



(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)



1-0035676

(51)⁷ C07K 14/195; A01N 63/02

(13) B

(21) 1-2019-00278

(22) 19/07/2017

(86) PCT/IB2017/054354 19/07/2017

(87) WO/2018/015895 A1 25/01/2018

(30) 201611024726 19/07/2016 IN

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/07/2019 376A

(73) NATIONAL INSTITUTE OF PLANT GENOME RESEARCH (IN)

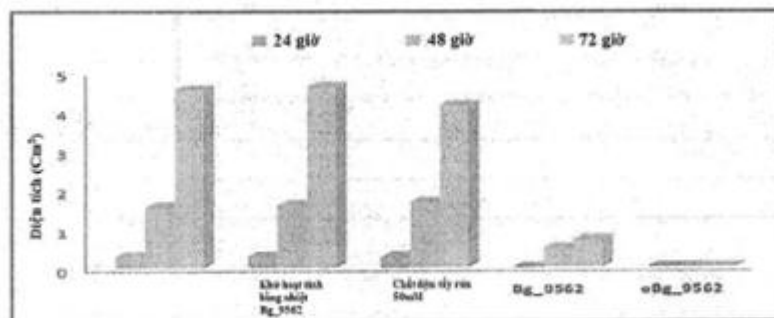
Aruna Asaf Ali Marg, P.O. Box No. 10531, New Delhi 110 067, India

(72) SWAIN, Durga Madhab (IN); YADAV, Sunil Kumar (IN); JHA, Gopaljee (IN).

(74) Công ty TNHH Tư vấn ALIATLEGAL (ALIAT LEGAL)

(54) PROTEIN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM PHỔ RỘNG, CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến protein có hoạt tính kháng nấm phổ rộng bao gồm các loại gen mới được chiết xuất từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1. Sáng chế còn đề xuất trình tự nucleotit mã hóa protein có trình tự của SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của protein mới có trình tự của SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit và trình tự axit amin thu được từ gen Bg_9562 kỹ thuật di truyền. Protein mới cũng như gen mã hóa được điều chỉnh cho phù hợp với các hoạt tính kháng nấm và ăn nấm theo phổ rộng. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm, phương pháp sản xuất protein có hoạt tính kháng nấm phổ rộng và phương pháp kiểm soát bệnh do nấm gây ra ở cây trồng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến protein có hoạt tính kháng nấm phổ rộng có thể kháng các mầm bệnh do nấm gây ra. Cụ thể hơn, sáng chế liên quan đến loại protein được chiết xuất từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 chống lại nấm bệnh để kiểm soát nhiều loại bệnh về nấm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn có mặt ở khắp nơi được tìm thấy trong đất, trong nước, trong không khí, v.v., và còn cả trong các sinh vật đa bào bao gồm côn trùng, thực vật và động vật. Chúng có hệ thống giao tiếp tế bào rất tích cực và đôi khi có thể hoạt động như các sinh vật đa bào bằng cách hình thành các màng sinh học. Để tồn tại, chúng cần cạnh tranh với các vi khuẩn, nấm cùng chung sống, v.v., và phải sống cùng hay liên kết với thực vật, động vật, v.v., (Frey-Klett và các đồng tác giả, 2011; Reinhold-Hurek và Hurek, 2011). Sự tương tác giữa vi khuẩn với các sinh vật khác có thể là hỗ sinh, hội sinh, đối kháng hay ký sinh (Haas và Défago, 2005; Frey-Klett và các đồng tác giả, 2011). Thông thường, chúng trực tiếp thúc đẩy sự phát triển của thực vật bằng cách tổng hợp nội tiết tố thực vật (phytohormon), v.v., hoặc gián tiếp giúp thực vật bằng cách bảo vệ chúng khỏi các vi sinh vật gây bệnh tiềm ẩn (Haas và Défago, 2005; Lugtenberg và Kamilova, 2009; Beneduzi và các đồng tác giả, 2012).

Các vi khuẩn cho thấy sự tương tác đối kháng được xem như các tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng. Cơ chế kiểm soát sinh học nói chung được cho là do vi khuẩn tạo ra các chất chuyển hóa kháng nấm (bacillaen, diffixidin, fengycin, macrolactin, surfactin v.v.), enzym phân giải kitin, siderophore, các chất độc, v.v., bởi các vi khuẩn (Huang và các đồng tác giả, 2005; Tortora và các đồng tác giả, 2011; Raaijmakers và Mazzola, 2012). Một điều thú vị là trong số các vi khuẩn kháng nấm, có rất ít loài có thể sinh trưởng và phát triển bằng cách làm sinh trưởng nguồn sinh khối nấm. Sự tương tác như vậy gọi là tính ăn nấm của vi khuẩn (động vật ăn nấm) (Leveau và Preston, 2008). Một trong số các bằng chứng trực tiếp đầu tiên về tính ăn nấm của vi khuẩn đã được báo

cáo về *Collimonas* mà không có bất kỳ chất dinh dưỡng bổ sung nào có thể phát triển trong đất hấp tiết trùng, với sự có mặt của sợi nấm sinh trưởng nhiều lan ra ba đụn đất thông thường ví dụ, *Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum*, và *Mucorhiemalis* (Höppener-Ogawa và các đồng tác giả, 2009).

Burkholderia là vi khuẩn Gram âm hình que được tìm thấy trong nhiều môi trường sống đa dạng. Số ít trong số chúng được báo cáo là có thể gây bệnh cho thực vật và con người; tuy nhiên, cũng có báo cáo về một số loại có các hoạt tính tiềm năng cho việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật, sống trong mô, và thuộc chủng kháng nấm. Gần đây, việc xác định trình tự gen của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 từ cây lúa đã được thực hiện (Jha và các đồng tác giả, 2015). *Rhizoctonia solani* là một trong những loài nấm gây bệnh quan trọng sinh ra trong đất, là tác nhân gây nhiều loại bệnh có tầm quan trọng về mặt kinh tế đối với nhiều loại cây trồng, bao gồm cả lúa (Zheng và các đồng tác giả, 2013; Ghosh và các đồng tác giả, 2014; Hane và các đồng tác giả, 2014). Nó được coi là nghĩa địa của nghề trồng lúa. Tuy nhiên, đáng chú ý là một số loài vi khuẩn bao gồm *Burkholderia*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Psuedomonas* v.v., được biết đến là có khả năng kháng nấm đối với *R. solani* (Andersen và các đồng tác giả, 2003; Elshafie và các đồng tác giả, 2012; Huang và các đồng tác giả, 2012; Mela và các đồng tác giả, 2012).

Các tác nhân kiểm soát sinh học này rất hữu ích trong việc cung cấp các phương án thân thiện với môi trường và hệ sinh thái thay cho các hóa chất diệt nấm để kiểm soát các loại bệnh khác nhau đối với thực vật; tuy nhiên có những hạn chế trong việc sử dụng chúng trực tiếp. Một số vi khuẩn kiểm soát sinh học tạo ra các hợp chất lytic như các enzym lytic ngoại bào, siderophores, axit salixylic, kháng sinh, và các chất chuyển hóa dễ bay hơi, như hydro xyanua (axit xianhydric HCN) (Nagarajkumar và các đồng tác giả, 2004; Manwar và các đồng tác giả, 2005; Compant và các đồng tác giả, 2005; Kishore và các đồng tác giả, 2005; Sharifi và các đồng tác giả, 2005; Afsharmanesh và các đồng tác giả, 2006) là các tác nhân kháng nấm. Ngoài ra, nhiều loại protein kháng nấm mới như Baxiamin, được tạo ra bởi *Bacillus amyloliquefaciens* (Wong và các đồng tác giả, 2008), B29I, được tạo ra bởi *B. subtilis* thuộc chủng B29 (Li và các đồng tác giả, 2009), protein F2, được tạo ra bởi *B. licheniformis* (Tang-Bing và các đồng tác giả, 2012), protein PPEBL21, được tạo ra bởi vi khuẩn *Escherichia coli* thuộc chủng BL21 (Yadav và các đồng tác giả, 2012) và một loại protein giả định (gi154685475) được tạo

ra bởi *B. subtilis* B25 (Tan và các đồng tác giả, 2013) có tác dụng ngăn ngừa đã được chứng minh đối với các loại mầm bệnh khác nhau đối với thực vật.

