



(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)



1-0030154

(51)<sup>7</sup> C12N 1/21; C12P 7/16; C12N 15/52

(13) B

(21) 1-2016-02628

(22) 16/12/2014

(86) PCT/KR2014/012428 16/12/2014

(87) WO/2015/093831 A1 25/06/2015

(30) 10-2013-0156802 16/12/2013 KR

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/10/2016 343A

(73) GS CALTEX CORPORATION (KR)

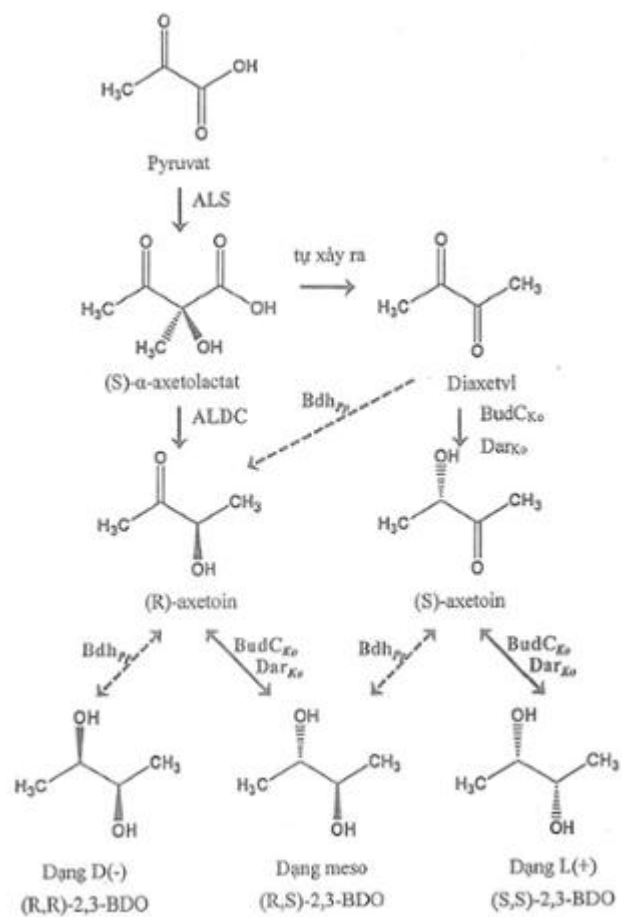
508 Nonhyeon-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-985, Republic of Korea

(72) YANG, Taek-Ho (KR).

(74) Công ty cổ phần Sở hữu trí tuệ BROSS và Cộng sự (BROSS & PARTNERS., JSC)

(54) VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT D(-) 2,3-BUTANDIOL  
GIA TĂNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT D(-) 2,3-BUTANDIOL BẰNG  
CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này.



### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất D(-) 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

2,3-butandiol là rượu (có công thức  $\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$ ) có bốn nguyên tử cacbon và hai nhóm hydroxyl (-OH) và có thể được chuyển hóa hóa học và xúc tác thành 1,3-butadien, mà là nguyên liệu thô để sản xuất cao su tổng hợp, và metyl etyl keton (Methyl Ethyl Ketone - MEK), mà là phụ gia và dung môi cho nhiên liệu. 2,3-butandiol là hợp chất trung gian rất quan trọng trong công nghiệp vì 2,3-butandiol có thể được sử dụng làm chất tăng chỉ số octan bằng cách trộn lẫn với xăng.

2,3-butandiol có thể được tạo ra bằng quá trình tổng hợp hóa học và quá trình lên men vi sinh vật. Tuy nhiên, do chi phí sản xuất cao, nên không thể sản xuất 2,3-butandiol trên quy mô công nghiệp. Trong những năm gần đây, với sự phát triển nhanh chóng về kỹ thuật sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật, cùng với việc giá nhiên liệu thô hóa thạch đang tăng nhanh và việc đưa vào áp dụng quy định quốc tế nghiêm ngặt về vấn đề gây ô nhiễm môi trường, tầm quan trọng của việc tìm ra các phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh vật đang được tập trung nghiên cứu và phát triển nhanh.

Vì 2,3-butandiol bao gồm hai trung tâm lập thể, nên 2,3-butandiol có thể có ba chất đồng phân lập thể, cụ thể là, dạng D(-) (dạng quay trái, 2R,3R-BDO), dạng L(+) (dạng quay phải, 2S,3S-BDO), và dạng không quang hoạt (dạng meso) (2R,3S-BDO). 2,3-butandiol có hoạt tính quay quang cùng với khả năng ứng dụng chung của 2,3-butandiol như mô tả trên đây có thể có các ứng dụng

đặc biệt. Ví dụ, D(-) 2,3-butandiol có thể được sử dụng làm chất chống đông vì nó có điểm đông đặc rất thấp. Ngoài ra, D(-) 2,3-butandiol có thể được sử dụng làm chất trung gian cho thuốc và hóa chất nông nghiệp. Tuy nhiên, việc sản xuất D(-) 2,3-butandiol tinh khiết về mặt quang học thông qua quá trình tổng hợp hóa học không được ưu tiên sử dụng vì quá trình tổng hợp và quá trình tách/quá trình tinh chế của nó rất tốn kém. Việc sản xuất D(-) 2,3-butandiol tinh khiết về mặt quang học thông qua quá trình lên men vi sinh vật có các ưu điểm về mặt thương mại (Zeng et al., Curr. Opin. Biotechnol., 22:1, 2011).

Quá trình sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học có thể được thực hiện bằng các vi sinh vật khác nhau thông qua quá trình lên men vi sinh vật và ví dụ cụ thể về vi sinh vật này bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Enterobacter*, chi *Klebsiella*, chi *Bacillus*, chi *Serratia*, và vi sinh vật khác. Vi sinh vật thể đại có trong tự nhiên có nhược điểm ở chỗ chúng chủ yếu tạo ra meso-2,3-butandiol không có hoạt tính quay quang, hoặc ngay cả khi chúng có thể tạo ra các chất đồng phân 2,3-butandiol có hoạt tính quay quang, thì các chất đồng phân này được tạo ra ở dạng hỗn hợp.

*Paenibacillus polymyxa* có thể tạo ra D(-) 2,3-butandiol với độ tinh khiết cao. Tuy nhiên, *Paenibacillus polymyxa* cần các thành phần dinh dưỡng rất đắt và có năng suất và hiệu suất thấp, và do đó nảy sinh vấn đề ở chỗ nó không thể sử dụng nó một cách trực tiếp cho các quá trình ở quy mô công nghiệp hiện hành.

Nhờ các nghiên cứu sâu rộng tập trung vào việc phát triển vi sinh vật tái tổ hợp có hoạt tính quay quang để sử dụng vi sinh vật này trong các quá trình ở quy mô công nghiệp và có thể sản xuất D(-) 2,3-butandiol, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vi sinh vật tái tổ hợp trong đó gen cụ thể được loại bỏ/được thay thế tạo ra D(-) 2,3-butandiol có độ tinh khiết cao với năng suất và hiệu suất cao. Dựa trên phát hiện này, các tác giả đã tạo ra sáng chế.

#### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Mục đích của sáng chế là tạo ra vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất D(-) 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này.

Cách thức giải quyết vấn đề

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol,

trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:

ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và  
nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có khả năng sản xuất D(-) 2,3-butandiol gia tăng và có thể điều chỉnh tỷ lệ của các chất đồng phân trong 2,3-butandiol được tạo ra bằng cách điều chỉnh gen được đưa vào và gen bị kìm hãm.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện con đường sinh tổng hợp của mỗi chất đồng phân 2,3-butandiol trong các chủng sản xuất 2,3-butandiol.

Fig. 2 thể hiện opêron của quá trình tổng hợp 2,3-butandiol liên quan đến gen trong *Klebsiella oxytoca* làm chủng cơ sở.

Fig. 3 thể hiện opêron của quá trình tổng hợp 2,3-butandiol liên quan đến gen trong *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp.

Fig. 4 thể hiện kết quả phân tích sắc ký khí (Gas chromatography - GC) của mỗi chất đồng phân 2,3-butandiol được tạo ra bằng quá trình lên men gián đoạn các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella*.

Fig. 5 thể hiện kết quả sản xuất của mỗi chất đồng phân 2,3-butandiol trong quá trình lên men gián đoạn có cung cấp dinh dưỡng của chủng tái tổ hợp của *Klebsiella* (KoΔLB3).

Fig. 6 thể hiện độ tinh khiết của mỗi chất đồng phân 2,3-butandiol trong quá trình lên men gián đoạn có cung cấp dinh dưỡng của chủng tái tổ hợp của *Klebsiella* (KoΔLB3).

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:

ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và  
nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Sau đây, sáng chế sẽ được một mô tả một cách chi tiết hơn.

### Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol.

Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, ít nhất một gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol có thể bị kìm hãm.

Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat có thể bị kìm hãm.

Tốt hơn là, trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol được thay thế bằng gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol. Tốt hơn nữa là, trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol (cụ thể là, enzym chuyển hóa (R)-axetoin thành meso-2,3-butandiol) được thay thế bằng gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin

thành D(-) 2,3-butandiol (cụ thể là, enzym chuyển hóa (R)-axetoin thành D(-) 2,3-butandiol), và con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat suppressed.

Vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol có thể là vi sinh vật thể đại hoặc vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, và ví dụ về vi sinh vật này có thể bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Enterobacter*, chi *Klebsiella*, chi *Bacillus*, chi *Serratia*, và vi sinh vật khác. Vi sinh vật tốt hơn là vi sinh vật thuộc chi *Klebsiella*, tốt hơn nữa là *Klebsiella oxytoca*.

Tốt hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể tạo ra D(-) 2,3-butandiol có độ tinh khiết cao có nhiều hữu ích hơn đồng thời duy trì các đặc tính sản xuất 2,3-butandiol của chủng hiện hành của *Klebsiella oxytoca*, cụ thể là, độ ổn định của chủng, năng suất, nồng độ sản phẩm, hiệu suất, và đặc tính khác bằng cách loại bỏ gen mã hóa các enzym AR1 (Bud<sub>KO</sub>) và/hoặc AR2 (Dar<sub>KO</sub>) mà là các enzym chuyển hóa 2,3-butandiol (axetoin reductaza) trong *Klebsiella oxytoca* thể đại và chèn gen mã hóa enzym có hoạt tính cao để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol.

Quá trình bổ sung gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol

Gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol có thể là *bdh<sub>pp</sub>*, gen bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 hoặc gen có độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, gen mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 20, gen mã hóa protein có trình tự axit amin với độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 20, gen mã hóa protein *Bdh<sub>pp</sub>*, hoặc gen mã hóa protein có hoạt tính enzym với độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với protein *Bdh<sub>pp</sub>*, và gen khác.

Quá trình bổ sung gen (đưa gen vào) có thể được thực hiện bằng cách thay thế bằng gen cụ thể trên bộ gen của chủng đích hoặc chèn vào trong vị trí cụ thể trên bộ gen của chủng đích. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra hoạt tính mới cho protein bằng cách lựa chọn phương

pháp thích hợp, như thay thế gen cần được loại bỏ trên bộ gen của chủng đích, ví dụ, *budC<sub>Ko</sub>* hoặc *dar<sub>Ko</sub>*, hoặc gen có độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với các gen này, và gen tương tự bằng gen mã hóa protein, cụ thể là, *bdh<sub>PP</sub>*, gen được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, hoặc gen có độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với các gen này, và gen tương tự, hoặc chèn gen mã hóa protein, cụ thể là, gen *bdh<sub>PP</sub>*, gen được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, hoặc gen có độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với các gen này, và gen tương tự vào vị trí mới cụ thể trên bộ gen có thể biểu hiện gen này.

Quá trình kìm hãm gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol

Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, ít nhất một gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol có thể bị kìm hãm. Ví dụ về gen này có thể bao gồm *budC<sub>Ko</sub>*, *dar<sub>Ko</sub>*, gen có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 orSEQ ID NO: 12, hoặc gen có độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 orSEQ ID NO: 12, gen mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 orSEQ ID NO: 11, hoặc gen mã hóa protein có trình tự axit amin với độ tương đồng là 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 11, gen mã hóa protein AR1 hoặc protein AR2, và gen tương tự.

Việc kìm hãm gen có thể không những bao gồm việc kìm hãm gen này mà còn ức chế (kìm hãm) hoạt tính protein được mã hóa bằng gen này. Việc ức chế hoạt tính của protein có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của protein, ức chế hoạt tính enzym, và cách ức chế khác. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể kìm hãm gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol bằng cách lựa chọn phương pháp thích hợp, như loại bỏ gen mã hóa gen hoặc gây ra sự đột biến trong gen (sự đột biến như quá trình kìm hãm sự biểu hiện gen bình thường bằng cách biến đổi, thay thế hoặc loại bỏ một phần trình tự nucleotit hoặc bổ sung một phần trình tự nucleotit), điều hòa sự biểu hiện gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, và cách tương tự khác.

Nếu gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol không bị kìm hãm và gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được bổ sung, thì cả meso-2,3-butandiol và D(-) 2,3-butandiol được tạo ra với tỷ lệ đáng kể. Do đó, có thể tạo ra 2,3-butandiol bao gồm cả meso-2,3-butandiol và D(-) 2,3-butandiol với tỷ lệ đáng kể.

