



(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)



1-0027303

(51)⁷ A61K 38/16; A01N 63/00

(13) B

(21) 1-2013-00483

(22) 14/11/2012

(86) PCT/KR2012/009613 14/11/2012

(87) WO 2013/073843 A1 23/05/2013

(30) 10-2011-0118446 14/11/2011 KR

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/10/2014 319A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

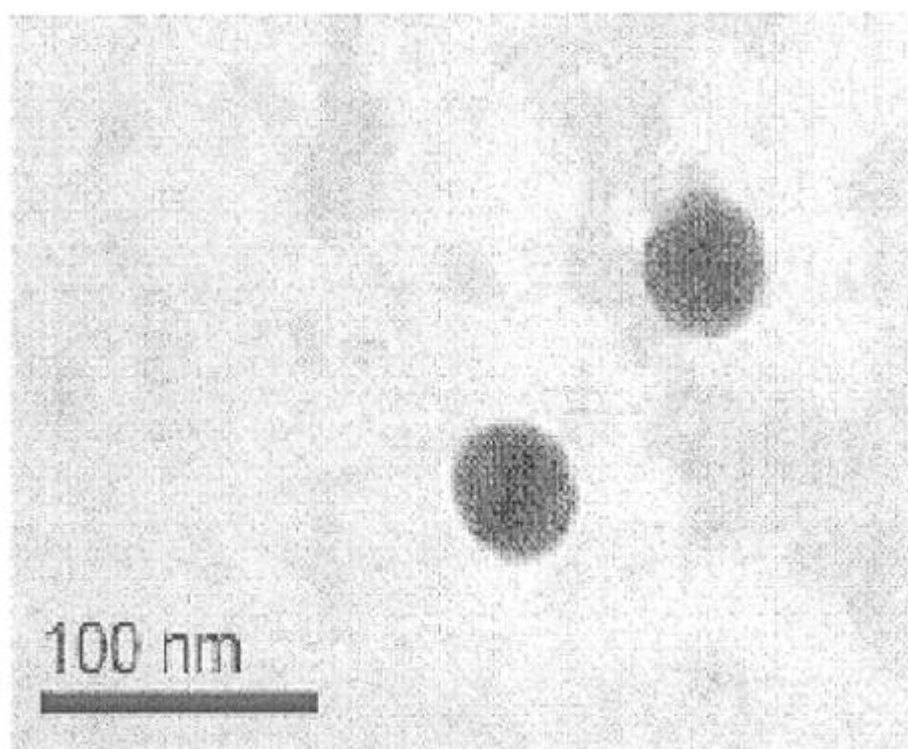
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) KIM, Jae Won (KR); CHO, Young Wook (KR); SHIN, Eun Mi (KR); KIM, Young Sa (KR); YANG, Si Yong (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) THỂ THỰC KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH DIỆT KHUẨN ĐẶC HIỆU KHÁNG
ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI (E.COLI) VÀ CHẾ PHẨM CHỨA
THỂ THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu với *E.coli*, chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *E.coli* chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này, kháng sinh chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này, thức ăn bổ sung chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này, chất khử trùng hoặc chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này, và phương pháp điều trị bệnh trực khuẩn *E.coli* (colibacillosis) bằng cách sử dụng thể thực khuẩn này. Thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng *E.coli* gây bệnh, và bền với axit và nhiệt. Do đó, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh trực khuẩn *E.coli* ở lợn, là bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *E.coli* gây bệnh, và cũng có thể được sử dụng rộng rãi trong thức ăn bổ sung cho động vật, chất khử trùng, và chất làm sạch.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn phân lập có hoạt tính diệt khuẩn *E.coli* đặc hiệu, và chế phẩm diệt khuẩn chứa nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

E.coli là vi khuẩn gram âm, có cấu tạo hình que ngắn thuộc chi *Escherichia* và họ *Enterobacteriaceae*, và là một phần của quần thể vi khuẩn trong hệ tiêu hóa của nhiều loài động vật khác nhau bao gồm động vật có vú. Nhận thấy rằng hầu hết các chủng *E. coli* là không gây bệnh và có thể gây bệnh nhiễm khuẩn cơ hội, nhưng một số chủng lại có khả năng cao trong việc gây ra bệnh đường ruột và bệnh nhiễm trùng máu trầm trọng ở động vật có vú bao gồm người. Trong số các bệnh này, các chủng gây ra bệnh ở dạ dày-ruột có thể được chia chủ yếu thành 6 nhóm dựa vào khả năng gây độc của chúng; Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enteropathogenic *E.coli* (EPEC), Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC), Enteroaggregative *E.coli* (EAEC), Enteroinvasive *E.coli* (EIEC), và Necrotoxicogenic *E.coli* (NTEC). Đã biết rằng Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) gây ra bệnh nhiễm khuẩn ở lợn. Nói chung, các bệnh do lây nhiễm vi khuẩn hoặc virus có thể được chẩn đoán bằng cách xác định nguồn gây bệnh. Tuy nhiên, do *E.coli* có mặt trong ruột của các động vật khỏe mạnh, nên việc chẩn đoán sớm các bệnh gây ra bởi sự nhiễm *E.coli* thường gặp khó khăn (Patent Hàn Quốc số 963157).

ETEC là vi khuẩn gram âm hình que, và di chuyển bằng lông roi hoặc không di chuyển được khi không có roi. ETEC là vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý sinh ra axit và khí có nguồn gốc từ lactoza và fructoza, và phát triển tốt trong môi trường thông thường ở nhiệt độ nằm trong khoảng 7-48°C, nhiệt độ tối ưu ở 35-37°C, và ở khoảng pH 4,5-9,0. ETEC sản sinh ra độc tố tương tự độc tố gây bệnh tả, và độc tố này có thể được chia thành độc tố trong ruột không bền với nhiệt (heat-labile enterotoxin - LT), bị mất hoạt tính khi gia nhiệt ở 60°C trong 10 phút, và độc tố trong ruột bền với nhiệt vẫn

giữ được hoạt tính sau khi gia nhiệt ở 100°C trong 30 phút. Khi bị nhiễm khuẩn, các triệu chứng xuất hiện tương tự như triệu chứng ở bệnh tả, và vi khuẩn sinh sôi nảy nở ở phần trên của ruột non và nồng độ vi khuẩn đạt được 10^7 - 10^8 cfu (đơn vị tạo khuẩn lạc) trên 1ml, từ đó gây bệnh nhiễm khuẩn *E.coli*.

Gần đây, do xu hướng nuôi lợn tập trung ở quy mô lớn, nên bệnh trực khuẩn *E.coli* (colibacillosis) ở lợn là vấn đề gặp phổ biến và thường xuyên hơn ở các trại nuôi lợn (Park Young-il, Sun-Jin Publishing Co. 353-359, 1998). Ở Hàn quốc, gần đây bệnh trực khuẩn *E.coli* ở lợn xuất hiện ngày càng gia tăng gây chậm lớn và gây chết do tiêu chảy ở lợn con, dẫn đến các tổn thất to lớn về kinh tế cho người nông dân (Hong Eu-Chul, luận văn cao học, Dankook University, Addition Effect of Egg Yolk in Early Weaned Piglets, 2001). Nhiều loại kháng sinh đã được sử dụng để phòng ngừa và điều trị bệnh trực khuẩn *E.coli* ở lợn, nhưng sự lạm dụng và dùng quá mức kháng sinh làm xuất hiện các vấn đề nghiêm trọng về tính kháng thuốc và tồn dư thuốc ở lợn. Do vậy, việc sử dụng kháng sinh bị hạn chế ở nhiều nước trên thế giới (Mason HS *et al.*, Trends in Biotech. 13:388-392, 1995).

Trong khi đó, thể thực khuẩn là loại virus đặc hiệu chỉ gây nhiễm một loại vi khuẩn cụ thể và khống chế sự phát triển của vi khuẩn, và chúng chỉ có thể tự sao chép bên trong vi khuẩn chủ. Thể thực khuẩn được cấu thành từ vật liệu di truyền ở dạng ADN hoặc ARN sợi đơn hoặc sợi kép. Dựa trên hình thái học của chúng, thể thực khuẩn được chia thành Myoviridae, Siphoviridae, và Podoviridae, khác biệt bởi tính co rút, không co rút kéo dài, và đuôi ngắn, tương ứng (Arch Virol (2001) 146:843-857; Elizabeth Kutter *et al.*, Bacteriophages Biology and Application; CRC press).

Sau khi phát hiện ra thể thực khuẩn, thoát tiên người ta đã rất cố gắng sử dụng chúng vào việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, so với kháng sinh có phổ đích rộng, thì thể thực khuẩn được xem là không cần thiết do nó có phổ đích đặc hiệu. Thế nhưng, việc lạm dụng và dùng quá mức kháng sinh lại làm tăng nỗi lo ngại về vi khuẩn kháng kháng sinh và tác dụng có hại của kháng sinh tồn dư trong thực phẩm (Cislo, M *et al.* Arch Immunol.Ther.Exp. 1987,2:175-183; Kim sung-hun *et al.*, bacteriophage, New Alternative Antibiotics. BRIC).

Những lo lắng ngày càng tăng này làm sống lại mối quan tâm về thể thực khuẩn. Bảy loại thể thực khuẩn để khống chế *E.coli* O157:H được bộc lộ trong Patent Mỹ Số 6,485,902 (2002) và hai thể thực khuẩn để khống chế các vi sinh vật khác nhau được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,942,858 (được đưa ra bởi Nymox vào năm 2005).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các vấn đề tồn tại trong việc lạm dụng hoặc dùng quá mức các kháng sinh phổ rộng, như vi khuẩn kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong thực phẩm, các tác giả sáng chế đã tiến hành phân lập từ các nguồn tự nhiên thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng *E.coli* gây ra các bệnh chủ yếu trên vật nuôi. Nhận thấy rằng thể thực khuẩn này có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng *E.coli* gây bệnh, cũng như tính bền với axit và bền với nhiệt tuyệt vời, như được xác định bởi các đặc tính hình thái, hóa sinh và di truyền của chúng. Cũng nhận thấy rằng thể thực khuẩn này có thể được dùng làm chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn ở vật nuôi gây ra bởi *E.coli* gây bệnh, và làm các sản phẩm khác để phòng ngừa và khống chế hữu hiệu quá trình tăng sinh của *E.coli* gây bệnh, như thức ăn bổ sung dùng cho vật nuôi, nước uống dùng cho vật nuôi, chất khử trùng chuồng trại, và chất làm sạch cho các sản phẩm thịt.

