Nucleotit biến thể và các trình tự axit amin của sáng chế cũng bao gồm các trình tự thu được từ các quy trình đột biến và tái tổ hợp như sắp xếp lại trật tự ADN. Với quy trình này, một hoặc nhiều protein diệt sinh vật gây hại khác nhau mã hóa các vùng có thể được sử dụng để tạo ra protein diệt sinh vật gây hại mới có các đặc tính mong muốn. Theo cách này, các thư viện polynucleotit tái tổ hợp được tạo ra từ quần thể polynucleotit có trình tự có liên quan bao gồm các vùng trình tự mà hầu như có sự giống nhau về trình tự và có thể được tái tổ hợp một cách tương đồng *in vitro* hoặc *in vivo*. Ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp này, các motif trình tự mã hóa miền quan tâm có thể được sắp xếp lại trật tự giữa gen diệt sinh vật gây hại của sáng chế và các gen diệt sinh vật gây hại khác đã được biết đến để thu được gen mới mã hóa đối với protein với đặc tính quan tâm được cải thiện, như hoạt tính trừ sâu được tăng. Các chiến lược để sắp xếp lại trật tự ADN là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; US 5,605,793 và US 5,837,458.

Việc trao đổi hoặc sắp xếp lại trật tự miền là cơ chế khác để tạo ra protein diệt sinh vật gây hại thay đổi. Các miền có thể được trao đổi giữa protein diệt sinh vật gây hại, dẫn đến các độc tố lai hoặc khảm với hoạt tính diệt sinh vật gây hại hoặc phổ đích được cải thiện. Các phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp và thử nghiệm chúng đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, ấn phẩm: Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67 :5328-5330 ; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit theo sáng chế bao gồm các trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, 5 và 6 và trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, 18, 19 hoặc 20.

Theo các phương án khác nhau, sự dung hợp của Axmi005 với Axmi115 dẫn đến trình tự axit amin có hoạt tính được cải thiện hoặc được mở rộng được so với hoạt tính của riêng Axmi005 hoặc Axmi115. Thuật ngữ hoạt tính “được cải thiện” chỉ sự tăng tỷ lệ tử vong cho ít nhất một sinh vật gây hại hoặc tăng tỷ lệ mà giảm sự phát triển đáng kể đối với sự phát triển sinh vật gây hại, sự ăn hoặc sự phát triển sinh lý bình thường so với protein bẩm sinh. Thuật ngữ hoạt tính “được mở rộng” chỉ hoạt tính diệt sinh vật gây hại mà không được chứng minh bởi Axmi005 và Axmi115. Ví dụ, sự dung hợp của phần Axmi005 với phần Axmi115 có thể dẫn đến protein đơn lẻ có hoạt tính của cả Axmi005 và Axmi115. Theo một số phương án, hoạt tính diệt sinh vật gây hại riêng rẽ được cải thiện trong protein dung hợp so với một trong hai hoặc cả hai Axmi005 và/hoặc Axmi115.

Vector

Trình tự diệt sinh vật gây hại của sáng chế có thể có thể được tạo ra trong catxet biểu hiện đối với sự biểu hiện ở thực vật quan tâm. Thuật ngữ “catxet biểu hiện của thực vật” chỉ cấu trúc ADN mà có khả năng dẫn đến sự biểu hiện của protein từ khung đọc mở trong tế bào thực vật. Thông thường, cấu trúc này chứa trình tự khởi đầu và trình tự mã hóa. Thông thường, các cấu trúc này cũng sẽ chứa vùng không được dịch mã 3'. Các cấu trúc này có thể chứa “trình tự tín hiệu” hoặc “trình tự dẫn đầu” để tạo thuận lợi cho sự vận chuyển cùng dịch mã hoặc sau dịch mã của peptit vào một số cấu trúc nội bào như lục lạp (hoặc thể hạt khác), mạng lưới nội chất hoặc bộ máy Golgi.

Thuật ngữ “trình tự tín hiệu” chỉ trình tự mà đã được biết đến hoặc nghi ngờ dẫn đến việc vận chuyển peptit cùng dịch mã hoặc sau dịch mã qua màng tế bào. Ở sinh vật có nhân thật, thông thường, điều này bao gồm tiết vào bộ máy Golgi, với một số glycosyl hóa thu được. Các độc tố trừ sâu của vi khuẩn thường được tổng hợp như tiền độc tố, mà được hoạt hóa về mặt protein trong ruột của sinh vật gây hại đích (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). Theo một số phương án của sáng chế, trình tự tín hiệu được định vị trong trình tự bẩm sinh hoặc có thể thu được từ trình tự của

sáng chế. Thuật ngữ “trình tự dẫn đầu” chỉ trình tự bất kỳ mà khi được dịch mã, dẫn đến đủ trình tự axit amin để gây ra sự vận chuyển cùng dịch mã của chuỗi peptit vào hạt cơ quan dưới mức tế bào. Do đó, điều này bao gồm trình tự dẫn đầu tạo đích vận chuyển và/hoặc glycosyl hóa bằng cách chuyển vào mạng lưới nội chất, chuyển vào không bào, các thể hạt bao gồm lục lạp, ti thể và tương tự.

Thuật ngữ “vector biến nạp của thực vật” chỉ phân tử ADN mà cần thiết để biến nạp hiệu quả tế bào thực vật. Phân tử này có thể bao gồm một hoặc nhiều catxet biểu hiện của thực vật và có thể được tổ chức thành nhiều hơn một “vector” phân tử ADN. Ví dụ, các vector nhị phân là các vector biến nạp của thực vật mà sử dụng các vector ADN không liên kết để mã hóa tất cả các chức năng tác dụng cis- và trans- yêu cầu đối với sự biến nạp của tế bào thực vật (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). “Vector” đề cập đến cấu trúc axit nucleic được thiết kế để tuyển gĩa các tế bào chủ khác nhau. “Vector biểu hiện” đề cập đến vector mà có khả năng kết hợp, tích hợp và biểu hiện các trình tự hoặc mảnh ADN ở tế bào ngoại. Catxet sẽ bao gồm các trình tự điều hòa 5' và/hoặc 3' được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự của sáng chế. Thuật ngữ “được liên kết một cách có kiểm soát” chỉ liên kết chức năng giữa trình tự khởi đầu và trình tự thứ hai, trong đó trình tự khởi đầu bắt đầu và thông qua sao chép trình tự ADN tương ứng với trình tự thứ hai. Thông thường, được liên kết một cách có kiểm soát có nghĩa là các trình tự axit nucleic được liên kết là liên kết và, trong đó kết hợp với hai vùng mã hóa protein, liên kết và trong cùng khung đọc. Catxet còn có thể chứa ít nhất một gen bổ sung được cùng biến nạp vào sinh vật. Theo cách khác, (các) gen bổ sung có thể được tạo ra trên nhiều catxet biểu hiện.

Theo các phương án khác nhau, trình tự nucleotit của sáng chế được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu, ví dụ, trình tự khởi đầu của thực vật. “Trình tự khởi đầu” đề cập đến trình tự axit nucleic mà có chức năng định hướng sự sao chép của trình tự mã hóa xuôi chiều. Đoạn khởi đầu cùng với các trình tự axit nucleic điều chỉnh sao chép và dịch mã khác (cũng được gọi là “các trình tự đối chứng”) là cần thiết cho sự biểu hiện của trình tự ADN quan tâm.

Catxet biểu hiện này được tạo ra cùng với nhiều vị trí giới hạn để cài xen trình tự diệt sinh vật gây hại vào trong sự điều chỉnh sao chép của các vùng điều chỉnh.

Catxet biểu hiện sẽ bao gồm hướng sao chép từ 5' đến 3', vùng khởi đầu sao chép và dịch mã (nghĩa là, trình tự khởi đầu), trình tự ADN của sáng chế và vùng kết thúc dịch mã và sao chép (nghĩa là, vùng kết thúc) có chức năng ở thực vật. Trình tự khởi đầu có thể là bẩm sinh hoặc tương tự hoặc ngoại hoặc khác loại, với vật chủ thực vật và/hoặc với trình tự ADN của sáng chế. Ngoài ra, trình tự khởi đầu có thể là trình tự tự nhiên hoặc theo cách khác là trình tự tổng hợp. Khi trình tự khởi đầu là “bẩm sinh” hoặc “tương đồng” với vật chủ thực vật, thì được dự định rằng trình tự khởi đầu được tìm thấy trong thực vật bẩm sinh mà trong đó trình tự khởi đầu được đưa vào. Khi trình tự khởi đầu là “ngoại” hoặc “khác loại” với trình tự ADN của sáng chế, thì được dự định rằng trình tự khởi đầu không phải là trình tự khởi đầu bẩm sinh hoặc xuất hiện tự nhiên đối với trình tự ADN được liên kết một cách có kiểm soát của sáng chế.

Vùng kết thúc có thể là bẩm sinh với vùng khởi đầu sao chép, có thể là bẩm sinh với trình tự ADN quan tâm được liên kết một cách có kiểm soát, có thể là bẩm sinh với vật chủ thực vật hoặc có thể thu được từ nguồn khác (nghĩa là, ngoại hoặc khác loại với trình tự khởi đầu, trình tự ADN quan tâm, vật chủ thực vật hoặc kết hợp bất kỳ của các trình tự này). Các vùng kết thúc thuận tiện là có sẵn từ Ti-plasmit của *A. tumefaciens*, như các vùng kết thúc octopin synthaza và nopalin synthaza. Cũng xem ấn phẩm: Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; và Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Nếu thích hợp, (các) gen có thể được tối ưu hóa đối với sự biểu hiện tăng ở tế bào chủ được biến nạp. Tức là, các gen có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các codon được ưu tiên của tế bào chủ đối với sự biểu hiện được cải thiện hoặc có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các codon ở tần số sử dụng codon được ưu tiên của vật chủ. Thông thường, hàm lượng gen GC sẽ được tăng. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 đối với sự mô tả về việc sử dụng codon được ưu tiên của vật chủ. Các phương pháp là sẵn có trong lĩnh vực này để tổng hợp các gen được ưu tiên của thực vật. Xem, ví dụ, các US 5,380,831, US 5,436,391, US 20090137409, và ấn phẩm Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

Theo một phương án, protein diệt sinh vật gây hại được tạo đích với lục lạp đối với sự biểu hiện. Theo cách này, trong đó protein diệt sinh vật gây hại không được lồng một cách trực tiếp vào lục lạp, catxet biểu hiện sẽ còn chứa axit nucleic mã hóa peptit chuyển tiếp để định hướng protein diệt sinh vật gây hại với lục lạp. Các peptit chuyển tiếp này là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; và Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Gen diệt sinh vật gây hại được tạo đích với lục lạp có thể được tối ưu hóa đối với sự biểu hiện trong lục lạp cho là khác nhau trong sử dụng codon giữa nhân của thực vật và hạt cơ quan này. Theo cách này, các axit nucleic quan tâm có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng codon được ưu tiên của lục lạp. Xem, ví dụ, US 5,380,831.

Biến nạp thực vật

Phương pháp của sáng chế bao gồm đưa cấu trúc nucleotit vào thực vật. Thuật ngữ “đưa vào” chỉ sự có mặt đối với thực vật cấu trúc nucleotit theo cách mà cấu trúc thu được tiếp cận vào bên trong của tế bào thực vật. Phương pháp của sáng chế không nhất thiết rằng phương pháp cụ thể để đưa cấu trúc nucleotit vào thực vật được sử dụng, chỉ có cấu trúc nucleotit thu được tiếp cận vào bên trong của ít nhất một tế bào của thực vật. Các phương pháp để đưa các cấu trúc nucleotit vào thực vật là đã được biết đến trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp biến nạp ổn định, các phương pháp biến nạp tạm thời và các phương pháp thông qua virus.

Thuật ngữ “thực vật” chỉ toàn bộ thực vật, cơ quan của thực vật (ví dụ, lá, thân, rễ, v.v), hạt, tế bào thực vật, cành giâm, phôi và thế hệ con của thực vật. Tế bào thực vật có thể được phân hóa hoặc không được phân hóa (ví dụ thể sần, tế bào nuôi cấy huyền phù, thể nguyên sinh, tế bào lá, tế bào rễ, tế bào libe, phấn hoa).

“Thực vật chuyển gen” hoặc thực vật “được biến nạp” hoặc “được biến nạp ổn định” hoặc tế bào hoặc mô đề cập đến thực vật mà có trình tự axit nucleic hoặc mảnh ADN ngoại sinh được kết hợp hoặc được tích hợp vào tế bào thực vật. Các trình tự axit

nucleic này bao gồm các trình tự mà là ngoại sinh hoặc không có mặt trong tế bào thực vật không được biến nạp, cũng như các trình tự mà có thể là nội sinh hoặc có mặt trong tế bào thực vật không được biến nạp. Thông thường, “khác loại” đề cập đến các trình tự axit nucleic mà không phải là nội sinh đối với tế bào hoặc phần của bộ gen bẩm sinh, trong đó chúng có mặt và đã được bổ sung vào tế bào bằng cách tiêm nhiễm, chuyển nhiễm, vi tiêm, xung điện, vi đạn hoặc tương tự.

Các thực vật chuyển gen của sáng chế biểu hiện một hoặc nhiều trình tự độc tố mới được bộc lộ theo sáng chế. Theo các phương án khác nhau, thực vật chuyển gen còn bao gồm một hoặc nhiều gen bổ sung đối với sự kháng côn trùng (ví dụ, Cry1, như các thành viên của họ Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E và Cry1F; Cry2 như các thành viên của họ Cry2A; Cry9 như các thành viên của họ Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E và Cry9F; v.v). Sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng thực vật chuyển gen có thể bao gồm gen bất kỳ tạo ra tính trạng quan tâm trong nông nghiệp.

Sự biến nạp của tế bào thực vật có thể được hoàn thành bằng một trong số vài kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này. Gen diệt sinh vật gây hại của sáng chế có thể được biến đổi để thu được hoặc làm tăng cường sự biểu hiện ở tế bào thực vật. Thông thường, cấu trúc mà biểu hiện protein này sẽ chứa trình tự khởi đầu để điều khiển sự sao chép của gen, cũng như vùng không được dịch mã 3' để cho phép kết thúc sao chép và polyadenyl hóa. Sự tổ chức của các cấu trúc này là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Trong một số trường hợp, có thể là hữu ích để tạo ra gen sao cho peptit thu được được tiết hoặc mặt khác được tạo đích trong tế bào thực vật. Ví dụ, gen có thể được tạo ra để chứa peptit tín hiệu để tạo thuận lợi cho việc truyền peptit vào mạng lưới nội chất. Tốt hơn là, cũng có thể tạo ra catxet biểu hiện của thực vật để chứa intron, sao cho ARN thông tin xử lý intron cần thiết cho sự biểu hiện.

Thông thường, “catxet biểu hiện của thực vật” này sẽ được lồng vào “vector biến nạp của thực vật”. Vector biến nạp của thực vật này có thể bao gồm một hoặc nhiều vector ADN cần để đạt được sự biến nạp của thực vật. Ví dụ, thực tiễn thông thường trong lĩnh vực này để sử dụng vector biến nạp của thực vật mà bao gồm nhiều hơn một đoạn ADN liền kề. Các vector này thường được gọi trong lĩnh vực này là “vector nhĩ

phân.” Các vector nhị phân cũng như các vector với các plasmid hỗ trợ là thường được sử dụng nhất đối với sự biến nạp thông qua *Agrobacterium*, trong đó kích cỡ và sự phức tạp của các đoạn ADN cần để đạt được sự biến nạp có hiệu quả là khá lớn và thuận lợi để chia tách chức năng trên các phân tử ADN riêng biệt. Thông thường, các vector nhị phân chứa vector plasmid mà chứa các trình tự hoạt động cis cần thiết đối với sự truyền T-ADN (như đường biên bên trái và đường biên bên phải), gen đánh dấu chọn lọc mà được tạo ra có khả năng biểu hiện ở tế bào thực vật và “gen quan tâm” (gen được tạo ra có khả năng biểu hiện ở tế bào thực vật mà trong đó sự tạo ra thực vật chuyển gen là mong muốn). Ngoài ra, sự có mặt trên vector plasmid này là các trình tự cần thiết đối với sự sao chép của vi khuẩn. Các trình tự hoạt động cis được bố trí theo cách cho phép truyền hiệu quả vào tế bào thực vật và biểu hiện trong đó. Ví dụ, gen đánh dấu chọn lọc và gen diệt sinh vật gây hại được định vị ở giữa các đường biên bên trái và bên phải. Thông thường, vector plasmid thứ hai chứa các yếu tố hoạt động trans mà làm trung gian truyền T-ADN từ *Agrobacterium* vào tế bào thực vật. Plasmid này thường chứa các chức năng độc hại (gen Vir) mà cho phép sự nhiễm của tế bào thực vật bởi *Agrobacterium*, và truyền ADN bằng cách tách ở các trình tự đường biên và chuyển ADN thông qua vir, là đã biết trong lĩnh vực này (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Vài loại chủng *Agrobacterium* (ví dụ LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, v.v) có thể được sử dụng đối với sự biến nạp của thực vật. Vector plasmid thứ hai là không nhất thiết để biến nạp thực vật bằng các phương pháp khác như vi đạn, vi tiêm, xung điện, polyetylen glycol, v.v..

Thông thường, các phương pháp biến nạp thực vật bao gồm chuyển ADN khác loại vào tế bào thực vật đích (ví dụ phôi chưa trưởng thành hoặc trưởng thành, nuôi cấy huyền phù, thể sần chưa được biệt hóa, thể nguyên sinh, v.v), tiếp theo bằng cách áp dụng mức chọn lọc thích hợp ngưỡng tối đa (phụ thuộc vào gen đánh dấu chọn lọc) để thu hồi tế bào thực vật được biến nạp từ nhóm khối tế bào không được biến nạp. Thông thường, mô cấy bên ngoài được truyền vào nguồn cung cấp sạch chứa môi trường giống nhau và được nuôi cấy thông thường. Tiếp theo, tế bào được biến nạp được phân hóa thành chồi cây sau khi đặt vào môi trường tái sinh được bổ sung với mức chất chọn lọc ngưỡng tối đa. Sau đó, chồi cây được truyền vào môi trường tạo rễ chọn lọc để khôi phục chồi cây được tạo rễ hoặc cây non. Sau đó, cây non được biến

nap phát triển thành cây trưởng thành và tạo ra hạt có thể nảy mầm (ví dụ Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Thông thường, mô cấy bên ngoài được truyền vào nguồn cung cấp sạch chứa môi trường giống nhau và được nuôi cấy thông thường. Phần mô tả chung các kỹ thuật và phương pháp để tạo ra thực vật chuyển gen được tìm thấy trong ấn phẩm: Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 and Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Do nguyên liệu được biến nạp chứa nhiều tế bào; cả tế bào được biến nạp và không được biến nạp có mặt trong phần bất kỳ của thể sản đích hoặc mô hoặc nhóm tế bào. Khả năng tiêu diệt tế bào không được biến nạp và cho phép tế bào được biến nạp tăng sinh dẫn đến nuôi cấy thực vật được biến nạp. Thông thường, khả năng loại bỏ tế bào không được biến nạp bị hạn chế đến sự khôi phục nhanh chóng của tế bào thực vật được biến nạp và tạo ra thực vật chuyển gen thành công.

Các quy trình biến nạp cũng như các quy trình đưa trình tự nucleotit vào thực vật có thể thay đổi phụ thuộc vào loại thực vật hoặc tế bào thực vật, nghĩa là thực vật có một lá mầm hoặc hai lá mầm, được tạo đích đối với sự biến nạp. Việc tạo ra thực vật chuyển gen có thể được thực hiện bởi một trong số vài phương pháp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi tiêm, xung điện, chuyển gen trực tiếp, chuyển ADN khác loại bởi *Agrobacterium* vào tế bào thực vật (biến nạp thông qua *Agrobacterium*), sự bắn phá tế bào thực vật với ADN ngoại lai khác loại được phủ vào hạt, gia tốc hạt đạn đạo, biến nạp chùm bình phun (US 20010026941; US 4,945,050; WO 91/00915; US 2002015066), biến nạp *Lec1* và các phương pháp qua trung gian không hướng hạt khác nhau khác để truyền ADN.

Phương pháp biến nạp của lục lạp là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, ấn phẩm: Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Phương pháp dựa vào sự chuyển gen bằng súng hạt ADN chứa gen đánh dấu chọn lọc và tạo đích ADN với bộ gen thể hiện qua sự tái tổ hợp tương đồng. Ngoài ra, sự biến nạp thể hạt có thể được hoàn thành bằng cách chuyển gen chuyển mang thể hạt bất hoạt bằng sự biểu hiện được ưu tiên mô của ARN polymeraza

được mã hóa nhân và định hướng thể hạt. Hệ thống này đã được báo cáo trong ấn phẩm: McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Sự tích hợp sau đây của ADN ngoại khác loại vào tế bào thực vật, sau đó áp dụng mức chọn lọc thích hợp ngưỡng tối đa trong môi trường để tiêu diệt tế bào không được biến nạp và chia tách và tăng sinh tế bào được biến nạp một cách giả định mà sống sót từ sự xử lý chọn lọc này bằng cách truyền một cách đều đặn vào môi trường sạch. Bằng cách đi qua liên tục và thách thức với sự chọn lọc thích hợp, nhận dạng và tăng sinh tế bào mà được biến nạp với vector plasmit. Sau đó, các phương pháp phân tử và sinh hóa có thể được sử dụng để xác nhận sự có mặt của gen khác loại được tích hợp quan tâm trong bộ gen của thực vật chuyển gen.

Các tế bào mà đã được biến nạp có thể được phát triển trong thực vật theo các cách thông thường. Xem, ví dụ, ấn phẩm: McCormick et al. (1986) Plant cell Reports 5:81-84. Sau đó, các thực vật này được phát triển và được thụ phấn với chủng được biến nạp giống nhau hoặc các chủng khác nhau và thế lai thu được có sự biểu hiện cơ bản của đặc trưng kiểu hình mong muốn được nhận dạng. Hai hoặc nhiều thế hệ có thể được phát triển để bảo đảm rằng sự biểu hiện của đặc trưng kiểu hình mong muốn được duy trì ổn định và được thừa hưởng và sau đó hạt được thu hoạch để bảo đảm sự biểu hiện của đặc trưng kiểu hình mong muốn đã đạt được. Theo cách này, sáng chế đề xuất hạt được biến nạp (cũng được gọi là “hạt chuyển gen”) có cấu trúc nucleotit của sáng chế, ví dụ, catxet biểu hiện của sáng chế, được kết hợp ổn định vào bộ gen của chúng.

Đánh giá sự biến nạp của thực vật

Sự đưa ADN ngoại lai sau đây vào tế bào thực vật, sự biến nạp hoặc tích hợp gen khác loại trong bộ gen thực vật được xác nhận bởi các phương pháp khác nhau như phân tích axit nucleic, protein và chất trao đổi kết hợp với gen được tích hợp.

Phân tích PCR là phương pháp nhanh chóng để sàng lọc tế bào được biến nạp, mô hoặc chồi non đối với sự có mặt của gen được kết hợp ở giai đoạn sớm hơn trước khi được trồng vào đất (Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các trình tự mỗi oligonucleotit đặc hiệu đối với gen quan tâm hoặc vector *Agrobacterium*, v.v..

Sự biến nạp của thực vật có thể được xác nhận bằng phân tích thẩm tích Southern của ADN bộ gen (Sambrook and Russell, 2001, nêu trên). Nói chung, tổng ADN được chiết từ thể biến nạp, được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn thích hợp, được phân đoạn trong gel agarosa và được truyền vào nitroxenluloza hoặc màng ni lông. Sau đó, màng hoặc “điểm” được dò với, ví dụ, mảnh ADN đích được đánh dấu phóng xạ ^{32}P để xác nhận sự tích hợp của gen được đưa vào vào bộ gen của thực vật theo các kỹ thuật tiêu chuẩn (Sambrook and Russell, 2001, nêu trên).

Trong phân tích thẩm tách Northern, ARN được phân lập từ các mô đặc hiệu của thể biến nạp, được phân đoạn trong gel formaldehyt agarosa và được tạo đốm trên thiết bị lọc ni lông theo các quy trình tiêu chuẩn mà được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này (Sambrook and Russell, 2001, nêu trên). Sự biểu hiện của ARN được mã hóa bởi gen diệt sinh vật gây hại sau đó được thử nghiệm bằng cách lai, thiết bị lọc với đầu dò phóng xạ thu được từ gen diệt sinh vật gây hại, bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này (Sambrook and Russell, 2001, nêu trên).