Đơn đã được công bố của Hàn Quốc KR 200641054 liên quan đến phương pháp ngăn ngừa bệnh thán thư ở cây bằng cách sử dụng một dung dịch nuôi cấy thuộc chủng *Bacoliella gladiolis* NIAB 131-133 có hoạt tính kháng vi khuẩn và phương pháp ức chế nấm gây bệnh thán thư (*Colletotrichum gloeosporioides*) sử dụng dung dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *Bacillaria gladioli* NIAB 131-133. Chủng vi khuẩn có tác dụng chống lại các chủng nấm nhưng không đặc hiệu cho cây lúa và các bệnh liên quan.

Đơn đã được công bố của Nhật Bản JP2010047532 cung cấp biện pháp mới sử dụng các vi sinh vật thuộc giống *Burkholderia* làm phương pháp kiểm soát bệnh thực vật thực hiện bằng cách phun các vi sinh vật thuộc giống *Burkholderia* và cho thấy tác dụng kháng khuẩn chống lại mầm bệnh trên tán lá cây và một phương pháp kiểm soát bệnh thực vật để kiểm soát các vi sinh vật của giống *Burkholderia*.

Tuy nhiên, bất chấp nỗ lực rộng rãi trên toàn cầu, cho đến nay vẫn chưa xác định được nguồn kháng bệnh hoàn toàn cho bệnh khô vằn ở cây lúa do nấm *Rhizoctonia solani* gây ra. Hơn nữa, cũng không có các biện pháp kiểm soát phù hợp được triển khai đối với vi khuẩn *Rhizoctonia solani*, mà việc này cũng ích lợi cho việc kiểm soát nhiều bệnh khác do *R. solani* gây ra đối với các cây trồng quan trọng khác nhau. Hơn nữa, ngoài *R. solani*, thực vật còn dễ bị nhiễm một số loại nấm bệnh khác. Để kiểm soát chúng theo cách thân thiện với môi trường vẫn còn là một thách thức. Do đó, phát triển chiến lược cho các hợp chất kháng nấm trên diện rộng sẽ rất hữu ích để kiểm soát các bệnh nấm ở các loại thực vật/cây trồng khác nhau.

Để khắc phục các vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất trình tự gen được biến đổi gen của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1. Protein tinh lọc và biểu hiện vượt trội của vi khuẩn cho thấy hoạt tính kháng nấm đối với *R. solani*. Hơn nữa, protein tinh lọc thể hiện hoạt tính kháng nấm trên diện rộng chống lại một số mầm bệnh gây hại trong nông nghiệp bao gồm : *Magnaporthe oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Dedymella* sp., *Phytophthora* sp., *Colletotrichum* sp., *Ascochyta rabiei*, *Neofusicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida albicans*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất một loại protein mới bao gồm các gen mới được chiết xuất từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1. Trình tự nucleotit mã hóa protein mới có trình tự của SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của protein mới có trình tự của SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án khác, trình tự nucleotit và trình tự axit amin thu được từ gen Bg_9562 được biến đổi gen. Theo một phương án, trình tự nucleotit mã hóa protein mới ít nhất giống 70% với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2. Theo một phương án khác, trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 có ít nhất từ 1 đến 90 lần thay thế, xóa bỏ và/hoặc chèn thêm axit nucleotit. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất từ 1 đến 30 sự thay thế, xóa bỏ và/hoặc chèn thêm axit amin. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 thay đổi theo 11 axit amin thay thế.

Theo một phương án khác, protein mới được điều chỉnh cho thích nghi với các hoạt tính kháng nấm trên diện rộng và tạo ra hàm lượng protein cao. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của protein mới dài 111 gốc axit amin với trọng lượng phân tử khoảng ~13 kDa, độ pI vào khoảng 4,65 và độ pH tối ưu vào khoảng 7,4.

Theo một phương án khác, protein mới được điều chỉnh cho thích nghi với các hoạt tính kháng nấm và ăn nấm ngăn chặn sự sinh trưởng của hạch nấm và gây chết tế bào trong sợi nấm. Theo một phương án khác, hoạt tính kháng nấm của gen Bg_9562 rất có lợi cho việc để kiểm soát bệnh khô vằn ở lúa và các cây trồng khác do *Rhizoctonia solani* gây ra. Theo một phương án khác, sáng chế đưa ra phương pháp điều chế protein mới bằng trình tự của SEQ ID NO: 2 có hoạt tính kháng nấm. Phương pháp bao gồm các bước: (i) nhận dạng protein mới có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính ăn nấm từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1, (ii) trình tự gen và trình tự protein được tạo ra bằng việc tổng hợp nhân tạo protein đã được nhận dạng trong bước (i) và gộp sự biến đổi gen như mong muốn vào protein đã được nhận dạng để tổng hợp gen thông qua phương pháp tổng hợp gen, (iii) protein đã tiến hóa được biểu hiện vượt trội trong vector biểu thức pET28a, (iii) protein biểu hiện vượt trội được tinh lọc bằng phương pháp sắc ký hóa học Ni-NTA, (iv) protein tinh lọc được đánh giá hoạt tính kháng nấm và (v) tính chất kháng nấm của protein được thiết lập bằng phương pháp di

truyền ngược. Sự biểu hiện tái tổ hợp của protein mới ngăn chặn sự phát triển của hạch nấm, gây chết tế bào trong sợi nấm và điều trị một số bệnh ở người/động vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm từ peptit mới. Các thành phần của chế phẩm bao gồm dầu được chọn từ nhóm bao gồm dầu hạnh nhân, dầu hạt cải và dầu mè; các chất cô đặc được lựa chọn từ sáp ong, bơ ca cao và bơ hạt mỡ, chất nhũ hóa được chọn từ nhóm bao gồm các rượu như rượu xetyl; và nước.

Theo một phương án khác, chế phẩm mã hóa peptit mới được điều chỉnh cho phù hợp với sự kháng bệnh từ nấm trên diện rộng theo đó nấm được lựa chọn từ nhóm bao gồm *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae*, *Magnaporthe oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Fusarium oxysporum*, *Dedymella* sp., *Phytophthora* sp., *Colletotrichum* sp., *Ascochyta rabiei*, *Neofusicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida albicans*.

Theo một phương án khác, sáng chế cung cấp quy trình điều chế chế phẩm. Quy trình bao gồm các bước: (i) Sản xuất protein Bg_9562 với số lượng lớn bằng phương pháp lên men trong bình phản ứng sinh học, (ii) sản phẩm lên men thu được được bọc kín bởi các hạt nano chitosan hoặc không phải chitosan; và (iii) sản phẩm được bọc kín như trong bước (ii) được sử dụng để tạo ra chất kem/thuốc mỡ gốc nước hoặc dầu và, (iv) sản phẩm như trong bước (iii) còn được dùng để tạo thành các lớp màng kháng nấm bao gồm tinh bột/các loại dầu.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kiểm soát nấm bệnh ở cây trồng hay thực vật bằng cách áp dụng một polypeptit bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, hay một chế phẩm đưa vào cây trồng nhiễm bệnh, hoặc bộ phận cây trồng nhiễm bệnh, hay thực vật nhiễm bệnh, người và động vật có nguy cơ bị nhiễm bệnh nấm.