Nếu gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol được thay thế bằng gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol, thì gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol bị kìm hãm cùng với việc bổ sung gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol, nhờ đó biểu hiện tác dụng mong muốn liên quan đến việc nâng cao khả năng tạo ra D(-) 2,3-butandiol.

Quá trình kìm hãm con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn kìm hãm con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat. Lactat dehydrogenaza kiểm soát quá trình chuyển hóa pyruvat thành lactat. Con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat có thể bị kìm hãm bằng cách kìm hãm lactat dehydrogenaza. Việc kìm hãm lactat dehydrogenaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện gen của lactat dehydrogenaza, ức chế hoạt tính enzym của lactat dehydrogenaza, và cách kìm hãm tương tự khác. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể kìm hãm lactat dehydrogenaza bằng cách lựa chọn phương pháp thích hợp, như loại bỏ gen mã hóa lactat dehydrogenaza, ví dụ, *ldhA*, gây ra sự đột biến trong gen (sự đột biến như việc kìm hãm sự biểu hiện gen bình thường bằng cách biến đổi, thay thế hoặc loại bỏ một phần trình tự nucleotit hoặc bổ sung một phần trình tự nucleotit), điều hòa sự biểu hiện gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, và cách kìm hãm tương tự khác.

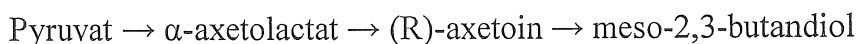
Quá trình sản xuất D(-) 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có con đường để sinh tổng hợp (R)-axetoin như được thể hiện trong Fig. 1. Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, bằng cách bổ sung thêm enzym chuyển hóa (R)-axetoin thành D(-) 2,3-

butandiol, con đường mới chuyển hóa (R)-axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được tạo ra, và con đường chuyển hóa (R)-axetoin thành meso-2,3-butandiol hiện hành bị kìm hãm.

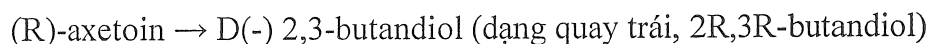
Theo sáng chế, vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol có thể bao gồm các enzym chuyển hóa như  $\alpha$ -axetolactat synthaza ( $\alpha$ -axetolactate synthase - ALS),  $\alpha$ -axetolactat dicarboxylaza ( $\alpha$ -axetolactate dicarboxylase - ALDC), và axetoin reductaza (acetoin reductase - AR), làm thể hiện trong Fig. 1. Opêron (cụm các gen cấu trúc có liên quan về chức năng thường được phân bố liền nhau có chung một cơ chế điều hòa) của quá trình tổng hợp 2,3-butandiol liên quan đến gen được mô tả trong Fig. 2. Mặt khác, trong chủng thể đại của *Klebsiella oxytoca*, pyruvat được chuyển hóa bằng axetolactat synthaza thành  $\alpha$ -axetolactat,  $\alpha$ -axetolactat được chuyển hóa bằng  $\alpha$ -axetolactat dicarboxylaza thành (R)-axetoin, và (R)-axetoin được chuyển hóa bằng axetoin reductaza thành meso-2,3-butandiol, được thể hiện trong con đường 1. Cả AR1 (*BudC<sub>Ko</sub>*) và AR2(*Dar<sub>Ko</sub>*) được mô tả trên đây đều tham gia vào sự biến đổi lẫn nhau giữa (R)-axetoin và meso-2,3-butandiol.

#### Con đường 1



Theo sáng chế, D(-) 2,3-butandiol có thể được tạo ra bằng cách bổ sung thêm enzym xúc tác cho phản ứng được thể hiện trong con đường 2, và enzym này thuộc về họ axetoin reductaza, mà có tính đặc hiệu vị trí khác với tính đặc hiệu vị trí của axetoin reductaza hiện có, cụ thể là, AR1 (*BudC<sub>Ko</sub>*) và AR2 (*Dar<sub>Ko</sub>*).

#### Con đường 2



#### Phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước: ủ môi trường nuôi cấy với vi sinh vật tái tổ hợp

theo sáng chế; và nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này. Phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol có thể còn bao gồm bước thu hoạch D(-) 2,3-butandiol được tạo ra.

#### Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 2,3-butandiol có tỷ lệ thành phần mong muốn của các chất đồng phân 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế. Cụ thể là, nếu gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol không bị kìm hãm và gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được bổ sung, thì 2,3-butandiol bao gồm cả meso-2,3-butandiol và D(-) 2,3-butandiol với tỷ lệ đáng kể được tạo ra. Ngoài ra, trong trường hợp nếu AR1 bị kìm hãm và gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được bổ sung và trong trường hợp nếu AR2 bị kìm hãm và gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được bổ sung, thì lượng được tạo ra của meso-2,3-butandiol và D(-) 2,3-butandiol trong 2,3-butandiol được tạo ra có thể khác nhau. Tương tự, nếu cả AR1 và AR2 bị kìm hãm và gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được bổ sung, lượng được tạo ra của meso-2,3-butandiol bị giảm rất mạnh và tỷ lệ của D(-) 2,3-butandiol trở lên nhiều hơn.

#### Quá trình nuôi cấy

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể được nuôi cấy dưới điều kiện hiếu khí, tốt hơn là dưới điều kiện vi hiếu khí. Ví dụ, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách cấp oxy, cụ thể là không khí, trong quá trình nuôi cấy. Cụ thể hơn, quá trình nuôi cấy được thực hiện bằng cách , nhưng không chỉ giới hạn ở, khuấy. Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường hỗn hợp, và các loại môi trường hỗn hợp không bị giới hạn một cách cụ thể. Rõ ràng là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được chọn một cách phù hợp từ các môi trường hỗn hợp được sử dụng rộng rãi và có bán trên thị trường nếu cần.

#### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ưu điểm và dấu hiệu của sáng chế và phương pháp theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn thông qua các ví dụ sau đây. Tuy nhiên cần phải hiểu rằng sáng

chế không bị giới hạn ở các ví dụ này và có thể được biến đổi theo các cách khác nhau, và các ví dụ này được mô tả để minh họa một cách chi tiết hơn cho sáng chế và giúp người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ sáng chế. Sáng chế sẽ được xác định bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo và các phương án tương đương của nó.

#### Nguyên liệu và phương pháp

Phương pháp điều chế chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta ldhA$  (KO  $\Delta L$ )

Chủng của gen lactat dehydrogenaza (*LdhA*) được loại bỏ *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta ldhA$  (KO  $\Delta L$ ) được tạo cấu trúc như sau. Đầu tiên, để tạo dòng lactat dehydrogenaza của *Klebsiella oxytoca*, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 2) của gen đích *ldhA* (SEQ ID NO: 1) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 3 và 4 bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase chain reaction - PCR). Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 5) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 6 và 7 bằng PCR. Sau đó, vùng tương đồng 1 và 2 được khuếch đại bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này làm mẫu cho PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 8) trong đó vùng tương đồng 1 và 2 được gắn với nhau. Mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng kháng sinh và gen tương tự để nâng cao khả năng tái tổ hợp của gen đích. Ngoài ra, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen *sacB* mã hóa levansucraza để loại bỏ gen kháng kháng sinh được kết hợp trong nhiễm sắc thể (xem, Bảng 1 dưới đây).

Mảnh ADN được tạo ra được chuyển đến *Klebsiella oxytoca* thể đại bằng cách điện di (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 18 kV/cm), trong đó gen đích được loại bỏ bằng cơ chế tái tổ hợp tương đồng bên trong vi sinh vật.

#### Xác định enzym chuyển hóa 2,3-butandiol và gen của nó

Các enzym liên quan đến quá trình tổng hợp 2,3-butandiol và con đường tiêu thụ được sàng lọc bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) và cơ sở dữ liệu NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) dựa trên thông tin về bộ gen của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP. Kết quả là, đã xác định được rằng tất cả các loài thuộc *Klebsiella oxytoca*, thông tin về bộ gen của nó đã biết, có ít nhất hai enzym chuyển hóa 2,3-butandiol (AR1 và AR2).

Trình tự axit amin của AR1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, và trình tự nucleotit của *budC<sub>Ko</sub>* mà mã hóa AR1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Trong khi đó, trình tự axit amin của AR2 được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và trình tự nucleotit của *dar<sub>Ko</sub>* mà mã hóa AR2 được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 (xem, Bảng 2 dưới đây).

Quá trình điều chế chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* $\Delta$ *dar<sub>Ko</sub>*

Để loại bỏ AR2, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 13) của gen đích *dar<sub>Ko</sub>* (SEQ ID NO: 12) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 14 và 15 bằng PCR. Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 16) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 17 và 18 bằng PCR. Sau đó, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 13) và 2 (SEQ ID NO: 16) được khuếch đại bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này làm mẫu cho PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 19) trong đó vùng tương đồng 1 và 2 được gắn với nhau (xem, Bảng 3 dưới đây).

Lactat dehydrogenaza được tạo cấu trúc trên đây (*LdhA*) được loại bỏ *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* (KO $\Delta$ L) được tạo ra. Mảnh ADN được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 được chuyển đến *Klebsiella oxytoca* (KO $\Delta$ L) bằng cách điện di (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 18 kV/cm). Kết quả là, chủng tái tổ hợp của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* $\Delta$ *dar<sub>Ko</sub>* trong đó AR2 (*Dar<sub>Ko</sub>*) được loại bỏ ra khỏi KO  $\Delta$ *ldhA* được tạo cấu trúc.

Ví dụ thực nghiệm 1: Phương pháp điều chế vi sinh vật tái tổ hợp

Chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA budC<sub>Ko</sub>* :: *bdh<sub>pp</sub>* (KO $\Delta$ LB1)

*Bdh<sub>pp</sub>* mà là axetoin reductaza được tạo ra từ *PaeniBacillus polymyxa* là enzym thuộc họ dehydrogenaza/reductaza mạch trung bình. *Klebsiella oxytoca*

tái tổ hợp trong đó *budC<sub>Ko</sub>* làm axetoin reductaza bẩm sinh *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP được thay thế bằng *bdh<sub>Pp</sub>* mà mã hóa *Bdh<sub>Pp</sub>* được tạo cấu trúc như sau. Cụ thể hơn, *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* (KO $\Delta$ L) theo phương pháp sau. Cụm gen của chủng này được mô tả trong Fig. 3. Trình tự axit amin của *PaeniBacillus polymyxa* KCTC 1663 có nguồn gốc từ *Bdh<sub>Pp</sub>* được thể hiện trong SEQ ID NO: 20, và trình tự nucleotit của gen *bdh<sub>Pp</sub>* mà mã hóa *Bdh<sub>Pp</sub>* được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 (xem, Bảng 4 dưới đây).

Đầu tiên, để thay thế trong khung gen *budC<sub>Ko</sub>* (SEQ ID NO: 10) của axetoin reductaza bẩm sinh *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP bằng *bdh<sub>Pp</sub>* (SEQ ID NO: 21) làm gen đích, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 22) của *budC<sub>Ko</sub>* được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 23 và 24. Ngoài ra, *bdh<sub>Pp</sub>* (SEQ ID NO: 21) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 25 và 26. Vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 27) của *budC<sub>Ko</sub>* được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 28 và 29. Sau đó, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 22), *bdh<sub>Pp</sub>* (SEQ ID NO: 21), và vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 27) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các vùng này làm mẫu cho PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 30) trong đó vùng tương đồng 1, *bdh<sub>Pp</sub>*, và vùng tương đồng 2 được gắn với nhau (xem, Bảng 5 dưới đây).

Mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng kháng sinh và gen tương tự để nâng cao khả năng tái tổ hợp của gen đích. Ngoài ra, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen *sacB* mã hóa levansucraza để loại bỏ gen kháng kháng sinh được kết hợp trong nhiễm sắc thể.

Chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* *dar<sub>Ko</sub>* :: *bdh<sub>Pp</sub>* (*Ko* $\Delta$ LB2)

Chủng *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA* *dar<sub>Ko</sub>* :: *bdh<sub>Pp</sub>* (*Ko* $\Delta$ LB2) trong đó *dar<sub>Ko</sub>* làm axetoin reductaza bẩm sinh *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP được thay thế bằng *bdh<sub>Pp</sub>* làm gen đích được tạo cấu trúc như sau. Cụ thể hơn, *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử

dụng *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta dhA$  (Ko  $\Delta dhA$ ) theo phương pháp sau. Cụm gen của chủng này được mô tả trong Fig. 3.

Đầu tiên, để thay thế trong khung  $dar_{Ko}$  (SEQ ID NO: 12) của axetoin reductaza bẩm sinh *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP với  $bdh_{pp}$  (SEQ ID NO: 21) làm gen đích, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 31) của  $dar_{Ko}$  được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 32 và 33. Ngoài ra,  $bdh_{pp}$  (SEQ ID NO: 21) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 34 và 35. Vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 36) của  $dar_{Ko}$  được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự SEQ ID NO: 37 và 38. Sau đó, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 31),  $bdh_{pp}$  (SEQ ID NO: 21), và vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 36) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các vùng này làm mẫu cho PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 39) trong đó vùng tương đồng 1,  $bdh_{pp}$ , và vùng tương đồng 2 được gắn với nhau (xem, Bảng 6 dưới đây).

Mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng kháng sinh và gen tương tự để nâng cao khả năng tái tổ hợp của gen đích. Ngoài ra, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm *sacB* mã hóa levansucraza để loại bỏ gen kháng kháng sinh được kết hợp trong nhiễm sắc thể.

Chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta dhA$   $\Delta dar_{Ko}$   $budC_{Ko} :: bdh_{pp}$  (Ko $\Delta$ LB3)

Chủng của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta dhA$   $\Delta dar_{Ko}$   $budC_{Ko} :: bdh_{pp}$  (Ko $\Delta$ LB3) được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta dhA$   $\Delta dar_{Ko}$  được tạo cấu trúc trên đây làm chủng cơ sở. Phương pháp để thay thế trong khung  $budC_{Ko}$  (SEQ ID NO: 10) làm một trong số các gen mã hóa axetoin reductaza bẩm sinh trong chủng cơ sở với  $bdh_{pp}$  (SEQ ID NO: 21) làm gen đích là giống với phương pháp được sử dụng để tạo cấu trúc chủng của "*Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta dhA$   $budC_{Ko} :: bdh_{pp}$  ( $Ko\Delta$ LB1)" (Fig. 3).

Kiểu gen của các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP được mô tả vắn tắt trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

| Chủng           | Kiểu gen                                                              | Đặc trưng                                                                                                                                                                  |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ko $\Delta$ L   | $\Delta ldhA$                                                         | <i>ldhA</i> được loại bỏ <i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 12133BP (chủng so sánh)                                                                                            |
| Ko $\Delta$ LB1 | $\Delta ldhA \text{ } budC_{Ko} :: bdh_{pp}$                          | <i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 12133BP trong đó <i>ldhA</i> được loại bỏ và <i>budC<sub>Ko</sub></i> được thay thế bằng <i>bdh<sub>pp</sub></i>                            |
| Ko $\Delta$ LB2 | $\Delta ldhA \text{ } dar_{Ko} :: bdh_{pp}$                           | <i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 12133BP trong đó <i>ldhA</i> được loại bỏ và <i>dar<sub>Ko</sub></i> được thay thế bằng <i>bdh<sub>pp</sub></i>                             |
| Ko $\Delta$ LB3 | $\Delta ldhA \text{ } \Delta dar_{Ko} \text{ } budC_{Ko} :: bdh_{pp}$ | <i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 12133BP trong đó <i>ldhA</i> và <i>dar<sub>Ko</sub></i> được loại bỏ và <i>budC<sub>Ko</sub></i> được thay thế bằng <i>bdh<sub>pp</sub></i> |

Ví dụ thực nghiệm 2: Việc sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men gián đoạn

Chủng tái tổ hợp được tạo cấu trúc trong Ví dụ thực nghiệm 1 được nuôi cấy, nhờ đó sản xuất 2,3-butandiol. Đối với mẫu đối chứng để so sánh, *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta ldhA$  (KO $\Delta$ L) được sử dụng.

250 ml của môi trường hỗn hợp chứa 9 g/L glucoza (50mM, glucoza) được ủ với mỗi chủng tái tổ hợp, sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Dung dịch nuôi cấy tạo thành được phun vào 3 L của môi trường hỗn hợp, mà sau đó được cho lên men. Điều kiện lên men như sau: điều kiện vi hiếu khí (tốc độ sục khí 1 vvm, tốc độ khuấy 400 vòng/phút), 90 g/L nồng độ glucoza ban đầu, độ pH là 6,8, nhiệt độ nuôi cấy là 37°C. Trong khi lên men, NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mẫu được tạo ra trong khi lên men bằng cách sử dụng *Klebsiella* tái tổ hợp. Tốc độ phát triển được xác định bằng cách đo OD600 (mật độ quang) của mẫu thử. Mẫu thử được ly tâm ở 13,000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó tiến hành phân tích nồng độ của chất chuyển hóa và 2,3-butandiol trong phân dịch nổi bề mặt bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC). Ngoài ra, các chất đồng phân 2,3-butandiol được tạo ra được tiến hành phân tích bằng sắc ký khí (GC).

Kết quả là, chủng tái tổ hợp được tạo cấu trúc trong Ví dụ thực nghiệm 1 có sự phát triển và năng suất tương tự với chủng KO $\Delta$ L dùng làm chủng so sánh. Ko $\Delta$ LB3 có đặc tính tốt nhất liên quan đến việc sản xuất D(-) 2,3-

butandiol. Cụ thể là, chủng trong đó một axetoin reductaza *budC<sub>Ko</sub>* trong số hai axetoin reductaza trong *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP được thay thế bằng *bdh<sub>Pp</sub>*, và *dar<sub>Ko</sub>* dùng làm axetoin reductaza khác trong *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP được loại bỏ có năng suất, nồng độ sản phẩm, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol tương tự với chủng so sánh đồng thời tạo ra D(-) 2,3-butandiol với độ tinh khiết (cụ thể là, tỷ lệ) là 97% hoặc cao hơn (Fig. 4, Bảng 8).

Bảng 8

| Chủng  | 2,3-butandiol các chất đồng phân |                |      |                |      |                | Tổng hiệu suất<br>(g/g) |
|--------|----------------------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|-------------------------|
|        | D(-)                             |                | L(+) |                | meso |                |                         |
|        | g/L                              | % <sup>a</sup> | g/L  | % <sup>a</sup> | g/L  | % <sup>a</sup> |                         |
| KoΔL   | 0,2                              | 0,8            | 2,0  | 6,9            | 26,8 | 92,3           | 0,32                    |
| KoΔLB1 | 25,1                             | 90,0           | 1,2  | 4,4            | 1,6  | 5,6            | 0,32                    |
| KoΔLB2 | 6,5                              | 22,3           | 3,6  | 12,3           | 19,1 | 65,4           | 0,34                    |
| KoΔLB3 | 26,1                             | 97,4           | 0    | 0              | 0,7  | 2,6            | 0,31                    |

<sup>a</sup>tỷ lệ của các chất đồng phân 2,3-butandiol

Ví dụ thực nghiệm 3: Việc sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men gián đoạn có cung cấp dinh dưỡng

Chủng của *KoΔLB3* (*Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP  $\Delta$ *ldhA*  $\Delta$ *dar<sub>Ko</sub>* *budC<sub>Ko</sub>* :: *bdh<sub>Pp</sub>*) mà được xác định là tốt nhất liên quan đến năng suất tạo ra D(-) 2,3-butandiol trong số các chủng được phân tích để xác định năng suất tạo ra D(-) 2,3-butandiol trong Ví dụ thực nghiệm 2 được tiếp tục nghiên cứu về năng suất của nó bằng quá trình lên men gián đoạn có cung cấp dinh dưỡng.

250 ml của môi trường hỗn hợp chứa 9 g/L glucoza (50mM, glucoza) được ủ với chủng tái tổ hợp *KoΔLB3*, sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Dung dịch nuôi cấy tạo thành được phun vào 3 L của môi trường hỗn hợp, mà sau đó được cho lên men. Điều kiện lên men như sau: điều kiện vi hiếu khí (tốc độ sục khí 1 vvm, tốc độ khuấy 400 vòng/phút), 90 g/L nồng độ glucoza ban đầu, độ pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy là 37°C. Trong khi lên men, NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Nếu glucoza nồng độ trong quá trình lên men giảm đến 10 g/L hoặc nhỏ hơn, dung dịch glucoza nồng độ 700 g/L hoặc cao hơn được bổ sung để cung cấp nguồn cacbon bổ sung. Mẫu được tạo ra

trong khi lên men bằng cách sử dụng *Klebsiella* tái tổ hợp. Tốc độ phát triển được xác định bằng cách đo OD600 (mật độ quang) của mẫu thử. Mẫu thử được ly tâm ở 13,000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó tiến hành phân tích nồng độ của chất chuyển hóa và 2,3-butandiol trong phần dịch nổi bề mặt bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Ngoài ra, các chất đồng phân 2,3-butandiol được tạo ra được tiến hành phân tích bằng sắc ký khí (GC).

Kết quả là đã xác định được rằng độ tinh khiết của các chất đồng phân D(-) 2,3-butandiol được duy trì ở 96,4% hoặc cao hơn trong toàn bộ quá trình lên men, hiệu suất là 44%, năng suất là 2,0 g/L/h, và nồng độ cuối của D(-) 2,3-butandiol là 98g/L (Fig. 5 và Fig. 6).

#### Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này.

#### Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit của gen *ldhA*. SEQ ID NO: 2 là vùng tương đồng 1 của gen *ldhA*, và SEQ ID NO: 3 và 4 là các đoạn nối để khuếch đại nó. SEQ ID NO: 5 là vùng tương đồng 2 của gen *ldhA*, và SEQ ID NO: 6 và 7 là các đoạn nối để khuếch đại bằng PCR của nó. SEQ ID NO: 8 là mảnh ADN trong đó là vùng tương đồng 1 và 2 của gen *ldhA* được gắn với nhau.

SEQ ID NO: 9 là trình tự axit amin của AR1, và SEQ ID NO: 10 là trình tự nucleotit của gen *budC<sub>Ko</sub>* mà mã hóa AR1.

SEQ ID NO: 11 là trình tự axit amin của AR2, và SEQ ID NO: 12 là trình tự nucleotit của gen *dar<sub>Ko</sub>* mà mã hóa AR2.

SEQ ID NO: 13 là vùng tương đồng 1 của *dar<sub>Ko</sub>* làm gen đích, và SEQ ID NO: 14 và 15 là các đoạn nối để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 16 là vùng tương đồng 2 của *dar<sub>Ko</sub>* làm gen đích, và SEQ

ID NO: 17 và 18 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 19 là mảnh ADN trong đó là vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 13) và vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 16) của *dar<sub>Ko</sub>* được gắn với nhau.

SEQ ID NO: 20 là trình tự axit amin của *Bdh<sub>pp</sub>* có nguồn gốc từ *PaeniBacillus polymyxa* KCTC 1663, và SEQ ID NO: 21 là trình tự nucleotit của gen *bdh<sub>pp</sub>* mà mã hóa *Bdh<sub>pp</sub>*.

SEQ ID NO: 22 là vùng tương đồng 1 của *budC<sub>Ko</sub>*, và SEQ ID NO: 23 và 24 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 25 và 26 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của *bdh<sub>pp</sub>* (SEQ ID NO: 21).

SEQ ID NO: 27 là vùng tương đồng 2 của *budC<sub>Ko</sub>*, và SEQ ID NO: 28 và 29 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 30 là mảnh ADN trong đó là vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 22) của *budC<sub>Ko</sub>*, *bdh<sub>pp</sub>* (SEQ ID NO: 21), và vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 27) của *budC<sub>Ko</sub>* được gắn với nhau.

SEQ ID NO: 31 là vùng tương đồng 1 của *dar<sub>Ko</sub>*, và SEQ ID NO: 32 và 33 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 34 và 35 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của *bdh<sub>pp</sub>* (SEQ ID NO: 21).

SEQ ID NO: 36 là vùng tương đồng 2 của *dar<sub>Ko</sub>*, và SEQ ID NO: 37 và 38 là các đoạn mồi dùng để khuếch đại bằng PCR của nó.

SEQ ID NO: 39 mảnh ADN trong đó là vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 31) của *dar<sub>Ko</sub>*, *bdh<sub>pp</sub>* (SEQ ID NO: 21) và vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 36) của *dar<sub>Ko</sub>* được gắn với nhau.

### YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol được đưa vào trong vi sinh vật có con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, và ít nhất một gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol bị kìm hãm.
2. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol là *bdh<sub>pp</sub>*.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 21.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol là gen mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó *budC<sub>Ko</sub>* hoặc *dar<sub>Ko</sub>* bị kìm hãm.
6. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó gen mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 11 bị kìm hãm.
7. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó gen có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 12 bị kìm hãm.
8. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

9. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị kìm hãm.
10. Phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:  
 ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9; và nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.
11. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol được thay thế bằng gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol.
12. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol là *bdh<sub>pp</sub>*.
13. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 21.
14. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành D(-) 2,3-butandiol gen mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.
15. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol là *budC<sub>Ko</sub>* hoặc *dar<sub>Ko</sub>*.
16. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol là gen mà mã hóa protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 11.
17. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 12, trong đó

gen mã hóa enzym để chuyển hóa axetoin thành meso-2,3-butandiol gen có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 12.

18. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

19. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất D(-) 2,3-butandiol theo điểm 11, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị kìm hãm.