Các thử nghiệm thẩm tách Western, thử nghiệm sinh hóa và tương tự có thể được thực hiện trên các thực vật chuyển gen để xác nhận sự có mặt của protein được mã hóa bởi gen diệt sinh vật gây hại bằng các quy trình tiêu chuẩn (Sambrook and Russell, 2001, nêu trên) bằng cách sử dụng các kháng thể mà gắn kết với một hoặc nhiều epitop có mặt trên protein diệt sinh vật gây hại.

Hoạt tính diệt sinh vật gây hại ở thực vật

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp có thể tạo ra thực vật chuyển gen biểu hiện protein diệt sinh vật gây hại mà có hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Các phương pháp được mô tả trên đây bằng cách ví dụ có thể được sử dụng để tạo ra thực vật chuyển gen, nhưng cách trong đó tế bào thực vật chuyển gen được tạo ra là không tối ưu với sáng chế. Các phương pháp đã được biết đến hoặc được mô tả trong lĩnh vực này như biến nạp thông qua *Agrobacterium*, biến nạp bằng súng bắn hạt và các phương pháp không qua trung gian hạt có thể được sử dụng theo ý muốn của người sử dụng. Các thực vật biểu hiện protein diệt sinh vật gây hại có thể được phân lập bằng

các phương pháp thông thường được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ bằng cách biến nạp thể sản, chọn lọc thể sản được biến nạp và tạo ra thực vật có thể sinh sản được từ thể sản chuyển gen này. Trong quy trình này, có thể sử dụng gen bất kỳ như gen đánh dấu chọn lọc miễn là nó biểu hiện trong tế bào thực vật tạo ra khả năng nhận dạng hoặc chọn lọc đối với tế bào được biến nạp.

Số lượng các gen đánh dấu đã được phát triển để sử dụng với tế bào thực vật, như kháng chloramphenicol, aminoglycosit G418, hygromycin hoặc tương tự. Các gen khác mà mã hóa sản phẩm liên quan đến trao đổi chất lục lạp cũng có thể được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc. Ví dụ, các gen mà tạo ra sự kháng đối với thuốc diệt cỏ thực vật như glyphosat, bromoxynil hoặc imidazolinon có thể tìm thấy sử dụng cụ thể. Các gen này đã được báo cáo trong ấn phẩm: Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (gen nitrilaza kháng bromoxynil); và Sathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (gen kháng AHAS imidazolinon). Ngoài ra, các gen được bộc lộ theo sáng chế là hữu ích làm các gen đánh dấu để đánh giá sự biến nạp của vi khuẩn hoặc tế bào thực vật. Các phương pháp phát hiện sự có mặt của gen chuyển trong thực vật, cơ quan thực vật (ví dụ, lá, thân, rễ, v.v), hạt, tế bào thực vật, cây con, phôi hoặc thể hệ con của thực vật là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Theo một phương án, sự có mặt của gen chuyển được phát hiện bằng cách thử nghiệm đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại.

Các thực vật có thể sinh sản biểu hiện protein diệt sinh vật gây hại có thể được thử nghiệm đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại và các thực vật thể hiện hoạt tính tối ưu được chọn để tạo giống tiếp. Các phương pháp có sẵn trong lĩnh vực này để đánh giá đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Thông thường, protein được trộn và được sử dụng trong các thử nghiệm nạp. Xem, ví dụ ấn phẩm: Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

Sán chế cũng được sử dụng đối với sự biến nạp của các loài thực vật bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thực vật có một lá mầm và thực vật có hai lá mầm. Các ví dụ về thực vật quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngũ cốc (ngô), lúa miến, lúa mì, hướng dương, cà chua, cây họ cải, hồ tiêu, khoai tây, bông, lúa gạo, đậu nành, của cải đường, mía, thuốc lá, lúa mạch và cải hạt có dầu, *Brassica* sp., cỏ linh

lăng, lúa mạch đen, cây kê, cây rum, cây lạc, cây khoai lang, cây sắn, cây cà phê, cây dừa, cây dứa, cây giống cam quýt, cây dứa, cây chè, cây chuối, cây lê tàu, cây sung, cây ổi, cây xoài, cây ôliu, cây đu đủ, cây đào lộn hột, cây mắc-ca, quả hạnh, yến mạch, cây rau, cây cảnh và cây có quả hình nón.

Các cây rau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây cà chua, rau diếp, đậu xanh, đậu lima, đậu Hà lan và các thành viên của giống *Curcumis* như cây dưa chuột, cây dưa đỏ và dưa dẻ hương. Các cây cảnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây khô, cây tú cầu, cây dâm bụt, cây hoa hồng, hoa uất kim hương, cây thủy tiên hoa vàng, cây thuốc lá cảnh, cây cẩm trướng, cây trạng nguyên và cây hóa cúc. Tốt hơn là, thực vật của sáng chế là các cây trồng (ví dụ, cây ngô, cây lúa miến, cây lúa mì, cây hoa hướng dương, cây cà chua, cây họ cải, cây hồ tiêu, cây khoai tây, cây bông, cây lúa gạo, cây đậu nành, cây củ cải đường, cây mía, cây thuốc lá, cây lúa mạch, cây cải hạt có dầu, v.v).

Sử dụng trong phòng trừ của thuốc diệt sinh vật gây hại

Các phương pháp thông thường để dùng các chủng bao gồm trình tự nucleotit của sáng chế hoặc biến thể của nó, trong phòng trừ sinh vật gây hại hoặc trong việc tạo ra sinh vật khác như các chất diệt sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ US 5,039,523, EP 0480762A2.

Các chủng *Bacillus* chứa trình tự nucleotit của sáng chế hoặc biến thể của nó hoặc các vi sinh vật mà đã được thay đổi về mặt di truyền để chứa gen diệt sinh vật gây hại của sáng chế và protein có thể được sử dụng để bảo vệ cây trồng trong nông nghiệp và các sản phẩm khỏi các sinh vật gây hại. Theo một khía cạnh của sáng chế, toàn bộ, nghĩa là không bị làm tan, tế bào của sinh vật tạo ra độc tố (diệt sinh vật gây hại) được xử lý bằng các chất phản ứng mà kéo dài hoạt tính của độc tố được tạo ra trong tế bào khi tế bào được áp dụng cho môi trường của (các) sinh vật gây hại đích.

Theo cách khác, thuốc diệt sinh vật gây hại được tạo ra bằng cách đưa gen diệt sinh vật gây hại vào vật chủ tế bào. Sự biểu hiện của gen diệt sinh vật gây hại dẫn đến, trực tiếp hoặc gián tiếp, tạo ra và duy trì diệt sinh vật gây hại nội bào. Theo một khía cạnh của sáng chế, sau đó, các tế bào này được xử lý trong các điều kiện mà kéo dài hoạt tính của độc tố được tạo ra trong tế bào khi tế bào được áp dụng cho môi trường của (các) sinh vật gây hại đích. Sản phẩm thu được giữ lại tính độc của độc tố. Sau đó,

các thuốc diệt sinh vật gây hại được kết nang tự nhiên này có thể được điều chế theo các kỹ thuật thông thường đối với sự áp dụng vào môi trường dẫn sinh vật gây hại đích, ví dụ, đất, nước và lá của thực vật. Xem, ví dụ EP 0192319 A và nội dung của tài liệu này được tích hợp vào sáng chế để tham khảo. Theo cách khác, có thể tạo ra tế bào biểu hiện gen của sáng chế như cho phép sự áp dụng của nguyên liệu thu được như thuốc diệt sinh vật gây hại.

Các hoạt chất của sáng chế thường được áp dụng ở dạng chế phẩm và có thể được áp dụng cho diện tích cây trồng hoặc thực vật được xử lý, đồng thời hoặc liên tiếp, với hợp chất khác. Các hợp chất này có thể là phân bón, chất diệt cỏ dại, chất bảo vệ cryo, chất hoạt động bề mặt, chất tẩy rửa, xà phòng diệt sinh vật gây hại, dầu thơm, các polyme và/hoặc các chế phẩm giải phóng theo thời gian hoặc chứa chất mang thoái biến sinh học mà cho phép dùng liều kéo dài của diện tích đích sau khi áp dụng đơn lẻ chế phẩm. Chúng cũng có thể là thuốc diệt cỏ chọn lọc, chất hóa học, thuốc trừ sâu, thuốc diệt virus, thuốc diệt vi sinh vật, thuốc diệt amip, thuốc diệt sinh vật gây hại, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vi khuẩn, thuốc diệt giun tròn, thuốc diệt nhuyễn thể hoặc hỗn hợp của vài trong số các chế phẩm này, nếu muốn, cùng với các chất mang dùng trong nông học khác, chất hoạt động bề mặt hoặc chất phụ trợ thúc đẩy áp dụng thường được dùng trong lĩnh vực điều chế. Các chất mang và các chất phụ trợ thích hợp có thể là chất rắn hoặc chất lỏng và tương ứng với các chất thường được dùng trong kỹ thuật điều chế, ví dụ các chất khoáng tự nhiên hoặc được tái sinh, dung môi, chất gây phân tán, chất làm ướt, chất tạo dính, chất gắn kết hoặc phân bón. Tương tự, các chế phẩm có thể được điều chế thành “môi” ăn được hoặc được tạo hình thành “bẫy” sinh vật gây hại để cho phép ăn hoặc tiêu hóa bởi sinh vật gây hại đích của chế phẩm diệt sinh vật gây hại.

Các phương pháp áp dụng hoạt chất của sáng chế hoặc chế phẩm nông hóa học của sáng chế mà chứa ít nhất một trong số các protein diệt sinh vật gây hại được tạo ra bởi các chủng vi khuẩn của sáng chế bao gồm áp dụng vào lá, bao ngoài hạt và áp dụng vào đất. Số lần áp dụng và tỷ lệ áp dụng phụ thuộc vào cường độ phá hoại bởi sinh vật gây hại tương ứng.

Chế phẩm có thể được điều chế thành bột, bụi, viên, hạt, bình phun, nhũ tương, dạng keo, dung dịch hoặc tương tự và có thể được tạo ra bằng các phương pháp thông thường như sấy khô, làm khô lạnh, làm đồng nhất, chiết, lọc, ly tâm, trầm tích hoặc cô đặc của môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm polypeptit. Trong tất cả các chế phẩm này mà chứa ít nhất một polypeptit diệt sinh vật gây hại, polypeptit có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 99% khối lượng.

Bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, côn trùng hai cánh hoặc sinh vật gây hại thuộc loài cánh cứng có thể bị tiêu diệt hoặc được làm giảm theo số lượng trong diện tích đã nêu bằng các phương pháp của sáng chế hoặc có thể được áp dụng về mặt phòng ngừa vào diện tích môi trường để ngăn ngừa sự phá hoại bởi sinh vật gây hại để được phòng ngừa. Tốt hơn là, sinh vật gây hại ăn hoặc được tiếp xúc với, lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại của polypeptit. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại” chỉ lượng thuốc diệt sinh vật gây hại mà có khả năng gây ra cái chết cho ít nhất một sinh vật gây hại hoặc làm giảm đáng kể sự phát triển của sinh vật gây hại, ăn hoặc sự phát triển sinh lý bình thường. Lượng này sẽ thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như, ví dụ, sinh vật gây hại đích đặc hiệu được phòng trừ, môi trường cụ thể, vị trí, thực vật, cây trồng hoặc vị trí trong nông nghiệp được xử lý, các điều kiện môi trường và phương pháp, tốc độ, nồng độ, tính ổn định và lượng áp dụng của chế phẩm polypeptit hữu hiệu diệt sinh vật gây hại. Các chế phẩm cũng có thể thay đổi đối với các điều kiện hậu, sự quan tâm đến môi trường và/hoặc tần số áp dụng và/hoặc tính nguy kịch của sự phá hoại của sinh vật gây hại.

Các chế phẩm thuốc diệt sinh vật gây hại được mô tả có thể được tạo ra bằng cách điều chế tế bào vi khuẩn, tinh thể và/hoặc huyền phù chứa bào tử hoặc thành phần protein được phân lập với chất mang nông dụng mong muốn. Các chế phẩm có thể được điều chế trước khi dùng theo các phương pháp thích hợp như làm khô lạnh, sấy thăng hoa, sấy khô hoặc trong chất mang trong nước, môi trường hoặc chất pha loãng thích hợp, như nước muối hoặc chất đệm khác. Các chế phẩm được điều chế có thể ở dạng nguyên liệu bụi hoặc hạt hoặc huyền phù trong dầu (thực vật hoặc khoáng) hoặc nước hoặc nhũ tương dầu/nước hoặc như bột có thể làm ướt hoặc kết hợp với nguyên liệu chất mang khác bất kỳ thích hợp để áp dụng trong nông nghiệp. Các chất mang trong nông nghiệp thích hợp có thể là chất rắn hoặc chất lỏng và đã được biết

đến trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “chất mang nông dụng” bao gồm tất cả các chất phụ trợ, các thành phần trợ, chất gây phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất tạo dính, chất gắn kết, v.v mà thường được dùng trong kỹ thuật điều chế thuốc diệt sinh vật gây hại; các chất này là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật điều chế thuốc diệt sinh vật gây hại. Các chế phẩm có thể được trộn với một hoặc nhiều chất phụ trợ dạng rắn hoặc dạng lỏng và được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau, ví dụ, bằng cách trộn đồng nhất, pha trộn và/hoặc nghiền chế phẩm diệt sinh vật gây hại với các chất phụ trợ thích hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật điều chế thông thường. Các chế phẩm thích hợp và phương pháp áp dụng là được mô tả trong US 6,468,523.

“Sinh vật gây hại” bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, côn trùng, nấm, vi khuẩn, giun tròn, ve, bét và các sinh vật tương tự. Các sinh vật gây hại thuộc côn trùng được chọn từ các bộ Bộ cánh cứng, Bộ hai cánh, Bộ cánh màng, Bộ cánh vảy, Bộ ăn lông, Bộ cánh giống, Bộ cánh nửa, Bộ cánh thẳng, Bộ cánh tơ, Bộ cánh da, Bộ cánh đều, Bộ rận hút, Bộ bọ chết, Bộ cánh lông, v.v., cụ thể là Bộ cánh cứng, Bộ cánh vảy và Bộ hai cánh.

Bộ cánh cứng bao gồm các phân bộ *Adephaga* và *Polyphaga*. Phân bộ *Adephaga* bao gồm các liên họ *Caraboidea* and *Gyrinoidea*, trong khi phân bộ *Polyphaga* bao gồm các liên họ *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* và *Curculionoidea*. Liên họ *Caraboidea* bao gồm các họ *Cicindelidae*, *Carabidae* và *Dytiscidae*. Liên họ *Gyrinoidea* bao gồm họ *Gyrinidae*. Liên họ *Hydrophiloidea* bao gồm họ *Hydrophilidae*. Liên họ *Staphylinoidea* bao gồm các họ *Silphidae* và *Staphylinidae*. Liên họ *Cantharoidea* bao gồm các họ *Cantharidae* và *Lampyridae*. Liên họ *Cleroidea* bao gồm các họ *Cleridae* và *Dermestidae*. Liên họ *Elateroidea* bao gồm các họ *Elateridae* và *Buprestidae*. Liên họ *Cucujoidea* bao gồm họ *Coccinellidae*. Liên họ *Meloidea* bao gồm họ *Meloidae*. Liên họ *Tenebrionoidea* bao gồm họ *Tenebrionidae*. Liên họ *Scarabaeoidea* bao gồm các họ *Passalidae* và *Scarabaeidae*. Liên họ *Cerambycoidea* bao gồm họ *Cerambycidae*. Liên họ

Chrysomeloidea bao gồm họ *Chrysomelidae*. Liên họ *Curculionoidea* bao gồm các họ *Curculionidae* và *Scolytidae*.

Bộ hai cánh bao gồm các Phân bộ *Nematocera*, *Brachycera* và *Cyclorrhapha*. Phân bộ *Nematocera* bao gồm các họ *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* và *Cecidomyiidae*. Phân bộ *Brachycera* bao gồm các họ *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* và *Dolichopodidae*. Phân bộ *Cyclorrhapha* bao gồm cả dòng *Aschiza* và *Aschiza*. Dòng *Aschiza* bao gồm các họ *Phoridae*, *Syrphidae* và *Conopidae*. Dòng *Aschiza* bao gồm các phân chi *Acalyptratae* và *Calypttratae*. Phân chi *Acalyptratae* bao gồm các họ *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* và *Drosophilidae*. Phân chi *Calypttratae* bao gồm các họ *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* và *Sarcophagidae*.

Bộ cánh vảy bao gồm các họ *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* và *Tineidae*.

Các sinh vật gây hại thuộc côn trùng của sáng chế đối với các cây trồng chính bao gồm: Ngô: *Ostrinia nubilalis*, sâu đục thân ngô châu Âu; *Agrotis ipsilon*, sâu xám; *Helicoverpa zea*, sâu đục thân ngô; *Spodoptera frugiperda*, sâu cắn gié mùa thu; *Diatraea grandiosella*, sâu đục thân ngô tây nam; *Elasmopalpus lignosellus*, sâu đục thân ngô ít hơn; *Diatraea saccharalis*, sâu đục thân mía; *Diabrotica virgifera*, sâu đục rễ ngô phương tây; *Diabrotica longicornis barberi*, sâu đục rễ ngô phương bắc; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, sâu đục rễ ngô phương nam; *Melanotus* spp., sâu ăn lá; *Cyclocephala borealis*, bọ da che mặt phương bắc (ấu trùng màu trắng); *Cyclocephala immaculata*, bọ da che mặt phương nam (ấu trùng màu trắng); *Popillia japonica*, bọ cánh cứng Nhật bản; *Chaetocnema pulicaria*, bọ chết cánh cứng hại ngô; *Sphenophorus maidis*, rệp ngô; *Rhopalosiphum maidis*, rệp lá ngô; *Anuraphis maidiradicis*, rệp rễ ngô; *Blissus leucopterus leucopterus*, rệp; *Melanoplus femurrubrum*, châu châu chân đỏ; *Melanoplus sanguinipes*, châu châu di trú; *Hylemya platura*, giòi hạt ngô; *Agromyza parvicornis*, sâu ăn lá đốm ngô; *Anaphothrips obscurus*, bọ trĩ hại cỏ mặt đất; *Solenopsis milesta*, kiến bù lạch; *Tetranychus urticae*,

rệp nhện hai đốm; Cây lúa miến: *Chilo partellus*, sâu đục thân cây lúa miến; *Spodoptera frugiperda*, sâu cắn gié mùa thu; *Helicoverpa zea*, sâu đục thân ngô; *Elasmopalpus lignosellus*, sâu đục thân ngô ít hơn; *Feltia subterranea*, sâu ngài đêm dạng hạt; *Phyllophaga crinita*, ấu trùng màu trắng; *Eleodes*, *Conoderus* và *Aeolus* spp., sâu ăn lá; *Oulema melanopus*, bọ chết hại lá cây ngũ cốc; *Chaetocnema pulicaria*, bọ chết cánh cứng hại ngô; *Sphenophorus maidis*, rệp ngô; *Rhopalosiphum maidis*; rệp lá ngô; *Sipha flava*, rệp mía màu vàng; *Blissus leucopterus leucopterus*, rệp; *Contarinia sorghicola*, muỗi vằn cây lúa miến; *Tetranychus cinnabarinus*, rệp nhện màu đỏ; *Tetranychus urticae*, rệp nhện hai đốm; Lúa mì: *Pseudaletia unipunctata*, sâu cắn gié; *Spodoptera frugiperda*, sâu cắn gié mùa thu; *Elasmopalpus lignosellus*, sâu đục thân ngô ít hơn; *Agrotis orthogonia*, sâu ngài đêm phương tây; *Elasmopalpus lignosellus*, sâu đục thân ngô ít hơn; *Oulema melanopus*, bọ chết hại lá cây ngũ cốc; *Hypera punctata*, một ngũ cốc hại lá cỏ ba lá; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, sâu đục rễ ngô phương nam; rệp lúa mì Nga; *Schizaphis graminum*, rệp xanh; *Macrosiphum avenae*, rệp ngũ cốc Anh; *Melanoplus femurrubrum*, châu chấu chân đỏ; *Melanoplus differentialis*, châu chấu phân hóa; *Melanoplus sanguinipes*, châu chấu di trú; *Mayetiola destructor*, Ruồi nhỏ; *Sitodiplosis mosellana*, muỗi vằn hại lúa mì; *Meromyza americana*, giòi hại thân lúa mì; *Hylemya coarctata*, ruồi hại thân lúa mì; *Frankliniella fusca*, bọ trĩ hại thuốc lá; *Cephus cinctus*, ong cắn lá hại thân lúa mì; *Aceria tulipae*, ve xoắn lúa mì; Cây hướng dương: *Suleima helianthana*, sâu bướm hại chồi cây hướng dương; *Homoeosoma electellum*, sâu bướm hại cây hướng dương; *zygogramma exclamationis*, bọ cánh cứng hại cây hướng dương; *Bothyrus gibbosus*, bọ cánh cứng hại cây cà rốt; *Neolasioptera murtfeldtiana*, muỗi vằn hại hạt hướng dương; Cây bông: *Heliothis virescens*, sâu hại chồi cây bông; *Helicoverpa zea*, sâu hại quả nang cây bông; *Spodoptera exigua*, sâu cắn gié hại củ cải đường; *Pectinophora gossypiella*, sâu hại quả nang màu hồng; *Anthonomus grandis*, một ngũ cốc hại quả nang; *Aphis gossypii*, rệp hại cây bông; *Pseudatomoscelis seriatus*, bọ nhảy hại cây bông; *Trialeurodes abutilonea*, ruồi trắng cánh dài; *Lygus lineolaris*, rệp thực vật tạo vết nhơ; *Melanoplus femurrubrum*, châu chấu chân đỏ; *Melanoplus differentialis*, châu chấu phân hóa; *Thrips tabaci*, bù lạch hại cây hành; *Frankliniella fusca*, bọ trĩ hại thuốc lá; *Tetranychus cinnabarinus*, rệp

nhện màu đỏ; *Tetranychus urticae*, rệp nhện hai đốm; Lúa gạo: *Diatraea saccharalis*, sâu đục thân mía; *Spodoptera frugiperda*, sâu cắn gié mùa thu; *Helicoverpa zea*, sâu đục thân ngô; *Colaspis brunnea*, bọ cánh cứng hại nhỏ; *Lissorhoptrus oryzophilus*, một ngũ cốc hại lúa nước; *Sitophilus oryzae*, một ngũ cốc hại lúa gạo; *Nephotettix nigropictus*, bọ chét hại lá lúa gạo; *Blissus leucopterus leucopterus*, rệp; *Acrosternum hilare*, rệp hôi màu xanh; Cây đậu nành: *Pseudoplusia includens*, sâu đo hại đậu nành; *Anticarsia gemmatilis*, sâu bướm hại đậu mè; *Plathypena scabra*, sâu hại cỏ ba lá màu xanh; *Ostrinia nubilalis*, sâu đục thân ngô châu Âu; *Agrotis ipsilon*, sâu xám; *Spodoptera exigua*, sâu cắn gié hại cây củ cải đường; *Heliothis virescens*, sâu hại chồi bông; *Helicoverpa zea*, sâu hại quả bông; *Epilachna varivestis*, bọ cánh cứng hại đậu Mê hi cô; *Myzus persicae*, rệp đào màu xanh; *Empoasca fabae*, bọ chét hại lá cây khoai tây; *Acrosternum hilare*, rệp hôi màu xanh; *Melanoplus femurrubrum*, châu chấu chân đỏ; *Melanoplus differentialis*, châu chấu phân hóa; *Hylemya platura*, giòi hạt ngô; *Sericothrips variabilis*, bù lạch hại cây đậu nành; *Thrips tabaci*, bù lạch hại cây hành; *Tetranychus turkestanii*, rệp nhện hại cây dâu tây; *Tetranychus urticae*, rệp nhện hai đốm; Lúa mạch: *Ostrinia nubilalis*, sâu đục thân ngô châu Âu; *Agrotis ipsilon*, sâu xám; *Schizaphis graminum*, rệp xanh; *Blissus leucopterus leucopterus*, rệp; *Acrosternum hilare*, rệp hôi màu xanh; *Euschistus servus*, rệp hôi màu nâu; *Delia platura*, giòi hạt ngô; *Mayetiola destructor*, Ruồi nhỏ; *Petrobia latens*, ve hại lúa mì màu nâu; Cải có hạt chứa dầu: *Brevicoryne brassicae*, rệp cải bắp; *Phyllotreta cruciferae*, bọ chét cánh cứng; *Mamestra configurata*, sâu cắn gié Bertha; *Plutella xylostella*, bướm đêm lưng óng ánh; *Delia* spp., giòi hại rễ.