Theo một phương án khác, protein được tạo ra bằng biểu hiện nucleotit mã hóa của nó trong các tế bào vi khuẩn, men, côn trùng, thực vật, con người hay động vật sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 Hành vi ăn nấm và kháng nấm của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 trên nấm *Rhizoctonia solani*. Vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 ức chế sự phát triển của nấm (hình thành vùng ức chế) trong 3 dpi (ngày sau ghép mầm cây) trong môi trường đồng nuôi cây. Sau đó, tại thời điểm 8 dpi (ngày sau ghép mầm cây), vi khuẩn được phát hiện phát triển khắp toàn bộ sợi nấm. Việc phát triển

bình thường của *R. solani* và chủng NGJ1 (riêng rẽ) được quan sát trên các khay PDA (Potato Dextrose Agar - môi trường dùng để phát hiện nấm men, nấm mốc trong mẫu thực phẩm và các mẫu vật khác). Trên các khay CDA (Czapek Dox Agar - Môi trường nuôi cấy nấm mốc), nấm *R. solani* sinh trưởng (mặc dù chậm) đã bao phủ toàn bộ khay, nhưng chủng NGJ1 cho thấy phát triển rất chậm. Tuy nhiên, khi gặp các sợi nấm, hành vi ăn nấm (vi khuẩn bao trùm lên nấm và phân hủy các sợi nấm) diễn ra rất nhiều trên các khay CDA.

Fig.2 Quá trình nhân bản và tinh lọc protein. (a) Cấu trúc tiêu hóa hạn chế của gen Bg_9562 được nhân bản trong vector biểu hiện pET28a. (b) Tinh lọc protein biểu hiện vượt trội bằng sắc ký Ni²⁺-NTA (L1- Dấu chuẩn, L2 – nước chảy qua, L3 – rửa sạch 50mM, L4 & L5- 100mM tinh lọc imidazon, L6 & L7- 200mM tinh lọc). (c) Sử dụng phương pháp Western blot cho protein Bg_9562 bằng kháng thể kháng His.

Fig.3 Tác động của protein Bg_9562 đối với sự sinh trưởng hạch nấm. (a) Hạch nấm *Rhizoctonia solani* được xử lý với 15µg/ml protein Bg_9562 cũng như các kiểu kiểm soát khác nhau (kiểm soát đậm, làm sạch 50mM và protein bất hoạt bằng nhiệt). Các ảnh đại diện về sự sinh trưởng của nấm trên các khay PDA ở 48 giờ sau xử lý được minh họa. (b) Việc ức chế sự sinh trưởng của nấm đối với việc xử lý protein eBg_9562. 15 µg/ml được biến đổi đủ để ngăn chặn sự sinh trưởng của *R. solani* trên khay PDA trong khi hạch nấm được xử lý bằng chất đậm cho thấy sự phát triển phù hợp. Các ảnh đại diện về sự sinh trưởng của nấm tại các khoảng thời gian khác nhau được minh họa. (c) Khu vực phát triển sợi nấm *R. solani* tại các khoảng thời gian khác nhau sau khi xử lý hạch nấm bằng 15µg/ml protein Bg_9562 và protein eBg_9562. Chất đậm, Bg_9562 bất hoạt bằng nhiệt và làm sạch 50 mM được sử dụng làm phương tiện phòng ngừa (*protein eBg_9562 là protein Bg_9562 đã phát triển*). (d) Ước tính protein thông qua Bradford cho thấy tăng cường sản xuất protein eBg_9562 so với Bg_9562 kiểu đại.

Fig.4 Thử nghiệm MTT cho thấy protein Bg_9562 gây ra phản ứng chết tế bào ở nấm. (a) Xét nghiệm MTT ở hạch nấm *R. solani* sau khi xử lý với 15µg/ml protein Bg_9562 hay chất đậm PBS. Sự xuất hiện của sắc tố nâu trong quá trình kiểm soát cho thấy các tế bào sống trong khi việc thiếu sự hình thành màu sắc trong các mẫu được xử lý protein cho thấy tế bào chết ở nấm.

Fig.5 Tạo ra *B. gladioli* đột biến bị bất hoạt trong sản xuất protein Bg_9562. (a) Đoạn gen một phần của gen Bg_9562 được nhân bản trong vectơ mob pK18, hình ảnh mô tả sự giải phóng đoạn chèn khi tiêu hóa hạn chế (b) plasmit pK18 mob-9562 được huy động vào bộ gen NGJ1 và các tái tổ hợp được chọn lọc trên khay kháng sinh. Chất khuếch đại PCR thu được thông qua quần thể PCR sử dụng gen cụ thể.

Chú thích: PCR (phản ứng chuỗi polymerase)

Fig.6 Hoạt tính kháng nấm của Bg_9562 đột biến và bổ sung cho các chủng *B. gladioli*. (a) Hai thể đột biến độc lập (NGJ100, NGJ101) của Bg_9562 được phát hiện có khiếm khuyết trong hoạt tính ăn nấm, vì chúng không thể ngăn ngừa nấm phát triển. Đáng lưu ý, việc xử lý bằng NGJ1 kiểu dại có thể ngăn ngừa sự phát triển của hạch nấm. (b) Các bổ thể NGJ102 và NGJ103 (thể hiện bản sao có chiều dài đầy đủ của gen Bg_9562 trên plasmit phạm vi vật chủ rộng, pHM1) đáp ứng được mức độ của NGJ1 kiểu dại trong việc thể hiện hoạt tính kháng nấm/ăn nấm của *R. solani*. Các hình vẽ minh họa sự phát triển của hạch nấm sau 7 ngày thực hiện các cách xử lý khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong khi sáng chế này dễ dàng áp dụng với các thay đổi khác nhau và/hoặc các quy trình và/hoặc các chế phẩm thay thế, phương án cụ thể của sáng chế đã được trình bày thông qua các ví dụ và bảng biểu và được mô tả chi tiết dưới đây. Cần hiểu rằng dù không có ý định giới hạn sáng chế vào các quy trình và/hoặc các chế phẩm cụ thể được bộc lộ, mà trái lại sáng chế đề cập đến tất cả các thay đổi, các thể tương đương thuộc tinh thần và phạm vi của sáng chế như xác định trong các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Các ví dụ, bảng biểu, và quy trình thí nghiệm được trình bày ở bất cứ chỗ nào phù hợp, trình bày chỉ những chi tiết cụ thể phù hợp với sự hiểu biết các phương án của sáng chế để phần trình bày không gây khó hiểu với những chi tiết rất rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể nắm được phần mô tả ở đây.

Phần mô tả sau đây về các phương án chỉ mang tính ví dụ và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi, khả năng áp dụng hoặc định dạng của sáng chế bằng bất cứ cách nào. Hơn nữa, phần mô tả sau trình bày việc minh họa thích hợp để thực hiện các phương án mang tính minh họa của sáng chế. Những thay đổi khác nhau đối với các

phương án được mô tả có thể được thực hiện trong chức năng và cách sắp xếp các yếu tố được mô tả mà không nằm ngoài phạm vi sáng chế.

Các thuật ngữ “bao gồm”, “gồm có”, hay bất cứ một biến thể nào của nó là nhằm mục đích đề cập tất cả các phần không hạn chế, chẳng hạn như một hay nhiều quy trình hay chế phẩm/ các chế phẩm hoặc các hệ thống hoặc các phương pháp mà đằng trước có từ “bao gồm”. Có nghĩa là không loại trừ sự tồn tại của các quy trình khác, các quy trình con, các chế phẩm, chế phẩm con, chế phẩm chính yếu và phụ hoặc các yếu tố hay các kết cấu khác hay các quy trình hoặc chế phẩm bổ sung hoặc các yếu tố bổ sung, hoặc các đặc điểm bổ sung hay các đặc tính bổ sung hoặc các thuộc tính bổ sung mà không có bất cứ hạn chế nào.

Trong phần quy cách kỹ thuật và trong các yêu cầu bảo hộ sau đó, phần tham chiếu được thực hiện với một số thuật ngữ sẽ được định nghĩa mang ý nghĩa như sau:

Như sử dụng trong phần quy cách kỹ thuật/mô tả và các yêu cầu bảo hộ đi kèm và các ví dụ, cần lưu ý rằng các dạng mạo từ một, một vài, hàm ý số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định rõ nghĩa khác.