20. Phương pháp sản xuất D(-) 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:

    ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 19;  
    và  
    nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Fig. 1

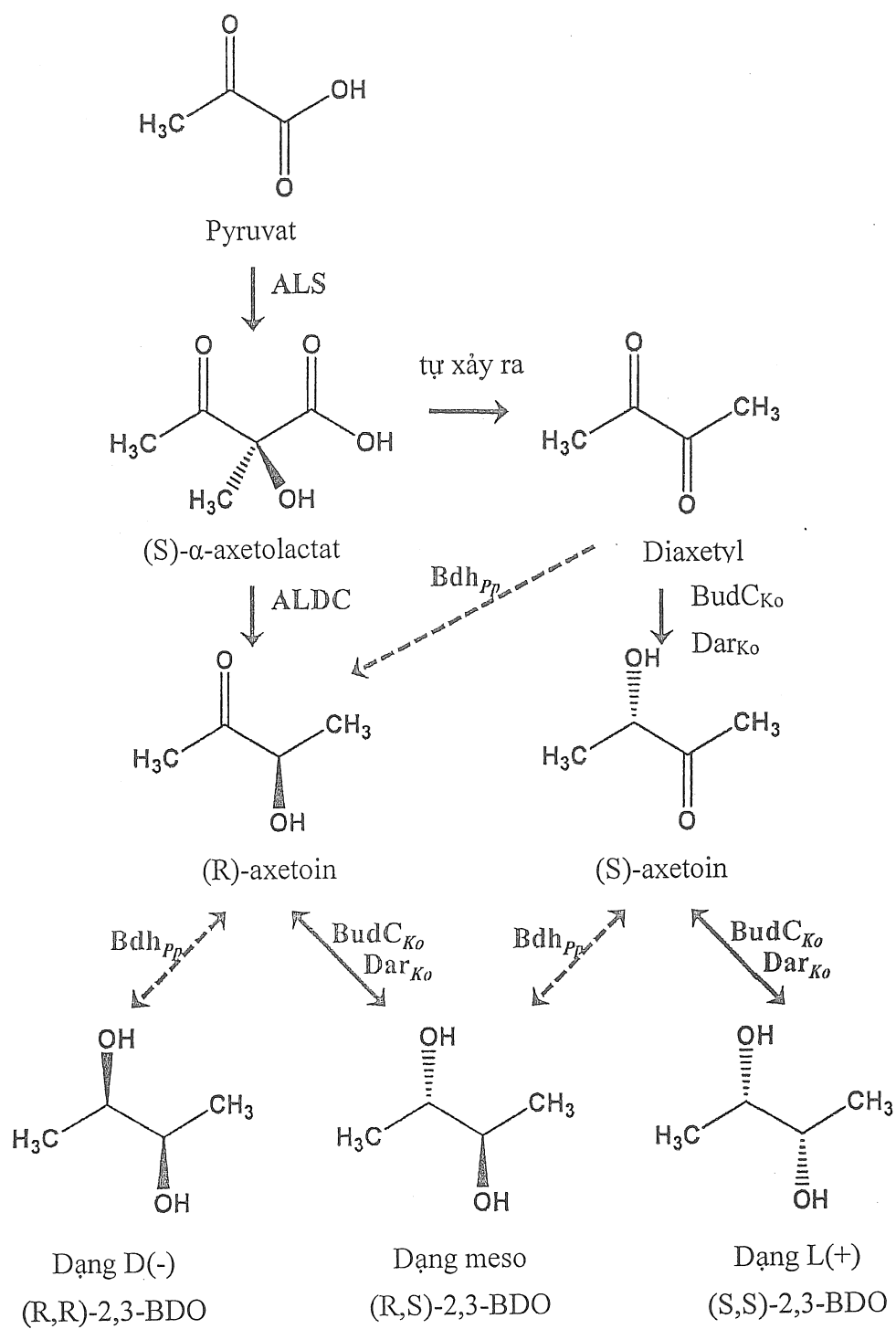


Fig. 2

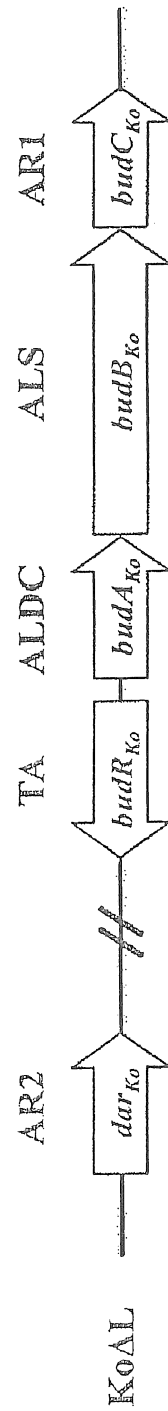


Fig. 3

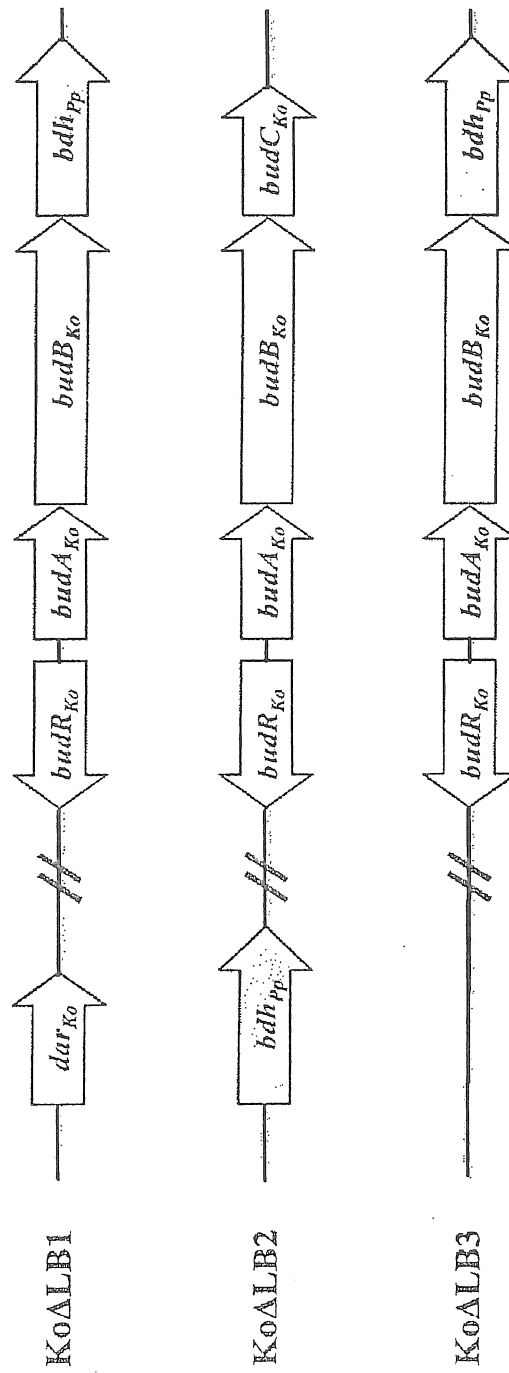
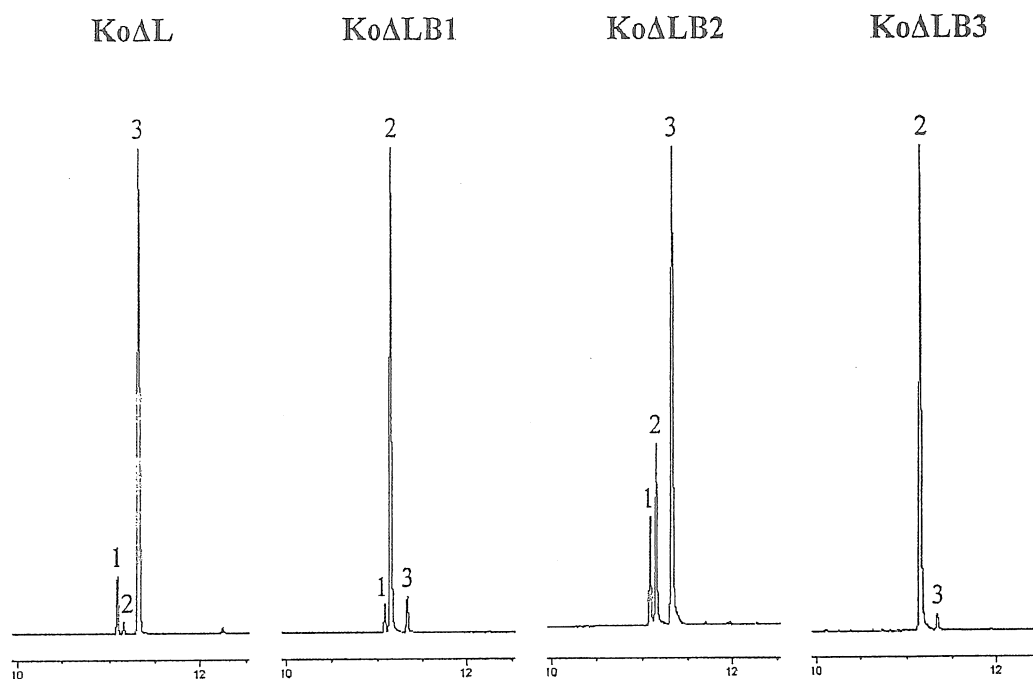


Fig. 4



- 1: L(+) 2,3-Butandiol (2S, 3S- Butandiol)  
2: D(+) 2,3-Butandiol (2R, 3R- Butandiol)  
3: meso 2,3-Butandiol (2R, 3S- Butandiol)

Fig. 5

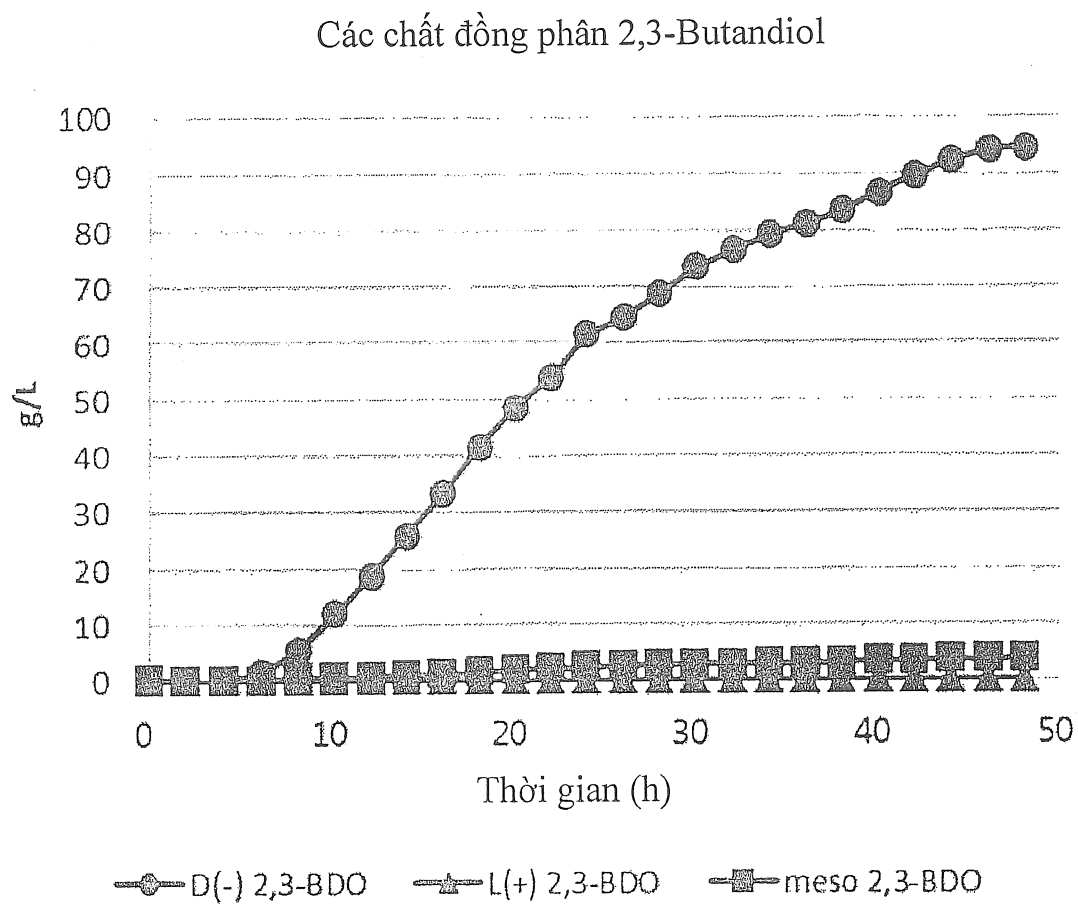
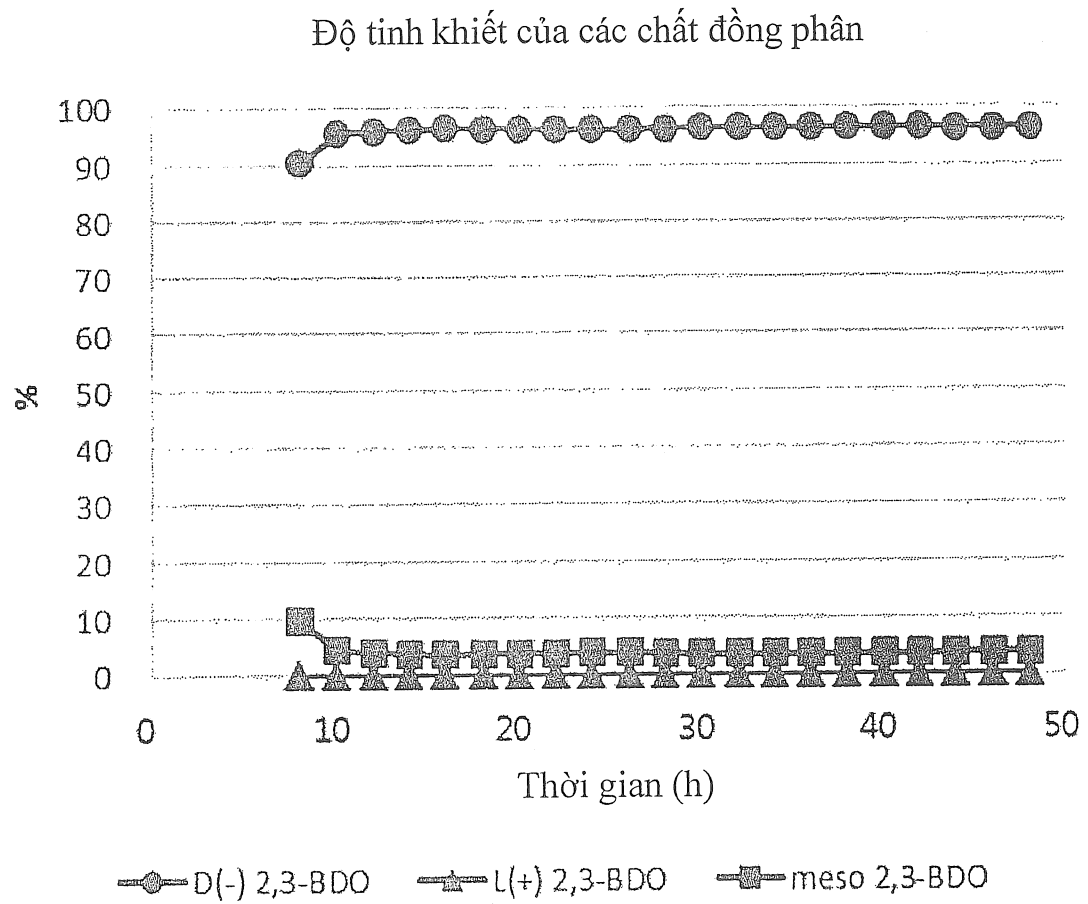