Giun tròn bao gồm giun tròn sống ký sinh như giun tròn máu rệp, túi bao và thương tổn, bao gồm *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. và *Globodera* spp.; cụ thể là các thành viên của giun tròn túi bao, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Heterodera glycines* (giun tròn túi bao đậu nành); *Heterodera schachtii* (giun tròn túi bao củ cải đường); *Heterodera avenae* (giun tròn túi bao ngũ cốc); và *Globodera rostochiensis* và *Globodera pailida* (giun tròn túi bao cây khoai tây). Các giun tròn thương tổn bao gồm *Pratylenchus* spp.

Phương pháp làm tăng sản lượng của thực vật

Sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng sản lượng của thực vật. Phương pháp này bao gồm tạo ra thực vật hoặc tế bào thực vật biểu hiện polynucleotit mã hóa trình tự polypeptit diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế và trồng thực vật hoặc hạt của nó vào cánh đồng bị phá hoại bởi (hoặc dễ bị phá hoại bởi) sinh vật gây hại mà polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại. Theo một số phương án, polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại diệt sinh vật gây hại là bộ cánh vảy, bộ bộ cánh cứng, côn trùng hai cánh, bộ cánh nửa hoặc thuộc giun tròn và cánh đồng này bị phá hoại bởi sinh vật gây hại là bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, côn trùng hai cánh hoặc giun tròn. Như được xác định theo sáng chế, “sản lượng” của thực vật đề cập đến chất lượng và/hoặc số lượng sinh khối được tạo ra bởi thực vật. Thuật ngữ “sinh khối” chỉ sản phẩm thực vật được đo bất kỳ. Sự tăng trong việc tạo ra sinh khối là sự cải thiện bất kỳ trong năng suất sản phẩm của thực vật được đo. Sự tăng sản lượng của thực vật có vài áp dụng thương mại. Ví dụ, sinh khối lá thực vật tăng có thể làm tăng sản lượng của rau ăn lá mà được tiêu thụ bởi người hoặc động vật. Ngoài ra, sinh khối lá tăng có thể được sử dụng để làm tăng sự tạo ra các sản phẩm được phẩm hoặc công nghiệp tạo thành chủ yếu từ thực vật. Sự tăng sản lượng có thể ba gồm sự tăng đáng kể về mặt thống kê bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sản lượng tăng ít nhất 1%, tăng ít nhất 3%, tăng ít nhất 5%, tăng ít nhất 10%, tăng ít nhất 20%, tăng ít nhất 30%, tăng ít nhất 50%, tăng ít nhất 70%, tăng ít nhất 100% hoặc lớn hơn so với thực vật không biểu hiện trình tự diệt sinh vật gây hại. Theo phương án cụ thể, sản lượng của thực vật được tăng là kết quả của sự kháng sinh vật gây hại được cải thiện của thực vật biểu hiện protein diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế. Sự biểu hiện của protein diệt sinh vật gây hại dẫn đến khả năng giảm khả năng phá hoại hoặc ăn của sinh vật gây hại.

Thực vật cũng có thể được xử lý bằng một hoặc nhiều chế phẩm hóa học, bao gồm một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ, thuốc trừ sâu hoặc thuốc diệt nấm. Các chế phẩm hóa học lấy làm ví dụ bao gồm: Thuốc diệt cỏ dùng cho trái cây/ Rau: Atrazin, Bromaxil, Diuron, Glyphosat, Linuron, Metribuzin, Simazin, Trifluralin, Fluazifop, Glufosinate, Halosulfuron Gowan, Paraquat, Propyzamit, Sethoxydim, Butafenaxil, Halosulfuron, Indaziflam; Thuốc trừ sâu dùng cho trái cây/Rau: Aldicarb, Bacillus thuriangiensis, Carbaryl, Carbofuran, Chlorpyrifos, Xypermethrin, Deltamethrin,

Abamectin, Xyfluthrin/beta-xyfluthrin, Esfenvalerat, Lambda-xyhalothrin, Acequinoxyl, Bifenazat, Methoxyfenozit, Novaluron, Chromafenozit, Thiacloprid, Dinotefuran, Fluacrypyrim, Spirodiclofen, Gama-xyhalothrin, Spiromesifen, Spinosad, Rynaxypyr, Xyazypyr, Triflumuron, Spirotetramat, Imidacloprid, Flubendiamit, Thiodicarb, Metaflumizon, Sulfoxaflor, Xyflumetofen, Xyanopyrafen, Clothianidin, Thiamethoxam, Spinotoram, Thiodicarb, Flonicamid, Methiocarb, Emamectin-benzoat, Indoxacarb, Fenamiphos, Pyriproxifen, Fenbutatin-oxid; Thuốc diệt nấm dùng cho trái cây/Rau: Ametoctradin, Azoxystrobin, Benthiavalicarb, Boscalid, Captan, Carbendazim, Clothalonil, Đồng, Xyazofamid, Xyflufenamid, Xymoxanil, Xyproconazol, Xyprodinil, Difenoconazol, Dimetomorph, Dithianon, Fenamidon, Fenhexamid, Fluazinam, Fludioxonil, Fluopicolit, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Folpet, Fosetyl, Iprodion, Iprovalicarb, Isopyrazam, Kresoxim-metyl, Mancozeb, Mandipropamid, Metalaxyl/mefenoxam, Metiram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propamocarb, Propiconazol, Propineb, Proquinazid, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quinoxyfen, Spiroxamin, Lưu huỳnh, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Thuốc diệt cỏ dùng cho ngũ cốc: 2.4-D, Amidosulfuron, Bromoxynil, Carfentrazone-E, Clotoluron, Chlorsulfuron, Clodinafop-P, Clopyralid, Dicamba, Diclofop-M, Diflufenican, Fenoxaprop, Florasulam, Flucarbazone-NA, Flufenacet, Flupyrosulfuron-M, Fluroxypyr, Flurtamon, Glyphosat, Iodosulfuron, Ioxynil, Isoproturon, MCPA, Mesosulfuron, Metsulfuron, Pendimethalin, Pinoxaden, Propoxycarbazon, Prosulfocarb, Pyroxsulam, Sulfosulfuron, Thifensulfuron, Tralkoxydim, Triasulfuron, Tribenuron, Trifluralin, Tritosulfuron; Thuốc diệt nấm dùng cho ngũ cốc: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Clothalonil, Xyflufenamid, Xyproconazol, Xyprodinil, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenpropidin, Fenpropimorph, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluquinconazol, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Kresoxim-metyl, Metconazol, Metrafenon, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Prochloraz, Propiconazol, Proquinazid, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Quinoxyfen, Spiroxamin, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Thuốc trừ sâu dùng cho ngũ cốc: Dimethoat, Lambda-xyhalothrin, Deltamethrin, alpha-Xypermethrin, beta-xyfluthrin, Bifenthrin, Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Thiacloprid,

Acetamiprid, Dinetofuran, Clorphyriphos, Pirimicarb, Methiocarb, Sulfoxaflor; Thuốc diệt cỏ dùng cho ngô: Atrazin, Alachlor, Bromoxynil, Axetochlor, Dicamba, Clopyralid, (S-)Dimethenamid, Glufosinat, Glyphosat, Isoxaflutol, (S-)Metolachlor, Mesotrion, Nicosulfuron, Primisulfuron, Rimsulfuron, Sulcotrion, Foramsulfuron, Topramezon, Tembotrion, Saflufenaxil, Thiencarbazon, Flufenaxet, Pyroxasulfon; Thuốc trừ sâu dùng cho ngô: Carbofuran, Chlorpyrifos, Bifenthrin, Fipronil, Imidacloprid, Lambda-Cyhalothrin, Tefluthrin, Terbufos, Thiamethoxam, Clothianidin, Spiromesifen, Flubendiamit, Triflumuron, Rynaxypyr, Deltamethrin, Thiodicarb, β -Xyfluthrin, Xypermethrin, Bifenthrin, Lufenuron, Tebupirimphos, Ethiprol, Xyazypyr, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinetofuran, Avermectin; Thuốc diệt nấm dùng cho ngô: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Xyproconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenitropan, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Metconazol, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propiconazol, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Trifloxystrobin; Thuốc diệt cỏ dùng cho lúa gạo: Butachlor, Propanil, Azimsulfuron, Bensulfuron, Xyhalofop, Daimuron, Fentrazamit, Imazosulfuron, Mefenaxet, Oxaziclomefon, Pyrazosulfuron, Pyributicarb, Quinclorac, Thiobencarb, Indanofan, Flufenaxet, Fentrazamit, Halosulfuron, Oxaziclomefon, Benzobixyclon, Pyriftalid, Penoxsulam, Bispyribac, Oxadiargyl, Ethoxysulfuron, Pretilachlor, Mesotrion, Tefuryltrion, Oxadiazon, Fenoxaprop, Pyrimisulfan; Thuốc trừ sâu dùng cho lúa gạo: Diazinon, Fenobucarb, Benfuracarb, Buprofezin, Dinotefuran, Fipronil, Imidacloprid, Isoprocarb, Thiacloprid, Chromafenozit, Clothianidin, Ethiprol, Flubendiamit, Rynaxypyr, Deltamethrin, Acetamiprid, Thiamethoxam, Xyazypyr, Spinosad, Spinotoram, Enamectin-Benzoat, Xypermethrin, Chlorpyriphos, Etofenprox, Carbofuran, Benfuracarb, Sulfoxaflor; Thuốc diệt nấm dùng cho lúa gạo: Azoxystrobin, Carbendazim, Carpropamid, Diclocymet, Difenconazol, Edifenphos, Ferimzon, Gentamycin, Hexaconazol, Hymexazol, Iprobenfos (IBP), Isoprothiolan, Isotianil, Kasugamycin, Mancozeb, Metominostrobin, Oryastrobin, Pencycuron, Probenazol, Propiconazol, Propineb, Pyroquilon, Tebuconazol, Thiophanate-metyl, Tiadinil, Trioxclazol, Trifloxystrobin, Validamycin; Thuốc diệt cỏ dùng cho bông: Diuron, Flometuron, MSMA, Oxyfluorfen, Prometryn, Trifluralin, Carfentrazon, Clethodim, Fluazifop-butyl, Glyphosat, Norflurazon,

Pendimethalin, Pyriethion, Trifloxysulfuron, Tepraloxydim, Glufosinat, Flumioxazin, Thidiazuron; Thuốc trừ sâu dùng cho bông: Axephat, Aldicarb, Chlorpyrifos, Xypermethrin, Deltamethrin, Abamectin, Axetamiprid, Enamectin Benzoat, Imidacloprid, Indoxacarb, Lambda-Xyhalothrin, Spinosad, Thiodicarb, Gama-Xyhalothrin, Spiromesifen, Pyridalyl, Flonicamid, Flubendiamit, Triflumuron, Rynaxypyr, Beta-Xyfluthrin, Spirotetramat, Clothianidin, Thiamethoxam, Thiachloprid, Dinotofuran, Flubendiamit, Xyazypyr, Spinosad, Spinetoram, gama Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)methyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Thiodicarb, Avermectin, Flonicamid, Pyridalyl, Spiromesifen, Sulfoxaflor; Thuốc diệt nấm dùng cho cây bông: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Clothalonil, Đòng, Xyproconazol, Difenoconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenamidon, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Iprodion, Isopyrazam, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metominostrobin, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propineb, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Quintozen, Tebuconazol, Tetraconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Thuốc diệt cỏ dùng cho đậu nành: Alachlor, Bentazon, Trifluralin, Chlorimuron-Etyl, Cloransulam-Metyl, Fenoxaprop, Fomesafen, Fluazifop, Glyphosat, Imazamox, Imazaquin, Imazethapyr, (S-)Metolachlor, Metribuzin, Pendimethalin, Tepraloxydim, Glufosinat; Thuốc trừ sâu đậu nành: Lambda-xyhalothrin, Methomyl, Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Thiachloprid, Acetamiprid, Dinotofuran, Flubendiamide, Rynaxypyr, Xyazypyr, Spinosad, Spinetoram, Enamectin-Benzoat, Fipronil, Ethiprol, Deltamethrin, β -Xyfluthrin, gama và lambda Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)methyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Spirotetramat, Spinodiclofen, Triflumuron, Flonicamid, Thiodicarb, beta-Xyfluthrin; Thuốc diệt nấm dùng cho đậu nành: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Clothalonil, Đòng, Xyproconazol, Difenoconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flutriafol, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Iprodion, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metconazol, Metominostrobin, Myclobutanil, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propiconazol, Propineb, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Tetraconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Thuốc diệt cỏ dùng cho củ cải đường: Chloridazon, Desmedipham, Ethofumesat, Phenmedipham, Triallat, Clopyralid, Fluazifop, Lenaxil, Metamitron, Quinmerac, Xycloxydim, Triflurosulfuron,

Tepraloxydim, Quizalofop; Thuốc trừ sâu dùng cho củ cải đường: Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Thiacloprid, Acetamiprid, Dinetofuran, Deltamethrin, β -Xyfluthrin, gama/lambda Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)metyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Tefluthrin, Rynaxypyr, Xyaxypyr, Fipronil, Carbofuran; Thuốc diệt cỏ dùng cho cải ngọt: Clopyralid, Diclofop, Fluazifop, Glufosinat, Glyphosat, Metazachlor, Trifluralin Ethametsulfuron, Quinmerac, Quizalofop, Clethodim, Tepraloxydim; Thuốc diệt nấm dùng cho cải ngọt: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Xyproconazol, Difenconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fluazinam, Flopyram, Fluoxastrobin, Flusilazol, Fluxapyroxad, Iprodion, Isopyrazam, Mepiquat-clorua, Metconazol, Metominostrobin, Paclobutrazol, Penthiopyrad., Picoxystrobin, Prochloraz, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin, Vinclozolin; Thuốc trừ sâu dùng cho cải ngọt: Carbofuran, Thiacloprid, Deltamethrin, Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Axetamiprid, Dinetofuran, β -Xyfluthrin, gama và lambda Xyhalothrin, tau-Fluvaleriat, Ethiprol, Spinosad, Spinetoram, Flubendiamit, Rynaxypyr, Xyazypyr, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)metyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on.

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thử nghiệm

Ví dụ 1. Thiết kế và thử nghiệm protein dung hợp Axmi115

Axmi115 được mô tả trong công bố US 20100004176 (trình tự axit amin được nêu theo sáng chế là SEQ ID NO:43). Gen này có chung 70% trình tự tương đồng với Vip3Aa. Phiên bản được tối ưu hóa codon của Axmi115 (cũng được đề cập đến theo sáng chế là Axmi115v01 và được nêu trong SEQ ID NO:42) được tạo dòng vô tính và được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện *E coli*. Protein được tạo ra được thể hiện trong thử nghiệm sinh học *in vitro* có hoạt tính diệt sinh vật gây hại diệt các sinh vật gây hại là côn trùng khác nhau bao gồm sâu đục thân ngô châu Âu (ECB), sâu đục thân ngô (CEW), sâu cắn gié mùa thu (FAW) và sâu xám (BCW).

Axmi005 cũng được mô tả trong công bố US 20100004176. Gen này dùng chung 94% trình tự tương đồng với Vip3Aa. Phiên bản được tối ưu hóa codon của Axmi005 (optAxmi005, mà được nêu theo sáng chế là SEQ ID NO:44) được tạo vô tính và được biểu hiện bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện *E. coli*. Protein được tạo ra được thể hiện trong thử nghiệm sinh học *in vitro* có hoạt tính diệt sinh vật gây hại diệt sinh vật gây hại là côn trùng khác nhau bao gồm *Helicoverpa zea* (Hz), *Heliothis virescens* (Hv), FAW, BCW, sâu đục thân mía (SCB) và sâu bướm hại đậu mè (VBC).

Hoạt tính tương đối của Axmi115 là thấp diệt Hz và FAW so với Axmi005. Ngoài ra, như được lưu ý trên đây, Axmi005 không có hoạt tính ECB. Trong nỗ lực nhận dạng các miền đáp ứng đối với tính đặc hiệu khác nhau cũng như hoạt tính của hai protein, cấu trúc biểu hiện các dung hợp của optAxmi005 và phiên bản được tối ưu hóa codon của Axmi115 (optAxmi115v01) được tạo ra như được mô tả dưới đây và được biểu diễn theo sơ đồ trong Fig.1. Protein được biểu hiện trong *E. coli* và được thử nghiệm diệt ECB, Hz, FAW và BCW trong thử nghiệm sinh học *in vitro*. Protein được biểu hiện bởi pAX6307 (Axmi115v02.01, được nêu theo sáng chế là SEQ ID NO:1) thể hiện hoạt tính được tăng cường khi được so với protein được biểu hiện bởi pAX5477 (Axmi115v01, được nêu theo sáng chế là SEQ ID NO:42) diệt tất cả bốn sinh vật gây hại được thử nghiệm.

Gen được biểu hiện trong pAX6307 (Axmi115v02.01) được tạo vectơ thành vectơ biểu hiện của thực vật pAG6141, trong đó sự biểu hiện của protein được điều khiển bởi trình tự khởi đầu Ubiquitin của mía.

Các mẫu lá của các cây chuyển gen biểu hiện Axmi115v01 và Axmi115v02.01 được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học côn trùng trong phòng thí nghiệm diệt ECB, Hz, FAW và BCW và các thử nghiệm trên cánh đồng diệt ECB, Hz và FAW. Các kết quả thể hiện rằng gen Axmi115v02.01 được cải thiện có hiệu quả tốt hơn diệt tất cả sinh vật gây hại được thử nghiệm.

Mô tả cấu trúc:

Các trình tự axit amin thu được bởi sự dịch mã *in silico* của trình tự ADN của Vip3Aa, Axmi005, Axmi115v01, Axmi163 và Axmi184 được sắp hàng để nhận dạng

các axit amin được bảo tồn trong tất cả các thể tương đồng (Axmi163 và Axmi184 cũng được mô tả trong US 20100004176).

Các trình tự môi PCR được thiết kế thành ba vùng được bảo tồn của Axmi005 và Axmi115v01 bằng cách sử dụng trình tự của optAxmi005 được tìm thấy trong pAX5478 (mà chứa phiên bản được tối ưu hóa codon của Axmi005, được nêu trong SEQ ID NO:44) và trình tự của optAxmi115 được tìm thấy trong pAX5477 (mà chứa phiên bản được tối ưu hóa codon của Axmi115). Ba gen dung hợp được tạo ra bởi PCR xếp chồng (xem Fig.1).

ADN của gen dung hợp được tạo ra bởi các phản ứng PCR này được tạo dòng vô tính vào vector biểu hiện *E. coli* pRSf1B. Các vector biểu hiện thu được được thể hiện trong Bảng 1. Protein được biểu hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến và phân chiết *E. coli* được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học *in vitro*.

Bảng 1. Các cấu trúc gen dung hợp

Tên cấu trúc	Trình tự cài xen	Nucleotit SEQ ID NO:	Axit amin SEQ ID NO:
pAX6307	Axmi005/Axmi115 dung hợp A	1	15
pAX6308	Axmi005/Axmi115 dung hợp B	2	16
pAX6309	Axmi005/Axmi115 dung hợp D	3	17
pAX5478	optAxmi005	44	45
pAX5477	Axmi115v01	42	43
pRSf1b	vector đối chứng	---	---

Thử nghiệm sinh học *in-vitro*

Phân chiết thô từ *E. coli* được biểu hiện trong các vector được thử nghiệm diệt Hz, ECB, FAW và BCW. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 (chậm phát triển) và Bảng 3 (tử vong).

Bảng 2. Điểm số chậm phát triển

ECB			Hz			FAW			BCW		
	Tb*	SD		Tb*	SD		Tb*	SD		Tb*	SD
pAX6307 (dung hợp A)	2,2	0,3	pAX 6307	1,8	0,3	pAX 6307	3	0	pAX 6307	0,8	0,3
pAX6308	0,5	0,5	pAX	0,3	0,4	pAX	1,3	1,3	pAX	0	0

(dung hợp B)			6308			6308			6308		
pAX6309 (dung hợp D)	1,2	0,3	pAX 6309	0,2	0,3	pAX 6309	0,7	0,7	pAX 6309	0	0
pRSf1b (vector đối chứng)	0,3	0,4	pRSf 1b	0	0	pRSf 1b	0,5	0,5	pRSf 1b	0	0
pAX5478 (Axmi005)	0	0	pAX 5478	1,8	0,3	pAX 5478	3	0	pAX 5478	1,7	0,7
pAX5477 (Axmi115v01)	0,2	0,3	pAX 5477	0,5	0,5	pAX 5477	1,5	1,5	pAX 5477	0,2	0,3

* Hệ thống ghi điểm số trung bình:

0 = không có tác dụng được quan sát

1 = chậm phát triển không đồng nhất ôn hòa

2 = chậm phát triển không đồng nhất vừa phải

3 = chậm phát triển đồng nhất từ vừa phải đến nguy kịch

4 = tử vong (<100%) với sự chậm phát triển đồng nhất

5 = tử vong hoàn toàn

Bảng 3. Phần trăm tử vong

	Hz	ECB	FAW	BCW
pAX6307 (dung hợp A)	50	50	75	25
pAX6308 (dung hợp B)	0	0	0	0
pAX6309 (dung hợp D)	0	25	25	0
pRSf1b (vector đối chứng)	0	0	0	0
pAX5478 (optAxmi005)	50	0	75	25
pAX5477 (Axmi115v01)	0	0	0	0

Protein được biểu hiện từ vector pAX6307 (dung hợp A) thay đổi theo sáu axit amin và được ký hiệu là Axmi115v02.01. Trình tự axit amin đối với protein dung hợp này được nêu trong SEQ ID NO:15.

Các vector biểu hiện *E. coli* biểu hiện Axmi115v01 (pAX5476) và Axmi115v02.01 (pAX6307) có 6X His Tag đầu N. Hai protein được tinh chế bằng cách sử dụng các đặc tính gắn kết niken của 6X His tag. Các nồng độ khác nhau của protein được tinh chế được thử nghiệm bằng thử nghiệm sinh học *in vitro* diệt ECB, FAW, BCW và sâu cắn gié củ cải đường BAW). Các kết quả thể hiện rằng Axmi115v02.01 có hoạt tính được tăng cường so với Axmi115v01 trong tất cả các trường hợp (các Bảng 4 và 5).

Bảng 4. Điểm số chậm phát triển

	µg/ml	BAW	FAW	ECB	BCW
Axmi115v01	40	4	4	3	0
Axmi115v01	10	2	3	0	0
Axmi115v01	1	0	0	0	0
Axmi115v01	0,1	0	0	0	0
Axmi115v01	0,01	0	1	0	0
Axmi115v02	40	4	4	3	3
Axmi115v02	10	4	4	3	1
Axmi115v02	1	4	4	3	0
Axmi115v02	0,1	2	1	2	0
Axmi115v02	0,01	0	2	1	0

Bảng 5. Điểm số tử vong

	µg/ml	BAW	FAW	ECB	BCW
Axmi115v01	40	75%	0%	0%	0%
Axmi115v01	10	0%	25%	0%	0%
Axmi115v01	1	0%	0%	0%	0%
Axmi115v01	0,1	0%	0%	0%	0%
Axmi115v01	0,01	0%	0%	0%	0%
Axmi115v02	40	75%	50%	0%	0%
Axmi115v02	10	0%	25%	50%	0%
Axmi115v02	1	0%	25%	0%	0%
Axmi115v02	0,1	0%	0%	0%	0%
Axmi115v02	0,01	0%	0%	0%	0%

Thử nghiệm sinh học đĩa lá thực vật

Axmi115v01 (SEQ ID NO:42) và Axmi115v02.01 (SEQ ID NO:1) được tạo dòng vô tính vào các vector biểu hiện của thực vật lần lượt là pAG6585 và pAG6141

và các cây ngô chuyển gen được tạo ra. Các mẫu được lấy đối với PCR và phân tích thẩm tách Western và đối với thử nghiệm sinh học đĩa lá *in vitro* diệt Hz, ECB, FAW và BCW. Thử nghiệm sinh học được ghi điểm đối với không bị tổn hại, tổn hại thấp (1- ít lỗ), tổn hại vừa phải và tổn hại nặng. Không bị tổn hại và tổn hại nhẹ được cho là kết quả tích cực trong khi tổn hại từ vừa phải đến nặng được cho là kết quả tiêu cực.