Phạm vi có thể được biểu thị ở đây là “từ khoảng” một giá trị cụ thể, và hoặc “tới khoảng” một giá trị cụ thể khác. Khi một phạm vi như vậy được biểu thị, một khía cạnh khác bao gồm từ một giá trị cụ thể và hoặc đến giá trị cụ thể khác. Tương tự, khi các giá trị được biểu thị là các giá trị gần đúng, bằng cách sử dụng tiền đề “khoảng”, thì được hiểu là giá trị cụ thể hình thành một phương diện khác. Cần hiểu thêm rằng điểm mấu chốt của mỗi một phạm vi có ý nghĩa trong cả việc liên quan với điểm mấu chốt khác và độc lập với điểm mấu chốt khác.

Vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 cho thấy hoạt tính nấm trước kia cách ly khỏi cây lúa khỏe mạnh (Jha và các đồng tác giả. 2015) và đặc biệt vector biểu hiện pET28a có sẵn trên hồ sơ tài liệu nay có sẵn về mặt thương phẩm từ Novagen (Merck Life Science Private Limited) được sử dụng trong sáng chế để biểu hiện trình tự mới của gen Bg_9562. Do đó, vật liệu sinh học được mô tả đầy đủ trong sáng chế.

Sáng chế cung cấp gen và protein mới có thể có hoạt tính kháng nấm trên diện rộng lấy từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 và sự biểu hiện của nó trong vector biểu hiện pET28a.

Như trình bày ở phần trước, vẫn có nhu cầu đối với trình tự gen có hoạt tính kháng nấm trên diện rộng đối với các mầm bệnh nghiêm trọng trong nông nghiệp, bao gồm *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe oryzae*, *Venturia inaequalis*, và *Fusarium oxysporum*. Đồng thời, hoạt tính kháng nấm phải hữu ích để điều trị các bệnh do nấm gây ra ở động vật cũng như con người.

Định nghĩa:

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Hành vi ăn nấm” khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến hành vi của các sinh vật tiêu thụ nấm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Hành vi kháng nấm” khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến điều trị và ngăn ngừa các bệnh nấm như bệnh nấm ở bàn chân, hắc lào, bệnh nấm candida (loét miệng), các bệnh nhiễm trùng toàn thân nghiêm trọng như viêm màng não do nấm *cryptococcus*, và các bệnh khác kháng nấm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đột biến” khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến việc xảy ra là do kết quả của hoặc cho thấy ảnh hưởng của sự đột biến.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sự đột biến chèn” khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến khả năng gây đột biến ADN bằng cách chèn một hoặc nhiều bazơ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phương pháp di truyền ngược” khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến phương pháp tiếp cận để khám phá chức năng của gen bằng cách phân tích các tác động kiểu hình của các trình tự gen được thao tác di truyền cụ thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc nhận dạng protein mới có hoạt tính kháng nấm và ăn nấm từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đưa ra việc biểu hiện quá giới hạn và tinh lọc protein kháng nấm tiềm năng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình đánh giá hoạt tính kháng nấm của protein mới. Vẫn còn một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc xác lập vai trò của protein kháng nấm thông qua phương pháp tiếp cận di truyền ngược.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các loại gen và protein mới có các hoạt

tính kháng nấm trên diện rộng. Các loại gen mới biểu hiện protein mới từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 cho thấy đặc tính ăn nấm (tính ăn nấm). Trình tự nucleotit mã hóa protein mới được biểu hiện bởi trình tự của SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của protein mới được biểu hiện bằng trình tự của SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất trình tự nucleotit được biến đổi gen mới và trình tự peptit của gen Bg_9562 có hoạt tính kháng nấm mạnh, giúp ức chế thêm sự phát triển của hạch nấm, gây chết tế bào trong sợi nấm và điều trị nhiễm nấm cho người/động vật.

Theo một phương án, trình tự nucleotit mã hóa protein mới ít nhất có 70% tương đồng với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2. Theo một phương án khác, trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 có ít nhất từ 1 đến 90 thể thay thế, xóa bỏ, và/hoặc chèn thêm axit nucleotit. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất từ 1 đến 30 thể thay thế, xóa bỏ, và/hoặc chèn thêm axit amin. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất từ 2 đến 20 thể thay thế, xóa bỏ, và/hoặc chèn thêm axit amin. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất từ 2 đến 15 thể thay thế, xóa bỏ, và/hoặc chèn thêm axit amin. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất từ 5 đến 15 thể thay thế, xóa bỏ, và/hoặc chèn thêm axit amin. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 thay đổi khoảng 11 thể thay thế axit amin. Theo một phương án khác, trong trình tự trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 có ít nhất một hay nhiều gốc Leuxin, Valin, và/hoặc Isoleuxin được thay thế.

Theo một phương án, protein mới lan truyền, cho thấy hiệu quả kháng nấm được cải thiện, phạm vi kháng nấm mở rộng, tính hòa tan được nâng cao, tính ổn định nhiệt tốt lên, và tạo ra khả năng tái tổ hợp được cải thiện so với chủng kiểu dại của *Burkholderia gladioli*. Theo một phương án, protein mới được điều chỉnh cho các hoạt tính kháng nấm trên diện rộng và tạo ra hàm lượng protein cao. Theo một phương án khác, trình tự axit amin dài 111 gốc và có trọng lượng phân tử khoảng ~13kDa, độ pI khoảng 4,65 và độ pH tối ưu vào khoảng 7,4.

Theo một phương án của sáng chế, đột biến gen Bg_9562 thông qua gây đột biến chèn dẫn đến làm mất hoạt tính kháng nấm và hoạt tính ăn nấm của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1. Theo một phương án, hoạt tính kháng nấm

của gen Bg_9562 rất hữu ích để kiểm soát bệnh khô vằn ở lúa và các cây trồng khác do *Rhizoctonia solani* gây ra.

Theo một phương án của sáng chế, việc chèn bản sao có chiều dài đầy đủ của gen có thể bổ sung cho khiếm khuyết và khôi phục hoạt tính kháng nấm và ăn nấm. Thêm một phương diện nữa của sáng chế là cung cấp gen Bg_9562 mã hóa protein kháng nấm có thể được sử dụng để chất kiểm soát bệnh liên quan đến nấm. Theo một phương án khác của sáng chế, hoạt tính kháng nấm của gen Bg_9562 là đặc biệt kháng hạch nấm *Rhizoctonia solani* loại có thể gây bệnh khô vằn ở cây lúa. Theo một phương án khác của sáng chế, vi khuẩn Bg_9562 gây ra phản ứng chết tế bào ở hạch nấm *Rhizoctonia solani*.

Theo một phương án khác của sáng chế, trình tự nucleotit và trình tự peptit mới được điều chỉnh cho phù hợp để kiểm soát các loại bệnh do *R. solani* gây ra ở cây lúa (bệnh khô vằn) cũng như các loại cây trồng khác (bệnh héo cây con ở đậu nành/cà chua; vẩy mốc đen ở khoai tây, thối rễ củ cải, thối rễ dưa chuột, mốc loang lỗ ở ngũ cốc), nấm bệnh hại lúa (như bệnh khô vằn cũng như bệnh đạo ôn), bệnh về nấm của thực vật (như đề cập ở Bảng 1) và được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm nấm của người/động vật. Ví dụ, điều trị bệnh nhiễm nấm men *Candida* trong người/động vật. Theo một phương án khác của sáng chế, nucleotit và protein mới được điều chỉnh cho phù hợp để sử dụng dưới dạng thuốc phun hoặc thuốc mỡ cho các ứng dụng khác nhau, như việc chuyển hóa gen để phát triển cây lúa kháng nấm trên diện rộng cũng như các loại cây trồng trọng yếu khác, tạo ra thể kháng bệnh ở cây lúa cũng như các loại cây trồng khác kháng lại các bệnh nhiễm nấm *R. solani*. Hơn nữa, việc chuyển hóa gen có thể được sử dụng để tạo ra sự kháng bệnh chống lại các bệnh nhiễm nấm khác gây ra.