Fig. 6



Bảng 1

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1            | ATGAAAATCGCTGTGTATAGTACAAAACAGTACGACAAGAAGTATCTGCAGCATGTTAATGATGCAT<br>ATGGCTTTGAACTGGAGTTTTTTGACTTCCTGCTAACCAGAAAAACCGCCAAAACCGCCAACGGCTG<br>TGAAGCGGTGTGTATCTTCGTAAACGATGACGGTAGCCGCCGGTACTTGAAGAACTGAAAGCCCA<br>CGGCGTGCACTACATCGCGCTGCGCTGCGCGGGGTTCAACAACGTTGACCTCGATGCCGCCAAAGA<br>GCTGGGCCTGCGGGTGGTGCCTGCCGCTCCCGGCTACTCGCCGAAGCGGTGCTGAGCACGCGATCG<br>GCATGATGATGTCGCTGAACCGCCGATTACCGTGCCTATCAGCGCACCCGCGACGCGAACTTCTC<br>TCTGGAAGGGCTGACCGGTTTCACCATGCACGGTAAAACCGCCGGCGTTATTGGCACCGGTAAAAT<br>CGGCGTGCCTCGCTGCGCATTCTAAAGGCTTCGGTATGCGTCTGCTGGCGTTTGATCCCTACCCA<br>AGCGCCGCCGCTGGATATGGGCGTGGAGTATGTCGATCTTGAACCTGTACCGGGAGTCCGAT<br>GTTATCTCACTGCACTGCCCACTGACCGATGAAAACCTACCATTTGCTGAACCATGCCGCTTCGATCG<br>CATGAAAGACGGGGTATGATCATCAACACCGCCGCGCGCTCATCGATTCGACGGCAGCGAT<br>CGACGCCCTGAAGCATCAGAAAATTGGCGCGCTGGGGATGGACGTGTATGAGAACGAACGCGATCT<br>GTTCTTTGAAGATAAGTCTAATGACGTGATTACAGGATGATGTGTTCCGCGTCTCTCCGCTGCCATA<br>ACGTCCTGTTTACCGGTACCGAGCGTTTCTGACCGCGGAAGCGTTGATCAGATTTTCGAAACCAC<br>CCTCGACAACCTGCGTCAAGTGGATGCAGGCGAAACCTGTCTTAACGCACTGGTCTGA |
| 2            | ATGACGTTTCGCTAAATCCTGCGCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACTGCTGTTTCG<br>GCACCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTAAATGTGGATGAGCGCCAGCCTCGGCGCTATCG<br>GCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGTACCGGTACCATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAA<br>TGCCGAACGCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTGCGCGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCC<br>GCTTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTCCGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTGCGCAGT<br>TTCAGCTCGCCAACGTACGCTCCGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCTGCTGGCGCCAGGCGGTTAAGC<br>CTCAGCTTTTGATGAAAGGTATTGTCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCATATGCTCTAGAATTATTA<br>CTATAACCTGCTGATTAACTAGTTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTAT<br>CACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 3            | Ko_IdhA_FP1 – CACGGATCCATGACGTTTCGCTAAATCCTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 4            | Ko_IdhA_RP1 - GCACAAAAGGGCAAGGAAAAAAGACTTTTCTCCAGTGATA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5            | TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTCCTCCCTTCGCGGGGGGCACATTCAGATAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Bảng 1 (tiếp tục)

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | TCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAATACGATAAATATTTATGGAGATT<br>AAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGGGCTGCGTTTATAACAGCAAGG<br>TGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCAACCGTTTTGTGCTGACCAGCGTTAACGGGCAGCCGCTG<br>AATGCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTCGGCGAAAAGATGCCATTACGGGCAAGATGTCTGT<br>TTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAGCGGCACGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAG<br>AGCTGGCAATGACCCGCATGCTCTGCACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAA<br>ATGCTGCGCGAAGGCGCGCAGGTCGACCTGACGGAAACGCAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACCAG<br>ACGCTGGTGTATAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 6 | Ko_IdhA_FP2 - TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7 | Ko_IdhA_RP2 - CCTGCGGCCGCTAATTATTAATTCATCAGGTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 8 | ATGACGTTTCGCTAAATCCTGCGCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACTGCTGTTTCG<br>GCACCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCCAGCCTCGGCGCTATCG<br>GCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGTACCGTACCGGTACCATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAA<br>TGCCGAACGCCTCGCTCGGGCCAGTTGTTCTGCGCCGCCACGGCGCTGGGCAGTCTTTTTAGCC<br>GCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGCCGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTCTGGCAGT<br>TTCAGCTCGCCAACGTCAGTCCGGGTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGCGTTAAGC<br>CTCAGCTTTTGATGAAAGGTATTGTCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTATTA<br>CTATAACCTGCTGATTAACTAGTTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGCTATTAT<br>CACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTCGCGGGGGGCACATTCAGATAATCC<br>CCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAATACGATAAATATTTATGGAGATTAAA<br>TGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGGGCTGCGTTTATAACAGCAAGGTGT<br>CGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCAACCGTTTTGTGCTGACCAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAAT<br>GCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTCGGCGAAAAGATGCCATTACGGGCAAGATGTCTGTTTC<br>AGGTAATATGTGCAACCGCTTCAGCGGCACGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAG<br>CTGGCAATGACCCGCATGCTCTGCACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAAT<br>GCTGCGCGAAGGCGCGCAGGTCGACCTGACGGAAACGCAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACCAGAC<br>GCTGGTGTATAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA |

Bảng 2

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9            | MKKVALVTGAGQGIGKAIALRLVKDGFVAIAIDYNDATAQAVADEINRSGGRALAVKVDVSQR<br>DQVFAAVEQARKGLGGFDVIVNAGVAPSTPIEEIREEVIDKVYNINVKGVIWGIQAAVEAFKKE<br>GHGGKIINACSQAGHVGNP ELAVYSSSKFAVRGLTQTAARDLAHLGITVNGYCPGIVKTPMWAE<br>IDRQVSEAAGKPLGYGTQEFKRITLGRLEPEDVAACVSYLAGPDSNYMTGQSLIDGGMVFN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 10           | ATGAAAAAAGTCGCACTCGTCACCGGCGCGGGCCAGGGTATCGGTAAAGCTATCGCCCTTCG<br>TCTGGTGAAAGATGTTTTGCCGTGGCTATCGCCGATTATAACGACGCCACCGCGCAGGCGGT<br>CGCTGATGAAATTAACCGCAGCGGCGCGCGGCGCTAGCGGTGAAGGTGGATGTGTCTCAA<br>CGCGATCAGTTTTTGCCGCCGTGAACAGGCGCGCAAGGGTCTCGGCGTTTTGACGTGAT<br>CGTCAACAACGCCGGGGTTGCGCCCTCCACACCAATCGAAGAGATTGCGGAGGAGGTGATC<br>GATAAAGTCTACAATATCAACGTTAAAGGCGTTATCTGGGGCATCCAGGCCGCGGTAGAGGC<br>GTTTAAAAAAGAGGGCCACGGCGGCAAAATTATCAACGCCTGCTCCCAGGCGGGCCATGTA<br>GGTAACCCGGAGCTGGCGGTCTATAGCTCCAGTAAATTGCCGTGCGCGGCTGACGCAAAC<br>CGCCGCCGCGATCTGGCGCATCTGGGGATTACCGTAAACGGCTACTGCCCGGGATCGTCA<br>AAACCCCAATGTGGGCGGAAATTGACCGCCAGGTTCCGAAGCGGCGGGTAAACCGCTGGG<br>CTACGGAACCCAGGAGTTCGCCAACGCATTACCCTGGGCGGCTATCCGAGCCGGAAGAC<br>GTCGCAGCCTGCGTCTTATCTCGCCGGTCCGGACTCCAATTATATGACCGGCCAATCGCTGC<br>TGATCGATGGCGGCATGGTATTTAAC |
| 11           | MAIENKVALVTGAGQGIGRGIALRLAKDGASVMLVDVNPEGIAAVAAEVEALGRKAATFVANIA<br>DRAQVYAAIDEAEKQLGGFDIIVNNAGIAQVQALADVTPEEVDRI MRINVQGT LWGIQAAAKK<br>FIDRQQKGKIINACSIAGHDGFALLGVYSATKFVRALTQAAAKEYASRGITVNAYCPGIVGTGM<br>WTEIDKRFAETGAPVGETYKKYVEGIALGRAETPDDVASLVSYLAGPDSDYVTGQSILIDGGIVYR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 12           | ATGGCTATCGAAAATAAAGTTGCGCTGGTAACCGGCGCCGGTCAGGGCATTGGCCGCGGTAT<br>TGCGTTGCGTCTGGCCAAAGACGGCGCGTCGGTGATGCTGGTCGACGTGAACCCTGAAGGGA<br>TTGCCCGCTGCCGCCGAAGTGAAGCGCTGGGACGCAAAGCAGCCACCTTCGTCGCTAA<br>CATCGCCGATCGCGCGCAGGTGTACGCCGCCATTGATGAAGCGGAAAAACAGCTGGGCGGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Bảng 2 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TTGATATTATCGTGAACAACGCCGGGATCGCCCAGGTTTCAGGCGCTGGCCGATGTGACGCCT<br>GAAGAAGTGGACCGCATCATGCGCATCAACGTTCAAGGTACCCTGTGGGGTATTCAGGCGGC<br>GGCGAAAAAATTCATCGATCGTCAGCAGAAAGGGAAAATCATCAACGCCTGCTCTATCGCCG<br>GTCATGATGGTTTCGCGCTGCTGGGCGTTTATTCCGCCACCAAATTTGCCGTACGCGCCCTGA<br>CGCAGGCGGCGGCGAAGGAGTATGCCAGCCGCGGCATTACGGTTAATGCCTACTGTCCGGG<br>GATTGTGGGAACCGGGATGTGGACCGAAATCGATAAGCGCTTTCGCGAAATTACCGGTGCGC<br>CGGTGGGCGAAACTTATAAAAAATACGTTGAAGGCATCGCCCTTGCGCGCGCCGAAACGCC<br>GGACGATGTGGCAAGCCTGGTCTCTTATCTGGCAGGCCCGGATTCCGATTATGTTACCGGTCA<br>GTCGATTCTGATCGATGGCGGTATTGTTTACCGT |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bảng 3

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13           | GGAGGTCGGCCGGAAGCTCGCCTTGCAGCAGCTGCAGAAACGACGGGCTCCACCCCTGCCACAAG<br>GGCCGCAGCGCCTCCTGCAGATAGCGTATAAACAGTAGCGGCGCGTTGTATCCTCTTCAAGGCTCA<br>GCCAGGCCAGCGCATCCCCTTGTGGAAGGCGGTGTCGATACCACTGCGCCAGCAGGGTGTTTTGC<br>CAAATCCGGCGGGCGCGCGCACCAGGGTTAAACGGCGGGAGACGGCGGCGTCGAGGCGCTGTAG<br>CAGGCGCTCCCGCGATAGCAGACTTCCGGCGTACGGGGCGGCGTAAAGCGCGTGGAGATAAGCG<br>GCAGCGTCCCCGTGAAGCGTAAAGGTTCTGATGAACAAGCGCTGCCAGCGCATCATCCCGGAGG<br>ATAAAAAGGCCATACCACGATTACTCTTAATCCAGTCCGTACGCTCATTATCCCCCCCATCAGGGG<br>GGTAGGCCACGTTATCGCGCCGATAGAGTAGTGCCATTCGCCGAGCGGCTACGACGACATCGG<br>CCGCGGGCCTCCCTAGTTTATTAATCAGTACAAGGTGAGTACAGACATGGCTATCGAAAATAAAGTT<br>GCGACCGGTCAGTCGATTCTGATCGATG |
| 14           | TCTAGAGGATCCGGAGGTCGGCCGGAAGCTCGCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 15           | CATCGATCAGAATCGACTGACCGGTCGCAACTTTATTTTCGATAGCCATGTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 16           | GACATGGCTATCGAAAATAAAGTTGCGACCGGTCAGTCGATTCTGATCGATGGCGGTATTGTTTACC<br>GTTAAGGGATAAACCCGGCGCAGAACGCGCCGGGTTTTGCGGGGTTACGCGTTAGCCGCGGGCTC<br>CTGCGGCTTGTGCTACGGGTGTTTTCCAGCATCCGGCGAACCAGGAACAATCAGCAGGCACAGCAC<br>CGCGGCGCAGATCAGCAGCGCAATAGAGCAGCGTGCGAACAGGTCGGGCAGCATATCCAGTGAT<br>CGGCCTTCAGTGACCGCCAATCAGACCCGCCAGGTTCCCCAGGGCGCTGGCGCAGAACCACA<br>GCCCCATCATCTGGCCGCGCATTCTTCCGGCGCCAGCAGCGTCATGGTCGCGAGGCCAATCGGGC<br>TGAGGCACAGCTCGCCAGCGTCAGCATCAGAATACTGCCACCAGCCACATCGGCGAGACGCCCG<br>CGCCGTTGTTGCTCAGGACGTTTTGCGCCGCCAGCATCATCAGGCCAAAGCCCGCCGCGCATA<br>AAATACCGATAACAACTTGGTGATGCTGCTCGGACGCACGTTTTTACGCGCCAGCGCAGGCCACG<br>CCCAGCTAAATACC                  |
| 17           | GACATGGCTATCGAAAATAAAGTTGCGACCGGTCAGTCGATTCTGATCGATG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 18           | ATCGCGGCCGCGGTATTAGCTGGGCGTGGCCTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 19           | GGAGGTCGGCCGGAAGCTCGCCTTGCAGCAGCTGCAGAAACGACGGGCTCCACCCCTGCCACAAG<br>GGCCGCAGCGCCTCCTGCAGATAGCGTATAAACAGTAGCGGCGCGTTGTATCCTCTTCAAGGCTCA<br>GCCAGGCCAGCGCATCCCCTTGTGGAAGGCGGTGTCGATACCACTGCGCCAGCAGGGTGTTTTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

