



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002821

(51)⁷ **C12N 15/13**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00112

(22) 12/04/2019

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/06/2019 375A

(73) Trường Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Trương Quốc Phong (VN).

(54) **CHỦNG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS* TÁI TỔ HỢP SINH TỔNG HỢP
LACTOFERRIN BÒ VÀ QUY TRÌNH TẠO RA CHỦNG NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò và quy trình tạo ra chủng này. Chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc pPICZ-*mbLf_{opt}* chứa đoạn gen *mbLf_{opt}* có trình tự được tối ưu dựa trên trình tự gen từ bò nhà *Bos taurus* có mã số truy cập trên ngân hàng gen NCBI là FJ589071.1 và được nêu trong SEQ ID NO. 1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp sinh tổng hợp lactoferrin bò và quy trình tạo ra chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Lactoferrin (LF) là một protein đa chức năng, có vai trò điều hòa cân bằng nồng độ sắt trong máu, có hoạt tính kháng vi khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng ký sinh trùng, kháng ung thư, kháng viêm, điều hòa miễn dịch, hoạt tính enzym. Do đó, LF đã và đang được sử dụng nhiều làm thực phẩm chức năng; bổ sung vào mỹ phẩm và sản phẩm chăm sóc răng miệng,.... Với nhiều ứng dụng thực tiễn có lợi như vậy nên nhu cầu về LF ngày một tăng lên (185 tấn năm 2012 – 262 tấn năm 2017).

Với nhiều ứng dụng có lợi như vậy nên nhu cầu về lactoferrin ngày một tăng lên. Để đáp ứng nhu cầu đó đã có nhiều giải pháp được đưa ra như tách chiết từ sữa động vật, tạo động vật chuyển gen tăng cường hàm lượng LF trong sữa, tạo thực vật và vi sinh vật chuyển gen sinh tổng hợp LF. Do LF có hàm lượng không cao trong sữa tự nhiên (50 – 100 mg/L) nên việc tách chiết LF từ sữa là không hiệu quả và sản phẩm tạo ra có thể có nhiễm tác nhân gây bệnh từ động vật cho sữa. Như đã phân tích ở trên, hướng tiếp cận sản xuất LF bằng con đường tái tổ hợp đã và đang được thực hiện bởi nhiều nhóm nghiên cứu và được nhiều công ty sản xuất LF quan tâm vì nó có hiệu suất tổng hợp LF cao.

Pichia pastoris là chủng nấm men được đánh giá là có thể sử dụng để sản xuất LF trong công nghiệp. Việc sử dụng nấm men *P. pastoris* cho sản xuất LF có nhiều ưu điểm: có khả năng tổng hợp LF cao nhất trong số các vi sinh vật được nghiên cứu sử dụng làm vật chủ biểu hiện, có khả năng lên men với hiệu suất cao, phù hợp lên men quy mô lớn và đặc biệt LF sau khi được tổng hợp được đường hóa và biến đổi tạo thành protein có hoạt tính tương tự như LF tự nhiên. Gen mã hóa lactoferrin *Lf* có nguồn gốc từ động vật có vú (người, bò) trong khi đó vật chủ là nấm men nên có thể chưa thực sự phù hợp, hiệu suất tổng hợp chưa thực sự tối ưu.

Do đó, cần thiết tối ưu hóa gen mã hóa lactoferrin nguồn gốc từ bò nhà *bLf* phù hợp với chủng chủ *P. pastoris* và tạo được chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp lactoferrin, tiến tới có thể phát triển thành chủng có khả năng sản xuất quy mô lớn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các vấn đề tồn tại nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò, và quy trình tạo ra chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò, khác biệt ở chỗ các chủng này mang cấu trúc pPICZ-*mbLf_{opt}* chứa gen *mbLf_{opt}* tối ưu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Theo phương án ưu tiên của khía cạnh này, chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp mang gen *mbLf_{opt}* đã được tối ưu theo giải pháp hữu ích có khả năng lên men sinh tổng hợp lactoferrin bò.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp, quy trình này bao gồm các bước:

a) khuếch đại đoạn gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 từ trình tự gen tối ưu được tổng hợp hoá học bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 và SEQ ID NO. 3 thu được sản phẩm PCR;