BẢNG 1: Danh sách các loại nấm được sử dụng để kiểm tra hoạt tính kháng nấm của protein Bg_9562

STT	Chủng Nấm	Bệnh
1	<i>Rhizoctonia solani</i>	Bệnh khô vằn ở cây lúa/ bệnh héo cây con ở đậu nành và cà chua/vẩy mốc đen ở khoai tây/thối rễ củ cải/thối rễ dưa chuột/mốc loang lỗ ở ngũ cốc
2	<i>Alternaria brassicae</i>	Đốm đen trên cây họ cải

3	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Bạc lá/đạo ôn trên ngũ cốc
4	<i>Venturia inaequalis</i>	Bệnh ghẻ trên táo
5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Bệnh héo tàn của cà chua, thuốc là, khoai lang, chuối, cây họ đậu
6	<i>Dedymella</i> sp.	Bệnh nứt thân chảy nhựa của cây họ bầu bí
7	<i>Phytophthora</i> sp.7700	Bệnh đạo ôn của khoai tây, thối gốc/thối thân đậu nành
8	<i>Colletotrichum</i> sp.	Bệnh đốm đen trên cây họ đậu
9	<i>Ascochyta rabiei</i>	Bệnh bạc lá cây đậu xanh
10	<i>Neofusicoccum</i> sp.	Bệnh thối cuống cây xoài
11	<i>Alternaria</i> sp.	Bệnh sọc nâu trên lá mía
12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nấm mầu
13	<i>Candida albicans</i>	nấm mầu

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế protein mới SEQ ID NO: 2 có hoạt tính kháng nấm. Phương pháp bao gồm các bước: (i) nhận diện protein có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính ăn nấm từ chủng *Burkholderia gladioli*, (ii) phân tích trình tự gen và protein từ protein được nhận diện ở bước (i) bằng cách phát hiện các thể dư chủ yếu cho hoạt tính kháng nấm cũng như việc sản xuất hàng và tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp tổng hợp gen, (iii) protein tiến hóa được biểu hiện trong vectơ biểu hiện pET28a, (iii) làm tinh lọc protein biểu hiện vượt trội bằng sắc ký Ni-NTA, (iv) đánh giá protein được tinh lọc về hoạt tính kháng nấm và (v) protein kháng nấm được thiết lập bằng cách tiếp cận di truyền ngược. Sự biểu hiện tái tổ hợp của protein mới ngăn cản sự phát triển của hạch nấm và gây chết tế bào trong sợi nấm.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm chứa peptit mới để sử dụng và tạo ra thuốc mỡ gốc nước hoặc dầu hoặc thuốc phun hoặc màng kháng nấm được bao bọc nano. Các thành phần của chế phẩm bao gồm dầu được chọn từ nhóm bao gồm dầu hạnh nhân, dầu hạt cải và dầu mè; chất làm đặc được chọn từ sáp ong, bơ ca cao và bơ hạt mỡ, chất nhũ hóa được chọn từ nhóm bao gồm các rượu như rượu xetyl; và nước.

Theo một phương án, chế phẩm được điều chỉnh cho phù hợp để phát triển sự kháng bệnh liên quan đến nấm trên diện rộng theo đó nấm được lựa chọn từ thuộc nhóm bao gồm *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae*, *Magnaporthe oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Fusarium oxysporum*, *Dedymella* sp., *Phytophthora* sp., *Colletotrichum* sp., *Ascochyta rabiei*, *Neofusicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida albicans*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập quy trình điều chế chế phẩm. Quy trình bao gồm các bước: (i) Protein Bg_9562 được sản xuất với số lượng lớn bằng cách lên men sử dụng bình phản ứng sinh học, (ii) sản phẩm lên men thu được được bao bọc bởi các hạt nano chitosan hoặc không phải chitosan; và (iii) các sản phẩm được đóng gói ở bước (ii) được sử dụng để tạo chất kem/thuốc mỡ gốc nước hoặc dầu và, (iv) sản phẩm của bước (iii) được phát triển thêm để điều chế màng kháng nấm bao gồm tinh bột/dầu.

Theo một phương án khác, sáng chế đưa ra phương pháp kiểm soát bệnh do nấm gây ra đối với cây trồng hoặc thực vật bằng cách ứng dụng polypeptit bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, hoặc một chế phẩm của bất cứ một trong số các yêu cầu bảo hộ nào từ 12 đến 13 vào thực vật bị nhiễm bệnh, hoặc bộ phận thực vật bị nhiễm bệnh, hoặc cây trồng có nguy cơ nhiễm nấm. Phương pháp này cũng điều trị cho người và động vật. Theo một phương án khác, thực vật là ngũ cốc, cây bầu bí, rau cải, rau ăn củ, hoặc cây họ đậu, hoặc tạo ra một loại cây ăn quả. Theo một phương án khác, cây trồng hay thực vật được lựa chọn từ nhóm bao gồm cây lúa, đậu tương, cà chua, củ cải, mía, dưa chuột, táo, xoài, đậu cô ve, thuốc lá, chuối, cây họ đậu, và cây răng ngựa.

Theo một phương án khác sáng chế đề xuất một chế phẩm bao gồm gen mã hóa chuỗi peptit mới để sử dụng trong việc tạo ra thực vật chuyển hóa gen (bao gồm cả cây lúa) với khả năng kháng bệnh trên diện rộng. Chế phẩm được sử dụng trong việc phát triển khả năng kháng bệnh của cây lúa đối với bệnh khô vằn. (do *R. solani* gây ra). Hơn nữa, lúa chuyển hóa gen cũng có thể kháng lại bệnh đạo ôn (do *Magnaporthe oryzae* gây ra) vì protein cũng cho thấy hoạt tính kháng nấm đối với *Magnaporthe oryzae* (như minh họa trong Bảng 1). Chế phẩm cũng điều trị sự nhiễm nấm ở người/động vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đưa ra phương pháp kiểm soát bệnh lây nhiễm từ nấm. Phương pháp này bao gồm các bước (i) phun protein Bg_9562 được tinh lọc lên thực vật bị nhiễm bệnh và dạng được bọc kín bằng vỏ nano của protein tinh lọc

được phun lên thực vật/cánh đồng nhiễm bệnh; (ii) chất kem kháng nấm được bôi trực tiếp lên chỗ thương tổn có bệnh để kiểm soát các bệnh nhiễm nấm của động vật/người và lớp màng kháng nấm được dán như băng vết thương để kiểm soát nhiễm nấm.

Theo một phương diện khác, sáng chế cung cấp một protein hoặc polypeptit mới không có trong tự nhiên có trình tự đột biến của gen Bg_9562. Protein mới hay polypeptit được điều chỉnh cho phù hợp để cho thấy hoạt tính kháng nấm bằng việc ngăn chặn sự phát triển của hạch nấm và gây chết tế bào trong sợi nấm. Cụ thể hơn, trình tự nucleotit mới được phát triển nhân tạo của gen Bg_9562 và polypeptit hay protein của chúng được đưa ra.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát bệnh khô vằn ở lúa cũng như các loại cây trồng khác, phương pháp kiểm soát bệnh về nấm của cây lúa, phương pháp kiểm soát bệnh về nấm của cây trồng, phương pháp điều trị bệnh về nấm của con người/động vật.

Theo một phương diện khác, sáng chế đưa ra phương pháp tạo thành dạng phun hoặc thuốc mỡ cho nhiều ứng dụng khác nhau, phương pháp sử dụng theo kiểu chuyển hóa gen để phát triển loại kháng bệnh đối với các mầm bệnh do nấm gây ra, phương pháp kiểm soát bệnh khô vằn của cây lúa, cũng như các loại cây trồng khác để phát triển thực vật kháng bệnh về nấm trên diện rộng.