Nguyên liệu lá từ PCR và các cây tích cực trong thẩm tách Western được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học đĩa lá *in vitro*. Fig.2A thể hiện phần trăm các cây tích cực PCR mà tạo ra điểm số thử nghiệm sinh học không bị tổn hại, tổn hại nhẹ, tổn hại vừa phải hoặc tổn hại nặng đối với mỗi cấu trúc. Các điểm thẩm tách Western cho biết rằng các mức biểu hiện của protein ở thực vật biểu hiện optAxmi115v02.01, nói chung, là cao hơn so với các thực vật biểu hiện Axmi115v01.

Các thực vật chuyển gen bổ sung được tạo ra biểu hiện Axmi115v02.01. Nguyên liệu lá từ PCR và các thực vật tích cực trong thẩm tách Western được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học đĩa lá *in vitro* diệt Hz, ECB, FAW và BCW. Các kết quả được thể hiện trong Fig.2b.

Thử nghiệm thực địa thực vật

Thực vật biểu hiện gen được thể hiện trong Bảng 6 được trồng ở Polk County, vị trí thử nghiệm IA. Các phân loại âm tính được nhận dạng và được loại bỏ bằng cách sử dụng sự áp dụng 1X của Glyphosat (20 oz./A of Buccaneer 5, Tenkoz, Inc.) khi thực vật ở giai đoạn lá mầm V3-V4. Ứng suất của côn trùng thu được từ sự phá hoại dẫn của ECB, Hz và FAW.

Sự phá hoại của ECB đã bắt chước sự kiện tự nhiên của các thể hệ thứ nhất và thứ hai. Đối với ECB, tổng số khoảng 340 ấu trùng được làm nhiễm vào vòng lá (thể hệ thứ nhất, ECB1) hoặc nách lá (thể hệ thứ hai, ECB2) của mỗi thực vật. ECB1 được đánh giá bởi quy mô tỷ lệ Guthrie 1-9. ECB2 là sự đo tổng chiều dài của sự khoét thân được đo theo cm.

Hai mươi ấu trùng Hz được làm nhiễm trên đầu tai chính trên mỗi thực vật. Cũng có sự phá hoại tự nhiên vừa phải của Hz mà làm tăng sự phá hoại dẫn này. Tổn hại của tai được đo theo cm vuông.

Khoảng 60 ấu trùng FAW được làm nhiễm vào vòng lá. Tổn hại được đo trong quy mô tỷ lệ Modified Davis 1-9 như được mô tả dưới đây.

Các kết quả của các thử nghiệm thực địa này được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6. Các kết quả của thử nghiệm thực địa

	FAW (1-9)		Hz (cm vuông)		ECB2 (cm)	
	Điểm số trung bình	SD	Điểm số trung bình	SD	Điểm số trung bình	SD
Axmi115v02.01	1,20	0,48	0,12	0,15	0,00	0,00
Axmi115v01	1,92	1,18	1,96	1,40	0,83	N/A
Axmi005	1,75	0,97	4,12	2,06	N/A	N/A
neg. Control	6,42	0,74	7,06	1,61	9,65	1,66

FAW – Mô tả quy mô tỷ lệ Modified Davis 1-9.

1. Không có tổn hại có thể nhìn thấy hoặc chỉ có các thương tổn có lỗ đường kính nhỏ có mặt trên các lá vòng.
2. Các thương tổn có lỗ đường kính nhỏ và vòng tròn nhỏ có mặt trên các lá vòng.
3. Các thương tổn có vòng tròn nhỏ và vài thương tổn có hình thon dài nhỏ (có hình chữ nhật) đến tối đa 1,3cm (1/2") chiều dài có mặt trên các lá vòng và cuộn.
4. Vài thương tổn có hình thon dài theo chiều dài có kích cỡ từ nhỏ đến trung bình từ 1,3 đến 2,5cm (từ 1/2" đến 1") có mặt trên vài lá vòng và cuộn.
5. Vài thương tổn có hình thon dài lớn có chiều dài lớn hơn 2,5cm (1") trên một vài lá vòng và cuộn và/hoặc một vài lỗ có hình đồng nhất đến không đều có kích cỡ từ nhỏ đến trung bình (màng nền bị phá hủy) được ăn từ lá vòng và/hoặc cuộn.
6. Một vài thương tổn có hình thon dài lớn có mặt trên vài lá vòng và cuộn và/hoặc vài lỗ có hình từ đồng nhất đến không đều lớn được ăn từ các lá cuộn/vòng.
7. Nhiều thương tổn có hình thon dài bất kỳ có tất cả các kích cỡ có mặt trên vài lá vòng và cuộn cộng với vài lỗ có hình đồng nhất hoặc không đều lớn được ăn từ lá vòng và cuộn.

8. Nhiều thương tổn có hình thon dài có tất cả các kích cỡ có mặt trên hầu hết lá vòng và cuộn cộng với nhiều lỗ có hình đồng nhất hoặc không đều có kích cỡ từ trung bình đến lớn được ăn từ các lá vòng và cuộn.

9. Các lá vòng và cuộn hầu như bị phá hủy hoàn toàn.

Davis, F. M., S. S. Ng and W.P. Williams. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Miss. Agric. Forestry Exp. Stn. Tech. Bull. 186.

ECB – Mô tả quy mô tỷ lệ Guthrie 1-9.

1. Không nhìn thấy tổn hại lá.
2. Lượng nhỏ tổn hại lỗ khoan nhỏ trên một vài lá.
3. Tổn hại lỗ khoan nhỏ thông thường trên một vài lá.
4. Một vài lá có các lỗ khoan nhỏ và thương tổn có hình thon dài.
5. Vài lá có thương tổn có hình thon dài.
6. Vài lá có thương tổn có hình thon dài dài khoảng 2,5cm.
7. Các thương tổn dài thông thường trên khoảng một nửa lá.
8. Các thương tổn dài thông thường trên khoảng hai phần ba lá.
9. Hầu hết lá có các thương tổn dài.

Guthrie, W. D., F. F. Dicke and C. R. Neiswander. 1960. Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. Ohio. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 860.

Ví dụ 2. Phát triển định hướng của Axmi115v02.

Phát triển định hướng đã được sử dụng để cải thiện hiệu lực và hoạt tính của Axmi115 diệt ECB, Hz, FAW, BCW và VBC. Để nhận biết các vùng của Axmi115 có liên quan đến độ độc đối với côn trùng, nhiều biến thể trao đổi trình tự Axmi115/Axmi005 trong phần đầu C của Axmi115 được tạo ra. Hai mươi một khối phân kỳ trình tự giữa Axmi115 và Axmi005 được ký hiệu (xem, công bố US 20100004176) và các khối trình tự này trong Axmi115 được thay thế bằng các khối trình tự Axmi005 tương ứng. Các thử nghiệm sinh học của các protein lai thể hiện rằng

các thay thế trong các khối 2, 3, 10 và 18 được liên kết với độ độc đối với côn trùng được tăng.

Các thư viện đột biến điểm được tạo ra rằng các vị trí được tạo đích trong các khối 2, 3, 10 và 18. Các thư viện đột biến điểm này được thử nghiệm diệt ECB, Hz, FAW, BCW và VBC ở 1,5x độ phủ ở mức sao chép 4. Các thử nghiệm lại được thực hiện ở mức sao chép 4 và quy mô lớn được thực hiện ở mức sao chép 4. Các đột biến điểm sau đây thể hiện hoạt tính được cải thiện diệt một hoặc nhiều sinh vật gây hại:

Bảng 7. Hoạt tính của các đột biến điểm Axmi115

	nucleotit SEQ ID NO:	axit amin SEQ ID NO:	Hoạt tính được cải thiện đối với	Sự cải thiện không đáng kể đối với
Block2 L11C7	9	23	FAW	Hz, ECB, BCW
Block 2 L11H6		24	FAW	Hz, ECB
Block 2 L11H7	10	25	FAW	Hz, ECB, BCW
Block 2 L11A9	11	26	FAW	ECB, BCW
Block 2 L11F9		27	ECB	BCW, FAW
Block 2 L11G10	12	28	Hz, FAW	
Block 2 L12C3	13	29	Hz, FAW	
Block 18 L12A10	14	30	FAW	ECB, VBC
Block 18 L12B10		31	FAW	ECB

Các biến thể này chứa các đột biến trong phần đầu C. Để nhìn đối với các cải thiện hiệp đồng với Axmi115v02 (pAX6307), phần đầu C của vài trong số các đột biến trên đây được tạo dòng vô tính vào Axmi115v02 (pAX6307). Các thử nghiệm trên quy mô lớn được thực hiện và các biến thể với hoạt tính được cải thiện so với Axmi115v02 được nhận dạng.

Bảng 8. Hoạt tính của các đột biến Axmi115v02

Gen	ECB		FAW		VBC		Hz		BCW	
	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong
axmi-115 v02	3,50	14,84	3,75	45,31	4,00	72,27	4,00	16,67	2,08	4,17
115B2L11H6	3,67	13,02	3,67	52,08	4,00	84,38	4,00	35,16	1,50	0,00

Gen	ECB		FAW		VBC		Hz		BCW	
	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong	Còi cọc	% Từ vong
(v02) – evo27										
115B18L12B10 (v02) – evo28	3,33	15,63	3,67	26,56	4,00	60,94	4,00	1,56	2,25	0,00
115B2L11H7 (v02)	3,33	10,94	3,67	33,33	4,00	56,77	4,00	3,91	2,00	0,00
115B18L12A10 (v02)	3,33	16,15	3,67	27,08	4,00	60,94	4,00	0,78	2,13	0,00
115B2L11F9 (v02) – evo29	3,67	6,88	3,67	54,17	4,00	86,98	4,00	34,38	1,38	3,13

Biến thể axmi115 B2L11H6 (v02) thể hiện hoạt tính được cải thiện diệt *H. zea*, VBC, FAW. Được ký hiệu là Axmi115v02(evo27). Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo27) được nêu trong SEQ ID NO:4 và trình tự axit amin được mã hóa được nêu trong SEQ ID NO:18.

Biến thể axmi115 B18L12B10 (v02) thể hiện sự cải thiện diệt ECB. Được ký hiệu là Axmi115v02(evo28). Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo28) được nêu trong SEQ ID NO:5 và trình tự axit amin được mã hóa được nêu trong SEQ ID NO:19.

Biến thể axmi115 B2L11F9 (v02) thể hiện sự cải thiện diệt *H. Zea*, VBC, FAW. Được ký hiệu là Axmi115v02(evo29). Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo29) được nêu trong SEQ ID NO:6 và trình tự axit amin được mã hóa được nêu trong SEQ ID NO:20.

Các đột biến bổ sung được tạo ra trong trình tự AXMI115v02 trong vùng đầu C. Ba biến thể được nhận dạng với hoạt tính được cải thiện so với AXMI115v02 (Bảng 9). Các giá trị LC50 và EC50 được xác định đối với hai trong số các đột biến đầu C (Bảng 10). AXMI115v02(EVO31) thể hiện sự tử vong được cải thiện diệt FAW, sâu đo hại đậu nành (SBL) và VBC so với AXMI115v02. Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo31) được nêu trong SEQ ID NO:7 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:21.

AXMI115v02(EVO32) thể hiện sự tử vong được cải thiện diệt ECB và *H.Zea* so với AXMI115v02. Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo32) được nêu trong SEQ ID NO:8 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22.

AXMI115v02(EVO38) thể hiện sự tử vong được cải thiện diệt BCW so với AXMI115v02. Trình tự nucleotit đối với Axmi115v02(evo38) được nêu trong SEQ ID NO:47 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:48.

Bảng 9. Hoạt tính của các đột biến đầu C Axmi115v02

Gen	ECB		FAW		VBC		Hz		BCW	
	Còi cọc	% Tử vong	Còi cọc	% Tử vong	Còi cọc	% Tử vong	Còi cọc	% Tử vong	Còi cọc	% Tử vong
Axmi115v02	3,3	11,5	4,0	16,5	4,0	80,2	4,0	13,8	2,8	1,1
Axmi115v02(evo31)	3,4	28,6	4,0	20,7	4,0	81,4	4,0	14,3	2,4	0,0
Axmi115v02(evo32)	3,4	30,0	4,0	18,2	4,0	94,4	4,0	35,0	3,0	0,0
Axmi115v02(evo38)	0,2	0,0	4,0	15,7	4,0	87,1	4,0	10,5	3,6	6,6

Bảng 10. LC50 và EC50 đối với các đột biến đầu C

Gen	ECB		FAW		VBC	SBL	Hz		BCW
	LC50	EC50	LC50	EC50	LC50	LC50	LC50	EC50	LC50
Axmi115v02	20 µg/ml	3 µg/ml	6,3 µg/ml	1,3 µg/ml	400 ng/ml	280 ng/ml	339 µg/ml	14,3 µg/ml	7,6 µg/ml
Axmi115v02 (evo31)	18 µg/ml	4,5 µg/ml	2,4 µg/ml	240 ng/ml	120 ng/ml	80 ng/ml	185 µg/ml	12 µg/ml	27,3 µg/ml
Axmi115v02 (evo32)	12,3 µg/ml	4,3 µg/ml	6 µg/ml	400 ng/ml	520 ng/ml	520 ng/ml	42,5 µg/ml	13,3 µg/ml	16,6 µg/ml

SBL = Sâu đo hại đậu nành

Ví dụ 3. Các thử nghiệm bổ sung đối với hoạt tính diệt sinh vật gây hại

Trình tự nucleotit của sáng chế có thể được thử nghiệm đối với khả năng tạo ra protein diệt sinh vật gây hại. Khả năng của protein diệt sinh vật gây hại tác động như thuốc diệt sinh vật gây hại diệt sinh vật gây hại thường được đánh giá theo nhiều phương pháp. Một phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này là thực hiện thử nghiệm cho ăn. Theo thử nghiệm cho ăn này, khi tiếp xúc sinh vật gây hại với mẫu

chứa hợp chất được thử nghiệm hoặc các mẫu đối chứng. Thông thường, việc này được thực hiện bằng cách đặt nguyên liệu được thử nghiệm hoặc chất pha loãng thích hợp chứa nguyên liệu này, lên nguyên liệu mà sinh vật gây hại sẽ ăn, như khẩu phần ăn nhân tạo. Nguyên liệu được thử nghiệm có thể bao gồm chất lỏng, chất rắn hoặc chất bùn. Nguyên liệu được thử nghiệm có thể được đặt vào bề mặt và sau đó cho phép khô. Theo cách khác, nguyên liệu được thử nghiệm có thể được trộn với khẩu phần ăn nhân tạo được nấu chảy và sau đó được phân tán vào khoang thử nghiệm. Khoang thử nghiệm này có thể là, ví dụ, chén, đĩa hoặc giếng của đĩa vi chuẩn.

Các thử nghiệm đối với sinh vật gây hại hút (ví dụ rệp) có thể bao gồm chia tách nguyên liệu thử nghiệm ra khỏi côn trùng bằng cách phân chia, theo lý tưởng, phần mà có thể được xuyên qua bởi phần miệng hút của côn trùng hút, cho phép ăn nguyên liệu thử nghiệm. Thông thường, nguyên liệu thử nghiệm được trộn với chất kích thích cho ăn, như sucroza, để thúc đẩy sự ăn của hợp chất thử nghiệm.

Các loại thử nghiệm khác có thể bao gồm vi tiêm nguyên liệu thử nghiệm vào miệng hoặc ruột của sinh vật gây hại, cũng như sự phát triển của thực vật chuyển gen, tiếp theo bằng thử nghiệm khả năng của sinh vật gây hại ăn thực vật chuyển gen. Thử nghiệm thực vật có thể bao gồm tách các phần của thực vật thường tiêu thụ, ví dụ, lòng nhỏ được gắn vào lá hoặc tách toàn bộ thực vật trong lòng chứa côn trùng.

Các phương pháp và cách tiếp cận khác để thử nghiệm sinh vật gây hại là đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được tìm thấy, ví dụ trong ấn phẩm: Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Theo cách khác, các thử nghiệm thường được mô tả trong ấn phẩm: *Arthropod Management Tests* và *Journal of Economic Entomology* hoặc bằng sự mô tả bởi các thành viên của Entomological Society of America (ESA).

Theo một số phương án, các vùng ADN mã hóa vùng độc tố của protein diệt sinh vật gây hại được bộc lộ theo sáng chế được tạo dòng vô tính vào vectơ biểu hiện *E. coli* pMAL-C4x sau gen *malE* mã hóa đối với Maltoza gắn kết protein (MBP). Các dung hợp trong khung này dẫn đến sự biểu hiện protein dung hợp MBP-Axmi ở *E. coli*.

Để biểu hiện ở *E.coli*, BL21*DE3 được biến nạp với từng plasmit riêng rẽ. Các khuẩn lạc đơn lẻ được ghép vào LB được bổ sung với carbenixilin và glucoza và được phát triển qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, môi trường sạch được ghép với môi trường nuôi cấy 1% qua đêm và được phát triển ở 37°C đến pha loga. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được cảm biến bằng 0,3mM IPTG qua đêm ở 20°C. Mỗi hạt tế bào được tạo huyền phù trong 20mM chất đệm Tris-Cl, độ pH = 7,4 + 200mM NaCl + 1mM DTT + chất ức chế proteaza và siêu âm. Phân tích bởi SDS-PAGE có thể được sử dụng để xác nhận sự biểu hiện của protein dung hợp.

Sau đó, tổng phần chiết không có tế bào được chạy qua cột amyloza được gắn vào sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC) đối với sự tinh chế ái lực của protein dung hợp MBP-axmi. Các protein dung hợp được gắn kết được tách rửa từ nhựa với 10mM dung dịch maltoza. Sau đó, các protein dung hợp được tinh chế được chia tách với Yếu tố Xa hoặc trypsin để loại bỏ MBP tag đầu amino ra khỏi Axmi protein. Sự phân tách và độ tan của protein có thể được xác định bởi SDS-PAGE.

Ví dụ 4. Tạo cấu trúc của các trình tự tổng hợp

Theo một khía cạnh của sáng chế, các trình tự *axmi* tổng hợp được tạo ra. Các trình tự tổng hợp này có trình tự ADN được thay đổi so với trình tự *axmi* gốc và mã hóa protein mà cộng tuyến với AXMI protein gốc mà nó tương ứng, nhưng thiếu “miền tinh thể” đầu C có mặt trong nhiều protein nội độc tố delta.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, các phiên bản được biến đổi của các gen tổng hợp được thiết kế sao cho peptit thu được được tạo đích với hạt cơ quan của thực vật, như mạng lưới nội chất hoặc không bào. Các trình tự peptit đã được biết đến dẫn đến tạo đích protein dung hợp với hạt cơ quan của thực vật là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, vùng đầu N của gen phosphatase axit từ White Lupin *Lupinus albus* (Genebank ID GI:14276838; Miller et al. (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) là đã được biết đến trong lĩnh vực này dẫn đến mạng lưới nội chất tạo đích của protein khác loại. Nếu protein dung hợp thu được cũng chứa trình tự mạng lưới nội chất bao gồm peptit đầu N-lysine-aspartic-acid glutamic-leucine (nghĩa là, motif “KDEL” (SEQ ID NO:46) ở đầu C, thì protein dung hợp sẽ được tạo đích với mạng lưới nội chất. Nếu protein dung hợp thiếu mạng lưới nội chất tạo đích trình tự ở đầu C, thì protein sẽ

được tạo đích với mạng lưới nội chất, nhưng cuối cùng sẽ được tạo trình tự trong không bào.

Ví dụ 5. Sự biến nạp của tế bào của ngô với gen protein diệt sinh vật gây hại được mô tả theo sáng chế

Tai ngô được gom lại tốt nhất từ 8 đến 12 ngày sau khi thụ phấn. Các phôi được tách từ các tai và các phôi này có kích cỡ từ 0,8 đến 1,5mm là được ưu tiên để sử dụng trong biến nạp. Các phôi được phủ mặt lớp vảy nhỏ lên trên môi trường ủ thích hợp, như môi trường DN62A5S (3,98g/L muối N6; 1mL/L (1000x Dung dịch lưu trữ) N6 Vitamin; 800mg/L L-Asparagin; 100mg/L Myo-inositol; 1,4g/L L-Prolin; 100mg/L axit Casamin; 50g/L sucroza; 1mL/L (1mg/mL Dung dịch lưu trữ) 2,4-D). Tuy nhiên, môi trường và muối khác với DN62A5S là thích hợp và đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các phôi được ủ qua đêm ở 25°C trong bóng tối. Tuy nhiên, không nhất thiết phải ủ phôi qua đêm.

Các mô cây bên ngoài thu được được chuyển vào mắt lưới vuông (từ 30 đến 40 mắt lưới/đĩa), được chuyển lên môi trường thẩm lọc trong khoảng từ 30 đến 45 phút, sau đó được chuyển vào đĩa chum (xem, ví dụ, WO/0138514 và US 5,240,842).

Các cấu trúc ADN được thiết kế với gen của sáng chế trong tế bào thực vật được gia tốc vào mô thực vật bằng cách sử dụng thiết bị gia tốc chùm bình phun, bằng cách sử dụng các điều kiện thiết yếu như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO/0138514. Sau khi tạo chùm, các phôi được ủ trong khoảng 30 phút trên môi trường thẩm lọc và được đặt vào môi trường ủ qua đêm ở 25°C trong bóng tối. Để tránh các mô cây bên ngoài được chiếu chùm bị tổn hại không chính đáng, chúng được ủ trong ít nhất 24 giờ trước khi chuyển vào môi trường phục hồi. Sau đó, các phôi được trải trên môi trường trong thời gian phục hồi, trong khoảng 5 ngày, 25°C trong bóng tối, sau đó được chuyển vào môi trường chọn lọc. Các mô cây bên ngoài được ủ trong môi trường chọn lọc trong đến tám tuần, phụ thuộc vào bản chất và đặc điểm của chọn lọc cụ thể được sử dụng. Sau thời gian chọn lọc, thể sản thu được được chuyển vào môi trường trưởng thành phôi, cho đến khi quan sát được sự hình thành phôi soma trưởng thành. Sau đó, các phôi soma trưởng thành thu được được đặt trong ánh sáng có độ chiếu sáng yếu và quy trình tái sinh được bắt đầu bằng các phương pháp đã được

biết đến trong lĩnh vực này. Các chồi cây thu được được cho phép thành rễ trên môi trường tạo rễ và các cây thu được được chuyển vào các chậu ươm và được nhân giống như thực vật chuyển gen.

Nguyên liệu

Môi trường DN62A5S

Các thành phần	/lit	Nguồn
Hỗn hợp muối cơ bản Chu's N6 (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật
Dung dịch vitamin Chu's N6 (Prod. No. C 149)	1mL/L (1000x Dung dịch lưu trữ)	Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật
L-Asparagin	800mg/L	Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật
Myo-inositol	100mg/L	Sigma
L-Prolin	1,4g/L	Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật
Axit casamin	100mg/L	Fisher Scientific
Sucroza	50g/L	Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1mL/L (1mg/mL Dung dịch lưu trữ)	Sigma

Độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến độ pH = 5,8 bằng KOH 1N /KCl 1N, Gelrite (Sigma) được bổ sung vào ở nồng độ đến 3g/L và môi trường được hấp. Sau khi làm nguội đến 50°C, 2ml/L 5mg/ml dung dịch lưu trữ chứa bạc nitrat (Phòng thí nghiệm công nghệ thực vật) được bổ sung vào.

Ví dụ 6. Sự biến nạp của gen của sáng chế trong tế bào thực vật bằng cách biến nạp thông qua *Agrobacterium*

Tai được gom lại tốt nhất từ 8 đến 12 ngày sau khi thụ phấn. Các phôi được tách ra khỏi tai và các phôi này có kích cỡ từ 0,8 đến 1,5mm là được ưu tiên để sử dụng trong biến nạp. Các phôi được phủ mặt lớp vảy nhỏ lên trên môi trường ủ thích hợp và được ủ qua đêm ở 25°C trong bóng tối. Tuy nhiên, không nhất thiết phải phủ phôi qua đêm. Các phôi được cho tiếp xúc với chủng *Agrobacterium* chứa các vectơ thích hợp để truyền thông qua Ti plasmit trong khoảng từ 5 đến 10 phút và sau đó được đặt lên môi trường đồng nuôi dưỡng trong khoảng 3 ngày (25°C trong bóng tối). Sau khi đồng nuôi dưỡng, các mô cây bên ngoài được chuyển vào môi trường trong thời gian phục

hồi trong khoảng năm ngày (ở 25°C trong bóng tối). Các mô cấy bên ngoài được ủ trong môi trường chọn lọc trong điều kiện tối đa tám tuần, phụ thuộc vào bản chất và đặc điểm của chọn lọc cụ thể được sử dụng. Sau thời gian chọn lọc, thể sản thu được được chuyển vào môi trường trưởng thành phôi, cho đến khi quan sát được sự hình thành phôi soma trưởng thành. Sau đó, các phôi soma trưởng thành thu được được đặt trong ánh sáng trong ánh sáng có độ chiếu sáng yếu và quy trình tái sinh được bắt đầu bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Mặc dù sáng chế trên đây đã được mô tả theo một số chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích dễ hiểu, sẽ hiển nhiên rằng một số thay đổi và biến đổi có thể được thực hiện trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm gồm:

(a) trình tự nucleotit có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6;

(b) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và

(c) trình tự nucleotit mã hóa polypeptit chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự khuyết đoạn hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit dung hợp được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số các loại sâu đục thân ngô châu Âu, *H. Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo.

2. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó:

(a) trình tự nucleotit này là trình tự tổng hợp được thiết kế để biểu hiện ở thực vật; và/hoặc

(b) trình tự nucleotit này được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển sự biểu hiện của trình tự nucleotit đã nêu trong tế bào thực vật.

3. Vector bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo điểm 1 hoặc 2, tốt hơn là còn bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit khác loại.

4. Tế bào chủ chứa axit nucleic tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2 hoặc vector theo điểm 3, tốt hơn là tế bào chủ này là tế bào chủ vi khuẩn hoặc tế bào thực vật.

5. Thực vật chuyển gen bao gồm tế bào chủ thực vật theo điểm 4, tốt hơn là trong đó thực vật này được chọn từ nhóm bao gồm ngô, lúa miến, lúa mì, cải bắp, hướng

duong, cà chua, họ cải, hồ tiêu, khoai tây, bông, lúa, đậu nành, củ cải đường, mía, thuốc lá, lúa mạch và cây cải dầu.

6. Hạt chuyển gen bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 1 hoặc vector theo điểm 3.

7. Polypeptit tái tổ hợp có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và

(b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số các loại sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè.

8. Polypeptit tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó polypeptit này còn bao gồm các trình tự axit amin khác loại.

9. Chế phẩm bao gồm polypeptit theo điểm 7 hoặc 8.

10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chế phẩm này:

(a) được chọn từ nhóm bao gồm bột, bột mịn, viên, hạt, dạng sương mù, nhũ tương, dạng keo và dung dịch;

(b) được bào chế bằng cách sấy khô, làm khô lạnh, đông hóa, chiết, lọc, ly tâm, lắng cặn hoặc cô đặc môi trường nuôi cấy của tế bào vi khuẩn; hoặc

(c) bao gồm từ khoảng 1% đến khoảng 99% khối lượng polypeptit đã nêu.

11. Phương pháp để phòng trừ hoặc diệt sinh vật gây hại, trong đó phương pháp này:

(a) phòng trừ quần thể sinh vật gây hại thuộc bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, giun tròn hoặc cánh vảy, bao gồm bước cho quần thể này tiếp xúc với lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại của polypeptit theo điểm 7 hoặc chế phẩm theo điểm 9 hoặc 10;

(b) diệt sinh vật gây hại thuộc bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, giun tròn hoặc hai cánh, bao gồm bước cho sinh vật gây hại này tiếp xúc với hoặc cho sinh vật gây hại này ăn, lượng hữu hiệu diệt sinh vật gây hại của polypeptit theo điểm 7 hoặc chế phẩm theo điểm 9 hoặc 10.

12. Phương pháp sản xuất polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 4 trong các điều kiện trong đó phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được biểu hiện, tốt hơn là trong đó thực vật đã nêu là tế bào thực vật.

13. Thực vật có cấu trúc ADN được hợp nhất ổn định vào bộ gen của nó bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và

(b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số các loại sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mèo.

14. Phương pháp bảo vệ thực vật khỏi sinh vật gây hại, trong đó phương pháp này bao gồm bước biểu hiện ở thực vật hoặc tế bào của nó phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và

(b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè,

tốt hơn là trong đó thực vật này tạo ra polypeptit diệt sinh vật gây hại có hoạt tính diệt sinh vật gây hại đối với bộ cánh vảy, bộ cánh nửa, bộ bộ cánh cứng, giun tròn hoặc sinh vật gây hại hai cánh.

15. Phương pháp làm tăng sản lượng ở thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng trên thực địa thực vật hoặc hạt của nó có cấu trúc ADN được hợp nhất ổn định vào bộ gen của nó bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính diệt sinh vật gây hại, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20; và

(b) trình tự axit amin chứa từ 1 đến 5 sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự cài xen axit amin so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, trong đó hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit này được cải thiện so với hoạt tính diệt sinh vật gây hại của polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 về tỷ lệ tử vong đối với ít nhất một trong số sâu đục thân ngô châu Âu, *H.Zea*, sâu cắn gié mùa thu và sâu bướm hại đậu mè.

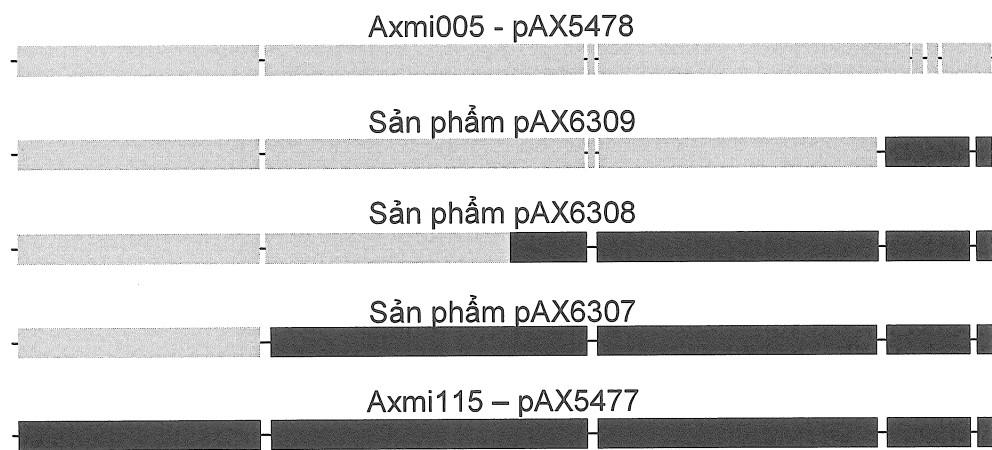
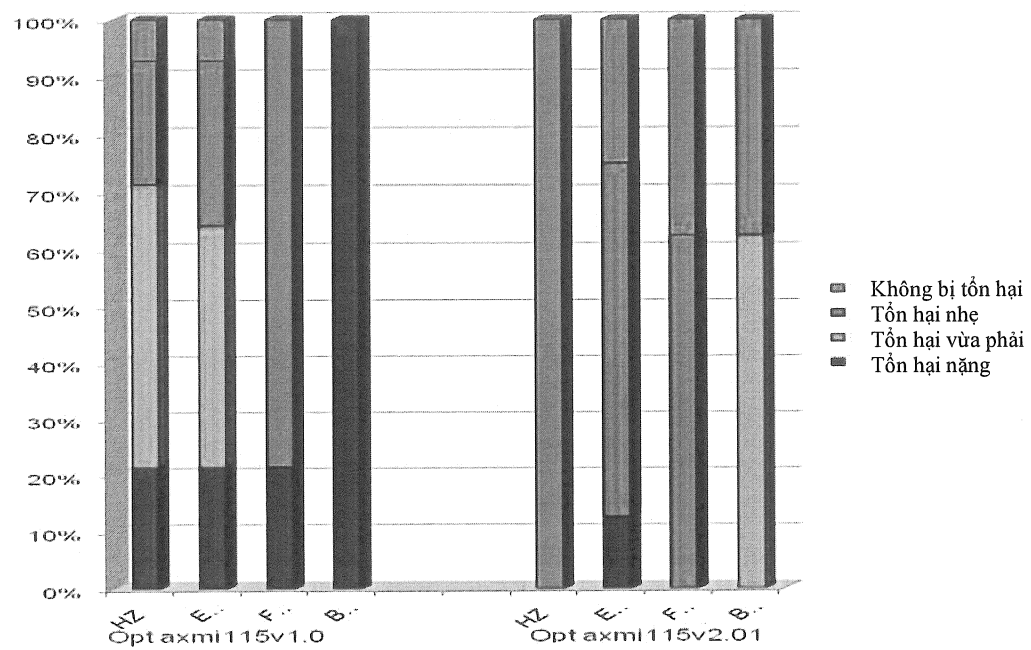


FIG. 1

A.



B.

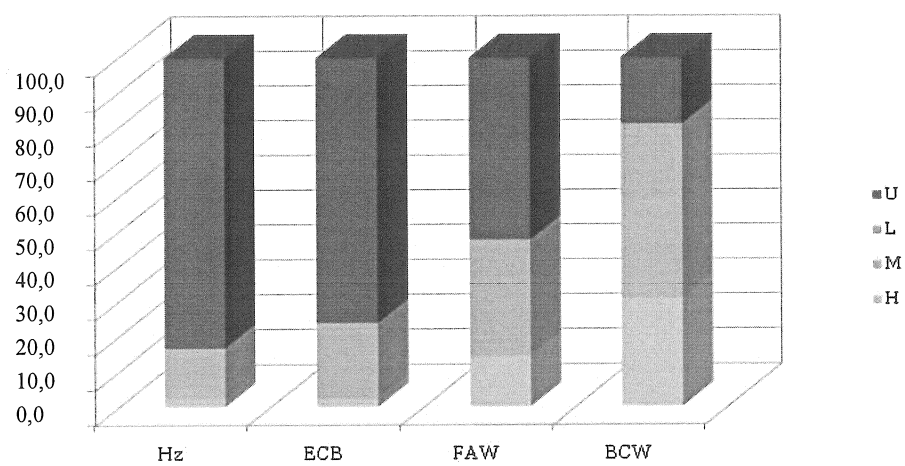


FIG. 2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Desai, Nalini
 Heinrichs, Volker
 Lehtinen, Duane

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP CÓ HOẠT TÍNH DIỆT SINH VẬT GÂY HẠI,
 THỰC VẬT CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO VỆ THỰC VẬT KHỎI SINH VẬT GÂY
 HẠI

<130> 2916693-093977

<150> 61/471,848
 <151> 2011-04-05

<160> 48

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 2415
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 1
 atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
 aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag 360
 atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
 tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg 480
 ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
 gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc 600
 ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg 660
 gccaaagaca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720
 gatgtgctca tcggcaacaa cctctttgga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc 780
 atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc 840
 atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg 900
 ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag 960

aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac 1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc 1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag 1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc 1500
ggcctggagg tggacgccaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg 1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat 1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg 1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac 1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagt ccaaacaatt 1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtggt caagagccaa 1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca 2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc 2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttcgcca aagcctcaac 2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg 2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtgggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
aagattgaat agtaa 2415

<210> 2

<211> 2397

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

```

<400> 2
atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc      60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc      120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag      180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac      240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg      300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag      360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag      420
tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg      480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat      540
gagaagtttg aggagctcac cttcgccacc gagacaacat tgaaggtgaa gaaggacagc      600
tcgccggcgg acatcctgga tgagctcacc gagctaacag agctggccaa gagcgtcacc      660
aagaatgatg ttgatggctt cgagttctac ctcaacacct tccatgatgt gatgggtgggc      720
aacaacctct tcggccgctc ggcgctcaag acggcgctcg agctgatcgc caaggagaat      780
gtcaagacaa gtggatcaga ggtgggcaat gtctacaact tcctcatcgt gctgacggcg      840
ctgcaagcca aggccttcct caccttgaca acctgccgca agttgctggg cctctccgac      900
atcgactaca cctccatcat gaatgagcac ctcaacaatg agaagaatga gttcagagac      960
aacatcctgc cggcgctgag caacaagtgc agcaacccaa gctacgcaa gaccatcggc     1020
tcagacaact acgccaaggt gatcctggag agcgagcctg gctacgcgct ggtgggcttc     1080
gagatcatca atgatccaat tcctgttctc aaggcctaca aggccaagct gaagcagaac     1140
taccaggtgg acaaccagag cttgagcgag atcgtctacc tggacatcga caagctcttc     1200
tgccccggaga actcagagca gaagtactac accaagaacc tcaccttccc tgatggatat     1260
gtcatcacca agatcacctt cgagaagaag ctgaacaacc tcatctacga ggccaccgcc     1320
aactttctatg atccatcaac aggagacatc gacctcaaca agaagcaagt ggagagcacc     1380
ttccctcaaa cagactacat caccatggac attggagatg atgatggcat ctacatgccg     1440
ctcggcgtca tctcagaaac cttcttgacg cccatcaaca gcttcggcct ggaggtggac     1500
gccaagagca agaccttgac gctcaagtgc aagagctacc tcaggaggta cctgctggag     1560
agtgatttga agaacaagga gacagggctg atcgcgccgc caaatgtgtt catcagcaat     1620
gtggtgaaga actgggacat cgaggaggat tcattggagc catgggtggc caacaacaag     1680
aatgcttatg tggacaacac cggcggcatt gaaagaagca aggcgctctt cacccaagga     1740

```

gatggagagt tcagccagtt catcggcgac aagctaaagc ccaacaccga ctacatcatc	1800
cagtacaccg tcaagggcaa gccggccatc tacctcaaga acaagagcac cggctacatc	1860
acctacgagg acaccaatgg aaattctgag gagttccaaa caattgctgt gaagttcacc	1920
tcagaaacag atttgagcca gaccacactg gtgttcaaga gccaaaatgg atatgaagca	1980
tggggagaca acttcatcat cctggaggcc aagctcttcg agacaccaga aagcccggag	2040
ctcatcaagt tcaatgattg ggagagggtc ggcaccacct acatcaccgg caatgagctg	2100
aggattgatc attcaagagg aggctacttc cgccaaagcc tcaacatcga cagctacagc	2160
acctacgacc tcagcttcag cttcagcggc ctctgggcca aggtgattgt gaagaacagc	2220
cgcggcgtgg tgctcttcga gaaggagaag aacaatggaa gcagctatga ggacatctca	2280
gagagcttca ccaccgccag caacaaggat ggcttcttca tcgagctcac cgccgagagg	2340
acaagcagca ccttccacag cttcagagac atcagcatca aggagaagat tgaataa	2397

<210> 3
 <211> 2421
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 3	
atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatgaaca tgaacaacac caagctcaat	60
gcaagggcgc tgccgagctt catcgactac ttcaatggca tctatggctt cgccaccggc	120
atcaaggaca tcatgaacat gatcttcaag accgacaccg gcggcaacct caccttggat	180
gagatcctca agaaccagca gctgctgaat gagatctcag gcaagctgga cggcgtcaat	240
ggaagcctca acgacctcat tgctcaaggc aacctcaaca ccgagctgag caaggagatc	300
ctcaagattg caaatgagca gaaccagggt ctgaatgatg tcaacaacaa gctggacgcc	360
atcaacacca tgctgcacat ctacctgcca aagatcacct caatgctctc tgatgtgatg	420
aagcagaact acgcgctgag cctccagatt gagtacctct caaagcagct gcaagagatc	480
tccgacaagc tggacatcat caatgtcaat gtgctcatca acagcacctt gacagagatc	540
acgccggcct accagaggat caagtatgtc aatgagaagt ttgaggagct caccttcgcc	600
accgagacaa cattgaaggt gaagaaggac agctcgccgg cggacatcct ggatgagctc	660
accgagctaa cagagctggc caagagcgtc accaagaatg atgttgatgg cttcgagttc	720
tacctcaaca ccttccatga tgtgatggtg ggcaacaacc tcttcggccg ctcggcgctc	780
aagacggcgt cggagctgat cgccaaggag aatgtcaaga caagtggatc agaggtgggc	840

aatgtctaca acttcctcat cgtgctgacg gcgctgcaag ccaaggcctt cctcaccttg	900
acaacctgcc gcaagttgct gggcctcgcc gacatcgact acacctccat catgaatgag	960
cacctcaaca aggagaagga ggagttccgc gtcaacatcc tgccaacatt gagcaacacc	1020
ttcagcaacc ccaactacgc caaggtgaag ggctcagatg aagatgccaa gatgattgtg	1080
gaggccaagc ctggccatgc tctggtgggc ttcgagatga gcaacgacag catcaccttg	1140
ctgaaggtct acgaggccaa gctgaagcag aactaccagg tggacaagga cagcttgtct	1200
gaggtgatct acggcgacat ggacaagctg ctatgtccag atcaaagcga gcagatctac	1260
tacaccaaca acatcgtctt tccaaatgaa tatgtcatca ccaagatcga cttaccaag	1320
aagatgaaaa cattgagata tgaggtgacg gccaacagct acgacagcag caccggcgag	1380
atcgacctca acaagaagaa ggtggagagc tcagaagctg agtacaggac gctctccgcc	1440
aaggatgatg gcgtctacat gccgctcggc gtcattctcag aaaccttctt gacgcccatc	1500
aatggcttcg gcctccaagc tgatgagaac agcaggctca tcaccttgac ctgcaagagc	1560
tacctcaggg agctgctgct ggccaccgac ctcagcaaca aggagacaaa gctcatcgtg	1620
ccgccatcag gcttcatcag caacatcgtg gagaatggca acctggaagg agagaacctg	1680
gagccatgga tagccaacaa caagaatgct tatgttgatc acaccggcgg cgtcaatgga	1740
acaagggcgc tctatgttca caaggatgga ggcttcagcc agttcatcgg cgacaagctg	1800
aagcccaaga cagaatatgt catccagtac accgtcaagg gcaagccggc catctacctc	1860
aagaacaaga gcaccggcta catcacctac gaggacacca atggaaattc tgaggagttc	1920
caaacaattg ctgtgaagtt cacctcagaa acagatttga gccagacca cctggtgttc	1980
aagagccaaa atggatatga agcatgggga gacaacttca tcatcctgga ggccaagctc	2040
ttcgagacac cagaaagccc ggagctcatc aagttcaatg attgggagag gttcggcacc	2100
acctacatca ccggcaatga gctgaggatt gatcattcaa gaggaggcta cttccgcaa	2160
agcctcaaca tcgacagcta cagcacctac gacctcagct tcagcttcag cggcctctgg	2220
gccaaagtgga ttgtgaagaa cagccgcggc gtggtgctct tcgagaaggt gaagaacaat	2280
ggaagcagct atgaggacat ctcagagagc ttcaccaccg ccagcaacaa ggatggcttc	2340
ttcatcgagc tcaccgccga gaggacaagc agcaccttcc acagcttcag agacatcagc	2400
atcaaggaga agattgaata a	2421

<210> 4
 <211> 2412
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 4

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctctttgga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttcctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat	1620

gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg 1680
 gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740
 ctcttcaccc aaggagatgg aaagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac 1800
 accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
 agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt 1920
 gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa 1980
 aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca 2040
 ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc 2100
 accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac 2160
 atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg 2220
 attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
 tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
 ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
 aagattgaat aa 2412

<210> 5
 <211> 2412
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 5
 atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
 aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag 360
 atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
 tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg 480
 ctcacatcaa gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
 gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc 600

ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcattctca gaaaccttct tgacgccccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcca gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccgggt acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc atgagcaaca aggatggctt cttcatcgag	2340
ctcaccgccc agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag	2400

aagattgaat aa

2412

<210> 6

<211> 2412

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 6

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctctttgga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaagggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380

caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgccccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccg taggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag	2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag	2400
aagattgaat aa	2412

<210> 7

<211> 2409

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 7

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgacatcta cctgccaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420

tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgccaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggctta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttcctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcca gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160

atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaaggtg 2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagga cttcaccacc aatggcttta aggatggctt ctatatcgag 2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
aagattgaa 2409

<210> 8
<211> 2409
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 8
atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccagggtgctg 300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag 360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg 480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgccaa gcaaggcatc 600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg 660
gccaaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc 780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc 840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg 900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag 960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
gccaaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac 1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200

atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgccccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga gggtcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagca cttcaccacc tggggctata aggatggctt ctttatcgag	2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag	2400
aagattgaa	2409

<210> 9

<211> 2412

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 9

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180

atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccagggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctctttgga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggctta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct cgcacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcgtcc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980

aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag	2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag	2400
aagattgaat aa	2412

<210> 10
 <211> 2412
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 10	
atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggctta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct cgcacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960

aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac 1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc 1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag 1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc 1500
ggcctggagg tggacgcca gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg 1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat 1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg 1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740
ctcttcaccc ttggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac 1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagt ccaaacaatt 1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtggt caagagccaa 1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca 2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc 2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac 2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg 2220
attgtgaaga acagccgcg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
aagattgaat aa 2412

<210> 11

<211> 2412

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 11
 atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
 aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag 360
 atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
 tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg 480
 ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
 gagaagttcg acaagctcac ctctgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc 600
 ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg 660
 gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720
 gatgtgctca tcggcaacaa cctctttgga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc 780
 atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc 840
 atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttctcacct tgacaacctg ccgcaagttg 900
 ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag 960
 aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
 gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac 1080
 gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
 aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200
 atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
 ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc 1320
 tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag 1380
 caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
 ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc 1500
 ggcttgaggg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgtca agtgcaagag ctacctcagg 1560
 gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat 1620
 gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg 1680
 gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg 1740

ctcttcacca aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac 1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag 1860
agcaccgggt acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt 1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtggt caagagccaa 1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca 2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga gggtcggcac cacctacatc 2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac 2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg 2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc 2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag 2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400
aagattgaat aa 2412

<210> 12
<211> 2412
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 12
atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag 360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg 480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc 600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg 660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctca caccttccat 720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcg tcaagacggc atcagagctc 780

atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttccctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggtgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccc aaagtgatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttcgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag	2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag	2400
aagattgaat aa	2412

<211> 2412
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 13
 atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
 aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag 360
 atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
 tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg 480
 ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
 gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc 600
 ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg 660
 gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat 720
 gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcgc tcaagacggc atcagagctc 780
 atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc 840
 atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttcctcacct tgacaacctg ccgcaagttg 900
 ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag 960
 aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac 1020
 gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatc tggagagcga gcctggctac 1080
 gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc 1140
 aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac 1200
 atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc 1260
 ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc 1320
 tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag 1380
 caagtggaga gcaccttccc taaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat 1440
 ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccac caacagcttc 1500
 ggccctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg 1560

```

gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat      1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg      1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg      1740
ctcttcaccc aaggagatgg agttttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac      1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag      1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt      1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa      1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca      2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattggggaga ggttcggcac cacctacatc      2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac      2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg      2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc      2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag      2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag      2400
aagattgaat aa                                                                2412

```

```

<210> 14
<211> 2412
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự biến thể Axmi115

```

```

<400> 14
atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc      60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc      120
gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag      180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac      240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg      300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag      360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag      420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg      480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat      540

```

gagaagttcg acaagctcac cttcgccacc gagagcaccc tccgcgccaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaagggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttcctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatcc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgccccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgccaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaaat	1620
gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg	1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg	1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac	1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag	1860
agcaccggct acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt	1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa	1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaaagct cttcgagaca	2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattgggaga ggttcggcac cacctacatc	2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggaggct acttccgcca aagcctcaac	2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg	2220
attgtgaaga acagccgcgg cgtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc	2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc tgcagcaaca aggatggctt cttcatcgag	2340

ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag 2400

aagattgaat aa 2412

<210> 15

<211> 803

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 15

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110

Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180 185 190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195 200 205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210 215 220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
225 230 235 240

Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	245	250	255
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	260	265	270
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	275	280	285
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	290	295	300
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	305	310	315
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	325	330	335
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	340	345	350
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	355	360	365
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	370	375	380
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	385	390	395
Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr	405	410	415
Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	420	425	430
Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	435	440	445
Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser	450	455	460
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	465	470	475
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	485	490	495
Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	500	505	510
Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	515	520	525
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	530	535	540
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	545	550	555
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu			

565					570					575					
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe
			580					585					590		
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr
		595					600						605		
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr
		610				615					620				
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile
625					630					635					640
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val
				645					650					655	
Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile
			660					665					670		
Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys
		675					680					685			
Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu
		690				695					700				
Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn
705					710					715					720
Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu
				725					730					735	
Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu
			740					745					750		
Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe
		755					760					765			
Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu
		770				775					780				
Arg	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	His	Ser	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu
785					790					795					800
Lys	Ile	Glu													

<210> 16
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 16

Met	Asn	Met	Asn	Asn	Thr	Lys	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe
1				5					10					15	