b) tách dòng đoạn gen *mbLf_{opt}* vào vector pPICZ α A bằng cách xử lý lần lượt sản phẩm PCR bằng cặp enzyme cắt hạn là *EcoRI/XbaI* với lượng 5U/ μ g ADN ở 37°C, sau đó nối đoạn gen này vào vector pPICZ α A bằng ADN enzyme T4 ligaza với lượng 5U/phản ứng, sau khi biến nạp vào *E.coli* DH5 α khả biến và chọn lọc trên môi trường thạch LB chứa 100 μ g/ml bleomycin, chiết thu được vector tái tổ hợp pPICZ-*mbLf_{opt}*; và

c) tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pPICZ-*mbLf_{opt}* vào chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71H tương ứng, sau khi chọn lọc trên môi trường YPD chứa kháng sinh bleomycin thu được chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp chứa gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Theo một phương án ưu tiên của khía cạnh này, quy trình theo giải pháp hữu ích đề cập đến gen *mbLf_{opt}* có trình tự tối ưu nêu trong SEQ ID NO. 1 và chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp lactoferrin bò.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và ví dụ cụ thể, tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích thu hẹp phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp.

Giải pháp hữu ích đề cập đến xuất chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò và quy trình tạo ra chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò, khác biệt ở chỗ chủng này mang vector biểu hiện pPICZ-*mbLf_{opt}* chứa gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Gen *mbLf_{opt}* mã hoá tổng hợp lactoferrin bò, đây là gen có trình tự được tối ưu dựa vào trình gen tự nhiên có mã số truy cập trên ngân hàng gen NCBI là FJ589071.1. Gen *mbLf_{opt}* bao gồm 2100 nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp chứa gen *mbLf_{opt}* theo giải pháp hữu ích có khả năng lên men sinh tổng hợp lactoferrin bò.

Chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích là chủng *Pichia pastoris* KM71H mang vector biểu hiện pPICZ-*mbLf_{opt}* chứa gen *mbLf_{opt}* được tối ưu và tổng hợp hoá học từ trình tự gen có nguồn gốc từ bò nhà *Bos taurus*. Hiện chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam với số hiệu lưu giữ là CRDB-002.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích, quy trình này bao gồm các bước: a) khuếch đại đoạn gen *mbLf_{opt}* tối ưu; b) tách dòng đoạn gen *mbLf_{opt}* vào vector pPICZ α A; c) tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp.

Đầu tiên, trình tự gen tự nhiên mã hoá lactoferrin từ bò nhà có mã số truy cập trên ngân hàng gen NCBI là FJ589071.1 được tối ưu hóa phù hợp chủng chủ *Pichia pastoris* và sau đó được tiến hành tổng hợp bằng phương pháp hoá học. Tác giả tiến hành xác định khung đọc mở của trình tự gen mã số FJ589071.1, công cụ OptimumGene™ Codon Optimization của Genscript (Mỹ) được sử dụng để tối ưu trình tự gen đích theo một loạt các tham số (khả năng sử dụng mã di truyền, thành phần GC, thành phần dinucleotit CpG, cấu trúc bậc 2 của mARN, các vị trí PolyA chưa trưởng thành, đảo CpG âm tính, motif ARN không ổn định, các trình tự lặp, các vị trí cắt enzym giới hạn có thể ảnh hưởng đến việc tách dòng, trình tự khởi đầu dịch mã, mã kết thúc). Trình tự tối ưu hoá được lựa chọn dựa trên tần số sử dụng mã di truyền thông qua hệ số thích ứng mã di truyền (Codon Adaptation Index – CAI), tần số mã di truyền tối ưu (Frequency of Optimal Codons – FOP), sự điều chỉnh thành phần GC, sự thay đổi vị trí cắt enzym hạn chế đảm bảo cho quá trình tách dòng, mức độ loại bỏ trình tự lặp lại. Cuối cùng, kết quả thu được trình tự đoạn gen *mbLf_{opt}* đã được tối ưu như nêu trong SEQ ID NO.1.

Tiếp theo, tác giả tiến hành khuếch đại đoạn gen *mbLf_{opt}*, trong đó đoạn gen *mbLf_{opt}* là trình tự được tổng hợp hoá học. Sau đó ADN tổng hợp này được sử dụng làm khuôn để tiến hành PCR bằng cách sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 và SEQ ID NO. 3 sau:

Cặp mồi LF F/R:

GAATTCGCCCCAAGAAAGAACG

SEQ ID NO. 2

TCTAGACTAATGGTGGTGATGA

SEQ ID NO. 3

Phản ứng được thực hiện theo điều kiện như sau: tiền biến tính 95°C – 5 phút, thực hiện 30 chu kỳ với các giai đoạn biến tính 95°C – 30 giây, gắn mồi 59°C – 45 giây, kéo dài chuỗi 72°C – 1 phút 30 giây. Hoàn tất kéo dài 72°C trong 5 phút thu được sản phẩm PCR cho đoạn gen *mbLf_{opt}*.