Bảng 3 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAAATCGGCGGGCGCGCGCACCAGGGTTAAACGGCGGGAGACGGCGGCGTCGAGGCGCTGTAG<br>CAGGCGCTCCCGGATAGCAGACTTTCGGCGTACGGGGCGGCGTAAAGCGCGTGAGATAAGCG<br>GCAGCGTCCCCGTGAAGCGTAAAGGTTCTGATGAACAAGCGTGCCAGCGCATCATCCGCCGAGG<br>ATAAAAAGGCCATACCACGATTACTCTTAATCCAGTCCGTACGCTCATTATCCCCCATCAGGGG<br>GGTAGGCCACGCTTATCGCGCCCGATAGAGTAGTGCCATTGCGCGCAGCGGCTACGACGACATCGG<br>CCGCGGGCCTCCCTAGTTTATTAATCAGTACAAGGTGAGTACAGACATGGCTATCGAAAATAAAGTT<br>GCGACCGGTCAGTCGATTCTGATCGATGGCGGTATTGTTTACCGTTAAGGGATAAACCCGGCGCAGA<br>ACGCGCCGGGTTTTTGCGGGGTTACGCGTTAGCCGCGGGCTCCTGCGGCTTGTCGCTACGGGTGTTT<br>TCCAGCATCCGGCGAACCAGGAACAATCAGCAGGCACAGCACCGCGGCGCAGATCAGCAGCGCAAT<br>AGAGCAGCGTGCGAACAGGTGCGGCAGCATATCCAGCTGATCGGCCTTACGTGACCGCCAATCAG<br>ACCCGCCGCCAGGTTCCCCAGGGCGCTGGCGCAGAACCACAGCCCCATCATCTGGCCGCGCATTCT<br>TTCCGGCGCCAGCAGCGTCATGGTCGCGAGGCCAATCGGGCTGAGGCACAGCTCGCCAGCGTCA<br>GCATCAGAATACTGCCACAGCCACATCGGCGAGACGCCCCGCGCGTGTGTTGCTCAGGACGTTTT<br>GCGCCGCCAGCATCATCAGGCCAAAGCCCGCGCCGCGCATAAAATACCGATAACAACTTGGTGA<br>TGCTGCTCGGACGCACGTTTTTACGCGCCAGCGCAGGCCACGCCAGCTAAATACC |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bảng 4

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20           | <p>             MQALRWHGVKDLRLNIEQPAALPGVKIKVEWCGICGSDLHEYVAGPIFIPENAQHPLTGEKA<br/>             PIVMGHEFSGQVVEIGEGVTQIQVGDRVVEPVFACGECDACRQGKYNLCDKMGFLGLAGGG<br/>             GGFSEYVADEHMHKIPESVSFEQALVEPSAVALYAVRQSQLKVGDKAVVFGAGPIGLLVIEA<br/>             LKASGASEIYAVELSEERKAKAEELGAIVLDPKTYDVVEELHKRTNGGVDVAYEVTGVPPVLTQAIE<br/>             STKISGQIMIVSIFEKEAPIKPNINVMKERNLTGIIGYRDVFPAVISLMEKGYFPADKLVTKRILEEVI<br/>             EQGFEGLLKEKNQVKILVSPKA           </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 21           | <p>             ATGCAAGCATTGAGATGGCATGGAGTAAAAGATTTACGTTTGGAAAACATTGAGCAACCCGC<br/>             TGCTCTTCCAGGAAAAGTAAAAATCAAAGTAGAATGGTGTGGCATTGCGGAAGTGATCTTCA<br/>             CGAATATGTAGCAGGACCGATCTTATTCTGAAAACGCTCAGCATCCACTGACTGGCGAAAA<br/>             AGCTCCGATTGTGATGGGACATGAATTTCTGGACAAGTCGTTGAAATCGGTGAAGGTGTAAC<br/>             TAAAATTCAGGTTGGCGACCGGTAGTCGTAGAACCGGTTTTTGCATGTGGAGAATGTGATGC<br/>             ATGTAGACAAGGCAAATATAACCTTTGCGATAAAATGGGCTTCTCGGTTTGGCAGGCGGCG<br/>             GCGGTGGATTTTCTGAATATGTCGCAGCTGACGAGCACATGGTTCACAAAATCCAGAAAGC<br/>             GTATCCTTCGAGCAAGGCGCTTTGGTAGAGCCTTCGGCCGTTGCTTTGTACGCTGTACGTCAA<br/>             AGCCAACTGAAAGTCGGCGACAAAGCTGTCGTGTTTGGCGCTGGTCTATCGGATTGCTGGTT<br/>             ATTGAAGCGTTGAAAGCTTCGGGCGCATCTGAGATTTATGCAGTAGAGCTTCCGAGGAGCG<br/>             TAAAGCTAAAGCTGAAGAGCTGGGTGCTATTGTGCTTGATCCTAAAACCTTATGATGTTGTGGAA<br/>             GAACTGCACAAACGGACCAACGGTGGCGTAGATGTAGCCTATGAAGTCACTGGAGTACCTCC<br/>             TGTGCTGACTCAAGCGATTGAATCCACTAAAATTAGCGGACAAATCATGATCGTCAGCATTTT<br/>             GAAAAAGAAGCTCCAATCAAACCGAACAATATCGTTATGAAGGAACGCAATCTGACTGGTATT<br/>             ATCGGCTACCGTGATGTATTCCCGCTGTATCAGCTTGATGGAAAAAGGGTATTTCCTGCTG<br/>             ACAAGCTTGTGACCAACGTATTAAGCTCGAAGAAGTAATCGAGCAAGGTTTGAAGGTCTC<br/>             CTGAAAGAAAAAATCAGGTAAAATCCTGGTATCTCCGAAAGCC           </p> |

Bảng 5

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 22           | CCGCATACCGGCAAAGCGGGCGTCGCGCTGGTCACGTCCGGACCGGGCTGCTCTAACCTG<br>ATTACCGGGATGGCAACGGCCAATAGCGAAGGCGACCCGGTGGTGGCGCTGGGCGGCGCG<br>GTAAAACGCGCCGACAAGGCCAAACAGGTGCACCAGAGTATGGATACGGTGACGATGTTTA<br>GCCCCGGTGACCAAATACTCGGTGGAAGTCACCGCGCCGGAAGCGCTGGCGGAAGTTGTCTC<br>CAACGCGTTTCGTGCAGCCGAGCAGGGACGCCCCGGCAGCGCCTTCGTGAGCCTGCCGAG<br>GACGTGGTCGACGGGCCGGTCCACGCCAGGGTTCTGCCCGCCGGCGATGCGCCGAGACCG<br>GCGCGGGCGCCGGACGACGCCATTGCGCGAGTCGCGAAGATGATTGCCGGCGCGAAAAATCC<br>GATATTTCTGCTCGGCCTGATGGCCAGCCAGACGGAAAAACAGCGCGGCGCTGCGCGAATTG<br>CTGAAAAAAGTCATATCCCGGTGACCAGCACCTATCAGGCCGCCGGCGCAGTCAATCAGGA<br>TCACTTTACCCGCTTCGCCGACGGTTGGTCTGTTCAACAACCAGGCAGGGGATCGACTCC<br>TGCATCTCGCCGACCTGGTCATCTGCATCGGCTATAGTCCGGTGGAGTACGAGCCGGCCATGT<br>GGAATAACGGTAACGCCACGCTGGTACATATCGACGTGCTGCCCGCTTACGAAGAGCGTAATT<br>ATACCCCGGACGTCGAGCTGGTCGGCAATATCGCCGCCACCCTGAACAACTGTCTCAACGC<br>ATCGACCACCAGCTGGTGCTCTCGCCGAGGCCGCCGAGATCCTTGTGACCGCCAGCATCA<br>GCGGGAGCTCCTCGACCGCCGCGGTGCGCACCTGAACCAGTTCGCGCTTCATCCGCTGCGCA<br>TCGTTGCGGCCATGCAGGACATCGTCAATAGCGATGTACCCTGACCGTCGATATGGGGAGCT<br>TTCATATCTGGATCGCCCGTATCTCTACAGCTTTCGCGCCCGTCAGGTCATGATTTCCAACGGT<br>CAACAGACCATGGGCGTGGCGCTGCCGTGGGCGATTGGCGCCTGGCTGGTCAATCCGCAGC<br>GCAAAGTGGTTTCCGTTTCCGGCGACGGCGGTTTCTGCAGTCCAGCATGGAGCTGGAGACC<br>GCTGTACGGCTGAAAGCGAACGTCCTGCATATCATCTGGGTCGATAACGGCTACAACATGGTG<br>GCGATTACAGGAGGAGAAAAAATACCAGCGGCTCTCCGGCGTTGAGTTCGGCCCCGTGGATT<br>TTAAAGTCTACGCCGAAGCCTTCGGCGCCAAAGGGTTTGGGTAGAGAGCGCCGAAGCCCT<br>TGAGCCGACGCTGCGGGCGGCGATGGACGTCGACGGCCCCGCCGTCGTAGCCATCCCCGTG<br>GATTACCGGATAACCCGCTGCTGATGGGCCAGCTCCATCTCAGTCAACTACTTTGAGTCACTA<br>CAGAAGGAATCTATCA |
| 23           | budCtobdhF1 - GGATCCCCGCATACCGGCAAAGCGGGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

Bảng 5 (tiếp tục)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 24 | budCtobdhR1 - CTCCATGCCATCTCAATGCTTGCATTGATAGATTCTTCTGTAGTGAC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 25 | budCtobdhF2 - TCACTACAGAAGGAATCTATCAATGCAAGCATTGAGATGGCATGGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 26 | budCtobdhR2 - CAAACCATGTCAGAGCTTATTTATTATTAGGCTTTCGGAGATACCAGGAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 27 | <p>TAATAAATAAGCTCTGACATGGTTTGCCCGGCGTCACCGCCGGGGCTTTTTTATTCAACCTT</p> <p>TAGGGAAGATCCACAGGTCGCTGACGGGAATGTCAGATGGCAACGCTCGGCATCGCGCAG</p> <p>CGCGCTGCCGTAGGCGCGTATGGCGAAATCATCGCCTTCAGTGCGAAACAGATACTCCCAGC</p> <p>GGTCGCGGAGGTACATGCTGGTCAACAGCGGCAGCGCCAGCATGTTCTCTTCAGGCGCGGA</p> <p>AGCGATGCGCAAACGCTCAACGCGGATCACCGCCGTCGCCTCTTCCCCACGCTAACCCCTT</p> <p>CCCCCGCCATTCCCATAGCGCCAGCTGGCCCCCTCAATGCGCGCCCGACCGTTCTCCAGCG</p> <p>CGCTAACGGTGCCATGCAGGCGATTATTACTGCCATAAACTCGGCGGCAAACAGCGTTTTCG</p> <p>GGTGCGCGTACATCTCCTGCGGGGTTCCCTGCTGCTCGATCACGCCGTTGTTAAGCAGCAGAA</p> <p>TGCGATCGGAAATCGCCATCGCCTCATTCTGATCGTGGGTGACCATCAGCGCCGAAAGCCCCA</p> <p>GCTTGACGATCAGCTCGCGCAAAAAGACCCGCGCTTCTTCCCGCAGCTTGGCGTCCAGATTC</p> <p>GACAGCGGTTTCATCCAGCAGGATCACCGGCGGGTTGTAACAGCGCCCTGCCGATGGCCA</p> <p>CGCGCTGCTGCTGTCTCCGGAGAGCTGATGCGGATGGCGACTGCCAAGATGCCCCAGCCCA</p> <p>AGCTGTTCAAGTACGGTCTGGACCCGTTGCTTGATCTCCGCGGCGGCAACCTTACGCAGCTTC</p> <p>AGCGGGTAAGCGACGTTTTCAAACACCGTTTTATGCGGCCACAGCGCATAGGACTGAAACAC</p> <p>CAGACCCAGGTTACGCTCTCGGCCGAATTCGCTACGCGGGTTGCCGTCATAGACGCGGG</p> <p>ATTTTCAATGGTAATAATGCCGCCGGTCGGCTTCTCCAGCCCGGCGACCGCCCGCAGCAGC</p> <p>GTGGTTTTTCCGCTGCCGATGGCCGAGCAGCGACACCACCTCTCCCGCTTCAGTTCCATG</p> <p>GACACGCCCTTCAGTACCGGATTATCGCCATAGGTCAGATGCAGGTTTTCTACCGATAATTCAA</p> <p>TCATGTAATTTCACTCCAAAGCGCAGGGCGATACCCAGACCGACGACCACAGCAGGATATT</p> <p>AATAAAGGAGAGCGCGGCGACGATATCGATAGCCCCCGCCGCCACAGCGAGACCAGCATC</p> <p>GAACCAATCGTTTCGGTTCGGGGCGAAAGCAGATAGACCCCGGTGGAGTATTCGCGCTCGAA</p> <p>GATAAGAAAACATCAGCAGCCAGGAGCCGATTAAGCCGTAGCGCGACAGCGGCACCGTAACG</p> <p>TGACGGGTAATCTGCCCGCGCGATGCGCCGGTACTGCGCGCGGCCTTCCAACTCCGGCGC</p> <p>TACCTGCAGCAGCGTCGAGGAGATCAGCCGAGGCCGTAAGCCATCCACACCACGGTATAGG</p> <p>CCAGCCA</p> |