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190
 Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Ser Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ser Glu

340					345					350					
Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Asn	Asp	Pro	Ile	Pro
		355					360					365			
Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp
	370					375					380				
Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile	Asp	Lys	Leu	Phe
385					390					395					400
Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe
			405					410						415	
Pro	Asp	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn
			420					425						430	
Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Gly
		435					440					445			
Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr
	450					455					460				
Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	Gly	Ile	Tyr	Met	Pro
465					470					475					480
Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Ser	Phe	Gly
			485					490						495	
Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Cys	Lys	Ser
			500					505					510		
Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr
		515					520					525			
Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Asn
	530					535					540				
Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys
545					550					555					560
Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Leu
			565					570						575	
Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu
		580					585					590			
Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro
		595					600					605			
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp
	610					615					620				
Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Lys	Phe	Thr
625					630					635					640
Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Gln	Asn
			645					650						655	
Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu
			660				665						670		

Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asn Asp Trp Glu
 675 680 685
 Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu Leu Arg Ile Asp His
 690 695 700
 Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ser Tyr Ser
 705 710 715 720
 Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val Ile
 725 730 735
 Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Lys Asn Asn
 740 745 750
 Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Ala Ser Asn
 755 760 765
 Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu Arg Thr Ser Ser Thr
 770 775 780
 Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu Lys Ile Glu
 785 790 795

<210> 17
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115
 <400> 17

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys

130					135					140					
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Val	Asn	Val
145					150					155					160
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile
				165					170					175	
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Thr
			180					185					190		
Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Asp	Ile	Leu	Asp	Glu
		195					200					205			
Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Asn	Asp	Val
	210					215					220				
Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	His	Asp	Val	Met	Val	Gly
225					230					235					240
Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Ile
				245					250					255	
Ala	Lys	Glu	Asn	Val	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Tyr
			260					265					270		
Asn	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr
		275					280					285			
Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr
	290					295					300				
Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Phe	Arg	Val
305					310					315					320
Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala
				325					330					335	
Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Ala	Lys	Met	Ile	Val	Glu	Ala	Lys
			340					345					350		
Pro	Gly	His	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Met	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr
		355					360					365			
Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp
	370					375					380				
Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Leu
385					390					395					400
Cys	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Val	Phe
				405					410					415	
Pro	Asn	Glu	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Met	Lys
			420					425					430		
Thr	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly
		435					440					445			
Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Tyr
	450					455					460				

Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Lys	Asp	Asp	Gly	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	465	470	475	480
Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Ala	485	490	495	
Asp	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	500	505	510	
Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile	515	520	525	
Val	Pro	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Leu	530	535	540	
Glu	Gly	Glu	Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Ile	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	545	550	555	560
Val	Asp	His	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Gly	Thr	Arg	Ala	Leu	Tyr	Val	His	565	570	575	
Lys	Asp	Gly	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Lys	580	585	590	
Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	595	600	605	
Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	610	615	620	
Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	625	630	635	640
Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	645	650	655	
Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	660	665	670	
Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	675	680	685	
Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	690	695	700	
Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	705	710	715	720
Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu	Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	725	730	735	
Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	740	745	750	
Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	755	760	765	
Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	His	Ser	770	775	780	

Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu Lys Ile Glu
785 790 795

<210> 18
<211> 803
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 18

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15
Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30
Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
35 40 45
Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50 55 60
Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80
Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95
Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110
Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125
Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
130 135 140
Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
145 150 155 160
Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
165 170 175
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180 185 190
Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195 200 205
Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210 215 220
Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
225 230 235 240
Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
245 250 255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
 260 265 270
 Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
 275 280 285
 Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
 290 295 300
 Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
 305 310 315 320
 Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
 325 330 335
 Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
 340 345 350
 Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
 355 360 365
 Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
 405 410 415
 Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575

Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Lys Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 19

<211> 803

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 19

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30

Ile	Met	Asn	Met	Ile	Phe	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	35	40	45
Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Glu	Ile	Ser	Gly	Lys	50	55	60
Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	65	70	75
Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	85	90	95
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	100	105	110
Met	Leu	His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val	115	120	125
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	130	135	140
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Val	Asn	Val	145	150	155
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	165	170	175
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	180	185	190
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn	195	200	205
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	210	215	220
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	225	230	235
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	245	250	255
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	260	265	270
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	275	280	285
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	290	295	300
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	305	310	315
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	325	330	335
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	340	345	350

```

Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
    355                                360                        365

Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
    370                                375                        380

Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
    385                                390                        395                        400

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
    405                                410                        415

Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
    420                                425                        430

Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
    435                                440                        445

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
    450                                455                        460

Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
    465                                470                        475                        480

Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
    485                                490                        495

Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
    500                                505                        510

Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
    515                                520                        525

Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
    530                                535                        540

Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
    545                                550                        555                        560

Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
    565                                570                        575

Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
    580                                585                        590

Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
    595                                600                        605

Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
    610                                615                        620

Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
    625                                630                        635                        640

Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
    645                                650                        655

Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
    660                                665                        670

Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys

```

675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Met Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 20
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115

 <400> 20

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125

```

Met  Lys  Gln  Asn  Tyr  Ala  Leu  Ser  Leu  Gln  Ile  Glu  Tyr  Leu  Ser  Lys
 130                                135                        140

Gln  Leu  Gln  Glu  Ile  Ser  Asp  Lys  Leu  Asp  Ile  Ile  Asn  Val  Asn  Val
145                                150                        155                        160

Leu  Ile  Asn  Ser  Thr  Leu  Thr  Glu  Ile  Thr  Pro  Ala  Tyr  Gln  Arg  Ile
                        165                                170                        175

Lys  Tyr  Val  Asn  Glu  Lys  Phe  Asp  Lys  Leu  Thr  Phe  Ala  Thr  Glu  Ser
                        180                                185                        190

Thr  Leu  Arg  Ala  Lys  Gln  Gly  Ile  Phe  Asn  Glu  Asp  Ser  Phe  Asp  Asn
                        195                                200                        205

Asn  Thr  Leu  Glu  Asn  Leu  Thr  Asp  Leu  Ala  Glu  Leu  Ala  Lys  Ser  Ile
                        210                                215                        220

Thr  Lys  Asn  Asp  Val  Asp  Ser  Phe  Glu  Phe  Tyr  Leu  His  Thr  Phe  His
225                                230                        235                        240

Asp  Val  Leu  Ile  Gly  Asn  Asn  Leu  Phe  Gly  Arg  Ser  Ala  Leu  Lys  Thr
                        245                                250                        255

Ala  Ser  Glu  Leu  Ile  Thr  Lys  Asp  Glu  Ile  Lys  Thr  Ser  Gly  Ser  Glu
                        260                                265                        270

Ile  Gly  Lys  Val  Tyr  Ser  Phe  Leu  Ile  Val  Leu  Thr  Ser  Leu  Gln  Ala
275                                280                        285

Lys  Ala  Phe  Leu  Thr  Leu  Thr  Thr  Cys  Arg  Lys  Leu  Leu  Gly  Leu  Ser
290                                295                        300

Asp  Ile  Asp  Tyr  Thr  Ser  Ile  Met  Asn  Glu  His  Leu  Asn  Asn  Glu  Lys
305                                310                        315                        320

Asn  Glu  Phe  Arg  Asp  Asn  Ile  Leu  Pro  Ala  Leu  Ser  Asn  Lys  Phe  Ser
                        325                                330                        335

Asn  Pro  Ser  Tyr  Ala  Lys  Thr  Ile  Gly  Ser  Asp  Asn  Tyr  Ala  Lys  Val
                        340                                345                        350

Ile  Leu  Glu  Ser  Glu  Pro  Gly  Tyr  Ala  Leu  Val  Gly  Phe  Glu  Ile  Ile
355                                360                        365

Asn  Asp  Pro  Ile  Pro  Val  Leu  Lys  Ala  Tyr  Lys  Ala  Lys  Leu  Lys  Gln
370                                375                        380

Asn  Tyr  Gln  Val  Asp  Asn  Gln  Ser  Leu  Ser  Glu  Ile  Val  Tyr  Leu  Asp
385                                390                        395                        400

Ile  Asp  Lys  Leu  Phe  Cys  Pro  Glu  Asn  Ser  Glu  Gln  Lys  Tyr  Tyr  Thr
                        405                                410                        415

Lys  Asn  Leu  Thr  Phe  Pro  Asp  Gly  Tyr  Val  Ile  Thr  Lys  Ile  Thr  Phe
                        420                                425                        430

Glu  Lys  Lys  Leu  Asn  Asn  Leu  Ile  Tyr  Glu  Ala  Thr  Ala  Asn  Phe  Tyr
435                                440                        445

Asp  Pro  Ser  Thr  Gly  Asp  Ile  Asp  Leu  Asn  Lys  Lys  Gln  Val  Glu  Ser

```

450					455					460					
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp
465					470					475					480
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro
				485					490						495
Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr
			500					505					510		
Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu
		515					520					525			
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser
		530				535					540				
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp
545					550					555					560
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu
				565					570					575	
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe
			580					585					590		
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr
		595					600					605			
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr
	610					615					620				
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile
625					630					635					640
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val
				645					650					655	
Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile
			660					665				670			
Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys
		675					680					685			
Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu
	690					695					700				
Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn
705					710					715					720
Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu
				725					730					735	
Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu
			740					745					750		
Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe
		755					760					765			
Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu
				770		775					780				

Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
785 790 795 800

Lys Ile Glu

<210> 21

<211> 803

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 21

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110

Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180 185 190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195 200 205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210 215 220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His

225		230		235		240
Asp Val Leu Ile Gly	Asn Asn Leu Phe Gly	Arg Ser Ala Leu Lys Thr				
	245	250	255			
Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu						
	260	265	270			
Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala						
	275	280	285			
Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser						
	290	295	300			
Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys						
305	310	315	320			
Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser						
	325	330	335			
Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val						
	340	345	350			
Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile						
	355	360	365			
Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln						
	370	375	380			
Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp						
385	390	395	400			
Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr						
	405	410	415			
Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe						
	420	425	430			
Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr						
	435	440	445			
Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser						
	450	455	460			
Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp						
465	470	475	480			
Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro						
	485	490	495			
Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr						
	500	505	510			
Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu						
	515	520	525			
Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser						
	530	535	540			
Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp						
545	550	555	560			

```
<210> 22
<211> 803
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 22
```

-106-

1		5		10		15										
Ile	Asp	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Lys	Asp	
		20						25					30			
Ile	Met	Asn	Met	Ile	Phe	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	
		35					40					45				
Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Glu	Ile	Ser	Gly	Lys	
		50				55					60					
Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	
65					70					75					80	
Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	
				85					90					95		
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	
			100					105					110			
Met	Leu	His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val	
		115					120					125				
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	
		130				135					140					
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Val	Asn	Val	
145					150					155					160	
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	
				165					170					175		
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	
			180					185						190		
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn	
		195					200					205				
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	
		210				215					220					
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	
225					230					235					240	
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	
				245					250					255		
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	
			260					265					270			
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	
		275					280						285			
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	
		290				295					300					
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	
305					310					315					320	
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	
				325					330					335		

Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val
			340					345					350		
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile
		355					360					365			
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln
	370						375				380				
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp
385					390					395					400
Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr
				405					410					415	
Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe
			420					425					430		
Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr
		435					440					445			
Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser
	450					455					460				
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp
465					470					475					480
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro
				485					490					495	
Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr
			500					505					510		
Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu
		515					520					525			
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser
	530					535					540				
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp
545					550					555					560
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu
				565					570					575	
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe
			580					585					590		
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr
		595					600					605			
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr
	610					615					620				
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile
625					630					635					640
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val
				645					650					655	

Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu His Phe
 755 760 765
 Thr Thr Trp Gly Tyr Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 23
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115
 <400> 23

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

```

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
  115                               120                       125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
  130                               135                       140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
  145                               150                       155                       160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
  165                               170                       175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
  180                               185                       190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
  195                               200                       205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
  210                               215                       220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
  225                               230                       235                       240

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
  245                               250                       255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
  260                               265                       270

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
  275                               280                       285

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
  290                               295                       300

Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
  305                               310                       315                       320

Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
  325                               330                       335

Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
  340                               345                       350

Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
  355                               360                       365

Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
  370                               375                       380

Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
  385                               390                       395                       400

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
  405                               410                       415

Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
  420                               425                       430

```

Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	435	440	445	
Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser	450	455	460	
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	465	470	475	480
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	485	490	495	
Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	500	505	510	
Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	515	520	525	
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	530	535	540	
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	545	550	555	560
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	565	570	575	
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Val	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	580	585	590	
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	595	600	605	
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	610	615	620	
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	625	630	635	640
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	645	650	655	
Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	660	665	670	
Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	675	680	685	
Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	690	695	700	
Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	705	710	715	720
Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu	725	730	735	
Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu	740	745	750	
Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe				

755					760					765					
Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu
	770					775					780				
Arg	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	His	Ser	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu
785					790					795					800
Lys Ile Glu															
<210> 24															
<211> 803															
<212> PRT															
<213> Trình tự nhân tạo															
<220>															
<223> Trình tự biến thể Axmi115															
<400> 24															
Met	Asn	Met	Asn	Asn	Thr	Lys	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe
1				5					10					15	
Ile	Asp	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Lys	Asp
			20					25					30		
Ile	Met	Asn	Met	Ile	Phe	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu
		35					40					45			
Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Glu	Ile	Ser	Gly	Lys
	50					55					60				
Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn
65					70					75					80
Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln
				85					90					95	
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr
			100					105					110		
Met	Leu	Asn	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val
		115					120					125			
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg
	130					135					140				
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val
145					150					155					160
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Gln	Arg	Ile
				165					170					175	
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser
			180					185					190		
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn
		195					200					205			

```

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
 210                               215                               220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
 225                               230                               235                               240

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
      245                               250                               255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
      260                               265                               270

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
      275                               280                               285

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
      290                               295                               300

Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
 305                               310                               315                               320

Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
      325                               330                               335

Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
      340                               345                               350

Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
      355                               360                               365

Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
      370                               375                               380

Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385                               390                               395                               400

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
      405                               410                               415

Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
      420                               425                               430

Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
      435                               440                               445

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
      450                               455                               460

Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465                               470                               475                               480

Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
      485                               490                               495

Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
      500                               505                               510

Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
      515                               520                               525

Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser

```

530					535					540					
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp
545					550					555					560
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu
				565					570					575	
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Lys	Phe	Ser	Gln	Phe
			580					585					590		
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr
		595					600					605			
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr
	610					615					620				
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile
625					630					635					640
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val
			645						650					655	
Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile
			660					665					670		
Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys
	675						680					685			
Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu
	690					695					700				
Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn
705					710					715					720
Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu
			725					730						735	
Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu
			740					745					750		
Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe
			755				760					765			
Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu
	770					775					780				
Arg	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	His	Ser	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu
785					790					795					800
Lys	Ile	Glu													

<210> 25

<211> 803

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 25

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1          5          10          15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20        25        30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35        40        45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50        55        60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65        70        75        80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85        90        95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100       105       110

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115       120       125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
130       135       140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
145       150       155       160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
165       170       175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180       185       190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195       200       205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210       215       220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
225       230       235       240

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
245       250       255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
260       265       270

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
275       280       285

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
290       295       300

Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys

```

305		310		315		320
Asn Glu Phe Arg Asp	Asn Ile Leu Pro Ala	Leu Ser Asn Lys Phe Ser				
	325	330				335
Asn Pro Ser Tyr Ala	Lys Thr Ile Gly	Ser Asp Asn Tyr Ala	Lys Val			
	340	345				350
Ile Leu Glu Ser Glu	Pro Gly Tyr Ala	Leu Val Gly Phe	Glu Ile Ile			
	355	360				365
Asn Asp Pro Ile Pro	Val Leu Lys Ala Tyr	Lys Ala Lys Leu Lys	Gln			
	370	375				380
Asn Tyr Gln Val Asp	Asn Gln Ser Leu Ser	Glu Ile Val Tyr Leu	Asp			
	385	390				400
Ile Asp Lys Leu Phe	Cys Pro Glu Asn Ser	Glu Gln Lys Tyr Tyr	Thr			
	405	410				415
Lys Asn Leu Thr Phe	Pro Asp Gly Tyr Val	Ile Thr Lys Ile Thr	Phe			
	420	425				430
Glu Lys Lys Leu Asn	Asn Leu Ile Tyr Glu	Ala Thr Ala Asn Phe	Tyr			
	435	440				445
Asp Pro Ser Thr Gly	Asp Ile Asp Leu Asn	Lys Lys Gln Val Glu	Ser			
	450	455				460
Thr Phe Pro Gln Thr	Asp Tyr Ile Thr Met	Asp Ile Gly Asp Asp	Asp			
	465	470				480
Gly Ile Tyr Met Pro	Leu Gly Val Ile Ser	Glu Thr Phe Leu Thr	Pro			
	485	490				495
Ile Asn Ser Phe Gly	Leu Glu Val Asp	Ala Lys Ser Lys Thr	Leu Thr			
	500	505				510
Leu Lys Cys Lys Ser	Tyr Leu Arg Glu Tyr	Leu Leu Glu Ser Asp	Leu			
	515	520				525
Lys Asn Lys Glu Thr	Gly Leu Ile Ala Pro	Pro Asn Val Phe Ile	Ser			
	530	535				540
Asn Val Val Lys Asn	Trp Asp Ile Glu Glu	Asp Ser Leu Glu Pro	Trp			
	545	550				560
Val Ala Asn Asn Lys	Asn Ala Tyr Val Asp	Asn Thr Gly Gly Ile	Glu			
	565	570				575
Arg Ser Lys Ala Leu	Phe Thr Leu Gly Asp	Gly Glu Phe Ser Gln	Phe			
	580	585				590
Ile Gly Asp Lys Leu	Lys Pro Asn Thr Asp	Tyr Ile Ile Gln Tyr	Thr			
	595	600				605
Val Lys Gly Lys Pro	Ala Ile Tyr Leu Lys	Asn Lys Ser Thr Gly	Tyr			
	610	615				620
Ile Thr Tyr Glu Asp	Thr Asn Gly Asn Ser	Glu Glu Phe Gln Thr	Ile			
	625	630				640

Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 26
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 26

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln

85					90					95					
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr
			100					105					110		
Met	Leu	Asn	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val
		115					120					125			
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg
	130					135					140				
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val
145						150					155				160
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Gln	Arg	Ile
				165					170					175	
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser
			180					185					190		
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn
	195						200						205		
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile
	210					215					220				
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His
225						230					235				240
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr
				245					250					255	
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu
			260					265					270		
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala
	275						280					285			
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser
	290					295					300				
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys
305						310					315				320
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser
				325					330					335	
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val
			340					345					350		
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile
	355						360					365			
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln
	370					375					380				
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp
385						390					395				400
Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr
				405					410					415	

Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Lys Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735

Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 27
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115

 <400> 27

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30
 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60
 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
 180 185 190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
 195 200 205
 Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
 210 215 220
 Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
 225 230 235 240
 Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
 245 250 255
 Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
 260 265 270
 Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
 275 280 285
 Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
 290 295 300
 Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
 305 310 315 320
 Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
 325 330 335
 Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
 340 345 350
 Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
 355 360 365
 Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
 405 410 415
 Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510

Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Val Gly Asp Gly Lys Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 28
 <211> 803
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 28

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1          5          10          15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20          25          30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35          40          45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50          55          60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65          70          75          80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85          90          95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100         105         110

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115         120         125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
130         135         140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
145         150         155         160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
165         170         175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180         185         190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195         200         205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210         215         220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
225         230         235         240

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
245         250         255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
260         265         270

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
275         280         285

```

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
 290 295 300
 Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
 305 310 315 320
 Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
 325 330 335
 Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
 340 345 350
 Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
 355 360 365
 Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
 370 375 380
 Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
 385 390 395 400
 Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
 405 410 415
 Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
 420 425 430
 Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
 450 455 460
 Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
 465 470 475 480
 Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
 485 490 495
 Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Ser Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr

```

        610                615                620
Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
625                630                635                640

Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
        645                650                655

Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
        660                665                670

Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
        675                680                685

Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
        690                695                700

Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
705                710                715                720

Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
        725                730                735

Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
        740                745                750

Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
        755                760                765

Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
        770                775                780

Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
785                790                795                800

Lys Ile Glu

```

<210> 29

<211> 803

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 29

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1                5                10                15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
        20                25                30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
        35                40                45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50                55                60

```

Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	
65					70					75					80	
Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	
				85					90					95		
Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	
			100					105					110			
Met	Leu	Asn	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Val	
		115					120					125				
Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg	
	130					135					140					
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	
145					150					155					160	
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Gln	Arg	Ile	
				165					170					175		
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	
			180					185					190			
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn	
		195					200					205				
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	
	210					215					220					
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	
225					230					235					240	
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	
				245					250					255		
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	
			260					265					270			
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	
		275					280					285				
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	
	290					295					300					
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	
305					310					315					320	
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	
				325					330					335		
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	
			340					345					350			
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	
		355					360					365				
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	
	370					375					380					
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	

385		390		395		400
Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr						
		405		410		415
Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe						
		420		425		430
Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr						
		435		440		445
Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser						
		450		455		460
Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp						
		465		470		475
Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro						
		485		490		495
Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr						
		500		505		510
Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu						
		515		520		525
Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser						
		530		535		540
Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp						
		545		550		555
Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu						
		565		570		575
Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Val Phe Ser Gln Phe						
		580		585		590
Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr						
		595		600		605
Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr						
		610		615		620
Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile						
		625		630		635
Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val						
		645		650		655
Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile						
		660		665		670
Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys						
		675		680		685
Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu						
		690		695		700
Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn						
		705		710		715
						720

Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
725 730 735

Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
740 745 750

Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
755 760 765

Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
770 775 780

Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
785 790 795 800

Lys Ile Glu

<210> 30
<211> 803
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 30

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile

165										170					175				
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser				
			180					185					190						
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn				
		195					200					205							
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile				
	210					215					220								
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His				
225					230					235					240				
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr				
				245					250					255					
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu				
			260					265					270						
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala				
	275						280					285							
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser				
	290					295					300								
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys				
305					310					315					320				
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser				
				325					330					335					
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val				
			340					345					350						
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile				
	355						360					365							
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln				
	370					375					380								
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp				
385					390					395					400				
Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr				
				405					410					415					
Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe				
			420					425					430						
Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr				
		435					440					445							
Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser				
	450					455					460								
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp				
465					470					475					480				
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro				
				485					490					495					

Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
 500 505 510
 Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
 515 520 525
 Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
 530 535 540
 Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
 545 550 555 560
 Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
 565 570 575
 Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
 580 585 590
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Cys Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 31
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 31

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1          5          10          15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20        25        30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35        40        45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50        55        60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65        70        75        80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85        90        95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100       105       110

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115       120       125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Arg
130       135       140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val
145       150       155       160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ser Tyr Gln Arg Ile
165       170       175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser
180       185       190

Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn
195       200       205

Asn Thr Leu Glu Asn Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile
210       215       220

Thr Lys Asn Asp Val Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
225       230       235       240

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
245       250       255

Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
260       265       270

```

```

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala
    275                                280                                285

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
    290                                295                                300

Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys
    305                                310                                315                                320

Asn Glu Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser
    325                                330                                335

Asn Pro Ser Tyr Ala Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
    340                                345                                350

Ile Leu Glu Ser Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
    355                                360                                365

Asn Asp Pro Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
    370                                375                                380

Asn Tyr Gln Val Asp Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
    385                                390                                395                                400

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
    405                                410                                415

Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
    420                                425                                430

Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
    435                                440                                445

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser
    450                                455                                460

Thr Phe Pro Gln Thr Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp
    465                                470                                475                                480

Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro
    485                                490                                495

Ile Asn Ser Phe Gly Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr
    500                                505                                510

Leu Lys Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
    515                                520                                525

Lys Asn Lys Glu Thr Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
    530                                535                                540

Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp
    545                                550                                555                                560

Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu
    565                                570                                575

Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe
    580                                585                                590

```

Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr
 595 600 605
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr
 610 615 620
 Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile
 625 630 635 640
 Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val
 645 650 655
 Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile
 660 665 670
 Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys
 675 680 685
 Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu
 690 695 700
 Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn
 705 710 715 720
 Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu
 725 730 735
 Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu
 740 745 750
 Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe
 755 760 765
 Thr Thr Met Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu
 770 775 780
 Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Glu