Trong bước tách dòng đoạn gen *mbLf_{opt}* vào vector pPICZαA, sản phẩm PCR được xử lý bằng cặp enzym giới hạn *EcoRI/XbaI* và gắn vào vector biểu hiện đã được xử lý bằng *EcoRI/XbaI*. Sau khi biến nạp vào *E.coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt (ví dụ, phương pháp của Sambrook et al., 2001) và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc LB chứa bleomycin. Do đó, sau khi chọn lọc sẽ thu được chủng *E. coli* DH5α tái tổ hợp. Vector

pPICZ-*mbLf_{opt}* trong chủng *E. coli* DH5 α tái tổ hợp này được chiết tách theo quy trình chuẩn.

Trong bước tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pPICZ-*mbLf_{opt}* vào chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71H. Sau đó chọn lọc trên môi trường YPD chứa kháng sinh bleomycin thu được chủng nấm men tái tổ hợp *Pichia pastoris* KM71-3 chứa gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Xác định chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris* tái tổ hợp

Tách chiết ADN tổng số từ chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích: 1 khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa được cấy vào 2 ml môi trường YPD lỏng chứa bleomycin 100 μ g/ml và nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 28°C qua đêm. Ly tâm thu sinh khối ở 5000 vòng/phút trong 5 phút. Hòa tan sinh khối trong 500 μ l đệm phá tế bào (400 mM Tris-HCl pH 8,0; 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% natri dodecyl sulfat), giữ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Bổ sung 150 μ l 3M CH₃COOH pH 4,8 và trộn đều. Bổ sung CI (hỗn hợp chloroform: isoamylalcol = 24 : 1) theo tỉ lệ 1 : 1, trộn đều bằng cách lộn ngược ống 5 lần. Ly tâm 10000 vòng/phút, trong 10 phút, thu pha trên sang ống eppendorf mới. Bổ sung isopropanol (tỉ lệ 1 : 1), để 30 phút, ủ ở - 20°C. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 5 phút, thu tủa. Rửa tủa bằng 300 μ l EtOH 70%, ly tâm 12000 vòng/phút trong 5 phút, thu tủa. Làm khô cón, hòa tan tủa trong 30 μ l H₂O. Điện di trên gel agarosa 0,8% để kiểm tra sự có mặt của ADN tổng số.

Khuếch đại đoạn gen *mbLf_{opt}*. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu như đã được mô tả ở trên. Phản ứng được thực hiện theo điều kiện như sau: tiền biến tính 95°C – 5 phút, thực hiện 30 chu kỳ với các giai đoạn biến tính 95°C – 30 giây, gắn mồi 59°C – 45 giây, kéo dài chuỗi 72°C – 1 phút 30 giây. Hoàn tất kéo dài 72°C trong 5 phút thu được sản phẩm PCR cho đoạn gen *mbLf_{opt}*.

Sản phẩm thu được: băng ADN với kích thước khoảng 2,1 kb tương ứng với đoạn gen *mbLf_{opt}*.

Ví dụ 2: Lên men sinh tổng hợp lactoferrin bò

Chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp được bảo quản trong 50% glycerol ở -80°C. Chủng được nuôi lên trong môi trường YPD trong ống thạch nghiêng, ở tủ ấm 28°C.

Quá trình lên men được thực hiện theo hai giai đoạn:

Tế bào *Pichia pastoris* được nuôi cấy 24 giờ trong bình tam giác cỡ 250 ml có chứa 50 ml môi trường nhân giống gồm 1% cao nấm men, 2% pepton, 100 mM đệm phosphat pH 6,0, 1,34% YNB; $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% glycerol, ở điều kiện 28°C, lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi sau nhân giống được chuyển vào bình lên men chứa môi trường gồm 1,7 % KH_2PO_4 ; 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5% glycerol và 0,2 % PTM4 (g/lit): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,0; NaI, 0,08; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,0; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2; H_3BO_3 , 0,02; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5; CoCl_2 , 0,5; ZnCl_2 , 7; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22; biotin, 0,2; và 1 ml H_2SO_4 đậm đặc.