Mục đích của sáng chế là đề xuất thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic *E.coli*.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *E.coli*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất kháng sinh, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thức ăn bổ sung, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất khử trùng hoặc chất làm sạch, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh trực khuẩn *E.coli* bằng cách sử dụng thể thực khuẩn này hoặc các chế phẩm nêu trên.

Thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic *E.coli*, và tính bền với axit và bền với nhiệt tuyệt vời. Do đó, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh trực khuẩn *E.coli* ở lợn, bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *E.coli* gây bệnh, và cũng có thể được sử dụng rộng rãi trong thức ăn bổ sung cho động vật, chất khử trùng, và chất làm sạch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh của thể thực khuẩn ΦCJ13 chụp bằng kính hiển vi điện tử;

Fig.2 thể hiện kết quả PFGE của thể thực khuẩn ΦCJ13 đã phân lập;

Fig.3 thể hiện kết quả SDS-PAGE của thể thực khuẩn ΦCJ13 đã phân lập;

Fig.4 thể hiện kết quả thử nghiệm tính bền với axit của thể thực khuẩn ΦCJ13;

Fig.5 thể hiện kết quả thử nghiệm tính bền với nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ13;

Fig.6 thể hiện kết quả so sánh độ sệt của phân của lợn con sau cai sữa được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn có bổ sung thể thực khuẩn ΦCJ13 và lợn con sau cai sữa cho ăn chỉ với thức ăn tiêu chuẩn, sau khi cho ăn cưỡng bức ETEC; và

Fig.7 thể hiện kết quả PCR thời gian thực để định lượng ETEC trong phân.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC).

Các tác giả sáng chế tiến hành thu gom các mẫu phân từ Samhwa GPS Breeding Agri., Inc. ở vùng Kwangcheon, Hong sung-gun, tỉnh Chung Cheong, và thể thực khuẩn đã phân lập từ đó có thể được gây nhiễm và phân giải chọn lọc tế bào chủ ETEC. Thử nghiệm về hình thái dưới kính hiển vi điện tử đã khẳng định rằng thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic *Escherichia coli*; thuộc họ Podoviridae có các đặc điểm hình thái như capsit cùng cỡ và không có đuôi (Fig.1); có tổng kích thước cỡ bộ gen xấp xỉ 35 kbp; và bao gồm các protein cấu trúc chính xấp xỉ 43 kDa, 38

kDa, 34 kDa, và 33 kDa như được đo bằng cách phân tích mẫu protein (Fig.3). Ngoài ra, thể thực khuẩn theo sáng chế có tính đặc hiệu loài gây nhiễm ETEC chọn lọc trong số các loại *E.coli* (Bảng 1).

Ngoài ra, kết quả phân tích các đặc điểm di truyền của nó cho thấy rằng thể thực khuẩn này bao gồm các phân tử axit nucleic được đặc trưng bởi các SEQ ID NO. 1 đến 6 trong bộ gen toàn phần. Dựa trên các SEQ ID NO. 1 đến 6, tiến hành so sánh mức tương đồng di truyền với các loài khác. Nhận thấy rằng các mức tương đồng khác nhau 86%-100% được quan sát tùy thuộc vào mỗi đoạn axit nucleic, nhưng không có thể thực khuẩn nào có mức tương đồng bằng 100% trên toàn bộ các đoạn, từ đó chứng tỏ rằng thể thực khuẩn này là thể thực khuẩn mới (Bảng 2). Dựa trên việc phân tích cụ thể về các đặc điểm di truyền, nhận thấy rằng PCR có sử dụng các bộ đoạn mỗi đặc hiệu thể thực khuẩn, tức là, các SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10, SEQ ID NO. 11 và 12, SEQ ID NO. 13 và 14, SEQ ID NO. 15 và 16, và SEQ ID NO. 17 và 18 tạo ra các sản phẩm có kích thước đặc hiệu.

Trong khi đó, khi ETEC được gây nhiễm bởi thể thực khuẩn, các mảng thể thực khuẩn (vùng trong suốt trên thạch aga mềm tạo ra bằng cách phân giải tế bào chủ bởi một thể thực khuẩn) được quan sát và có cùng kích thước và độ đục, chứng tỏ rằng thể thực khuẩn đã ức chế sự phát triển của ETEC bằng cách phân giải ETEC. Bằng cách thử nghiệm độ ổn định của thể thực khuẩn trong các điều kiện nhiệt độ và khoảng pH khác nhau, nhận thấy rằng thể thực khuẩn ổn định trong môi trường với khoảng pH rộng từ 3 đến 10 và nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, và đặc biệt, nó có tính bền nhiệt ở nhiệt độ cao (Fig.5). Các đặc tính như hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu ETEC, và tính bền axit và tính bền nhiệt cho phép dùng thể thực khuẩn theo sáng chế trong các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau để sản xuất chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh liên quan tới ETEC ở lợn và các sản phẩm khác nhau chứa hoạt chất là thể thực khuẩn.

Do đó, các tác giả sáng chế đã đặt tên cho thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng ETEC và các đặc điểm nêu trên là “thể thực khuẩn ΦCJ13”, và nó được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun,

Seoul) vào ngày 7 tháng 11 năm 2011 với số truy cập KCCM11217P.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Do có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng ETEC, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng nhằm mục đích phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh gây ra bởi ETEC. Ví dụ về các bệnh này là bệnh trực khuẩn *E.coli* ở lợn gây ra bởi ETEC, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh này.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “bệnh trực khuẩn *E.coli*” có nghĩa là bệnh do sự nhiễm khuẩn *E.coli* gây ra ở vật nuôi, và có các triệu chứng như bệnh nhiễm khuẩn hệ thống, bệnh tiêu chảy (tiêu chảy lúc mới sinh và tiêu chảy sau khi cai sữa), và chứng nhiễm độc máu (chứng phù và bệnh mạch máu ở não tủy). Trong số chúng, bệnh nhiễm khuẩn hệ thống là bệnh nhiễm khuẩn toàn thân cấp tính xảy ra thường xuyên ở lợn mới sinh 2-3 ngày tuổi, và có tỷ lệ tử vong cao. Bệnh tiêu chảy là hậu quả thường gặp nhất của việc nhiễm khuẩn ở đường dạ dày ruột xảy ra trong giai đoạn cho bú trong vòng 1-2 tuần sau khi sinh và ngay sau giai đoạn cai sữa, và dẫn tới tử vong hoặc chậm lớn. Chứng nhiễm độc máu xảy ra ở lợn 8-12 tuần tuổi sau giai đoạn cai sữa, và kèm theo chứng phù và các dấu hiệu về thần kinh, sau đó là tử vong đột ngột.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “phòng ngừa” dùng để chỉ toàn bộ các hành động trong đó quá trình tiến triển bệnh được ức chế hoặc làm chậm bằng cách dùng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế, và thuật ngữ “điều trị” dùng để chỉ toàn bộ các hành động trong đó tình trạng bệnh được cải thiện tốt hơn hoặc được ức chế hoặc được tiến triển tích cực bằng cách dùng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm thể thực khuẩn ΦCJ13 với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^2 đến 5×10^{12} pfu/ml, và tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Mặt khác, chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm chất mang được dụng.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “chất mang được dụng” dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây ra kích ứng đáng kể cho cơ thể và không phá hủy hoạt tính

sinh học và các tính chất của hoạt chất đã dùng. Đối với việc bào chế chế phẩm thành chế phẩm dạng lỏng, nước muối, nước tinh khiết, dung dịch Ringer, dung dịch đậm nước muối sinh lý, dung dịch tiêm truyền albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của một hoặc nhiều dung dịch này có thể được sử dụng làm chất mang được dụng vô trùng và tương hợp sinh học. Nếu cần, chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hoá, chất đệm, và chất kìm hãm vi khuẩn có thể được bổ sung. Ngoài ra, các chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính và chất bôi trơn có thể được bổ sung thêm vào chế phẩm để bào chế chế phẩm dùng để tiêm như dung dịch nước, huyền phù, và nhũ tương, hoặc chế phẩm dùng theo đường miệng như viên tròn, viên nang, hạt, hoặc viên nén.

Chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế có thể được cấp hoặc được phun vào vùng bị đau, hoặc được dùng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Đường dùng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm tĩnh mạch, trong màng bụng (IP), trong cơ, dưới da hoặc tại chỗ. Liều lượng thích hợp để cấp, phun, hoặc dùng chế phẩm theo sáng chế phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm phương pháp bào chế, đường dùng, tuổi tác, trọng lượng, giới tính, tình trạng bệnh, và chế độ ăn uống của bệnh nhân hoặc động vật cần điều trị, thời điểm dùng, đường dùng, tốc độ bài tiết, và độ nhạy phản ứng. Thầy thuốc hoặc bác sĩ thú y có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định và kê đơn dễ dàng lượng hữu hiệu của chế phẩm cần dùng.

Ví dụ về dạng liều dùng theo đường miệng bao gồm chế phẩm theo sáng chế là hoạt chất bao gồm viên nén, thuốc viên, viên hình thoi, huyền phù nước hoặc nhũ tương, bột hoặc hạt, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, sirô, hoặc cốm ngọt. Đối với các chế phẩm như viên nén và viên nang, chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, các tá dược như đicanxi phosphat, chất làm phân rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất bôi trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol có thể được sử dụng. Đối với viên nang, ngoài các hợp chất nêu trên, chất mang lỏng như lipid có thể được sử dụng thêm.