Theo một phương án khác, protein được sản xuất bằng cách biểu hiện nucleotit mã hóa của nó trong hệ thống tương đồng hoặc dị hợp trong tế bào của vi khuẩn, nấm men, thực vật, người và động vật bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mô tả sau đây chỉ là các phương án mang tính ví dụ và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi, khả năng áp dụng hay định dạng đối với sáng chế bằng bất kỳ cách nào, mà mô tả sau đây nhằm minh họa thích hợp cho việc thực hiện các phương án mang tính ví dụ của sáng chế, những thay đổi khác nhau đối với các phương án được mô tả có thể được thực hiện về chức năng và sắp xếp các yếu tố được mô tả mà không đi ra ngoài phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Nhận dạng protein liên quan đến hoạt tính kháng nấm và ăn nấm của chủng *B. gladioli* NGJ1

Ví dụ đưa ra nhận dạng gen vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 có nguồn gốc từ cây có hạt khỏe mạnh như cây lúa (như mô tả trong Jha và các đồng tác giả 2015) là vi khuẩn có tính kháng nấm và ăn nấm hiệu nghiệm. Ban đầu, lên đến 3 dpi (ngày sau khi ủ) vi khuẩn cho thấy hoạt tính kháng nấm và ngăn ngừa sự phát triển của nấm ở khu vực lân cận. Trong thời gian 8 dpi (ngày sau khi ủ) khi đổi chiều, vi khuẩn bắt đầu xuất hiện bao phủ trên nấm và cho thấy hoạt tính ăn nấm (như trình bày trong Fig.1). Một điều thú vị là hành vi ăn nấm (vi khuẩn phát triển lan ra khắp trên nấm và phân hủy các sợi nấm) và sinh sản rất nhanh trên khay đựng CDA (Czapek Dox Agar) môi trường tối thiểu.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số protein của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 có tiềm năng để nhắm vào khu vực cây chủ và một trong những protein như vậy (Bg_9562) có khả năng mã hóa protein đuôi thể thực khuẩn được cụ thể hơn. Vai trò protein nhận dạng được nghiên cứu về hành vi ăn nấm và kháng nấm của vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 trên *Rhizoctonia solani*.

Một vài trình tự nucleotit được lựa chọn của Bg_9562 được điều chỉnh để tổng hợp nhân tạo trình tự gen đã tiến hóa (eBg_9562) có SEQ ID NO: 1 cấu tạo từ 333 bp.

Bg_9562 (Trình tự Nucleotit): gốc

5'ATG AAC ACG GAA AAC CAG GAT CCG ACG AGC ACC AGC GAC
AAC GCC GCG AAC ACG CAC ACG CTC GAC ACG CCG ATC GCG CGC GGC
GAG CAG ACG ATC ACC CAG GTG ACG CTG GCC AAG CCC GAT GCC GGC
GCG CTG CGC GGC ACC TCG CTG TCG GCG CTC GTC AAC CTC GAC GTC
GAC GCG CTG TGC AAG GTG CTG CCG CGC ATC ACG AGC CCG GCG CTG
ACC GCG GCC GAC GTG CGC GCC ATG GAC CCC GCC GAC CTG GTC TCG
CTG GGA GGC ATC TTC GCC GGT TTT TTG ATG CCG AAG TCG CTG AAA
GCG AGC ATG GAA TCC CCG AGC GCG 3'

SEQ ID NO: 1 (Trình tự nucleotit đã tiến hóa - Bg_9562)

5'ATG AAC ACG GAA AAC CAG GAT CCG ACG AGC ACC AGC GAC
AAC GCC GCG AAC ACG CAC ACG CTC GAC ACG CCG CTC GCG CGC GGC
GAG CAG ACG ATC ACC CAG GTG ACG CTG GCC AAG CCC GAT GCC GGC
GCG CTG CGC GGC ACC TCG CTG TCG GCG CTC GTC AAC CTC GAC GTC
GAC GCG CTG TGC AAG GCA ACT CCG CGC GCT ACG AGC CCG GCG GTC
ACC GCG GCC GAC ATC CGC GCC ATG GAC CCC GCC GAC GCA ATC TCG
GTC GGA GGC ATC TTC GCC GGT TTT GTT ATG CCG AAG TCG ATC AAA
GCG AGC ATG GAA TCC CCG AGC GCG 3'

Trình tự peptit mới khác của protein mới ở trên có SEQ ID NO:2 được tạo ra từ

111 axit amin được cung cấp.

Bg_9562 (Trình tự axit amin): gốc

5' MNTENQDPTSTSDNAANTHTLDTP**I**ARGEQTITQV
TLAKPDAGALRGTSLSALVNLDVDALCK**V****L**PR**I**TSPAL**T**
AAD**V**RAMDPAD**L****V****S****L**GGIFAGF**L**MPKS**L**KASMESPSA3'

SEQ ID NO:2 (Trình tự axit amin đã tiến hóa- Bg_9562)

5' MNTENQDPTSTSDNAANTHTLDTP**L**ARGEQTITQV
TLAKPDAGALRGTSLSALVNLDVDALCK**A****I**PR**A**TSPA**V**T
AAD**I**RAMDPAD**A****I****S****V**GGIFAGF**V**MPKS**I**KASMESPSA3'

Những thay đổi được làm *nổi bật* từ protein gốc được điều chỉnh cho phù hợp với việc sản xuất hàng loạt, tính hòa tan và hoạt tính kháng nấm của gen tiến hóa Bg_9562 được cải thiện.

Ví dụ 2: Sự biểu hiện vượt trội và tinh lọc protein kháng nấm tiềm năng

CDS hoàn chỉnh của gen Bg_9562 (333 bp) được PCR khuếch đại từ ADN hệ gen của chủng *B. gladioli* NGJ1 bằng cách sử dụng đoạn mỗi thuận đặc hiệu của gen có SEQ ID NO: 3 và đoạn mỗi ngược có SEQ ID NO: 4 như được tiết lộ trong Bảng 2 và tiếp tục được nhân bản vào vectơ biểu hiện vi khuẩn pET28a (Novagen / Merck Life Science Private Limited) để thu được pET28a -9562 (như trong Fig.2a). Các vị trí hạn chế của NdeI và HindIII đã được thêm vào lần lượt trong các trình tự đoạn mỗi xuôi và ngược.

Khi xác nhận trình tự, vi khuẩn pET28a -9562 được chuyển thể thành vi khuẩn *E. coli* (thuộc nhóm BL21, DE3-codon+) phục vụ việc sản xuất protein tái tổ hợp. Protein được tinh sạch bằng sắc ký Ni²⁺ + -NTA-Agarose và được phân giải trên SDS PAGE (như trong Fig.2b). Hơn nữa, nó được thấm điện trên màng polyvinyliden fluorit (PVDF) và được thăm dò với các kháng thể đa dòng của chuột (độ pha loãng 1: 1000) được nâng lên để chống lại kháng thể kháng His-kháng thể. Sự có mặt của dải khoảng ~13 KDa đưa ra sự biểu hiện vượt trội và tinh lọc protein như mong muốn (*như trình bày trong Fig.2c*).

Bảng 2: Những trình tự của đoạn mỗi

Số đoạn mỗi*	Trình tự	Vùng giới hạn
Đoạn mỗi xuôi: SEQ ID NO: 3	<u>CATATGAACACGGAAAACCAGGAT</u>	NdeI

Đoạn mồi ngược: SEQ ID NO: 4	<u>AAGCTTCGCGCTCGGGGATTCCATGCT</u>	<u>HindIII</u>
Đoạn mồi xuôi - SEQ ID NO: 5	<u>GAATTCATGCCGGCGCGCTGCGCGGC</u>	<u>EcoRI</u>
Đoạn mồi ngược SEQ ID NO: 6	<u>AAGCTTGCTCGGGGATTCCATGCTCGC</u>	<u>HindIII</u>
Đoạn mồi xuôi SEQ ID NO: 7	<u>AAGCTTAACACGGAAAACCAGGAT</u>	<u>HindIII</u>
Đoạn mồi ngược SEQ ID NO: 8	<u>GAATTCGCGCTCGGGGATTCCATGCT</u>	<u>EcoRI</u>

*Những đoạn mồi được thiết kế sử dụng dụng cụ Primer Quest Tool của IDT (Công nghệ ADN tích hợp, Inc, Hoa Kỳ; <https://eu.idtADN.com/Primerquest/Home/Index>) và được tổng hợp từ Eurofins Genomics India Pvt. Ltd., Bangalore, India. Phục vụ mục đích nhân bản, các vùng giới hạn phù hợp (đánh dấu bằng gạch dưới) được gộp ở đoạn 5' của các đoạn mồi được lựa chọn để biến chúng thành đoạn mồi tổng hợp trong tự nhiên.