Quá trình lên men sinh tổng hợp lactoferrin được thực hiện trong thiết bị lên men 2 lít hoặc 100 lít ở điều kiện 28°C, pH 6,0, khuấy 200-500 vòng/phút. Nhiệt độ, pH và DO được kiểm soát bởi các cảm biến trong bình lên men.

Sinh khối sau lên men 96 giờ được thu nhận bằng phương pháp ly tâm và được sử dụng để tách chiết protein lactoferrin theo phương pháp xử lý với đệm chứa 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2% SDS; siêu âm 30 giây và ly tâm 14000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C để thu dịch chứa protein lactoferrin. Dịch protein lactoferrin được bảo quản ở -20°C.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích đã được tối ưu để có khả năng tổng hợp lactoferrin bò một cách hiệu quả. Chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp này có khả năng sinh tổng hợp lactoferrin bò trong điều kiện môi trường nuôi đơn giản, rẻ tiền, phù hợp sản xuất ở quy mô công nghiệp. Đây là đặc điểm rất có ý nghĩa trong chiến lược phát triển sản xuất lactoferrin bằng con đường công nghệ sinh học.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lactoferrin bò, khác biệt ở chỗ chủng này mang cấu trúc chứa gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và mã hóa cho protein lactoferrin bò.
2. Quy trình tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp nêu trong điểm 1, quy trình này bao gồm các bước:
 - a) khuếch đại đoạn gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 từ trình tự gen tối ưu được tổng hợp hoá học bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 và SEQ ID NO. 3 thu được sản phẩm PCR;
 - b) tách dòng đoạn gen *mbLf_{opt}* vào vector pPICZ α A bằng cách xử lý lần lượt sản phẩm PCR bằng cặp enzyme cắt hạn là *EcoRI/XbaI* với lượng 5U/ μ g ADN ở 37°C, sau đó nối đoạn gen này vào vector pPICZ α A bằng ADN enzyme T4 ligaza với lượng 5U/phản ứng, sau khi biến nạp vào *E.coli* DH5 α khả biến và chọn lọc trên môi trường thạch LB chứa 100 μ g/ml bleomycin, chiết thu được vector tái tổ hợp pPICZ-*mbLf_{opt}*; và
 - c) tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pPICZ-*mbLf_{opt}* vào chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71H, sau khi chọn lọc trên môi trường YPD chứa kháng sinh bleomycin thu được chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp chứa gen *mbLf_{opt}* có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và mã hóa cho lactoferrin bò.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội
 <120> Chúng nấm men *Pichia pastoris* tái tổ hợp sinh tổng hợp lactoferrin bò và quy trình tạo ra chủng này