Dạng liều dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm chế phẩm theo sáng chế là hoạt

chất có thể được bào chế thành chế phẩm dùng để tiêm dưới da, tĩnh mạch, hoặc trong cơ, thuốc đạn, hoặc thuốc phun xịt để hít qua đường hô hấp, như khí dung. Dạng dùng để tiêm có thể được bào chế bằng cách hoà tan hoặc tạo huyền phù chế phẩm theo sáng chế, cùng với chất ổn định hoặc dung dịch đệm, trong nước và mang dung dịch hoặc huyền phù vào ống thuốc tiêm hoặc dạng lọ đơn vị. Đối với dạng phun xịt, như khí dung, chất đẩy để phun dạng cô đặc đã phân tán trong nước hoặc bột để thấm có thể được sử dụng kết hợp với chất phụ gia.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng sinh chứa hoạt chất là thể thực khuẩn.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “kháng sinh” dùng để chỉ thuốc bất kỳ được dùng cho động vật để tiêu diệt nguồn bệnh, và được dùng trong bản mô tả này như thuật ngữ chung cho chất khử trùng, chất diệt khuẩn và chất kháng khuẩn.

Động vật là động vật có vú bao gồm người.

Thể thực khuẩn theo sáng chế, không giống các kháng sinh thông thường, có khả năng tiêu diệt hiệu quả Enterotoxigenic *E.coli*, và không gây dung nạp thuốc hoặc kháng thuốc sao cho nó có thể được tạo ra dưới dạng kháng sinh mới có vòng đời tương đối dài.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thức ăn bổ sung chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo sáng chế.

Kháng sinh chứa trong thức ăn được sử dụng trong công nghiệp vật nuôi và công nghiệp cá được dự định dùng để phòng ngừa các nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, hầu hết kháng sinh chứa trong thức ăn hiện có sẵn có nhược điểm là chúng có thể gây kháng chủng và có thể truyền sang người do chúng bị giữ lại trong sản phẩm vật nuôi. Mức độ hấp thụ của các kháng sinh tồn dư này có thể làm nguồn bệnh trong người kháng lại kháng sinh, dẫn đến sự lan tràn bệnh tật. Ngoài ra, do có nhiều kháng sinh chứa trong thức ăn, nên sự xuất hiện ngày càng gia tăng trên toàn cầu của chủng kháng đa thuốc trở thành mối quan tâm lớn. Do đó, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng làm kháng sinh chứa trong thức ăn thân thiện với môi trường hơn và có thể giải quyết được các vấn đề của các kháng sinh đã biết nêu trên.

Thức ăn bổ sung theo sáng chế có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm bao

gồm thể thực khuẩn, và sau đó được trộn với thức ăn ngay trước khi cho ăn hoặc được bổ sung trực tiếp vào quy trình chế biến thức ăn. Thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được chứa trong thức ăn cho động vật dưới dạng lỏng hoặc dạng sấy khô, tốt hơn là ở dạng bột sấy khô. Quy trình sấy khô có thể được tiến hành bằng cách làm khô bằng không khí, làm khô tự nhiên, làm khô bằng cách phun, và đông khô, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. Thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được bổ sung dưới dạng bột với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 10% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 2% khối lượng, tính trên khối lượng của thức ăn cho động vật. Ngoài thể thực khuẩn theo sáng chế, thức ăn cho động vật còn có thể bao gồm chất phụ gia thông thường khác để bảo quản trong thời gian dài.

Thức ăn bổ sung theo sáng chế có thể còn bao gồm các vi sinh vật không gây bệnh khác. Vi sinh vật bổ sung có sẵn có thể được chọn từ nhóm gồm *Bacillus subtilis* có thể sản sinh ra proteaza, lipaza và invertaza, chủng *Lactobacillus* sp. có thể có hoạt tính sinh lý và có chức năng phân hủy các chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí, như trong dạ dày gia súc, nấm sợi bao gồm *Aspergillus oryzae* (J Animal Sci 43:910-926, 1976) làm tăng trọng lượng của động vật nuôi trong nhà, tăng sản phẩm từ sữa và giúp cho sự tiêu hóa và hấp thu thức ăn, và nấm men bao gồm *Saccharomyce scerevisiae* (J Anim Sci56:735-739, 1983).

Thức ăn bao gồm thể thực khuẩn ΦCJ13 theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn có nguồn gốc từ thực vật, như lúa, quả hạch, phụ phẩm, tảo biển, xơ, sản phẩm phụ từ thuốc, dầu, tinh bột, bột, và sản phẩm phụ từ lúa, và thức ăn có nguồn gốc từ động vật như protein, chất vô cơ, chất béo, chất khoáng, protein đơn bào, động vật phù du, và phế phẩm, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại thức ăn này.

Thức ăn bổ sung bao gồm thể thực khuẩn ΦCJ13 theo sáng chế có thể bao gồm chất kết dính, chất tạo nhũ tương, và chất bảo quản dùng để phòng ngừa sự suy giảm chất lượng, axit amin, vitamin, enzym, probiotic, hương vị, nitơ không protein, silicat, chất đệm, chất tạo màu, các phân chiết, và oligosacarit để cải thiện hiệu suất, và hỗn hợp thức ăn sơ chế khác, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Ngoài ra, nguồn dự trữ nước uống được trộn với thể thực khuẩn theo sáng chế có khả năng làm giảm số lượng

ETEC trong đường tiêu hóa, từ đó thu được vật nuôi không chứa ETEC.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chất khử trùng hoặc chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn.

Để loại bỏ ETEC, chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn cũng có thể được phun lên và được cấp lên vùng bất kỳ mà vật nuôi hoạt động, chuồng mổ, các nơi mà vật nuôi bị chết, khu vực nấu ăn và dụng cụ nấu ăn, nhưng không chỉ giới hạn ở các khu vực này. Ngoài ra, chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn có thể được sử dụng trên da và cơ thể của động vật sống, đã nhiễm hoặc có khả năng nhiễm ETEC.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *E.coli*, tốt hơn là ETEC, bằng cách sử dụng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Cụ thể, phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể thực khuẩn hoặc chế phẩm cho cá thể bị mắc bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *E.coli* gây bệnh, tốt hơn là ETEC. Thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho động vật dưới dạng dược phẩm hoặc có thể được ăn vào dưới dạng hỗn hợp với thức ăn cho động vật hoặc nước uống dưới dạng thức ăn bổ sung. Với điều kiện nó tới được các mô đích, theo đường bất kỳ, kể cả đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, có thể dùng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế. Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo cách tùy ý theo đường bất kỳ như đường miệng, trực tràng, tại chỗ, tĩnh mạch, trong màng bụng (IP), trong cơ, trong động mạch, da, qua mũi, và hít. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết rằng tổng liều hàng ngày của thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế cần dùng theo phương pháp điều trị cần được xác định bởi quyết định dùng thuốc thích hợp bởi thầy thuốc. Tốt hơn nếu lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết trong y khoa, bao gồm loại và mức độ đáp ứng cần đạt được, tình trạng bệnh của bệnh nhân như tuổi tác, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính, và chế độ ăn uống, thời gian và đường dùng thuốc, tốc độ bài tiết chế phẩm, khoảng thời gian trị liệu, chế phẩm cụ thể mà các chất khác có được sử dụng cùng hoặc hoặc không, v.v..

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể bằng các Ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các Ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, chứ không nhằm giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Phân lập thể thực khuẩn nhiễm Enterotoxigenic *E.coli*

Ví dụ 1-1: Sàng lọc thể thực khuẩn và phân lập thể thực khuẩn đơn lẻ

50ml mẫu thu được từ phân gà và mẫu môi trường của Samhwa GPS Breeding Agri., Inc. ở vùng Kwangcheon, Hong sung-gun, tỉnh Chung Cheong được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, dịch nổi trên bề mặt được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,45µm để điều chế dung dịch mẫu, và sử dụng phương pháp phủ thạch aga mềm.

Cụ thể, 18ml dịch lọc mẫu được trộn với 150µl dung dịch nuôi cấy lactic Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC, SNU0105) ($OD_{600}=2$) và 2ml của 10 lần thể tích môi trường LB (trypton 10g/L; dịch chiết nấm men 5g/L; NaCl 10g/L). Hỗn hợp này được nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ, và dung dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi trên bề mặt được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,45µm. 3ml aga 0,7% (khối lượng/thể tích) và 150µl dung dịch nuôi cấy lactic ETEC (SNU105) ($OD_{600}=2$) được trộn, và đặt trên đĩa LB, và để hóa rắn. 10µl dịch lọc môi trường được dàn lên trên đĩa này, và được nuôi cấy trong 18 giờ ở 30°C để quan sát sự tạo thành mảng thể thực khuẩn.

Mảng đơn lẻ chứa một thể thực khuẩn và do đó, thể thực khuẩn đơn lẻ được dự định để phân lập ra từ nhiều mảng. Cụ thể, một mảng thể thực khuẩn được bổ sung vào 400µl dung dịch SM (NaCl, 5,8g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2g/L; 1 M Tris-Cl (pH = 7,5) 50ml), và để trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng để phân lập dung dịch thể thực khuẩn. Sau đó, 100µl dung dịch thể thực khuẩn được trộn với 12ml aga 0,7% (khối lượng/thể tích) và 500µl dung dịch nuôi cấy lactic ETEC (SNU105) ($OD_{600}=2$), tiếp đó tiến hành phương pháp phủ thạch aga mềm lên đĩa LB có đường kính 150mm. Khi hoàn thành quá trình phân giải, 15ml dung dịch SM được bổ sung vào đĩa LB. Đĩa này được để ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ để thu được dung dịch thể thực khuẩn.

Dung dịch này được thu hồi, 1% (thể tích/thể tích) clorofom được bổ sung vào dung dịch, và được trộn đều trong 10 phút. Dung dịch được ly tâm ở 4.000 vòng/phút

trong 10 phút. Dịch nổi trên bề mặt thu được được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,45µm để thu được mẫu cuối cùng.

Ví dụ 1-2: Nuôi cấy ở quy mô lớn và tinh chế thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn thu được ở Ví dụ 1-1 được nuôi cấy với số lượng lớn bằng cách sử dụng ETEC (SNU105), và thể thực khuẩn được tinh chế từ đó.