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính kháng nấm của protein được tinh lọc

Hoạt tính kháng nấm của protein có gen SEQ ID NO: 2 được khảo nghiệm bằng cách xử lý hạch nấm *Rhizoctonia solani* thuộc chủng BRS1 với các hàm lượng khác nhau (5, 10 và 15µg/ml) của protein được tinh lọc. Để kiểm soát, hạch nấm được xử lý bằng ba dung dịch khác nhau 10 mM Nước muối đệm photphat (PBS) pH 7,4, chất rửa 50mM (một thành phần được sử dụng trong loại bỏ protein) và protein bất hoạt bằng nhiệt Bg_9562 (bằng cách ủ trong nước sôi trong 40 phút). Sau khi xử lý, hạch nấm được đặt trên khay PDA (Himedia, Ấn Độ) và được ủ ở 28°C để phát triển hơn nữa. Kết quả (như trình bày trong Fig.3a) tóm tắt rằng 15µg/ml protein là đủ để ngăn chặn sự phát triển của hạch nấm *R. solani*, trong khi sự phát triển nấm phù hợp được quan sát trong trường hợp các chất kiểm soát khác nhau. Việc biểu hiện sự phát triển của nấm khi xử lý protein eBg_9562 được tóm tắt trong Fig.3b. Hạch nấm được xử lý eBg_9562 không sinh trưởng được trong khi hạch nấm kiểm soát cho thấy sự phát triển phù hợp. Hơn nữa, trong các khoảng thời gian khác nhau (chẳng hạn như 24 giờ, 48 giờ và 72

giờ), sự phát triển của hạch nấm về diện tích thảm sợi nấm trên khay PDA cho cả protein Bg_9562 cũng như eBg_9562 được xử lý cùng với các mẫu được xử lý bằng chất phòng ngừa được đo lường và các dữ liệu được tóm tắt trong Fig.3c. Tổng thể, các dữ liệu cho thấy một cách rõ ràng khi so sánh với Bg_9562, thì eBg_9562 hiệu quả hơn trong việc ngăn chặn sự sinh trưởng của nấm. Hơn nữa, Bảng 3 trình bày dữ liệu được lập bảng cho thấy sự ức chế sự phát triển của nấm so sánh trên các phương pháp xử lý khác nhau. (như tham chiếu Fig.3c).

BẢNG 3: Trình bày sự sinh trưởng của nấm theo các cách xử lý khác nhau

Mẫu	Diện tích phát triển được quan sát (cm ²)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Kiểm soát chất đệm	0,28	1,53	4,52
Bất hoạt bằng nhiệt. Bg_9562	0,28	1,57	4,60
50mM Chất đệm tẩy rửa	0,25	1,66	4,13
Bg_9562	0,00	0,48	0,69
eBg_9562	0,00	0,00	0,00

Bảng 3 mô tả sau 72 giờ phát triển khi được xử lý bằng protein tiền hóa Bg_9562, nấm cho thấy không sinh trưởng so với nấm được xử lý bằng protein Bg_9562 kiểu đại cho thấy tăng trưởng 0,69 cm² sau 72 giờ xử lý. Đáng chú ý các loại xử lý phòng ngừa khác nhau không ngăn ngừa được nấm sinh trưởng. Vì vậy, sáng chế đưa ra các loại gen và protein mới có hoạt tính kháng nấm trên diện rộng. Các loại gen và protein mới lấy được từ vi khuẩn *Burkholderia gladioli* thuộc chủng NGJ1 và được biểu hiện trong vector biểu hiện pET28a. Protein eBg_9562 có hiệu quả và không có hoạt tính kháng nấm kể cả sau 72 giờ xử lý trong các điều kiện khác nhau (như minh họa trong Fig.3c). Sự thay đổi trong protein dẫn đến việc sản xuất protein được nâng cao như được xác nhận bằng dữ liệu ước tính protein thông qua phương pháp Bradford trong Fig.3d. Hình mô tả rằng nồng độ protein của eBg_9562 là gần 20mg/lít so với nồng độ protein của Bg_9562 kiểu đại tạo ra ít hơn 10mg/lít protein.

Hơn nữa, hạch nấm *R. solani* ban đầu sinh trưởng trong môi trường PDB trong 48 giờ để làm các sợi nấm nảy mầm và sau đó được xử lý bằng 15µg/ml protein Bg_9652 và 10mM chất đệm PBS (như một sự kiểm soát). Khi được ủ thêm ở nhiệt độ 28°C, sợi nấm đã được xử lý và kiểm soát lại được xét nghiệm MTT như quy trình thí nghiệm mô tả (Meshulam và các đồng tác giả, 1995). Kết quả xét nghiệm MTT cho thấy việc xử lý protein có thể gây chết tế bào vì không có sự hình thành hợp chất nhuộm màu (như trình bày trong Fig.4a). Trong khi đó quá trình trao đổi chất tích cực, sự hình thành hợp chất màu đã được phát hiện trong trường hợp sợi nấm kiểm soát (như trình bày trong Fig.4a).

Ví dụ 4: Xác định vai trò của protein kháng nấm thông qua phương pháp di truyền ngược

Để chứng minh rằng protein SEQ ID NO: 2 thực chất có liên quan các hành vi kháng nấm và ăn nấm của chủng *B. gladioli* NGJ1, chúng tôi áp dụng phương pháp di truyền ngược. Đối với điều này, plasmid pGD1 thu được bằng cách nhân bản 209 bp của gen Bg_9562 kiểu đại sử dụng đoạn mỗi xuôi có SEQ ID NO: 5 và đoạn mỗi ngược có SEQ ID NO: 6 như được bộc lộ trong Bảng 1 thành vector mob pK18 (Schäfer A và các đồng tác giả, 1994). Phân tử pGD1 được huy động vào chủng *B. gladioli* NGJ1 bằng cách sử dụng quy trình thí nghiệm đã công bố (Schäfer A và các đồng tác giả, 1990) và việc lựa chọn thể đột biến chèn Δ9562 (NGJ100 và NGJ101) được thực hiện trên kháng sinh kanamycin (50µg/µl) có chứa các khay PDA. Vi khuẩn thể đột biến chèn Δ9562 được xác nhận thông qua kỹ thuật PCR và giải trình tự gen (như trình bày trong Fig.5a & 5b).

Để bổ sung thêm, chiều dài đầy đủ của đoạn gen được khuếch đại từ bộ gen NGJ1 bằng cách sử dụng đoạn mỗi xuôi có trình tự của SEQ ID NO: 7 và đoạn mỗi ngược có trình tự của SEQ ID NO: 8 như bộc lộ trong Bảng 2 và được nhân bản thành vector pHM1. Plasmid pHM1- 9562 được điện phân vào chủng NGJ100 và NGJ101 và các cụm khuẩn lạc Kan^R và Spec^R được lựa chọn trên khay KBA. NGJ100 và NGJ101 có chứa plasmid bổ sung pHM1-9562 (NGJ102 và NGJ103) được tiếp tục xác nhận thông qua kỹ thuật PCR và giải trình tự gen.

Sau đó, cả hai đột biến Bg_9562 (NGJ100 và NGJ101) và vi khuẩn bổ sung (NGJ102 và NGJ103), thuộc chủng *B. gladioli* được thử nghiệm về hoạt tính kháng nấm

và ăn nấm của *R. solani*. Vi khuẩn đột biến không cho thấy hoạt tính kháng nấm và ăn nấm (như trình bày trong Fig.6a). Hạch nấm được xử lý bằng cách nuôi cấy vi khuẩn của các thể đột biến Bg_9562 (NGJ100 và NGJ101), và các thể bổ sung (NGJ102 và NGJ103) và chủng NGJ1 kiểu dại (WT) riêng rẽ trong 4 giờ ở 28°C sau đó ủ trên khay PDA trong 7 ngày (như trình bày trong Fig.6b).