<210> 32

<211> 2445

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 32

atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatgaaca tgaacaacac caagctcaat 60

gcaagggcgc tgccgagctt catcgactac ttcaatggca tctatggctt cgccaccggc 120

atcaaggaca tcatgaacat gatcttcaag accgacaccg gcggcaacct caccttggat 180

gagatcctca agaaccagca gctgctgaat gagatctcag gcaagctgga cggcgtaaat 240

ggaagcctca acgacctcat tgctcaaggc aacctcaaca ccgagctgag caaggagatc 300

ctcaagattg caaatgagca gaaccaggtg ctgaatgatg tcaacaacaa gctggacgcc	360
atcaacacca tgctgcacat ctacctgcca aagatcacct caatgctctc tgatgtgatg	420
aagcagaact acgcgctgag cctccagatt gagtacctct caaagcagct gcaagagatc	480
tccgacaagc tggacatcat caatgtcaat gtgctcatca acagcacctt gacagagatc	540
acgccggcct accagaggat caagtatgtc aatgagaagt tcgacaagct caccttcgcc	600
accgagagca ccctccgcgc caagcaaggc atcttcaatg aagattcatt tgacaacaac	660
accttgagaga acttgacaga cctcgccgag ctggccaaga gcatcaccaa gaatgatgtg	720
gacagcttcg agttctacct ccacaccttc catgatgtgc tcatcggcaa caacctcttt	780
ggaagaagcg cgctcaagac ggcacacagag ctcatcacca aggatgagat caagacaagc	840
ggcagcgaga tcggcaaggt ctacagcttc ctcatcgtgc tgacatcatt gcaagccaag	900
gccttcctca ccttgacaac ctgccgcaag ttgctgggcc tctccgacat cgactacacc	960
tccatcatga atgagcacct caacaatgag aagaatgagt tcagagacaa catcctgccg	1020
gcgctgagca acaagttcag caaccaagc tacgccaaga ccatcggctc agacaactac	1080
gccaaggtga tcctggagag cgagcctggc tacgcgctgg tgggcttcga gatcatcaat	1140
gatccaattc ctgttctcaa ggcttacaag gccaagctga agcagaacta ccaggtggac	1200
aaccagagct tgagcgagat cgtctacctg gacatcgaca agctcttctg cccggagAAC	1260
tcagagcaga agtactacac caagaacctc accttccttg atggatatgt catcaccaag	1320
atcaccttcg agaagaagct gaacaacctc atctacgagg ccaccgcaa cttctatgat	1380
ccatcaacag gagacatcga cctcaacaag aagcaagtgg agagcacctt ccctcaaaca	1440
gactacatca ccatggacat tggagatgat gatggcatct acatgccgct cggcgtcac	1500
tcagaaacct tcttgacgcc catcaacagc ttccggcctgg aggtggacgc caagagcaag	1560
accttgacgc tcaagtgcaa gagctacctc agggagtacc tgctggagag tgatttgaag	1620
aacaaggaga cagggctgat cgcgccgcca aatgtgttca tcagcaatgt ggtgaagaac	1680
tgggacatcg aggaggattc attggagcca tgggtggcca acaacaagaa tgcttatgtg	1740
gacaacaccg gcggcattga aagaagcaag gcgctcttca cccaaggaga tggagagttc	1800
agccagttca tcggcgacaa gctaaagccc aacaccgact acatcatcca gtacaccgtc	1860
aagggcaagc cggccatcta cctcaagaac aagagcaccg gctacatcac ctacgaggac	1920
accaatggaa attctgagga gttccaaaca attgctgtga agttcacctc agaaacagat	1980
ttgagccaga cccacctggt gttcaagagc caaaatggat atgaagcatg gggagacaac	2040

ttcatcatcc tggaggccaa gctcttcgag acaccagaaa gcccgagct catcaagttc	2100
aatgattggg agaggttcgg caccacctac atcaccggca atgagctgag gattgatcat	2160
tcaagaggag gctacttccg ccaaagcctc aacatcgaca gctacagcac ctacgacctc	2220
agcttcagct tcagcggcct ctgggccaag gtgattgtga agaacagccg cggcgtggtg	2280
ctcttcgaga aggtgaagaa caatggaagc agctatgagg acatctcaga gagcttcacc	2340
accgccagca acaaggatgg cttcttcatc gagctcaccg ccgagaggac aagcagcacc	2400
ttccacagct tcagagacat cagcatcaag gagaagattg aataa	2445

<210> 33

<211> 2430

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 33

atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatgaaca tgaacaacac caagctcaat	60
gcaagggcgc tgccgagctt catcgactac ttcaatggca tctatggctt cgccaccggc	120
atcaaggaca tcatgaacat gatcttcaag accgacaccg gcggcaacct caccttggat	180
gagatcctca agaaccagca gctgctgaat gagatctcag gcaagctgga cggcgtcaat	240
ggaagcctca acgacctcat tgctcaaggc aacctcaaca ccgagctgag caaggagatc	300
ctcaagattg caaatgagca gaaccagggtg ctgaatgatg tcaacaacaa gctggacgcc	360
atcaacacca tgctgcacat ctacctgcca aagatcacct caatgctctc tgatgtgatg	420
aagcagaact acgcgctgag cctccagatt gagtacctct caaagcagct gcaagagatc	480
tccgacaagc tggacatcat caatgtcaat gtgctcatca acagcacctt gacagagatc	540
acgccggcct accagaggat caagtatgtc aatgagaagt ttgaggagct caccttcgcc	600
accgagacaa cattgaaggt gaagaaggac agctcgccgg cggacatcct ggatgagctc	660
accgagctaa cagagctggc caagagcgtc accaagaatg atgttgatgg cttcgagttc	720
tacctcaaca ccttccatga tgtgatggtg ggcaacaacc tcttcggccg ctcggcgctc	780
aagacggcgt cggagctgat cgccaaggag aatgtcaaga caagtggatc agagggtgggc	840
aatgtctaca acttcctcat cgtgctgacg gcgctgcaag ccaaggcctt cctcaccttg	900
acaacctgcc gcaagttgct gggcctctcc gacatcgact acacctccat catgaatgag	960
cacctcaaca atgagaagaa tgagttcaga gacaacatcc tgccggcgct gagcaacaag	1020
ttcagcaacc caagctacgc caagaccatc ggctcagaca actacgcaa ggtgatcctg	1080

gagagcgagc ctggctacgc gctgggtgggc ttcgagatca tcaatgatcc aattcctgtt 1140
 ctcaaggcct acaaggccaa gctgaagcag aactaccagg tggacaacca gagcttgagc 1200
 gagatcgtct acctggacat cgacaagctc ttctgcccgg agaactcaga gcagaagtac 1260
 tacaccaaga acctcacctt ccctgatgga tatgtcatca ccaagatcac cttcgagaag 1320
 aagctgaaca acctcatcta cgaggccacc gccaaacttct atgatccatc aacaggagac 1380
 atcgacctca acaagaagca agtggagagc accttccctc aaacagacta catcaccatg 1440
 gacattggag atgatgatgg catctacatg ccgctcggcg tcatctcaga aaccttcttg 1500
 acgccccatca acagcttcgg cctggagggtg gacgccaaga gcaagacctt gacgctcaag 1560
 tgcaagagct acctcaggga gtacctgctg gagagtgatt tgaagaacaa ggagacaggg 1620
 ctgatcgcg cgcgccaaatgt gttcatcagc aatgtgggtga agaactggga catcgaggag 1680
 gattcattgg agccatgggt ggccaacaac aagaatgctt atgtggacaa caccggcggc 1740
 attgaaagaa gcaaggcgct cttcacccaa ggagatggag agttcagcca gttcatcggc 1800
 gacaagctaa agcccaacac cgactacatc atccagtaca ccgtcaaggg caagccggcc 1860
 atctacctca agaacaagag caccggctac atcacctacg aggacaccaa tggaaattct 1920
 gaggagttcc aaacaattgc tgtgaagttc acctcagaaa cagatttgag ccagaccac 1980
 ctggtgttca agagccaaaa tggatatgaa gcatggggag acaacttcat catcctggag 2040
 gccaaagctct tcgagacacc agaaagcccg gagctcatca agttcaatga ttgggagagg 2100
 ttcggcacca cctacatcac cggcaatgag ctgaggattg atcattcaag aggaggctac 2160
 ttccgccaaa gcctcaacat cgacagctac agcacctacg acctcagctt cagcttcagc 2220
 ggcctctggg ccaagggtgat tgtgaagaac agccgcggcg tgggtgctctt cgagaagggtg 2280
 aagaacaatg gaagcagcta tgaggacatc tcagagagct tcaccaccgc cagcaacaag 2340
 gatggcttct tcatcgagct caccgccgag aggacaagca gcaccttcca cagcttcaga 2400
 gacatcagca tcaaggagaa gattgaataa 2430

<210> 34

<211> 2454

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 34

atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatggcac atcaccacca ccatcacgga

60

tccaccatga	acatgaacaa	caccaagctc	aatgcaaggg	cgctgccgag	cttcatcgac	120
tacttcaatg	gcatctatgg	cttcgccacc	ggcatcaagg	acatcatgaa	catgatcttc	180
aagaccgaca	ccggcggcaa	cctcaccttg	gatgagatcc	tcaagaacca	gcagctgctg	240
aatgagatct	caggcaagct	ggacggcgct	aatggaagcc	tcaacgacct	cattgctcaa	300
ggcaacctca	acaccgagct	gagcaaggag	atcctcaaga	ttgcaaatga	gcagaaccag	360
gtgctgaatg	atgtcaacaa	caagctggac	gccatcaaca	ccatgctgca	catctacctg	420
ccaaagatca	cctcaatgct	ctctgatgtg	atgaagcaga	actacgcgct	gagcctccag	480
attgagtacc	tctcaaagca	gctgcaagag	atctccgaca	agctggacat	catcaatgtc	540
aatgtgctca	tcaacagcac	cttgacagag	atcacgccgg	cctaccagag	gatcaagtat	600
gtcaatgaga	agtttgagga	gctcaccttc	gccaccgaga	caacattgaa	ggtgaagaag	660
gacagctcgc	cggcgggacat	cctggatgag	ctcacccgagc	taacagagct	ggccaagagc	720
gtcaccaaga	atgatgttga	tggcttcgag	ttctacctca	acaccttcca	tgatgtgatg	780
gtgggcaaca	acctcttcgg	ccgctcggcg	ctcaagacgg	cgctcggagct	gatcgccaag	840
gagaatgtca	agacaagtgg	atcagagggtg	ggcaatgtct	acaacttcct	catcgtgctg	900
acggcgctgc	aagccaaggc	cttcctcacc	ttgacaacct	gccgcaagtt	gctgggcctc	960
gccgacatcg	actacacctc	catcatgaat	gagcacctca	acaaggagaa	ggaggagttc	1020
cgcgtaacaa	tcctgccaac	attgagcaac	accttcagca	accccaacta	cgccaagggtg	1080
aagggctcag	atgaagatgc	caagatgatt	gtggaggcca	agcctggcca	tgctctgggtg	1140
ggcttcgaga	tgagcaacga	cagcatcacc	gtgctgaagg	tctacgaggc	caagctgaag	1200
cagaactacc	aggtggacaa	ggacagcttg	tctgagggtga	tctacggcga	catggacaag	1260
ctgctatgtc	cagatcaaag	cgagcagatc	tactacacca	acaacatcgt	ctttccaaat	1320
gaatatgtca	tcaccaagat	cgacttcacc	aagaagatga	aaacattgag	atatgagggtg	1380
acggccaaca	gctacgacag	cagcaccggc	gagatcgacc	tcaacaagaa	gaagggtggag	1440
agctcagaag	ctgagtacag	gacgctctcc	gccaaaggatg	atggcgtcta	catgccgctc	1500
ggcgtcatct	cagaaacctt	cttgacgccc	atcaatggct	tcggcctcca	agctgatgag	1560
aacagcaggc	tcatcacctt	gacctgcaag	agctacctca	gggagctgct	gctggccacc	1620
gacctcagca	acaaggagac	aaagctcatc	gtgccgccat	caggcttcat	cagcaacatc	1680
gtggagaatg	gcaacctgga	aggagagaac	ctggagccat	ggatagccaa	caacaagaat	1740
gcttatgttg	atcacaccgg	cggcgtcaat	ggaacaaggg	cgctctatgt	tcacaaggat	1800
ggaggcttca	gccagttcat	cggcgacaag	ctgaagccca	agacagaata	tgtcatccag	1860

tacaccgtca agggcaagcc ggccatctac ctcaagaaca agagcaccgg ctacatcacc	1920
tacgaggaca ccaatggaaa ttctgaggag ttccaaacaa ttgctgtgaa gttcacctca	1980
gaaacagatt tgagccagac ccacctggtg ttcaagagcc aaaatggata tgaagcatgg	2040
ggagacaact tcatcatcct ggaggccaag ctcttcgaga caccagaaag cccggagctc	2100
atcaagttca atgattggga gaggttcggc accacctaca tcaccggcaa tgagctgagg	2160
attgatcatt caagaggagg ctacttccgc caaagcctca acatcgacag ctacagcacc	2220
tacgacctca gcttcagctt cagcggcctc tgggccaagg tgattgtgaa gaacagccgc	2280
ggcgtggtgc tcttcgagaa ggtgaagaac aatggaagca gctatgagga catctcagag	2340
agcttcacca ccgccagcaa caaggatggc ttcttcatcg agctcaccgc cgagaggaca	2400
agcagcacct tccacagctt cagagacatc agcatcaagg agaagattga ataa	2454

<210> 35
 <211> 2442
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 35	
atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatgaaca tgaacaacac caagctcaat	60
gcaagggcgc tgccgagctt catcgactac ttcaatggca tctatggctt cgccaccggc	120
atcaaggaca tcatgaacat gatcttcaag accgacaccg gcggcaacct caccttggat	180
gagatcctca agaaccagca gctgctgaat gagatctcag gcaagctgga cggcgtcaat	240
ggaagcctca acgacctcat tgctcaaggc aacctcaaca ccgagctgag caaggagatc	300
ctcaagattg caaatgagca gaaccaggtg ctgaatgatg tcaacaacaa gctggacgcc	360
atcaacacca tgctgcacat ctacctgcca aagatcacct caatgctctc tgatgtgatg	420
aagcagaact acgcgctgag cctccagatt gagtacctct caaagcagct gcaagagatc	480
tccgacaagc tggacatcat caatgtcaat gtgctcatca acagcacctt gacagagatc	540
acgccggcct accagaggat caagtatgtc aatgagaagt tcgacaagct caccttcgcc	600
accgagagca ccctccgcgc caagcaaggc atcttcaatg aagattcatt tgacaacaac	660
accttggaga acttgacaga cctcgccgag ctggccaaga gcatcaccaa gaatgatgtg	720
gacagcttgc agttctacct ccacaccttc catgatgtgc tcatcggcaa caacctcttt	780
ggaagaagcg cgctcaagac ggcacagag ctcatcacca aggatgagat caagacaagc	840

```

ggcagcgaga tgggcaaggt ctacagcttc ctcatcgtgc tgacatcatt gcaagccaag      900
gccttctctca ccttgacaac ctgccgcaag ttgctggggcc tctccgacat cgactacacc      960
tccatcatga atgagcacct caacaatgag aagaatgagt tcagagacaa catcctgccg      1020
gcgctgagca acaagttcag caaccaagc tacgccaaga ccatcggctc agacaactac      1080
gccaaagtgga tcctggagag cgagcctggc tacgcgctgg tgggcttcga gatcatcaat      1140
gatccaattc ctgtttctcaa ggcctacaag gccaaagctga agcagaacta ccagggtggac      1200
aaccagagct tgagcgagat cgtctacctg gacatcgaca agctcttctg cccggagaac      1260
tcagagcaga agtactacac caagaacctc accttccctg atggatatgt catcaccaag      1320
atcaccttcg agaagaagct gaacaacctc atctacgagg ccaccgcaa cttctatgat      1380
ccatcaacag gagacatcga cctcaacaag aagcaagtgg agagcacctt ccctcaaaca      1440
gactacatca ccatggacat tggagatgat gatggcatct acatgccgct cggcgtcatc      1500
tcagaaacct tcttgacgcc catcaacagc ttccggcctgg aggtggacgc caagagcaag      1560
accttgacgc tcaagtgcaa gagctacctc agggagtacc tgctggagag tgatttgaag      1620
aacaaggaga cagggtgat cgcgccgcca aatgtgttca tcagcaatgt ggtgaagaac      1680
tgggacatcg aggaggattc attggagcca tgggtggcca acaacaagaa tgcttatgtg      1740
gacaacaccg gcggcattga aagaagcaag gcgctcttca cccaaggaga tggagagttc      1800
agccagttca tcggcgacaa gctaaagccc aacaccgact acatcatcca gtacaccgtc      1860
aagggcaagc cggccatcta cctcaagaac aagagcaccg gctacatcac ctacgaggac      1920
accaatggaa attctgagga gttccaaaca attgctgtga agttcacctc agaaacagat      1980
ttgagccaga cccacctggt gttcaagagc caaaatggat atgaagcatg gggagacaac      2040
ttcatcatcc tggaggccaa gctcttcgag acaccagaaa gcccgagct catcaagttc      2100
aatgattggg agaggttcgg caccacctac atcaccggca atgagctgag gattgatcat      2160
tcaagaggag gctacttccg ccaaagcctc aacatcgaca gctacagcac ctacgacctc      2220
agcttcagct tcagcggcct ctgggccaag gtgattgtga agaacagccg cggcgtggtg      2280
ctcttcgaga aggtgaagaa caatggaagc agctatgagg acatctcaga ggacttcacc      2340
accaatggct ttaaggatgg cttctatata gagctcaccg ccgagaggac aagcagcacc      2400
ttccacagct tcagagacat cagcatcaag gagaagattg aa                        2442

```

<210> 36

<211> 2442

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 36

atggcacatc accaccacca tcacggatcc accatgaaca tgaacaacac caagctcaat	60
gcaagggcgc tgccgagctt catcgactac ttcaatggca tctatggctt cgccaccggc	120
atcaaggaca tcatgaacat gatcttcaag accgacaccg gcggcaacct caccttggat	180
gagatcctca agaaccagca gctgctgaat gagatctcag gcaagctgga cggcgtcaat	240
ggaagcctca acgacctcat tgctcaaggc aacctcaaca ccgagctgag caaggagatc	300
ctcaagattg caaatgagca gaaccagggt ctgaatgatg tcaacaacaa gctggacgcc	360
atcaacacca tgctgcacat ctacctgcca aagatcacct caatgctctc tgatgtgatg	420
aagcagaact acgcgtgag cctccagatt gaggacctct caaagcagct gcaagagatc	480
tccgacaagc tggacatcat caatgtcaat gtgctcatca acagcacctt gacagagatc	540
acgccggcct accagaggat caagtatgtc aatgagaagt tcgacaagct caccttcgcc	600
accgagagca ccctccgcgc caagcaaggc atcttcaatg aagattcatt tgacaacaac	660
accttggaga acttgacaga cctcgccgag ctggccaaga gcatcaccaa gaatgatgtg	720
gacagcttcg agttctacct ccacaccttc catgatgtgc tcatcggcaa caacctcttt	780
ggaagaagcg cgctcaagac ggcacagag ctcacacca aggatgagat caagacaagc	840
ggcagcgaga tcggcaaggc ctacagcttc ctcacgtgc tgacatcatt gcaagccaag	900
gccttcctca ccttgacaac ctgccgcaag ttgctgggcc tctccgacat cgactacacc	960
tccatcatga atgagcacct caacaatgag aagaatgagt tcagagacaa catcctgccg	1020
gcgctgagca acaagttcag caacccaagc tacgccaaga ccatcggctc agacaactac	1080
gccaagggtga tcctggagag cgagcctggc tacgcgctgg tgggcttcga gatcatcaat	1140
gatccaattc ctgttctcaa ggcctacaag gccaagctga agcagaacta ccagggtggac	1200
aaccagagct tgagcgagat cgtctacctg gacatcgaca agctcttctg cccggagaac	1260
tcagagcaga agtactacac caagaacctc accttccctg atggatatgt catcaccaag	1320
atcaccttcg agaagaagct gaacaacctc atctacgagg ccaccgcaa cttctatgat	1380
ccatcaacag gagacatcga cctcaacaag aagcaagtgg agagcacctt ccctcaaaca	1440
gactacatca ccatggacat tggagatgat gatggcatct acatgccgct cggcgtcatc	1500
tcagaaacct tcttgacgcc catcaacagc ttcggcctgg aggtggacgc caagagcaag	1560
accttgacgc tcaagtgcaa gagctacctc agggagtacc tgctggagag tgatttgaag	1620

```

aacaaggaga cagggctgat cgcgccgcca aatgtgttca tcagcaatgt ggtgaagaac      1680
tgggacatcg aggaggattc attggagcca tgggtggcca acaacaagaa tgcttatgtg      1740
gacaacaccg gcggcattga aagaagcaag gcgctcttca cccaaggaga tggagagttc      1800
agccagttca tcggcgacaa gctaaagccc aacaccgact acatcatcca gtacaccgtc      1860
aagggcaagc cggccatcta cctcaagaac aagagcaccg gctacatcac ctacgaggac      1920
accaatggaa attctgagga gttccaaaca attgctgtga agttcacctc agaaacagat      1980
ttgagccaga cccacctggt gttcaagagc caaaatggat atgaagcatg gggagacaac      2040
ttcatcatcc tggaggccaa gctcttcgag acaccagaaa gcccgagct catcaagttc      2100
aatgattggg agagggttcg caccacctac atcaccggca atgagctgag gattgatcat      2160
tcaagaggag gctacttccg ccaaagcctc aacatcgaca gctacagcac ctacgacctc      2220
agcttcagct tcagcggcct ctggggccaag gtgattgtga agaacagccg cggcgtggtg      2280
ctcttcgaga aggtgaagaa caatggaagc agctatgagg acatctcaga gcacttcacc      2340
acctgggggct ataaggatgg cttctttatc gagctcaccg ccgagaggac aagcagcacc      2400
ttccacagct tcagagacat cagcatcaag gagaagattg aa                        2442

```

<210> 37

<211> 814

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 37

```

Met Ala His His His His His Gly Ser Thr Met Asn Met Asn Asn
1          5          10          15

Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn
          20          25          30

Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile
          35          40          45

Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys
          50          55          60

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn
65          70          75          80

Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu
          85          90          95

Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn
          100          105          110

```

Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu His Ile Tyr
 115 120 125
 Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr
 130 135 140
 Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile
 145 150 155 160
 Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr
 165 170 175
 Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu
 180 185 190
 Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser Thr Leu Arg Ala Lys
 195 200 205
 Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn Asn Thr Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile Thr Lys Asn Asp Val
 225 230 235 240
 Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile Gly
 245 250 255
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 260 265 270
 Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr
 275 280 285
 Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 290 295 300
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr
 305 310 315 320
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp
 325 330 335
 Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Ser Tyr Ala
 340 345 350
 Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ser Glu
 355 360 365
 Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Pro Ile Pro
 370 375 380
 Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu Phe
 405 410 415
 Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Asn Leu Thr Phe
 420 425 430
 Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu Asn

435					440					445						
Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	
450					455					460						
Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	
465					470					475					480	
Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	
485					490					495						
Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	
500					505					510						
Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	
515					520					525						
Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	
530					535					540						
Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Asn	
545					550					555					560	
Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys	
565					570					575						
Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	
580					585					590						
Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	
595					600					605						
Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	
610					615					620						
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	
625					630					635					640	
Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Lys	Phe	Thr	
645					650					655						
Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	
660					665					670						
Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	
675					680					685						
Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	
690					695					700						
Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Leu	Arg	Ile	Asp	His	
705					710					715					720	
Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	
725					730					735						
Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu	Trp	Ala	Lys	Val	Ile	
740					745					750						
Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Asn	
755					760					765						

Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Ala Ser Asn
 770 775 780

Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Ala Glu Arg Thr Ser Ser Thr
 785 790 795 800

Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu Lys Ile Glu
 805 810

<210> 38

<211> 809

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axm115

<400> 38

Met Ala His His His His His His Gly Ser Thr Met Asn Met Asn Asn
 1 5 10 15

Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn
 20 25 30

Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile
 35 40 45

Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys
 50 55 60

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn
 65 70 75 80

Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu
 85 90 95

Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn
 100 105 110

Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu His Ile Tyr
 115 120 125

Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr
 130 135 140

Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile
 145 150 155 160

Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr
 165 170 175

Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu
 180 185 190

Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr Thr Leu Lys Val Lys
 195 200 205

Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr

210					215					220					
Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Gly	Phe	Glu	Phe
225					230					235					240
Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	His	Asp	Val	Met	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly
				245					250					255	
Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Ala	Lys	Glu	Asn	Val
			260					265					270		
Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Tyr	Asn	Phe	Leu	Ile	Val
		275					280					285			
Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg
		290				295					300				
Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu
305					310					315					320
His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala
				325					330					335	
Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser
			340					345					350		
Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu
		355					360					365			
Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr
	370					375					380				
Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser
385					390					395					400
Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser
				405					410					415	
Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Val
			420					425					430		
Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu
		435					440					445			
Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn
		450				455					460				
Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met
465					470					475					480
Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser
				485					490					495	
Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala
			500					505					510		
Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr
		515					520					525			
Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro
		530				535					540				

```

Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Val Val Lys Asn Trp Asp Ile Glu Glu
545                      550                      555                      560

Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp
                    565                      570                      575

Asn Thr Gly Gly Ile Glu Arg Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp
                    580                      585                      590

Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp
                    595                      600                      605

Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys
610                      615                      620

Asn Lys Ser Thr Gly Tyr Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser
625                      630                      635                      640

Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu
                    645                      650                      655

Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp
                    660                      665                      670

Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu
675                      680                      685

Ser Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr
690                      695                      700

Tyr Ile Thr Gly Asn Glu Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr
705                      710                      715                      720

Phe Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser
                    725                      730                      735

Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg
540                      740                      745                      750

Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu
755                      760                      765

Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe
770                      775                      780

Ile Glu Leu Thr Ala Glu Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg
785                      790                      795                      800

Asp Ile Ser Ile Lys Glu Lys Ile Glu
                    805