<160> 3

<210> 1

<211> 2100

<212> ADN

<213> Tái tổ hợp

<400> 2100

GAATTCGCCC	CAAGAAAGAA	CGTCAGATGG	TGTACTATCA	GTCAGCCAGA	GTGGTTTAAAG	60
TGTAGAAGAT	GGCAGTGGAG	AATGAAGAAG	TTGGGTGCTC	CATCTATTAC	TTGTGTTAGA	120
AGAGCTTTTG	CTTTGGAATG	TATTAGAGCT	ATTGCTGAGA	AGAAAGCTGA	TGCTGTTACT	180
TTGGATGGTG	GTATGGTTTT	CGAAGCTGGT	AGAGATCCAT	ACAAACTTAG	ACCAGTTGCT	240
GCTGAAATCT	ACGGTACTAA	GGAGTCTCCT	CAAACATCAT	ACTATGCTGT	TGCTGTTGTT	300
AAGAAAGGTT	CTAACTTCCA	ATTGGATCAA	TTGCAAGGTA	GAAAGTCTTG	TCACACTGGT	360
TTGGGTAGAT	CCGCTGGTTG	GATTATTCCA	ATGGGTATTC	TTAGACCATA	CTTGTCTTGG	420
ACTGAATCTT	TGGAGCCATT	GCAAGGTGCT	GTTGCTAAAT	TTTTCTCTGC	TTCTTGTGTT	480
CCATGTATTG	ATAGACAAGC	TTATCCTAAC	TTGTGTCAAT	TGTGTAAGGG	TGAAGGAGAG	540
AATCAATGTG	CTTGTTCTTC	CAGAGAACCA	TACTTTGGTT	ATTCTGGTGC	TTTCAAATGT	600
TTGCAAGATG	GTGCTGGAGA	TGTTGCTTTC	GTTAAGGAGA	CTACTGTTTT	CGAAAACTTG	660
CCTGAGAAGG	CTGATAGAGA	TCAATACGAA	TTGTTGTGTT	TGAACAACCTC	TCGTGCTCCA	720
GTTGATGCTT	TTAAAGAGTG	TCATTTGGCT	CAAGTTCCCT	CTCACGCTGT	TGTTGCTAGA	780
TCCGTTGATG	GTAAAGAAGA	TTTGATTTGG	AAGTTGTTGT	CTAAAGCTCA	AGAGAAGTTC	840
GGTAAAAACA	AGTCCAGATC	CTTTCAATTG	TTCGGTTCTC	CACCTGGTCA	AAGAGATTTG	900
TTGTTTAAAG	ATTCTGCTTT	GGGTTTCTTG	AGAATCCCAT	CTAAGGTTGA	TTCTGCTTTG	960
TACTTGGGTT	CCAGATATTT	GACTACTTTG	AAAACTTGA	GAGAACTGC	TGAAGAGGTT	1020
AAGGCTAGAT	ACACTAGAGT	TGTTTGGTGT	GCTGTTGGTC	CTGAAGAGCA	AAAGAAATGT	1080
CAACAATGGT	CCCAACAATC	TGGTCAAAAT	GTTACTTGTG	CTACTGCTTC	TACTACTGAT	1140
GATTGTATCG	TTTTGGTTTT	GAAAGGTGAA	GCTGATGCTT	TGAACTTGGA	TGGTGGTTAC	1200
ATCTACACTG	CTGGTAAATG	TGGTTTGGTT	CCAGTTTGGG	CTGAGAACAG	AAAGTCTTCT	1260
AAGCATTTCT	CTTTGGATTG	TGTTCTTAGA	CCAAGTGAAG	GTTATTTGGC	CGTCGCTGTT	1320
GTTAAGAAAG	CTAACGAGGG	TTTGAAGTTG	AACTCTTTGA	AGGATAAGAA	ATCTTGTCAC	1380
ACTGCTGTTG	ATAGAAGTGC	TGGTTGGAAC	ATTCCAATGG	GTTTGATTGT	TAATCAAAC	1440
GGTTCTTGTT	CTTTTGATGA	ATTTTTCTCT	CAATCTTGTT	CTCCAGGTGC	TGATCCTAAA	1500
TCCAGATTGT	GTGCTTTGTG	TGCTGGAGAT	GATCAAGGTT	TGGATAAGTG	TGTTCCCTAAC	1560
TCTAAGGAAA	AATACTATGG	TTACACTGGT	GCTTTTAGAT	GTTTGCTGTA	GGATGTCGGA	1620
GATGTCGCTT	TCGTTAAAAA	TGATACTGTT	TGGGAAAAACA	CTAATGGAGA	GTCTACTGCT	1680
GATTGGGCTA	AAAAGTTGAA	CAGAGAAGAT	TTCAGATTGT	TGTGTTTGGA	TGGTACTAGA	1740
AAGCCAGTTA	CTGAGGCTCA	ATCTTGTCAT	TTGGCTGTTG	CTCCTAATCA	CGCTGTTGTT	1800
TCCAGATCCG	ATAGAGCTGC	TCATGTTAAA	CAAGTTTTGT	TGCACCAACA	AGCTTTGTTT	1860
GGTAAAAACG	GTAAAAATTG	TCCTGATAAG	TTCTGTTTGT	TCAAATCTGA	AACTAAGAAC	1920
TTGTTGTTCA	ACGATAACAC	TGAGTGTTTG	GCTAAGTTGG	GTGGTAGACC	TACTTACGAA	1980
GAGTATTTGG	GTACTGAATA	CGTTACTGCT	ATCGCTAATT	TGAAGAAATG	TTCTACATCC	2040

CCACTTTTGG AGGCTTGTGC TTTTCTTACC AGACACCATC ATCACCACCA TTAGTCTAGA 2100

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Mỗi xuôi

<400> 22

GAATTCGCCCCAAGAAAGAACG

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Mỗi ngược

<400> 22

TCTAGACTAATGGTGGTGATGA