Cụ thể, ETEC (SNU105) được nuôi cấy trong điều kiện lắc, và phần có nồng độ $1,5 \times 10^{10}$ cfu được ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút, và viên tròn được tạo hỗn dịch lại trong 4ml dung dịch SM. Thể thực khuẩn $1,5 \times 10^6$ pfu được gây nhiễm vào đó, được chuẩn độ tới MOI (nhiễm khuẩn rất nhiều) bằng 0,0001, và được để ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, dung dịch được gây nhiễm vào 150ml môi trường LB, và được nuôi cấy ở 30°C trong 5 giờ. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, clorofom được bổ sung tới thể tích cuối 1% (thể tích/thể tích), và dung dịch nuôi cấy được khuấy trong 20 phút. Enzym Dnaza I và Rnaza A giới hạn lần lượt được bổ sung tới nồng độ cuối 1µg/ml. Dung dịch được để ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, NaCl và PEG (polyetylen glycol) lần lượt được bổ sung tới nồng độ cuối 1M và 10% (khối lượng/thể tích), và để ở 4°C trong 3 giờ tiếp theo. Dung dịch được ly tâm ở 4°C và 12.000 vòng/phút trong 20 phút để thu được viên tròn. Viên tròn được tạo hỗn dịch lại trong 5ml dung dịch SM, và được để ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. 4ml clorofom được bổ sung vào dung dịch này và được trộn đều, tiếp đó là ly tâm ở 4°C và 4.000 vòng/phút trong 20 phút. Dịch nổi trên bề mặt được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,45µm, và thể thực khuẩn được tinh chế bằng cách siêu ly tâm theo gradien tỷ trọng glyxerol (tỷ trọng: 40%, 5% glyxerol ở 35.000 vòng/phút và 4°C trong 1 giờ).

Các tác giả sáng chế đặt tên thể thực khuẩn này là “thể thực khuẩn ΦCJ13”, có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng ETEC và các tính chất nêu trên được phân lập từ các mẫu phân ở chuồng mổ gà, và được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) on Nov. 7, 2011 với số truy cập KCCM11217P.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về khả năng nhiễm ΦCJ13 của *E.coli*

Để phân tích thể thực khuẩn ΦCJ13 được tinh chế ở Ví dụ 1 về hoạt tính phân giải

trên các loài *E.coli* không phải ETEC (SNU105), các nỗ lực được thực hiện bằng cách cho nhiễm khuẩn chéo với các loài *E.coli* khác.

Cụ thể, hai loại ETEC (SNU105) và ETEC (CANRO8) và tám loại *E.coli* không gây bệnh (DH5a, MC4100, Rosetta (DE3), GM2929, K12G, W3110, BL21 (DE3), Tuner (DE3)) được nuôi cấy để thu được các dung dịch nuôi cấy. Mỗi dung dịch nuôi cấy và ΦCJ13 đã tinh chế được sử dụng để tiến hành phương pháp phủ thạch aga mềm, và các mảng thể thực khuẩn của chúng thu được được thử nghiệm (Bảng 1).

Bảng 1: Khả năng nhiễm ΦCJ13 của *E.coli*

Tên chủng	Tạo thành mảng thể thực khuẩn
ETEC(SNU105)	O
ETEC(CANRO8)	O
<i>E.coli</i> DH5a	X
<i>E.coli</i> MC4100	X
<i>E.coli</i> Rosetta(DE3)	X
<i>E.coli</i> GM2929	X
<i>E.coli</i> K12G	X
<i>E.coli</i> W3110	X/O
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	X
<i>E.coli</i> Tuner(DE3)	X

* Nguồn ‘SNU’: Khoa thú y, trường đại học Seoul

* ‘CAN’source: Trường đại học Guelph ở Canada

Như được thể hiện trong bảng 1, thể thực khuẩn ΦCJ13 được tinh chế ở Ví dụ 1 không có hoạt tính phân giải trên *E.coli* không gây bệnh.

Ví dụ 3: Hình thái học của ΦCJ13

ΦCJ13 đã tinh chế ở Ví dụ 1 được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01%, và sau đó được cố định trong dung dịch glutaraldehyt 2,5%. Mẫu được nhỏ lên đĩa mica phủ

cacbon (khoảng 2,5x2,5 mm), để cho thích ứng trong 10 phút, và được rửa bằng nước cất vô trùng. Màng cacbon được lắp trên vi đồng, được nhuộm bằng 4% uranyl axetat trong 30-60 giây, và được làm khô. Tiến hành thử nghiệm dưới kính hiển vi điện tử truyền qua JEM-1011 (ở 80kV, độ phóng đại x120.000~x200.000) (Fig.1). Fig.1 là ảnh ΦCJ13 chụp từ kính hiển vi điện tử. Nhận thấy rằng ΦCJ13 đã tinh chế thuộc họ Podoviridae theo hình thái học, được đặc trưng bởi capsit cùng cỡ và không có đuôi.

Ví dụ 4: Phân tích kích thước bộ gen ADN toàn phần của ΦCJ13

Bộ gen ADN được lấy từ thể thực khuẩn ΦCJ13 đã tinh chế ở Ví dụ 1.

Cụ thể, 20 mM EDTA, 50μg/ml proteinaza K, và 0,5% (khối lượng/thể tích) SDS được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy ΦCJ13 đã tinh chế, tiếp đó ủ ở 50°C trong 1 giờ. Thể tích phenol tương đương (độ pH = 8,0) được bổ sung và trộn đều. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ trong phòng và ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi trên bề mặt được trộn đều với thể tích PC tương đương (phenol:clorofom = 1:1). Tiến hành ly tâm tiếp ở nhiệt độ trong phòng và với 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, dịch nổi trên bề mặt thu được được trộn với thể tích clorofom tương đương, tiếp đó ly tâm ở nhiệt độ trong phòng và với 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi trên bề mặt thu được được trộn với 10% (thể tích/thể tích) natri axetat 3M và sau đó hai thể tích etanol lạnh 95%, và để ở -20°C trong 1 giờ. Sau khi ly tâm ở 0°C và với 12.000 vòng/phút trong 10 phút, thu được viên tròn, và viên tròn ADN được hòa tan trong 50μl dung dịch đệm TE (Tris-EDTA (độ pH = 8,0)), và tiến hành đo nồng độ của nó. 1μg ADN được nạp vào 1% gel agaroza PFGE (điện di gel trường xung), và được điện di ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ bằng cách sử dụng hệ chương trình BIORAD PFGE 7 (khoảng cỡ 25-100 kb; thời gian tắt xung 0,4-2,0 giây, hình dạng tuyến tính; điện áp thuận 180V; điện áp nghịch 120V) (Fig.2). Fig.2 thể hiện kết quả điện di của bộ gen ADN của thể thực khuẩn ΦCJ13, chứng tỏ rằng kích thước của nó xấp xỉ 35kbp.

Ví dụ 5: Phân tích mẫu protein của ΦCJ13

15μl dung dịch ΦCJ13 đã tinh chế với nồng độ 10^{10} pfu/ml được trộn với 3μl dung dịch mẫu 5xSDS, và được gia nhiệt trong 5 phút. 15% SDS-PAGE được tạo thành

(Fig.3). Fig.3 thể hiện kết quả SDS-PAGE của thể thực khuẩn ΦCJ13. Như được thể hiện trong Fig.3, các protein chính được phát hiện ở 43kDa, 38kDa, 34kDa và 33kDa.

Ví dụ 6: Phân tích di truyền ΦCJ13

Để phân tích di truyền ΦCJ13 đã tinh chế ở Ví dụ 1, 5μg bộ gen ADN của ΦCJ13 được cắt bằng các enzym giới hạn *EcoRV*, *ScaI* và *NruI*, và *PvuII*, *HincII* và *StuI*. Vật truyền pCL1920 (Promega) được cắt bằng enzym giới hạn *SmaI*, và sau đó được xử lý bằng CIP (phosphatase kiềm của ruột bê). Bộ gen ADN được trộn với vật truyền với tỷ lệ 3:1, và được gắn ở 16°C trong 5 giờ. Vật truyền tái tổ hợp thu được được chuyển nhiễm vào *E. coli* DH5α, tiếp đó được cấy trên đĩa LB chứa ampicilin và X-gal (5-brom-4-clo-3-indolyl-beta-D-galactopyranosit) để lựa chọn các khuẩn lạc xanh da trời/trắng. Hai khuẩn lạc được chọn, và được nuôi cấy bằng cách lắc trong 16 giờ trong môi trường nuôi cấy chứa ampicilin. Sau đó, các plasmid được chiết bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế (Solgent).

Quá trình tách dòng plasmid được khẳng định bằng PCR nhờ sử dụng bộ đoạn mồi gồm M13 xuôi và M13 ngược và quá trình lựa chọn chỉ được thực hiện vào đoạn chèn có kích thước 1kb hoặc dài hơn. Các trình tự bazơ của chúng được phân tích bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi gồm M13 xuôi và M13 ngược (Bảng 2).

Bảng 2: So sánh mức tương đồng trình tự giữa thể thực khuẩn ΦCJ13 và các thể thực khuẩn khác

SEQ ID NO.	Hữu cơ	Protein	Quary	Mức tương đồng	Giá trị E
1	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	gp19	38-388	116/117(99%)	7,00E-53
	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	gp19,5	727-52	38/38 (100%)	5,00E-05
2	Thể thực khuẩn	ống đuôi (gp 12)	966-37	306/310(99%)	4,00E-

	Enterobacteria K1F				165
3	Thể thực khuẩn Enterobacteria K1F	protein A đuôi hình ống (gp 11)	360-31	109/110(99%)	8,00E-44
	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	Protein capsit chính (gp 10A)	807- 932	50/50 (100%)	3,00E-49
4	Thể thực khuẩn Enterobacteria K1F	endo-N- axylneuraminidaza	303-40	88/88 (100%)	5,00E-42
	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	Protein D nội virion (gp 16)	1169- 371	128/129(99%)	3,00E- 110
5	Thể thực khuẩn Enterobacteria P1	lipoprotein giả định (Plp)	510- 136	124/125 (99%)	3,00E-62
	Thể thực khuẩn Enterobacteria P1	dòng gen ngược plp (Upl)	702- 514	63/63 (100%)	8,00E-28
	Thể thực khuẩn Enterobacteria P1	Kháng tellurite hoặc colicin/ức chế khả năng tách tế bào (TciA)	908- 1140	50/55 (91%)	8,00E-21
6	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	Protein D nội virion(gp16)	1066- 284	225/264 (86%)	1,00E- 118
	Thể thực khuẩn Enterobacteria EcoDS1	gp17	216-37	60/60 (100%)	2,00E-25

Ví dụ 7: Thiết kế trình tự đoạn môi đặc hiệu ΦCJ13

Để xác định ΦCJ13, đoạn môi đặc hiệu ΦCJ13 được thiết kế.