```

<210> 39

<211> 806

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 39

```

Met Ala His His His His His His Gly Ser Thr Met Asn Met Asn Asn
1          5          10          15

Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn
          20          25          30

Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile
          35          40          45

Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys
          50          55          60

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn
65          70          75          80

Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu
          85          90          95

Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn
          100          105          110

Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu His Ile Tyr
          115          120          125

Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr
          130          135          140

Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile
145          150          155          160

Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr
          165          170          175

Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu
          180          185          190

Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr Thr Leu Lys Val Lys
          195          200          205

Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr
210          215          220

Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe
225          230          235          240

Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly
          245          250          255

Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile Ala Lys Glu Asn Val
          260          265          270

Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val
          275          280          285

Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg
          290          295          300

Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu
305          310          315          320

```

His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr
 325 330 335
 Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser
 340 345 350
 Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys Pro Gly His Ala Leu
 355 360 365
 Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr Val Leu Lys Val Tyr
 370 375 380
 Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser
 405 410 415
 Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val
 420 425 430
 Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu
 435 440 445
 Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn
 450 455 460
 Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala
 465 470 475 480
 Lys Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe
 485 490 495
 Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg
 500 505 510
 Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala
 515 520 525
 Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile Val Pro Pro Ser Gly
 530 535 540
 Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu Glu Gly Glu Asn Leu
 545 550 555 560
 Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp His Thr Gly
 565 570 575
 Gly Val Asn Gly Thr Arg Ala Leu Tyr Val His Lys Asp Gly Gly Phe
 580 585 590
 Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile
 595 600 605
 Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser
 610 615 620
 Thr Gly Tyr Ile Thr Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe
 625 630 635 640

Gln Thr Ile Ala Val Lys Phe Thr Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr
 645 650 655
 His Leu Val Phe Lys Ser Gln Asn Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn
 660 665 670
 Phe Ile Ile Leu Glu Ala Lys Leu Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu
 675 680 685
 Leu Ile Lys Phe Asn Asp Trp Glu Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr
 690 695 700
 Gly Asn Glu Leu Arg Ile Asp His Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln
 705 710 715 720
 Ser Leu Asn Ile Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe
 725 730 735
 Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val Ile Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val
 740 745 750
 Leu Phe Glu Lys Val Lys Asn Asn Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
 755 760 765
 Glu Ser Phe Thr Thr Ala Ser Asn Lys Asp Gly Phe Phe Ile Glu Leu
 770 775 780
 Thr Ala Glu Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser
 785 790 795 800
 Ile Lys Glu Lys Ile Glu
 805

<210> 40
 <211> 814
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 40

Met Ala His His His His His His Gly Ser Thr Met Asn Met Asn Asn
 1 5 10 15
 Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn
 20 25 30
 Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile
 35 40 45
 Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys
 50 55 60
 Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn
 65 70 75 80
 Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu
 85 90 95

```

Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn
    100                      105                      110

Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu His Ile Tyr
    115                      120                      125

Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr
    130                      135                      140

Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile
    145                      150                      155                      160

Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr
    165                      170                      175

Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu
    180                      185                      190

Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser Thr Leu Arg Ala Lys
    195                      200                      205

Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn Asn Thr Leu Glu Asn
    210                      215                      220

Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile Thr Lys Asn Asp Val
    225                      230                      235                      240

Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile Gly
    245                      250                      255

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
    260                      265                      270

Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr
    275                      280                      285

Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
    290                      295                      300

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr
    305                      310                      315                      320

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp
    325                      330                      335

Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Ser Tyr Ala
    340                      345                      350

Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ser Glu
    355                      360                      365

Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Pro Ile Pro
    370                      375                      380

Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
    385                      390                      395                      400

Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu Phe
    405                      410                      415

```

Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Asn Leu Thr Phe
 420 425 430
 Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu Asn
 435 440 445
 Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr Gly
 450 455 460
 Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Pro Gln Thr
 465 470 475 480
 Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp Gly Ile Tyr Met Pro
 485 490 495
 Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Ser Phe Gly
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr Leu Lys Cys Lys Ser
 515 520 525
 Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asn Lys Glu Thr
 530 535 540
 Gly Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Val Val Lys Asn
 545 550 555 560
 Trp Asp Ile Glu Glu Asp Ser Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn Lys
 565 570 575
 Asn Ala Tyr Val Asp Asn Thr Gly Gly Ile Glu Arg Ser Lys Ala Leu
 580 585 590
 Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu
 595 600 605
 Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Ser Thr Gly Tyr Ile Thr Tyr Glu Asp
 625 630 635 640
 Thr Asn Gly Asn Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Lys Phe Thr
 645 650 655
 Ser Glu Thr Asp Leu Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln Asn
 660 665 670
 Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ala Lys Leu
 675 680 685
 Phe Glu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asn Asp Trp Glu
 690 695 700
 Arg Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Gly Asn Glu Leu Arg Ile Asp His
 705 710 715 720
 Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ser Tyr Ser
 725 730 735
 Thr Tyr Asp Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val Ile

740	745	750
Val Lys Asn Ser Arg Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Lys Asn Asn		
755	760	765
Gly Ser Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Glu Asp Phe Thr Thr Asn Gly Phe		
770	775	780
Lys Asp Gly Phe Tyr Ile Glu Leu Thr Ala Glu Arg Thr Ser Ser Thr		
785	790	795
		800
Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu Lys Ile Glu		
	805	810

<210> 41
 <211> 814
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmi115

<400> 41

Met Ala His His His His His His Gly Ser Thr Met Asn Met Asn Asn	
1	5 10 15
Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn	
	20 25 30
Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile	
	35 40 45
Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys	
	50 55 60
Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn	
65	70 75 80
Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu	
	85 90 95
Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn	
	100 105 110
Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu His Ile Tyr	
	115 120 125
Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr	
	130 135 140
Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile	
145	150 155 160
Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr	
	165 170 175
Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu	
	180 185 190

Lys Phe Asp Lys Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ser Thr Leu Arg Ala Lys
 195 200 205
 Gln Gly Ile Phe Asn Glu Asp Ser Phe Asp Asn Asn Thr Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Thr Asp Leu Ala Glu Leu Ala Lys Ser Ile Thr Lys Asn Asp Val
 225 230 235 240
 Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile Gly
 245 250 255
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 260 265 270
 Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val Tyr
 275 280 285
 Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 290 295 300
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr Thr
 305 310 315 320
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Asn Glu Lys Asn Glu Phe Arg Asp
 325 330 335
 Asn Ile Leu Pro Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Ser Tyr Ala
 340 345 350
 Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ser Glu
 355 360 365
 Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Pro Ile Pro
 370 375 380
 Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Asn Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu Phe
 405 410 415
 Cys Pro Glu Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Asn Leu Thr Phe
 420 425 430
 Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu Asn
 435 440 445
 Asn Leu Ile Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr Gly
 450 455 460
 Asp Ile Asp Leu Asn Lys Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Pro Gln Thr
 465 470 475 480
 Asp Tyr Ile Thr Met Asp Ile Gly Asp Asp Asp Gly Ile Tyr Met Pro
 485 490 495
 Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Ser Phe Gly
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Ala Lys Ser Lys Thr Leu Thr Leu Lys Cys Lys Ser

515					520					525					
Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Thr
530					535					540					
Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Asn
545					550					555					560
Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn	Lys
				565					570						575
Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Leu
			580					585						590	
Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu
			595				600					605			
Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro
	610					615					620				
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp
625					630					635					640
Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Lys	Phe	Thr
				645					650						655
Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	Phe	Lys	Ser	Gln	Asn
			660					665						670	
Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu
			675				680						685		
Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	Phe	Asn	Asp	Trp	Glu
	690					695					700				
Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Leu	Arg	Ile	Asp	His
705					710					715					720
Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser
				725					730					735	
Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu	Trp	Ala	Lys	Val	Ile
			740					745						750	
Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Asn
		755					760					765			
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	His	Phe	Thr	Thr	Trp	Gly	Tyr
	770					775					780				
Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Thr
785					790					795					800
Phe	His	Ser	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Ile	Lys	Glu	Lys	Ile	Glu		
				805					810						

<210> 42
 <211> 2412
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tối ưu hóa Axmil15

<400> 42

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcgacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccagggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tcaacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa ggcagctgca agagatctcc gacaagctgg atgtcatcaa cctcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccaagctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagttcg acaagctcac ctctgccacc gagagcacc tccgcgcaa gcaaggcatc	600
ttcaatgaag attcatttga caacaacacc ttggagaact tgacagacct cgccgagctg	660
gccaagagca tcaccaagaa tgatgtggac agcttcgagt tctacctcca caccttccat	720
gatgtgctca tcggcaacaa cctcttttga agaagcgcg ctaagacggc atcagagctc	780
atcaccaagg atgagatcaa gacaagcggc agcgagatcg gcaaggtcta cagcttcctc	840
atcgtgctga catcattgca agccaaggcc ttccctcacct tgacaacctg ccgcaagttg	900
ctgggcctct ccgacatcga ctacacctcc atcatgaatg agcacctcaa caatgagaag	960
aatgagttca gagacaacat cctgccggcg ctgagcaaca agttcagcaa cccaagctac	1020
gccaagacca tcggctcaga caactacgcc aaggatgatc tggagagcga gcctggctac	1080
gcgctggtgg gcttcgagat catcaatgat ccaattcctg ttctcaaggc ctacaaggcc	1140
aagctgaagc agaactacca ggtggacaac cagagcttga gcgagatcgt ctacctggac	1200
atcgacaagc tcttctgccc ggagaactca gagcagaagt actacaccaa gaacctcacc	1260
ttccctgatg gatatgtcat caccaagatc accttcgaga agaagctgaa caacctcatc	1320
tacgaggcca ccgccaactt ctatgatcca tcaacaggag acatcgacct caacaagaag	1380
caagtggaga gcaccttccc tcaaacagac tacatcacca tggacattgg agatgatgat	1440
ggcatctaca tgccgctcgg cgtcatctca gaaaccttct tgacgcccat caacagcttc	1500
ggcctggagg tggacgcaa gagcaagacc ttgacgctca agtgcaagag ctacctcagg	1560
gagtacctgc tggagagtga tttgaagaac aaggagacag ggctgatcgc gccgccaat	1620

```

gtgttcatca gcaatgtggt gaagaactgg gacatcgagg aggattcatt ggagccatgg      1680
gtggccaaca acaagaatgc ttatgtggac aacaccggcg gcattgaaag aagcaaggcg      1740
ctcttcaccc aaggagatgg agagttcagc cagttcatcg gcgacaagct aaagcccaac      1800
accgactaca tcatccagta caccgtcaag ggcaagccgg ccatctacct caagaacaag      1860
agcaccgggt acatcaccta cgaggacacc aatggaaatt ctgaggagtt ccaaacaatt      1920
gctgtgaagt tcacctcaga aacagatttg agccagaccc acctggtgtt caagagccaa      1980
aatggatatg aagcatgggg agacaacttc atcatcctgg aggccaagct cttcgagaca      2040
ccagaaagcc cggagctcat caagttcaat gattggggaga ggttcggcac cacctacatc      2100
accggcaatg agctgaggat tgatcattca agaggagggt acttccgcca aagcctcaac      2160
atcgacagct acagcaccta cgacctcagc ttcagcttca gcggcctctg ggccaagggtg      2220
attgtgaaga acagccgcg cggtggtgctc ttcgagaagg tgaagaacaa tggaagcagc      2280
tatgaggaca tctcagagag cttcaccacc gccagcaaca aggatggctt cttcatcgag      2340
ctcaccgccg agaggacaag cagcaccttc cacagcttca gagacatcag catcaaggag      2400
aagattgaat aa                                                                2412

```

```

<210> 43
<211> 803
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

```

```

<400> 43

```

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1          5          10          15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20        25        30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35        40        45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50        55        60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65        70        75        80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85        90        95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100       105       110

Met Leu Asn Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115      120      125

```

Met	Lys	Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg	130	135	140
Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	145	150	155
Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Gln	Arg	Ile	165	170	175
Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	180	185	190
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Gln	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Asp	Ser	Phe	Asp	Asn	195	200	205
Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	210	215	220
Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	225	230	235
Asp	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	245	250	255
Ala	Ser	Glu	Leu	Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	260	265	270
Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	275	280	285
Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	290	295	300
Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	305	310	315
Asn	Glu	Phe	Arg	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Ser	325	330	335
Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	340	345	350
Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	355	360	365
Asn	Asp	Pro	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	370	375	380
Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	385	390	395
Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	Cys	Pro	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Thr	405	410	415
Lys	Asn	Leu	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Thr	Phe	420	425	430
Glu	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	435	440	445
Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Ser			

450					455						460					
Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Asp	Asp	
465					470					475					480	
Gly	Ile	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	
				485					490					495		
Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	
			500					505					510			
Leu	Lys	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	
		515					520					525				
Lys	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Pro	Asn	Val	Phe	Ile	Ser	
	530					535					540					
Asn	Val	Val	Lys	Asn	Trp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Trp	
545					550					555					560	
Val	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	
				565					570					575		
Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Gln	Phe	
			580					585					590			
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	
		595					600						605			
Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	
	610					615					620					
Ile	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Thr	Ile	
625					630					635					640	
Ala	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Val	
				645					650					655		
Phe	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	
			660					665					670			
Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	
		675					680					685				
Phe	Asn	Asp	Trp	Glu	Arg	Phe	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	
	690					695					700					
Leu	Arg	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	
705					710					715					720	
Ile	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Leu	
				725					730					735		
Trp	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Arg	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Glu	
			740					745					750			
Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Phe	
		755					760					765				
Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	
	770					775					780					

Arg Thr Ser Ser Thr Phe His Ser Phe Arg Asp Ile Ser Ile Lys Glu
 785 790 795 800

Lys Ile Glu

<210> 44

<211> 2367

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tối ưu hóa Axmi005

<400> 44

atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag	180
atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac	240
ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg	300
aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag	360
atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag	420
tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg	480
ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat	540
gagaagtttg aggagctcac cttcgccacc gagacaacat tgaagggtgaa gaaggacagc	600
tcgccggcgg acatcctgga tgagctcacc gagctaacag agctggccaa gagcgtcacc	660
aagaatgatg ttgatggctt cgagttctac ctcaacacct tccatgatgt gatggtgggc	720
aacaacctct tcggccgctc ggcgtcaag acggcgtcgg agctgatcgc caaggagaat	780
gtcaagacaa gtggatcaga ggtgggcaat gtctacaact tcctcatcgt gctgacggcg	840
ctgcaagcca aggccttcct caccttgaca acctgccga agttgctggg cctcgccgac	900
atcgactaca cctccatcat gaatgagcac ctcaacaagg agaaggagga gttccgcgtc	960
aacatcctgc caacattgag caacaccttc agcaacccca actacgccaa ggtgaagggc	1020
tcagatgaag atgccaagat gattgtggag gccaaagcctg gccatgctct ggtgggcttc	1080
gagatgagca acgacagcat caccgtgctg aaggtctacg aggccaaagct gaagcagaac	1140
taccaggtgg acaaggacag cttgtctgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgcta	1200
tgtccagatc aaagcgagca gatctactac accaacaaca tcgtctttcc aaatgaatat	1260

```

gtcatcacca agatcgactt caccaagaag atgaaaacat tgagatatga ggtgacggcc      1320
aacagctacg acagcagcac cggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt ggagagctca      1380
gaagctgagt acaggacgct ctccgccaag gatgatggcg tctacatgcc gctcggcgctc      1440
atctcagaaa ccttcttgac gcccatcaat ggcttcggcc tccaagctga tgagaacagc      1500
aggctcatca ccttgacctg caagagctac ctcagggagc tgctgctggc caccgacctc      1560
agcaacaagg agacaaagct catcgtgccg ccatcaggct tcatcagcaa catcgtggag      1620
aatggcaacc tggaaggaga gaacctggag ccatggatag ccaacaacaa gaatgcttat      1680
gttgatcaca ccggcgggcg caatggaaca agggcgctct atgttcacaa ggatggaggc      1740
ttcagccagt tcatcggcga caagctgaag cccaagacag aatatgtcat ccagtacacc      1800
gtcaagggca agccatcaat ccacctcaag aatgagaaca ccggctacat ccactacgag      1860
gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcacca agaggttcac caccggcacc      1920
gacctcaagg gcgtctacct catcttgaag agccaaaatg gagatgaagc atgggggagac      1980
aacttcacca tcctggagat ctcgccatca gagaagctgc tctcgccgga gctcatcaat      2040
gtcaacaact ggatcagaac tggaagcacc cacatcagcg gcaacacctt gacgctctac      2100
caaggaggag gaggcaacct caagcagaac ctccagcttg acagcttctc cacctacagg      2160
gtgaacttct ccgtcaccgg cgacgccaat gtgaggatca gaaattcaag ggaggtgctc      2220
ttcgagaaga gatacatgag cggcgccaag gatgtttctg agatcttcac caccaagctg      2280
ggcaaggaca acttctacat cgagctgagc caaggcaaca acctctatgg agggccgctg      2340
gtgaagttca atgatgtgag catcaag                                     2367

```

```

<210> 45
<211> 789
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

```

```

<400> 45

```

```

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1              5              10              15

```

```

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20              25              30

```

```

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
35              40              45

```

```

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
50              55              60

```

```

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65              70              75              80

```

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95
 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190
 Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400

Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Lys Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu
 530 535 540
 Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Arg Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575
 Lys Asp Gly Gly Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605
 Leu Lys Asn Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Thr Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Val Asn Asn Trp Ile Arg Thr Gly
 675 680 685
 Ser Thr His Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Gly
 690 695 700
 Gly Asn Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720
 Val Asn Phe Ser Val Thr Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser

	725		730		735										
Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Tyr	Met	Ser	Gly	Ala	Lys	Asp	Val
			740					745					750		
Ser	Glu	Ile	Phe	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Asp	Asn	Phe	Tyr	Ile	Glu
		755					760					765			
Leu	Ser	Gln	Gly	Asn	Asn	Leu	Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Lys	Phe	Asn
	770					775					780				
Asp	Val	Ser	Ile	Lys											
785															

<210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến thể Axmil15

<400> 46

Lys Asp Glu Leu
 1

<210> 47
 <211> 2367
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Axmil15v02(evo38)

<400> 47
 atgaacatga acaacaccaa gctcaatgca agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
 aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
 gacaccggcg gcaacctcac cttggatgag atcctcaaga accagcagct gctgaatgag 180
 atctcaggca agctggacgg cgtcaatgga agcctcaacg acctcattgc tcaaggcaac 240
 ctcaacaccg agctgagcaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaggtgctg 300
 aatgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcacatcta cctgccaaag 360
 atcacctcaa tgctctctga tgtgatgaag cagaactacg cgctgagcct ccagattgag 420
 tacctctcaa agcagctgca agagatctcc gacaagctgg acatcatcaa tgtcaatgtg 480
 ctcatcaaca gcaccttgac agagatcacg ccggcctacc agaggatcaa gtatgtcaat 540
 gagaagttcg aggagctcac cttcgccacc gagacaaccc tcaaggtcaa gaaagattca 600
 tctcccgccg acatcttgga tgagttgaca gagctcaccg agctggccaa gagcgtcacc 660

aagaatgatg tggacggctt cgagttctac ctcaacacct tccatgatgt gatggtcggc	720
aacaacctct ttggaagaag cgcgctcaag acggcatcag agctcatcgc caaggagaat	780
gtcaagacaa gcggcagcga ggtcggcaat gtctacaact tcctcatcgt gctgacagca	840
ttgcaagcca aggccttcct caccttgaca acctgccgca agttgctggg cctcgccgac	900
atcgactaca cctccatcat gaatgagcac ctcaacaagg agaaggagga gttcagagtc	960
aacatcctgc cgacgctgag caacacgttc agcaacccaa actacgccaa ggtcaagggc	1020
tcagacgaag acgccaagat gatcgtggag gccaaagcctg gccacgcgct ggtgggcttc	1080
gagatgagca atgattcaat tactgttctc aaggctctac aggccaagct gaagcagaac	1140
taccaggtgg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gggacatgga caagctcctc	1200
tgcccggatc aatcagagca gatctactac accaacaaca tcgtcttccc taatgaatat	1260
gtcatcacca agatcgactt cacgaagaag atgaaaaccc tcagatacga ggtcacccgc	1320
aacagctatg attcatcaac aggagagatc gacctcaaca agaagaaagt ggagagctct	1380
gaagcagagt acaggaccct gtccgctaag gatgatggcg tctacatgcc gctcggcgtc	1440
atctcagaaa ctttcttgac gcccatcaac ggcttcggcc tgcaagcggc cgagaacagc	1500
aggctcatca cgctcacgtg caagagctac ctcaaggagc tcctgctggc gaccgatttg	1560
agcaacaagg agacaaagct gatcgtgccg ccaagtgggt tcatcagcaa tatcgtggag	1620
aacgggaacc tcgaggggga gaacttggag ccatggatag ccaacaacaa gaatgcttat	1680
gtggaccaca ccggcggcgt taatggaacc agggcgctct acgtccacaa agatggaggg	1740
ttcagccagt tcatcggcga caagctaaaag cccaagaccg aatacgtcac ccagtacacc	1800
gtcaagggca agccgtccat ccacctcaag aacgagaaca ccggctacat ccactacgag	1860
gacaccaata acaatcttga ggactaccaa acaattacta agaggttcac cacaggaaca	1920
gatttgagcc agaccacct gatcttgaag agccaaaatg gagatgaagc atggggagac	1980
aacttcacca tcctggagat ctgcctcc gagaaactac taagcccgga gctcatcaat	2040
gtcaataatt ggatcaggac cggcagcacc cacatcagcg gcaatacgct gacgctttat	2100
caaggaggag gaggcaacct caagcaaac ctccagctcg acagcttcag cacctaccgc	2160
gtcaacttca gcgtcaccgg cgacgccaat gtgaggatca ggaacagccg cgaagtgctc	2220
ttcgagaaga ggtacatgag tggagctaag gacgtctcag agatcttcac caccaaactc	2280
ggcaaggata acttctacat cgagctctcc caggggaata acctctatgg cggccccctc	2340
gtcaagttca atgacgtcag catcaag	2367

<210> 48
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Axmi115v02 (evo38)

<400> 48

Met Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu
 35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys
 50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190

Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255

Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270

```

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
  275                                280                                285

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
  290                                295                                300

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
  305                                310                                315                                320

Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
                                325                                330                                335

Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
                                340                                345                                350

Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr
                                355                                360                                365

Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
  370                                375                                380

Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
  385                                390                                395                                400

Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
                                405                                410                                415

Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
                                420                                425                                430

Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
                                435                                440                                445

Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
  450                                455                                460

Arg Thr Leu Ser Ala Lys Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
  465                                470                                475                                480

Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
                                485                                490                                495

Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
                                500                                505                                510

Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
                                515                                520                                525

Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu
  530                                535                                540

Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
  545                                550                                555                                560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Arg Ala Leu Tyr Val His
                                565                                570                                575

Lys Asp Gly Gly Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
                                580                                585                                590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His

```

595					600					605					
Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ile	His	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn
610						615					620				
Asn	Leu	Glu	Asp	Tyr	Gln	Thr	Ile	Thr	Lys	Arg	Phe	Thr	Thr	Gly	Thr
625					630					635					640
Asp	Leu	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Asp	Glu
				645					650					655	
Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Thr	Ile	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu	Lys
			660					665					670		
Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Asn	Val	Asn	Asn	Trp	Ile	Arg	Thr	Gly
		675					680					685			
Ser	Thr	His	Ile	Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gln	Gly	Gly	Gly
	690					695					700				
Gly	Asn	Leu	Lys	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Asp	Ser	Phe	Ser	Thr	Tyr	Arg
705					710					715					720
Val	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Arg	Asn	Ser
				725					730					735	
Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Tyr	Met	Ser	Gly	Ala	Lys	Asp	Val
			740					745					750		
Ser	Glu	Ile	Phe	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Asp	Asn	Phe	Tyr	Ile	Glu
		755					760					765			
Leu	Ser	Gln	Gly	Asn	Asn	Leu	Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Lys	Phe	Asn
		770				775					780				
Asp	Val	Ser	Ile	Lys											
785															