Bảng 5 (tiếp tục)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 28 | budCtobdhF3 - ATCCTGGTATCTCCGAAAGCCTAATAATAAATAAGCTCTGACATGGTTTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 29 | budCtobdhR3 - GCGGCCGCTGGCTGGCCTATACCGTGGTGTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 30 | <p>CCGCATCACCGGCAAAGCGGGCGTCGCGCTGGTCACGTCCGGACCGGGCTGCTCTAACCTG</p> <p>ATTACCGGATGGCAACGGCCAATAGCGAAGGCGACCCGGTGGTGGCGCTGGGCGGCGCG</p> <p>GTAAAACGCGCCGACAAGGCCAAACAGGTGCACCAGAGTATGGATACGGTGACGATGTTTA</p> <p>GCCCGGTGACCAAATACTCGGTGGAAGTCACCGCGCCGGAAGCGCTGGCGGAAGTTGTCTC</p> <p>CAACGCGTTTCGTGCAGCCGAGCAGGGACGCCCCGGCAGCGCCTTCGTAGCCTGCCGACG</p> <p>GACGTGGTCGACGGGCCGGTCCACGCCAGGGTTCTGCCCGCCGGCGATGCGCCGACAGCCG</p> <p>GCGCGGCGCCGGACGACGCCATTGCGCGAGTCGCGAAGATGATTGCCGGCGCGAAAAATCC</p> <p>GATATTCTGCTCGGCCTGATGGCCAGCCAGACGGAACAGCGCGGCGCTGCGGAATTG</p> <p>CTGAAAAAAGTCATATCCCGGTGACCAGCACCTATCAGGCCGCCGGCGCAGTCAATCAGGA</p> <p>TCACTTTACCCGCTTCGCCGGACGGTTGGTCTGTTCAACAACCAGGCAGGGGATCGACTCC</p> <p>TGCATCTGCCGACCTGGTCATCTGCATCGGCTATAGTCCGGTGGAGTACGAGCCGGCCATGT</p> <p>GGAATAACGGTAACGCCACGCTGGTACATATCGAGTGTGCCCCGCTACGAAGAGCGTAATT</p> <p>ATACCCCGGACGTGAGCTGGTCGGCAATATCGCCGCCACCCTGAACAACTGTCTCAACGC</p> <p>ATCGACCACGCTGGTGCTCTCGCCGAGGCCGCCGAGATCCTTGTCGACCGCCAGCATCA</p> <p>GCGGGAGCTCCTCGACCGCCGGTGCGCACCTGAACCAGTTCGCGCTTCATCCGCTGCGCA</p> <p>TCGTTGCGCCATGCAGGACATCGTCAATAGCGATGCACCCTGACCGTCGATATGGGGAGCT</p> <p>TTCATATCTGGATCGCCCGCTATCTCTACAGCTTTCGCGCCCGTCAGGTCATGATTCCAACGGT</p> <p>CAACAGACCATGGGCGTGGCGCTGCCGTGGGCGATTGGCGCCTGGCTGGTCAATCCGCAGC</p> <p>GCAAAGTGGTTTCCGTTTCCGGCGACGGCGGTTTCTGCAGTCCAGCATGGAGCTGGAGACC</p> <p>GCTGTACGGCTGAAAGCGAACGTCCTGCATATCATCTGGGTCGATAACGGCTACAACATGGTG</p> <p>GCGATTGAGGAGGAGAAAAATACCAGCGGCTCTCCGGCGTTGAGTTCGGCCCGGTGGATT</p> <p>TTAAAGTCTACGCCGAAGCCTTCGGCGCCAAAGGGTTGCGGTAGAGAGCGCCGAAGCCCT</p> <p>TGAGCCGACGCTGCGGGCGGCGATGGACGTCGACGGCCCCGCCGTCGTAGCCATCCCCGTG</p> <p>GATTACCGGATAACCCGCTGCTGATGGGCCAGCTCCATCTCAGTCAACTACTTTGAGTCACTA</p> <p>CAGAAGGAATCTATCAATGCAAGCATTGAGATGGCATGGAGTAAAAGATTACGTTTGAAAA</p> <p>ACATTGAGCAACCCGCTGCTCTTCCAGGAAAAGTAAAAATCAAAGTAGAATGGTGTGGCATT</p> <p>GCGGAAGTGATCTTACGAATATGTAGCAGGACCGATCTTCATTCTGAAAACGCTCAGCATC</p> |

Bảng 5 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CACTGACTGGCGAAAAAGCTCCGATTGTGATGGGACATGAATTTCTGGACAAGTCGTTGAA<br>ATCGGTGAAGGTGTAATAAAATTCAGGTTGGCGACCGTGTAGTCGTAGAACCGGTTTTTGCA<br>TGTGGAGAATGTGATGCATGTAGACAAGGCAAATATAACCTTTGCGATAAAATGGGCTTCCTC<br>GGTTTGGCAGGCGGCGGGCGGTGGATTTTCTGAATATGTCGCAGCTGACGAGCACATGGTTCA<br>CAAAATTCCAGAAAGCGTATCCTTCGAGCAAGGCGCTTTGGTAGAGCCTTCGGCCGTTGCTTT<br>GTACGCTGTACGTCAAAGCCAACTGAAAGTCGGCGACAAAGCTGTCGTGTTGGCGCTGGTC<br>CTATCGGATTGCTGTTATTGAAGCGTTGAAAGCTTCGGGCGCATCTGAGATTATGCAGTAG<br>AGCTTTCCGAGGAGCGTAAAGCTAAAGCTGAAGAGCTGGGTGCTATTGTGCTTGATCCTAAA<br>ACTTATGATGTTGTGGAAGAACTGCACAAACGGACCAACGGTGGCGTAGATGTAGCCTATGA<br>AGTCACTGGAGTACCTCCTGTGCTGACTCAAGCGATTGAATCCACTAAAATTAGCGGACAAAT<br>CATGATCGTCAGCATTTTTGAAAAAGAAGCTCCAATCAAACCGAACAATATCGTTATGAAGGA<br>ACGCAATCTGACTGGTATTATCGGCTACCGTGATGTATTCCCGGCTGTCATCAGCTTGATGGAA<br>AAAGGGTATTTCCCTGCTGACAAGCTTGTGACCAAACGTATTAAGCTCGAAGAAGTAATCGAG<br>CAAGGTTTTGAAGGTCTCCTGAAAGAAAAAATCAGGTTAAAATCCTGGTATCTCCGAAAGCC<br>TAATAATAAATAAGCTCTGACATGGTTTGCCCCGGCGTCACCGCCGGGGCTTTTTTATTCAAC<br>CTTTAGGGAAGATCCACAGGTCGCTGACGGGCAATGTCAGATGGCAACGCTCGGCATCGCG<br>AGCGCGCTGCCGTAGGCGCGTATGGCGAAATCATCGCCTTCAGTGCGAAACAGATACTCCCA<br>GCGGTGCGCGAGGTACATGCTGGTCAACAGCGGCAGCGCCAGCATGTTCTCTTCAGGCGCG<br>GAAGCGATGCGCAAACGCTCAACGCGGATCACCGCCGTCGCCTCTCCCCACGCTAACCCC<br>TTCCCCCGCCATTCCCCATAGCGCCAGCTGGCCCCCTCAATGCGCGCCCGACCGTTCTCCAG<br>CGCGCTAACGGTGCCATGCAGGCGATTATTACTGCCATAAACTCGGCGGCAAACAGCGTTTT<br>CGGGCTGCCGTACATCTCCTGCGGGGTTCCTGTGCTCGATCACGCCGTTGTTAAGCAGCAG<br>AATGCGATCGGAAATCGCCATCGCCTATTCTGATCGTGGGTGACCATCAGCGCCGAAAGCCC<br>CAGCTTGACGATCAGCTCGCGCAAAAAGACCCGCGCTTCTCCCGCAGCTTGCGGTCCAGAT<br>TCGACAGCGGTTATCCAGCAGGATCACCGGCGGGTTGTAAACCAGCGCCCTGCCGATGGCC<br>ACGCGCTGCTGCTGTCTCCGGAGAGCTGATGCGGATGGCGACTGCCAAGATGCCCCAGCCC<br>AAGCTGTTCAAGTACGGTCTGGACCCGTTGCTTGATCTCCGCGGCGGCAACCTTACGCAGCTT<br>CAGCGGGTAAGCGACGTTTTTAAACACCGTTTTATGCGGCCACAGCGCATAGGACTGAAACA<br>CCAGACCCAGGTTACGCTCCTCGGCCGAATTCGCTACGCGGGTTCGCTCATAGACGCGG |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bảng 5 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GATTTTCCAATGGTAATAATGCCGCCGGTCGGCTTCTCCAGCCCGGCGACCGCCCGCAGCAG<br>CGTGGTTTTTCCGCTGCCCCGATGGCCCGAGCAGCGACACCACCTCTCCCCGCTTCAGTTCCAT<br>GGACACGCCCTTCAGTACCGGATTATCGCCATAGGTCAGATGCAGGTTTTCTACCGATAATTCA<br>ATCATGTAATTTCACTCCAAAGCGCAGGGCGATACCCAGACCGACGACCACCAGCAGGATAT<br>TAATAAAGGAGAGCGCGGGCGACGATATCGATAGCCCCGCGCCACAGCGAGACCAGCAT<br>CGAACCAATCGTTTCGGTTCGGGGCGAAAGCAGATAGACCCCGGTGGAGTATTCGCGCTCGA<br>AGATAAGAAACATCAGCAGCCAGGAGCCGATTAAGCCGTAGCGCGACAGCGGCACCGTAAC<br>GTGACGGGTAATCTGCCCCGCGGATGCGCCGGTACTGCGCGCGGCCTTCCAACTCCGGCG<br>CTACCTGCAGCAGCGTCGAGGAGATCAGCCGAGGCCGTAAGCCATCCACACCACGGTATAG<br>GCCAGCCA |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bảng 6