Cụ thể, bộ đoạn môi có các SEQ ID NO. 7 và 8 và SEQ ID NO. 9 và 10 được xây dựng dựa trên các SEQ ID NO. 1 và 2, tương ứng. Ngoài ra, bộ đoạn môi có các SEQ ID NO. 11 và 12, SEQ ID NO. 13 và 14, các SEQ ID NO. 15 và 16, và SEQ ID NO. 17 và 18 được xây dựng dựa trên các SEQ ID NO. 3, 4, 5 và 6, tương ứng. Tiến hành PCR. 0,1μg bộ gen ADN của thể thực khuẩn và 0,5pmol của mỗi đoạn môi được bổ sung vào hỗn hợp sơ chế (Bioneer), và thể tích cuối cùng được điều chỉnh đến 20mL. PCR được tiến hành bằng 30 chu trình biến tính; 94°C trong 30 giây, bắt cặp; 60°C trong 30 giây, và polyme hoá; 72°C, 1 phút. Do đó, các sản phẩm PCR thu được như vậy có kích thước xấp xỉ 170 bp, 180 bp, 200 bp, 205 bp, 240 bp và 200 bp, với bộ đoạn môi SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10, SEQ ID NO. 11 và 12, SEQ ID NO. 13 và 14, SEQ ID NO. 15 và 16, và SEQ ID NO. 17 và 18, tương ứng.

Ví dụ 8: Độ ổn định về pH của thể thực khuẩn

Để xác định xem ΦCJ13 có sống sót ổn định trong môi trường pH thấp trong dạ dày lợn hay không, ΦCJ13 được thử nghiệm về độ ổn định trong khoảng pH rộng (độ pH = 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,2, 9,0, 9,8 và 11,0). Các dung dịch có độ pH khác nhau (dung dịch đệm natri axetat (độ pH = 2,1, pH = 4,0, pH = 5,5, và pH = 6,4), dung dịch đệm natri xitrat (độ pH = 2,5, pH = 3,0, và pH = 3,5), dung dịch đệm natri phosphat (độ pH = 6,9 và pH = 7,4) và Tris-HCl (độ pH = 8,2, pH = 9,0, pH = 9,8 và pH = 11,0)) được điều chế để thu được nồng độ 0,2M. 90μl mỗi dung dịch pH được trộn với 10μl dung dịch thể thực khuẩn ($1,0 \times 10^{11}$ pfu/ml) để tạo ra mỗi dung dịch pH có nồng độ 1M, tiếp đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được pha loãng theo dãy, và 10μl mỗi dịch pha loãng được nuôi cấy ở 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch aga mềm để xác định nồng độ của dịch phân giải thể thực khuẩn (Fig.4). Fig.4 thể hiện kết quả thử nghiệm tính bền với axit trên thể thực khuẩn ΦCJ13. Như được thể hiện trong Fig.4, thể thực khuẩn ΦCJ13 không làm mất hoạt tính của nó và vẫn ổn định trong khoảng pH từ 3,0 đến 10,0, khi so sánh với nhóm đối chứng.

Ví dụ 9: Độ ổn định về nhiệt của thể thực khuẩn

Để dùng làm thức ăn bổ sung, thể thực khuẩn được thử nghiệm về độ ổn định về nhiệt được tạo ra trong quy trình bào chế. Về mặt này, 100 μ l dung dịch Φ CJ13 với nồng độ $1,0 \times 10^8$ pfu/ml được ủ ở 40°C, 50°C, 60°C, và 70°C trong 0 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút. Dung dịch được pha loãng theo dải, và 10 μ l mỗi dịch pha loãng được nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch aga mềm để xác định nồng độ của dịch phân giải thể thực khuẩn (Fig.5). Fig.5 thể hiện kết quả thử nghiệm về tính bền với nhiệt trên thể thực khuẩn Φ CJ13. Như được thể hiện trong Fig.5, thể thực khuẩn Φ CJ13 vẫn giữ được hoạt tính của nó mặc dù bị phơi nhiễm ở 50°C trong thời gian lên tới 2 giờ, nhưng hoạt tính của nó lại giảm theo thời gian, khi được phơi nhiễm ở 60°C trong 30 phút hoặc dài hơn.

Ví dụ 10: Phổ nhiễm khuẩn của thể thực khuẩn trên ETEC kiểu hoang

Φ CJ13 được thử nghiệm về hoạt tính phân giải kháng 10 chủng ETEC kiểu đại, thu được từ Khoa thú y, trường đại học Seoul và Trường đại học Guelph ở Canada, ngoài chủng ETEC (SNU105) được sử dụng trong thử nghiệm. 150 μ l mỗi dung dịch nuôi cấy lắc chứa chủng ($OD_{600}=2$) được trộn, và 10 μ l dung dịch Φ CJ13 có nồng độ 10^8 pfu/ml được nhỏ giọt và được nuôi cấy ở 30°C trong 18 giờ bằng cách sử dụng phương pháp phủ thạch aga mềm để kiểm tra sự tạo thành các mảng (Bảng 3).

Bảng 3: Sự tạo thành các mảng thể thực khuẩn của chủng ETEC kiểu hoang của Hàn Quốc

Tên chủng	Sự tạo thành mảng thể thực khuẩn
ETEC SNU105	O
ETEC SNUF4	O
ETEC SNU162	O
ETEC SNU160	O
ETEC SNUJG280	O
ETEC SNU107	O

ETEC SNU2618	O
ETEC SNU193	O
ETEC CAN3220	O
ETEC SNUR08	O

* Nguồn ‘SNU’: Khoa thú y, trường đại học Seoul

* Nguồn ‘CAN’: Trường đại học Guelph ở Canada

Như được thể hiện trong bảng 3, thể thực khuẩn có khả năng nhiễm trên tít huyết thanh O của ETEC là O149 (SNU107, SNUF4, SNUJG280, CAN3220, SNUR08), thông thường hầu hết gây bệnh tiêu chảy ở lợn, và cũng có khả năng nhiễm trên tít huyết thanh F K88 (SNU105, SNU107, SNU160, SNU162, SNU193, SNUF4, CAN3220, SNUR08, SNUJG280), K99 (SNU2618) và do đó, thể thực khuẩn được kì vọng mang lại tác dụng vượt trội khi dùng.

Ví dụ 11: Giá trị của thể thực khuẩn ETEC trong thức ăn cho lợn con cai sữa

50 lợn con cai sữa (Landrace X Yorkshire) 25 ngày tuổi và được xác định là khỏe mạnh, âm tính với kháng nguyên ETEC bằng thử nghiệm tổng quát và phát hiện trên lâm sàng (tiêu chảy, trầm cảm, v.v.) và PCR ở phân được phân chia theo khối lượng, giống. Thử nghiệm được tiến hành trong 14 ngày.

Trước tiên, chủng ETEC được gây nhiễm vào TSB, và được nuôi cấy ở 37°C trong 18 giờ. Dung dịch nuôi cấy được pha loãng bằng PBS (độ pH = 7,2) và nồng độ được điều chỉnh đến 10^8 pfu/ml, và dùng qua đường miệng cho lợn 5 tuần tuổi bằng cách sử dụng đầu dò sau 7 ngày bắt đầu thử nghiệm. Từ ngày thử nghiệm đầu tiên, các nhóm đã điều trị bằng thể thực khuẩn được cho ăn hỗn hợp thức ăn chứa 1g thể thực khuẩn (10^6 pfu/g hoặc 10^8 pfu/g) trên 1kg thức ăn 2 lần/ngày ở các thời điểm xác định trước vào mỗi buổi sáng và buổi trưa. Nhóm đối chứng dùng thể thực khuẩn chỉ được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn đồng thời (các Fig.6 và Fig.7)

Trước tiên, Fig.6 thể hiện kết quả so sánh về độ sệt của phân giữa lợn con sau cai sữa được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn có bổ sung ΦCJ13 và lợn con chỉ được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn, sau khi cho ăn cưỡng bức ETEC. Lợn con cai sữa không được cho ăn

cường bức chủng ETEC được xác định là nhóm đối chứng âm tính. Lợn con cai sữa được cho ăn cường bức chủng ETEC ($1,0 \times 10^8$ pfu/ml) và chỉ cho ăn thức ăn tiêu chuẩn được xác định là nhóm đối chứng dương tính. 7 ngày bắt đầu trước khi cho ăn chủng ETEC, các nhóm thử nghiệm được cho ăn thức ăn bổ sung thể thực khuẩn. Lợn con sau cai sữa được cho ăn thức ăn bổ sung thể thực khuẩn có độ sệt của phân thấp hơn các nhóm chỉ cho ăn thức ăn tiêu chuẩn. Như được thể hiện trong Fig.6, độ sệt của phân dựa trên trị số sau bằng cách sử dụng phương pháp của Sherman et al. (1983) (phân bình thường, 0; phân mềm, 1; tiêu chảy lỏng, 2; tiêu chảy nặng, 3). Nhóm đối chứng dương tính được cho ăn thể thực khuẩn ETEC (cho ăn thức ăn tiêu chuẩn sau khi cho ăn ETEC) có độ sệt của phân cao hơn, nhưng nhóm thử nghiệm cho ăn thức ăn bổ sung thể thực khuẩn cho độ sệt cao lên tới 3-4 ngày, và sau đó trở về bình thường.

Fig.7 thể hiện kết quả thời gian thực PCR trong quá trình định lượng ETEC trong phân. Lượng ETEC được quan sát trong phân của lợn lợn con sau cai sữa được cho ăn thức ăn có bổ sung thể thực khuẩn thấp hơn so với lợn con sau cai sữa chỉ cho ăn thức ăn tiêu chuẩn. Như được thể hiện trong Fig.7, kết quả về thời gian thực PCR trong quá trình định lượng ETEC trong phân đã cho thấy rằng phân của nhóm thử nghiệm đã cho ăn thể thực khuẩn có nồng độ ETEC thấp hơn so với nhóm đối chứng dương tính.