| SEQ ID<br>NO | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31           | GCCGCAGACGACGTGCGACAGCGCCGGATGCAGGCGATTAAGCATCGAGGTCTGCAGAAGG<br>AAGTCGAGCACCTCTGGCGGCAGCGGCGGAAAATCACCTCATCCAGATAGCGGGAGATTG<br>ACCGCGAGCCGGCGCTGTGACCCATCGCCGTGGAGGCGTCCGCAGAGAGCGCGGCCATTTT<br>CATTCCCGCGATCCACCCTTCGTGAGCGCGATTAGCCGCGGGATCGCCTGCGGATCCAGCCC<br>CGATGCGCCGGAGAACCAGGCGCGGGCTTCGCTGGGGGTAAAGCGCAGCTCGGGGTCTGTA<br>CACCTCCAGCAGCTGATCCTGCATATGCAGACGGCTGAGGGCTAAAGACGGCTGACTGCGG<br>CTACCGATAATCAGGTGCAGCGCCGGCGGGCGCATGGTCCAGCAGCCAGCTCATTCCCTGATG<br>AATCGCCGGATCGTGATGCATTGATAGTCGTCGAGGATCAGATACAGCGGGTGCGGGCACT<br>GATTAAGCTGATTAACGAGTTCAGCAAAGAACAGGGGGAGGTCGGCCGGAAGCTCGCCTTG<br>CAGCAGCTGCAGAAACGACGGGCTCCACCCTGCCACAAGGGCCGAGCGCCTCCTGCAG<br>ATAGCGTATAAACAGTAGCGGCGCGTTGTCATCCTCTTCAAGGCTCAGCCAGGCCAGCGCATC<br>CCCTTGTCGAAGGCGGTGTCGATACCACTGCGCCAGCAGGGTGTTTTGCCAAATCCGGCGG<br>GCGCGCGCACCAGGGTTAAACGGCGGGAGACGGCGGCGTCGAGGCGCTGTAGCAGGCGCT<br>CCCGCGATAGCAGACTTTCGGCGTACGGGGCGGCGTAAAGCGCGTGAGATAAGCGGCAG<br>CGTCCCCGTGAAGCGTAAAGGTTCTGTATGAACAAGCGTGCCAGCGCATCATCCGCCGAGG<br>ATAAAAAGGCCATACCAGTACTCCTTAATCCAGTCCGTACGCTCATTATCCCCCATCAG<br>GGGGGTAGGCCACGCTTATCGCGCCCGATAGAGTAGTGCCATTGCGCCGACGCGCTACGACG<br>ACATCGGCCGCGGGCCTCCCTAGTTTATTAATCAGTACAAGGTGAGTACAGAC |
| 32           | dartobdhF1 - TCGACTCTAGAGCCGCAGACGACGTGCGACAGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 33           | dartobdhR1 - CATGCCATCTCAATGCTTGCATGTCTGTACTCACCTTGACTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 34           | dartobdhF2 - CAGTACAAGGTGAGTACAGACATGCAAGCATTGAGATGGCATG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 35           | dartobdhR2 - CTGCGCCGGGTTATCCCTTAGGCTTTCGGAGATACCAGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 36           | GGGATAAACCCGGCGCAGAACGCGCCGGGTTTTGCGGGGTACGCGTTAGCCGCGGGCTC<br>CTGCGGCTTGTCGCTACGGGTGTTTTCCAGCATCCGGCGAACCAGGAACAATCAGCAGGCACA<br>GCACCGCGGCGCAGATCAGCAGCGCAATAGAGCAGCGTGCGAACAGGTGCGGCAGCATATC<br>CAGCTGATCGGCCTTACGTGACCGCCAATCAGACCCGCGCCAGGTTCCCCAGGGCGCTGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Bảng 6 (tiếp tục)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | CGCAGAACCACAGCCCCATCATCTGGCCGCGCATTCTTTCCGGCGCCAGCAGCGTCATGGTC<br>GCGAGGCCAATCGGGCTGAGGCACAGCTCGCCAGCGTCAGCATCAGAATACTGCCACCA<br>GCCACATCGGCGAGACGCCCCGCGCGTTGTTGCTCAGGACGTTTTGCGCCGCCAGCATCATC<br>AGGCCAAAGCCCGCCGCGCGCATAAAATACCGATAACAACTTGGTGATGCTGCTCGGACG<br>CACGTTTTTACGCGCCAGCGCAGGCCACGCCCAGCTAAATACCGGCGCCAGCAGAATAATA<br>ACAGGGCGTTAATCGACTGGAACCACACCGCCGGGATCTCGAAGGAGCCGAGCATACGGTT<br>GGTATAGTCGTTAGCGAACAGGTTAAACGAGGTCGGTTTCTGCTCAAACGCCGACCAGAAAA<br>AGGCGGCAGAGATCAGCAGGATAAAGCATACCAGCAGGCGGGCGCGCTCTTTGCGGGCTCAA<br>TCCGGCGAAGACGAACAGGTAGATAAAATAGAGTACCACCGACGCCGAATCACGTAGACC<br>AGTACGCTGGCGACCGCCACCGGTTAATCAGATAACGCCCTGGGCAATCAAGGCGATGAT<br>AACCGCCACGCCCACCGTTAGCGCCAGCAACCATGCGCCGACGCCATTCGTTTCACTACCG<br>GGCTGTTCCAGGTGAATCGAGGCCGACTTCACTGTCTAGCGTTTCATCGCCGGGACGGCA<br>AAAACGCGGAAGATAATCAGCGCGACCAGCATCCCGATGCCGCCGATGCCGAAGCCCCAGT<br>GCCAGCCGTGGGATTTAATCAGCCAGCCGGAGATCAGCGGGGCGATAAACGACCCCATGTTG<br>ATGCCCATATAAAACAGCGAGAAGCCGCCATCGCGGCGCGCATCGCCTTTTTGTAGAGGGT<br>ACCGACCATCACCGAAATACAGGTTTTAAACAGGCCGGAACCGAGCAGGATAAACATCAGG<br>CCAATAAAGAACAGGCTATCGCCCATACCGCCGACAGGGCGATGGAGAGATGGCCAGAG<br>CGATCAGTATCGAACCGTACCAGACCGCCTTTGTTGCCCGAGCCAGTTATCAGCCAGCCAGC<br>CGCCCGGCGAGCGGGCAAGATACATGGTCCCGGCAAAGATCCCGACAATGGCCGACGCGTT<br>CTCGCGCGCCAGCCCCATCCACCGTCATAGACGGTGGCCGCCATAAACAGGATCAGTAACG<br>GACGAATACCGTAAAACGAGA |
| 37 | dartobdhF3 - CCTGGTATCTCCGAAAGCCTAAGGGATAAACCCGGCGCAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 38 | dartobdhR3 - GATCGCGGCCGCTCTCGTTTTACGGTATTCGTCCGTTAC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 39 | GCCGCAGACGACGTCGCACAGCGCCGGATGCAGGCGATTAAGCATCGAGGTCTGCAGAAGG<br>AAGTCGAGCACCTCTGGCGGCAGCGGCGCGAAAATCACCTCATCCAGATAGCGGGAGATTG<br>ACCGCGAGCCGGCGCTGTGACCCATCGCCGTGGAGGCGTCCGCAGAGAGCGCGGCCATTTT<br>CATTCGCGGATCCACCCTTCCGTGAGCGCGATTAGCCGCGGGATCGCCTGCGGATCCAGCCC<br>CGATGCGCCGAGAACCAGGCGCGGGCTTCGCTGGGGGTAAAGCGCAGCTCGGGGTCGTA<br>CACCTCCAGCAGCTGATCCTGCATATGCAGACGGCTGAGGGCTAAAGACGGCTGACTGCGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

Bảng 6 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p> CTACCGATAATCAGGTGCAGCGCCGGCGGCATGGTCCAGCAGCCAGCTATTCCCTGATG<br/> AATCGCCGGATCGCTGATGCATTGATAGTCGTCGAGGATCAGATACAGCGGTGCGGGCACT<br/> GATTAAGCTGATTAACGAGTTCAGCAAAGAACAGGGGGAGGTCGGCCGGAAGCTCGCCTTG<br/> CAGCAGCTGCAGAAACGACGGGCTCCACCCCTGCCACAAGGGCCGAGCGCCTCCTGCAG<br/> ATAGCGTATAAACAGTAGCGGCGGTTGTATCCTCTTCAAGGCTCAGCCAGGCCAGCGCATC<br/> CCCTTGTCGAAGGCGGTGTCGATACCACTGCGCCAGCAGGGTGTTTTGCCAAATCCGGCGG<br/> GCGCGCGCACCAAGGGTTAAACGGCGGGAGACGGCGGCGTCGAGGCGCTGTAGCAGGCGCT<br/> CCCGCGATAGCAGACTTTCGGCGTACGGGGCGGCGTAAAGCGCGTGAGATAAGCGGCAG<br/> CGTCCCGTGAAGCGTAAAGTTCCTGATGAACAAGCGCTGCCAGCGCATCATCCGCCGAGG<br/> ATAAAAAGGCCATACCACGATTACTCCTTAATCCAGTCCGTACGCTCATTATCCCCCCCATCAG<br/> GGGGGTAGGCCACGCTTATCGCGCCCGATAGAGTAGTGCCATTGCGCCGACGCGGCTACGACG<br/> ACATCGGCCGCGGGCCTCCCTAGTTTATTAATCAGTACAAGGTGAGTACAGACATGCAAGCAT<br/> TGAGATGGCATGGAGTAAAAGATTACGTTTGAAAACATTGAGCAACCCGCTGCTCTTCCA<br/> GGAAAAGTAAAATCAAAGTAGAATGGTGTGGCATTGCGGAAGTGATCTTCACGAATATGTA<br/> GCAGGACCGATCTTCATTCTGAAAACGCTCAGCATCCACTGACTGGCGAAAAAGCTCCGAT<br/> TGTGATGGGACATGAATTTCTGGACAAGTCGTTGAAATCGGTGAAGGTGTAATAAATTC<br/> GGTTGGCGACCGTGTAGTCGTAGAACCGGTTTTTGCATGTGGAGAATGTGATGCATGTAGACA<br/> AGGCAAATATAACCTTTGCGATAAAATGGGCTTCCTCGGTTTGGCAGGCGGCGGCGGTGGAT<br/> TTTCTGAATATGTCGAGCTGACGAGCACATGGTTCACAAAATCCAGAAAGCGTATCCTTCG<br/> AGCAAGGCGCTTTGGTAGAGCCTTCGGCCGTGCTTTGTACGCTGTACGTCAAAGCCAACTG<br/> AAAGTCGGCGACAAAGCTGTCGTGTTTGGCGCTGGTCTATCGGATTGCTGGTATTGAAGCG<br/> TTGAAAGCTTCGGGCGCATCTGAGATTTATGCAGTAGAGCTTTCGAGGAGCGTAAAGCTAA<br/> AGCTGAAGAGCTGGGTGCTATTGTGCTTGATCCTAAACTTATGATGTTGTGGAAGAACTGCA<br/> CAAACGGACCAACGGTGGCGTAGATGTAGCCTATGAAGTCACTGGAGTACCTCCTGTGCTGA<br/> CTCAAGCGATTGAATCCACTAAAATTAGCGGACAAATCATGATCGTCAGCATTTTTGAAAAAG<br/> AAGCTCCAATCAAACCGAACAATATCGTTATGAAGGAACGCAATCTGACTGGTATTATCGGCT<br/> ACCGTGATGTATTCCCGGCTGTCATCAGCTTGATGGAAAAAGGGTATTTCCCTGCTGACAAGC<br/> TTGTGACCAAACGTATTAAGCTCGAAGAAGTAATCGAGCAAGGTTTTGAAGGTCTCTGAAA<br/> GAAAAAATCAGGTTAAAATCCTGGTATCTCCGAAAGCCTAAGGGATAAACCCGGCGCAGAA </p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bảng 6 (tiếp tục)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CGCGCCGGGTTTTGCGGGGTACGCGTTAGCCGCGGGCTCCTGCGGCTTGCTGCTACGGGT<br>GTTTTCCAGCATCCGGCGAACCGGAACAATCAGCAGGCACAGCACCGCGGCGCAGATCAGC<br>AGCGCAATAGAGCAGCGTGCGAACAGGTCGGGCAGCATATCCAGCTGATCGGCCTTCACGTG<br>ACCGCAATCAGACCCGCCGCCAGGTTCCCCAGGGCGCTGGCGCAGAACCACAGCCCCATC<br>ATCTGGCCGCGCATTTCTTCCGGCGCCAGCAGCGTCATGGTCGCGAGGCCAATCGGGCTGAG<br>GCACAGCTCGCCAGCGTCAGCATCAGAATACTGCCACCAGCCACATCGGCGAGACGCCC<br>GCGCCGTTGTTGCTCAGGACGTTTTGCGCCGCCAGCATCATCAGGCCAAAGCCCGCCGCCG<br>GCATAAAATACCGATAACAACTTGGTGATGCTGCTCGGACGCACGTTTTTACGCGCCAGCGC<br>AGGCCACGCCCAGCTAAATACCGGCGCCAGCAGAATAATAACAGGGCGTTAATCGACTGG<br>AACCACACCGCCGGGATCTCGAAGGAGCCGAGCATACGTTGGTATAGTCGTTAGCGAACAG<br>GTTAAACGAGGTCGGTTTCTGCTCAAACGCCGACCAGAAAAAGGCGGCAGAGATCAGCAGG<br>ATAAAGCATACCAGCAGGCGGGCGCGCTCTTTGCGGCTCAATCCGGCGAAGACGAACAGGT<br>AGATAAAATAGAGTACCACCGACGCCGAATCAGTAGACCAGTACGCTGGCGACCGCCACC<br>GGGTTAATCACGATAACGCCCTGGGCAATCAAGGCGATGATAACCGCCACGCCACCGTTAG<br>CGCCAGCAACCATGCGCCGACGCCATTCGTTTCACTACCGGGCTGTTCCAGGTGGAATCGA<br>GGCCGACTTCACTGTCGTAGCGTTTCATCGCCGGGACGGCAAAAACGCGGAAGATAATCAGC<br>GCGACCGCATCCCGATGCCGCCGATGCCAAGCCCCAGTGCCAGCCGTGGGATTTAATCAG<br>CCAGCCGGAGATCAGCGGGGCGATAAACGACCCCATGTTGATGCCCATATAAAACAGCGAGA<br>AGCCGCCATCGCGGCGCGCATCGCCTTTTTGTAGAGGGTACCGACCATACCGAAATACAG<br>GTTTTAAACAGGCCGGAACCGAGCACGATAAACATCAGGCCAATAAAGAACAGGCTATCGC<br>CCATACCGCCGACAGGGCGATGGAGAGATGGCCCAGAGCGATCAGTATCGAACCGTACCA<br>GACCGCCTTTTGTGCCCAGCCAGTTATCAGCCAGCCAGCCGCCCGGCGAGCGCGCAAGAT<br>ACATGGTCCCGGCAAAGATCCCGACAATGGCCGACGCGTTCTCGCGCGCCAGCCCCATCCCA<br>CCGTCATAGACGGTGGCCGCCATAAACAGGATCAGTAACGGACGAATACCGTAAACGAGA |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|