Ví dụ 12: Phân tích độ dài lông nhung trong ruột của lợn con cai sữa

Thông thường, lợn con đã bị phơi nhiễm ETEC được đặc trưng ở chỗ chúng có chiều dài lông nhung trong ruột ngắn hơn so với lợn con khỏe mạnh, và có khả năng hấp thu nước không bình thường, dẫn đến tiêu chảy (Gaastra W. *et al.*, Microbial Rev. 46,129-161, 1982). Dựa trên thực tế này, ảnh hưởng của Φ CJ13 đối với độ dài lông nhung trong ruột của lợn con đã phơi nhiễm ETEC được thử nghiệm.

Sau khi kết thúc thử nghiệm ở Ví dụ 11, lợn con thử nghiệm được đem giết, và lấy 3cm mỗi loại các mô tá tràng, ruột chay, ruột hồi và ruột kết, và được cố định trong 10% formalin thông thường trong 48 giờ. Sau khi xử lý mô thông thường, các mô được chìm trong paraffin, và được chia thành các phần có độ dày 3µm. Các phần mô được khử paraffin và hydrat hoá lại, và sau đó được nhuộm bằng H&E (hematoxylin và eosin).

Tiếp theo, chiều dài của lông nhung và độ sâu của các khe niêm mạc ruột (crypt) được đo để phân tích hình thái ruột. Tại thời điểm này, để xác định chiều dài lông nhung và độ dài của crypt, các hình ảnh từ các phần mô tá tràng, ruột chày, và ruột hồi đã nhuộm được ghi lại từ trái sang phải và từ trên xuống dưới bằng cách sử dụng phân tích chẩn đoán điểm (Olympus, USA). Chiều dài của lông nhung (V), độ sâu của crypt I, và tỷ lệ của chiều dài lông nhung với độ sâu của crypt (tỷ lệ V/C) được đo, sau đó phân tích thống kê (Bảng 4).

Bảng 4: Phân tích chiều dài lông nhung của ruột

Vị trí trong ruột	Quần thể lợn con cai sữa				Giá trị P
	Nhóm âm tính	Nhóm dương tính	Thể thực khuẩn (1E+6)	Thể thực khuẩn (1E+8)	
Tá tràng					
Độ dài của lông nhung (μm)	540,9	305,6	334,5	322,9	<,0001
Độ sâu của crypt (μm)	287	345,3	343,5	316,2	0,0013
Tỷ lệ V/C (μm)	0,483a	0,239b	0,501b	0,401b	-
Ruột chày					
Độ dài của lông nhung (μm)	75,9	52,5	54,7	128,5	0,0013
Độ sâu của crypt (μm)	233,9	258	264	210,8	0,169
Tỷ lệ V/C (μm)	1,798	0,885	1,013	1,747	0,0005
Ruột hồi					
Độ dài của lông nhung (μm)	406	228	282,7	402	<,0001

Độ sâu của crypt (μm)	256,0a	307,2a	244,4a	222,3a	-
Tỷ lệ V/C (μm)	1,640a	0,804c	1,235b	1,868a	-

a, b, c: là các giá trị có thể phân biệt được rõ ràng là lớn hơn khoảng độ lệch chuẩn

Như được thể hiện trong bảng 4, nhóm kích thích ETEC (nhóm dương tính) có chiều dài lông nhung ngắn hơn và crypts sâu hơn trong tá tràng so với nhóm không kích thích, nhóm âm tính ($P < 0,05$). Nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn ($1\text{E}+8$) có độ dài lông nhung là $128,5\mu\text{m}$ trong ruột chảy, chứng tỏ rằng dài hơn $52,5\mu\text{m}$ so với nhóm kích thích ETEC dương tính ($P < 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa về độ sâu của crypts. Nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn ($1\text{E}+6$) và ($1\text{E}+8$) có tỷ lệ V/C lần lượt là 1,013 và 1,747, chứng tỏ rằng tỷ lệ này cao hơn 0,885 so với nhóm kích thích ETEC dương tính. Nhóm thể thực khuẩn ($1\text{E}+8$) có tỷ lệ cao hơn so với nhóm thể thực khuẩn ($1\text{E}+6$) ($P < 0,05$). Nhóm thể thực khuẩn ($1\text{E}+6$) và nhóm thể thực khuẩn ($1\text{E}+8$) có tỷ lệ V/C lần lượt là 1,235 và 1,868 trong ruột hồi, chứng tỏ rằng tỷ lệ này cao hơn 0,804, cao hơn đáng kể so với nhóm dương tính ($P < 0,05$). Đối với lợn khỏe mạnh có lông nhung dài, nhận thấy rằng thể thực khuẩn cũng có ảnh hưởng đáng kể.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E.coli*), có số truy cập KCCM11217P.
2. Chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *Escherichia coli*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi Enterotoxigenic *Escherichia coli* là bệnh trực khuẩn *E. coli* (colibacillosis).
4. Kháng sinh chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
5. Thức ăn bổ sung chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
6. Chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
7. Chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.

Fig.1

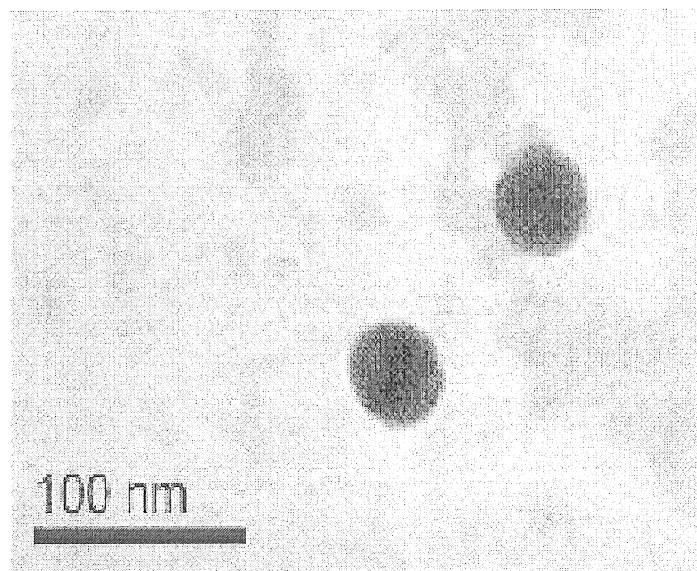


Fig.2

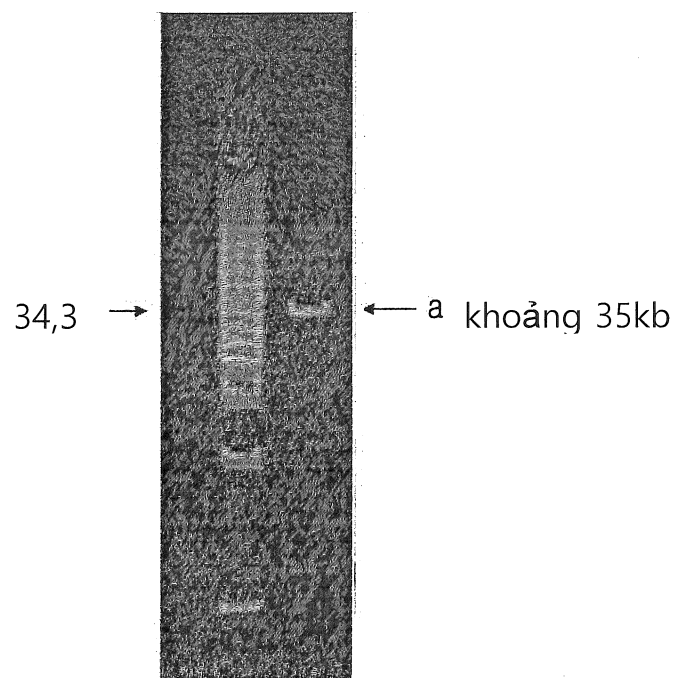


Fig.3

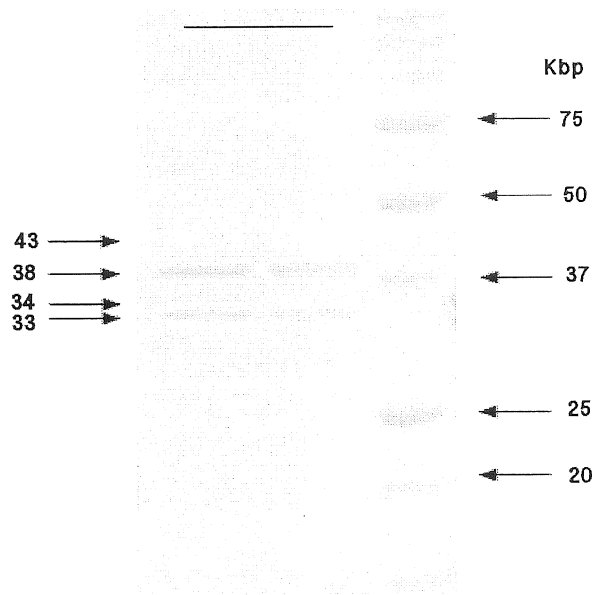


Fig.4

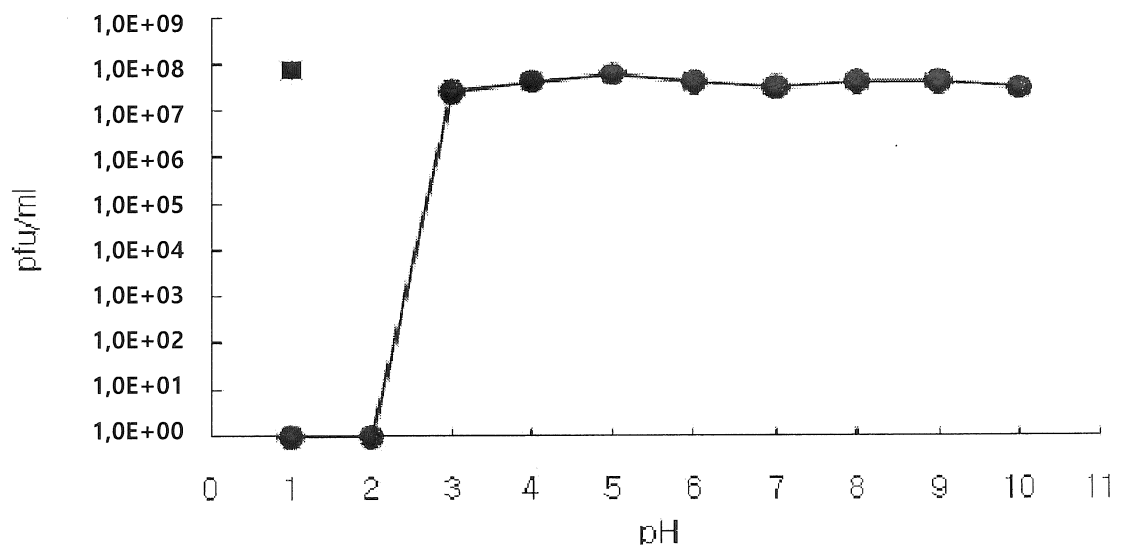


Fig.5

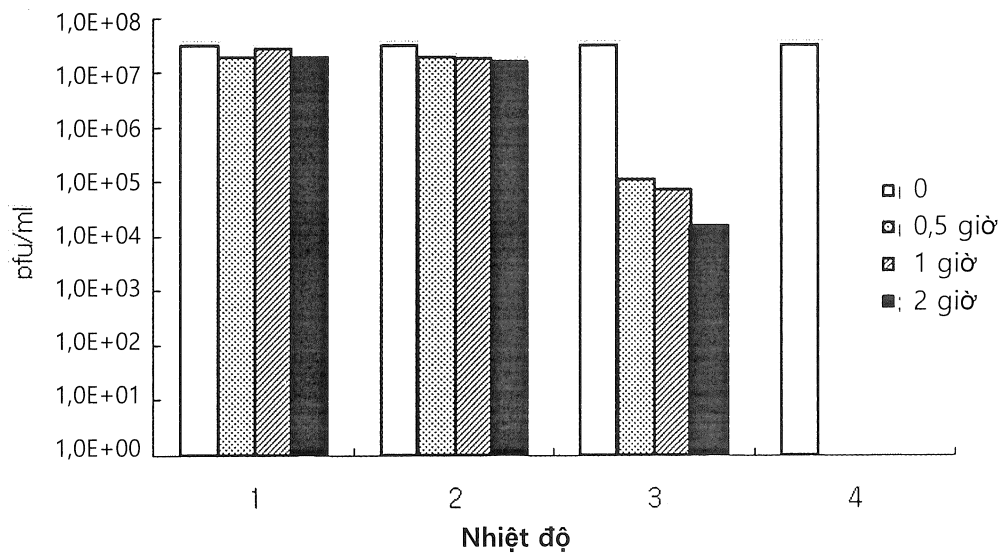


Fig.6

Bệnh tả chảy ở động vật thử nghiệm (lợn con 28 ngày tuổi)

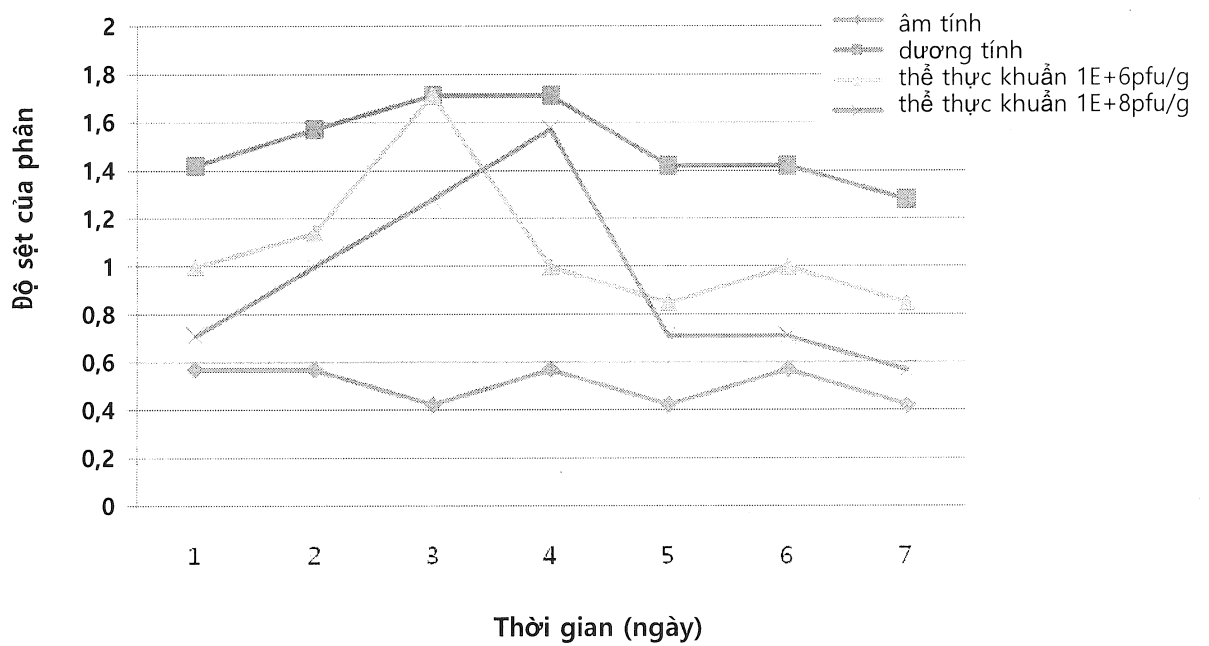
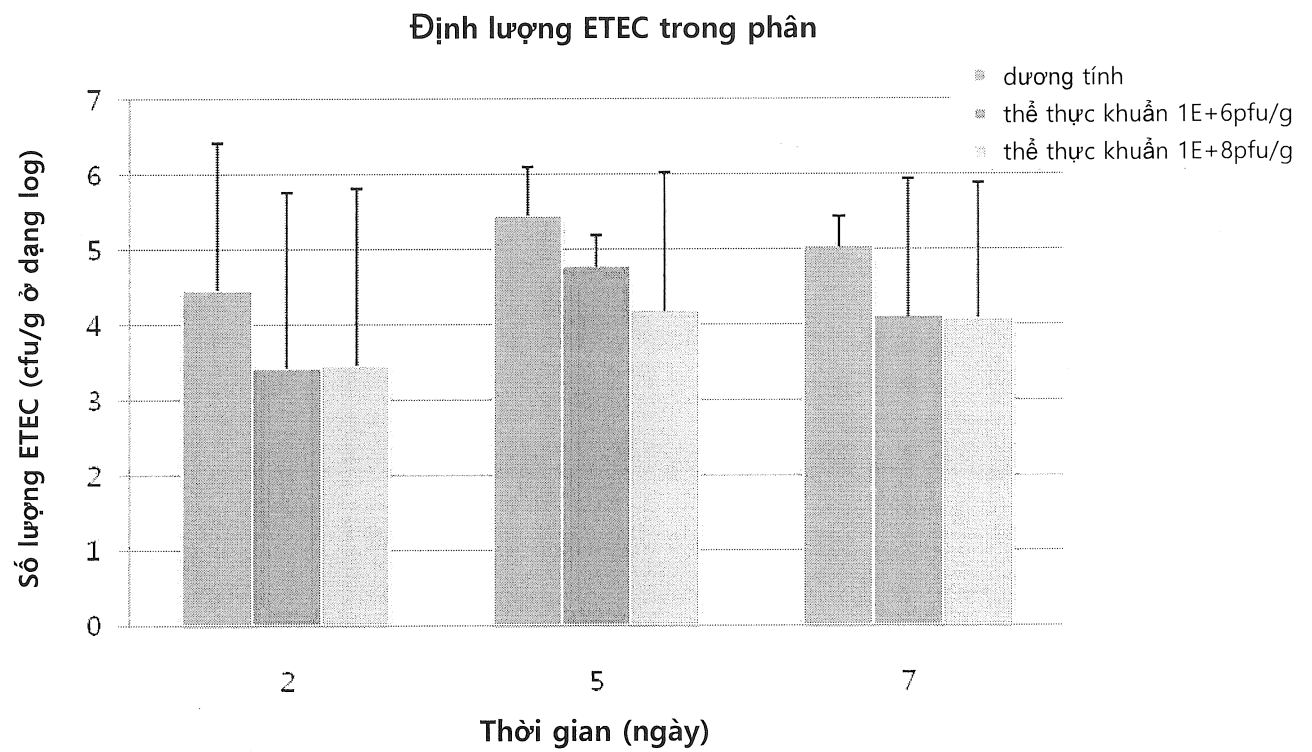


Fig.7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ CheilJedang Corporation	
<120>	Thế thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) và chế phẩm chứa thế thực khuẩn này	
<130>	OPA12123	
<150>	10-2011-0118446	
<151>	2011-11-14	
<160>	18	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	824	
<212>	ADN	
<213>	thế thực khuẩn	
<400>	1	
	gcacacgatg accgacttga tgcgcttgct ataggtgtac agttcttcgt tgagtctatg	60
	gctaaggatg ccaacaaagg cgaacgtgaa gtcactgagg agtggctgga ggaacagatg	120
	gagaacccac ggaaaggctt cgagtccatc cacactgagt tctgggacaa tgggggtccgg	180
	gtaactcacg atacggacga cgagctggga ctaggggtcat acgttacgtt ccactagctg	240
	aatgaataat tataggtgaa agctgcatga atacgcgggt agtaacctat agttactacc	300
	agtctaacct actgtttttac aaggagtttg gacttaacta tcactatagg gaagaccccc	360
	ggttacttat agtattactg tagtgaatat acatatgcag actttatgca agaccttagg	420
	aggcagactc cgagttctta cctaaggctt gcaccgatgg aaggaggggtg atattaatca	480
	taatccctcc aatacagata gtaaagacca tagatacagg aggtatgtag catatggcaa	540
	agaccaaagc tgtacttaaa gctctggcga ccaatcgagc tacatacagg tttcttgctg	600
	ctgtttctact tgctgctggc gttactgctg gaagtcagtg ggtcgggtgg gtcgagactc	660
	tcgtatgttc tctgggtctct cagtgttaatt aacgcaatca tggtaacgat tcatgagcgg	720
	aagacctaag gtcagtacgt ggataaagac tcactctact gaccttagct actatagtca	780
	aggacttttag gtaacactat agcagctcat ggtctatcca aagg	824
<210>	2	
<211>	1035	
<212>	ADN	
<213>	thế thực khuẩn	
<400>	2	
	gagctcggta cccgacgcag atgtagttct cagtcacctgt accttgaatg tcaaacaccc	60
	cgttagggat ataggacagt acgtggccag tggtatcatc cgcacacctc acgtcagaca	120

catctgctac agcgaagtat cgcttaatgc tggatgaatga cccacgaggc gctgagaaga 180
 agactgagcg tcctacagcg aacgggtctgg cattatcgcc taaggcaaac tctgagccta 240
 catcaagctg gatagacttc gaggtaagga cccagagct tgtcatcacg aactgaacct 300
 catccgacca aagtagtagc tgctcactaa acggaacggc atacttaagg attgagattc 360
 gaggggtgact tacagctaca tcaatagggg catcatcact cagtgtcgcc acactccttag 420
 ggaagaacgc aaagtagctt gctgaacggc tcattattac gttctcgcc gacaagaacc 480
 ccagcctatt cctgtagaag aacacatcgt taatcgtggc atccacgaag ctaggcatag 540
 ggtttgtgtc atcattacca gcaccacgt tagaccagtc cagagtcttg aactcaaagg 600
 agccgtcgga ttgcctaacc agagcatggg gcattgtggg gttatcgaac ccagtgacca 660
 ctcccgctcc tactgtctcc ttccacgtct tagtggtgga gtcatacatc acgtaatat 720
 catcggcgct actgtttgtc tcaccttgaa tcttaatgat gtaccattt ggagctgcaa 780
 gaggcaactt agagattgtt tgcaccgtgt cgagtactgg actgattagc tggttagcgt 840
 agccatcctc cgtctccact gagttaatgt cagtcctga aggggcagtg attaacagga 900
 agccagaccc aagggtcaaac gtgaaggtag gataggcagc aacagaaggc ctctcagagc 960
 tgcaccaatg gcttgagcgt cggggatcct ctagagtcga cctgcaggca tgcaagcttg 1020
 gcgtatcatg gtcac 1035

<210> 3
 <211> 971
 <212> ADN
 <213> thể thực khuẩn

<400> 3
 acaggtatcc gcccatgttg ctataatagc tgggtggccc ggagtcatt acacgaaggc 60
 atgacggtaa gaatcgaatc ctattgtctt ggacatcagg tgcaggacg gcagcttcgt 120
 tgatattaaa gttccagcct ttagcttgga cctgacgatt gacgcgatgc agtatacgtt 180
 gagcgtaga gacgtcagcg ttcccctcgt caagctgtag gactgctggg tcaccgatag 240
 cagctaacat atcggtgatg gcacctaagt catcgtagc gttcagtggg atgtattgag 300
 ccatactccc tcctatctgt cgtaaggact gcattggtccg gtttaataata tagtcgccc 360
 gaaactaaca aatagtccca aggctgtag taagtaaaac ataatcatcc caactttaag 420
 caaaaaaaaa acccctcaag caccgaagg caccgaagg gtttcaatta gttgttgagc 480
 tcanccagtt tagcggccct gttcgagca cgagtacgcg cagctttctg ttgaggagtt 540
 aaattctcct cttcaggtgc agccgctact gtagcgacgt taggttggt aaaggtgctt 600
 acgccgctgg gctgaaaacc agtgcgccag cagcttcagg acgcagacca ccgtgaccca 660

tagcgtatatt accaacaatc aggtcgccct gagcatcgac gtcacgggtca cgttccagcg 720
ccaagtcacg cagcttcaca gtaccacag canacgggtga gagaacaggc ccacaacggt 780
gtccatagca actttaacgt cgccagtagc agttgccggg aatgcgtggt tctgaccgga 840
agcgatagag ataccatcgt caccacgggt ctcacagcgc caccctgtac cagatgcgga 900
acttcaacaa caacgaagcc catcacgtta cggatgttac cagtctctgg gtcaatcagc 960
gcagcatagt t 971

<210> 4
<211> 1095
<212> ADN
<213> thể thực khuẩn

<400> 4
attcctgaag tctaccacta agtcagttcc agtctgacgg tgaatacgaa cgatgtcgaa 60
acctgattgg tcaaccaaca tctcaatcat cgttggatta aggaatcggg aatctcgacc 120
aacttcaagt acacgggtca gggtaggggt agagctattc accagcgtaa caacaacaaa 180
cgttctgggt aggtagtcga actcaatcct gtactgagtg tttcctgaag ggaattgtgt 240
aatcgtggac attatgcctc ctttgtgatt taaacggaga cctatggtag cgcctccagt 300
ttcctatagt gatagtttag tccttgatgt ggatgccttg ctctcaaac gttccaagca 360
atagcttctg ggtaatgggg tcgttcggaa ccagttcacg gaacgtatta tacatcccgg 420
tcatgtagtc tcgctcgttt acccgagtgt cggccttcag gtagccagcc aagttgtaag 480
ccgaagcgcc aacgtttagca gcatatccga aagctggaac ctgctccaag aagttaccaa 540
caacattcat cacgggggtca cttgtagctg caccatacgc gatggcacgt tcaggctgct 600
ctgtaggcga acgaggtagg atagacgaac ggagcatctt agtgcctca taccagcga 660
tgccaccag aatgttagct accccaagtg gaccaccag atgtgaaact acgggacaga 720
gccgcataac caatcatcgt cgggtcaaga gcttgcttga ggtattcacg gtctcgacca 780
tcctgcatag cgtaagcctt gacgtgagct tgagccatat agtagatacc agccagaccc 840
atagacatca cggtagatag agcagcatcc atcgctcggg tgttcttcgt ggcgttatag 900
aaggttcgca tgggtcgccc attgatggac ttgatgacga agttccttaa actgaaggac 960
agtcttagcg agagggccat aagcttgcgt ccatgttaag acagctatga ggtcgtagta 1020
cgtttcatcc agcaatgggtg tcaaccatac gccaacaggc caatancctt gggctctgaa 1080
ctgaacgact tctta 1095

<210> 5
<211> 979
<212> ADN
<213> thể thực khuẩn

<400> 5
 cgatgggttca aatccatcca ccatcgccaa tgccgggttta gctcagttgg tagagcgcct 60
 gccttgtaag caggatgtca gcggttcgag tccgttaatc ggcaccagca caacaggtaa 120
 ggggtattttg cgacgtcggg gatcgccgag cttggcagag gggtcgaatc cctacgaagt 180
 acccttaccg ttgtgatgaa gtgcagctct ttgaagcaac cagaagataa gcatctggct 240
 tcacaacata aaccgcagga acgaccaata aacggtagtc cgtatggaga acaccccggt 300
 gaggaagagg cctggccgga accgtaaccg gcactacaac gttgagaaca ctggcgtaac 360
 ggggtcatat cccaatctac gaataaatgt tgcgttgagc cgtgacaacc agtggttctca 420
 acattgtggg gaatgcacag gctgatgtgc cgcaactaca gtagtgcgcg ctttgcgggg 480
 cttgctacaa ccctgtgtcg gagttcagca ccgaccatca cagtttgatt ctctggcatg 540
 agcataacgc tgaaataagt ccagtctggg gcggcccgat caccgcgcgt tagctccacg 600
 aaacggagca cgtaacaggg aagagcattc tcctgtaacg gggtcatatc ccaatctaca 660
 ggtccaccaa gaatgctctt tccgttgagg tgaatgcggc taagcgcacg cggggaaatg 720
 gttatatctg tccattattt ctccttggtt ccacgtccac ggtggataac cagccaaagg 780
 acaccgggag gcaccgggca ccgcaacctt atttcccaac cagtaatgag gttaataaat 840
 gctcggcatt ctcaaaagaa attccgcaaa gcggctggcg gagtcaagaa gatggaaaac 900
 cgtgatgccg tggaagcgac tgtctggggc gcatattcca ttgcatactc tgacggcacc 960
 tgcgatgcga aagaaattg 979

<210> 6
 <211> 979
 <212> ADN
 <213> thể thực khuẩn

<400> 6
 catcgttggg ttaaggaatc ggtaatctcg accaacttca agtacacggg tcagggtagg 60
 gttagagcta ttcaccagcg taacaacaac aaacgttctg gctaggtagt cgaactcaat 120
 cctgtactga gtgtttcctg aagggaattg tgtaatcgtg gacattatgc ctcctttgtg 180
 atttaaacgg agacctatgg tagcgcctcc agtttcctat agtgatagtt tagtccttga 240
 tgtggatgcc ttgctcctca aacgttccaa gcaatagctt ctgggtaatg gggtcgttcg 300
 gaaccagttc acggaacgta ttatacatcc cggtcagtga gtctcgctcg tttaccgag 360
 tgtcggcctt caggtagcca gccaaagtgt aagccgaagc gccaacgtta gcagcatatc 420
 cgaaagctgg aacctgctcc aagaagttac caacaacatt catcacgggg tcacttgtag 480
 ctgcaccata cgcgatggca cgttcaggct gctctgtagg cgaacgaggt aggatagacg 540
 aacggagcat cttagtgtcc tcataccag cgatgccacc cagaatgtta gctaccccaa 600

gtggaccacc cagatgtgaa ctacgggaca gagccgcata accaatcatc gtcgggtcaa 660
gagcttgctt gaggtattca cggctctcgac catcctgcat agcgtaagcc ttgacgtgag 720
cttgagccat atagtagata ccagccagac ccatagacat cacggtagat agagcagcat 780
ccatcgctcg gttgttcttc gtggcgttat agaaagttcg catggttcgc ccattgatgg 840
acttgatgac gaagttctta aactgaaagg acagtcttag cgagagggcc ataagccttg 900
gcatccatgt tagacagctt atgaggtcgt agtaacgttt catcagcgat ggtgtcaccc 960
atacgccaca gtccatagc 979

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 7
tgaaagctgc atgaatacgc 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 8
tgcctcctaa ggtcttgcac 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 9
ggattgagat tcgaggggtga 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400>	10	
tgccacgatt	aacgatgtgt	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	11	
gcttcacagt	acccacagca	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	12	
gtaacgtgat	gggcttcggt	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	13	
atcacggggt	cacttgtagc	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	14	
ctcttgaccc	gacgatgatt	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 15
 accgtaaccg gcactacaac 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 16
 tttcagcgtt atgctcatgc 20

<210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 17
 atcacggggt cacttgtag 19

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 18
 ctcttgaccc gacgatgatt 20