Ví dụ 5: Protein cho thấy các hoạt tính kháng nấm trên diện rộng

Tác động của các loại protein được tinh lọc cũng được thử nghiệm trên các loại nấm khác nhau bao gồm nhiều các nấm gây bệnh trọng yếu trong nông nghiệp (như minh họa trong Bảng 1) và các dữ liệu thử nghiệm được thể hiện rõ ràng trong Fig.3 và Bảng 3 của bản mô tả.

Tài liệu tham khảo

- Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M, Sharifi-Tehrani A (2006) Biocontrol of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off by fluorescent pseudomonads. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 71:1021-1029
- Andersen J B, Koch B, Nielsen T H, Sorensen D, Hansen M, Nybroe O, Christophersen C, Sorensen J, Molin S, Givskov M (2003) Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 149: 37-46.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L M P (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1044-1051.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka E A (2005) Use of plant growth-promoting bacteris for biocontrol of plant disease: Principles, mechanism of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*. 71:4951-4959.
- Elshafie H S, Camele I, Racioppi R, Scrano L, Iacobellis N S, Bufo S A (2012) In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some Phytopathogenic fungi. *Int J Mol Sci*. 13: 16291-16302
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A (2011) Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *MMBR*. 75(4):583-609. doi:10.1128/MMBR.00020-11
- Ghosh S, Gupta S K, Jha G (2014) Identification and functional analysis of AG1-IA specific genes of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet*. 60: 327-341
- Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*. 3: 307-319
- Hane J K, Anderson J P, Williams A H, Sperschneider J, Singh K B (2014) Genome Sequencing and Comparative Genomics of the Broad Host-Range Pathogen *Rhizoctonia solani* AG8. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004281
- Huang D, Ou B, Prior R L (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Chem*. 53: 1841-1856.
- H  ppener-Ogawa S, Leveau J H J, van Veen J a, De Boer W (2009) Mycophagous growth of *Collimonas* bacteria in natural soils, impact on fungal biomass turnover and interactions with mycophagous *Trichoderma* fungi. *ISME J*. 3: 190-198
- Huang X, Zhang N, Yong X, Yang X, Shen Q (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiol Res*. 167: 135-143
- Jha G, Tyagi I, Kumar R, Ghosh S (2015) Draft Genome Sequence of Broad-Spectrum Antifungal Bacterium *Burkholderia gladioli* Strain NGJ1, Isolated from Healthy Rice Seeds. *Genome Announc*. doi: 10.1128/genomeA.00803-15
- Kishore G K, Pande S, Podile A R (2005) Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Can J Microbiol*. 51:123-132

Leveau J H J, Preston G M (2008) Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol.* 177: 859-876

Li J, Yang Q, Zhao L, Zhang S, Wang Y, Zhao X (2009) Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University Science B.* 10(4):264-272.doi:10.1631/jzus. B0820341

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541-556

Manwar A V, Khandelwal S R, Chaudhari B L, Meyer J M, Chincholkar S B (2004) Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* 118: 243-251

Mela F, Fritsche K, de Boer W, van Veen J a, de Graaff L H, van den Berg M, Leveau J H J (2011) Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: *Collimonas fungivorans* versus *Aspergillus niger*. *ISME J.* 5: 1494-1504

Meshulam T, Levitz S M, Christin L, Diamond R D (1995) A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *J Infect Dis.* 4:1153-1160.

Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol Res.* 159:73-81

Raaijmakers J M, Mazzola M (2012) Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50: 403-424

Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol.* 14:435-443

Schäfer A, Kalinowski J, Simon R, Seep-Feldhaus A H, Paler A (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol.* 172(3):1663-1666

Schäfer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Paler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1):69-73

Sharifi-Tehrani A, Shakiba M, Okhovat M, Zakeri Z (2005) Biological control of *Tiarospora phaseolina* the causal agent of charcoal rot of soybean. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 70:189-192

Tan Z, Lin B, Zhang R (2013) A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *Springer Plus* 2:543. doi: 10.1186/2193-1801-2-543

Tang-Bing Cui, Hai-Yun Chai, Li-Xiang Jiang. (2012) Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules.* 17(6):7336-7347

Tortora M L, Diaz-Ricci J C, Pedraza R O (2011) *Azospirillum brasilense*

siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Archives of Microbiology 193: 275-286

Wong J H1, Hao J, Cao Z, Qiao M, Xu H, Bai Y, Ng T B (2008) An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. J Appl Microbiol. 105(6):1888-1898

Yadav V, Mandhan R, Kumar M, Gupta J, Sharma G L (2010) Characterization of the *Escherichia coli* Antifungal Protein PPEBL21. Int J Microbiol. 196363. doi: 10.1155/2010/196363

Zheng A, Lin R, Zhang D, Qin P, Xu L, Ai P, Ding L, Wang Y, Chen Y, Liu Y, et al. (2013) The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. Nat Commun. 4:1424. doi: 10.1038/ncomms2427.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein có hoạt tính kháng nấm phổ rộng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2, trong đó axit amin này được mã hóa bởi trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1.
2. Protein theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin và trình tự nucleotit không có trong tự nhiên và được biến đổi gen từ gen *Burkholderia gladioli* Bg_9562 kiểu đại.
3. Protein theo điểm 1, có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 dài 111 gốc axit amin với trọng lượng phân tử ít nhất là ~13 kDa, pI khoảng 4,65 và độ pH tối ưu vào khoảng 7,4.
4. Protein theo điểm 1, trong đó protein này được sản xuất bằng cách biểu hiện nucleotit mã hóa nó trong tế bào của vi khuẩn, nấm men, côn trùng, thực vật, người hoặc động vật bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.
5. Phương pháp sản xuất protein cho hoạt tính kháng nấm có trình tự của SEQ ID NO: 2, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - (i) xác định protein có hoạt tính kháng nấm và hoạt tính ăn nấm từ chủng *Burkholderia gladioli* NGJ1 kiểu đại,
 - (ii) phân tích trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng cách tìm các gốc quan trọng liên quan đến hoạt tính kháng nấm cũng như sản xuất hàng loạt, và thiết kế nhân tạo trình tự gen để kết hợp những thay đổi mong muốn trong protein đã xác định của bước (i) và tổng hợp gen đã thiết kế thông qua tổng hợp gen,
 - (iii) biểu hiện quá mức protein đã phát triển ở bước (ii) trong vector biểu hiện để thu được protein tái tổ hợp,
 - (iv) tinh chế protein biểu hiện quá mức ở bước (iii) bằng sắc ký,
 - (v) đánh giá hoạt tính kháng nấm của protein tinh sạch ở bước (iv), và
 - (vi) thiết lập hoạt tính kháng nấm của vai trò protein bằng cách tiếp cận di truyền ngược để thu được protein mới từ Bg_5672.
6. Chế phẩm bao gồm protein theo điểm 1 cho hoạt tính kháng nấm, trong đó chế phẩm này còn bao gồm dầu được chọn từ nhóm bao gồm dầu hạnh nhân, dầu hạt cải và dầu

mè; chất làm đặc được lựa chọn từ sáp ong, bơ ca cao và bơ hạt mỡ; chất nhũ hóa được chọn từ nhóm bao gồm các rượu như rượu xetyl; và nước.

7. Phương pháp điều chế chế phẩm cho hoạt tính kháng nấm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) tạo ra protein Bg_9562 tiến hóa được thể hiện bởi trình tự của SEQ ID NO: 2 với số lượng lớn bằng cách lên men trong bình phản ứng sinh học;

(ii) bọc sản phẩm lên men của bước (i) trong các hạt nano chitosan hoặc không phải chitosan;

iii) sử dụng sản phẩm đã bọc ở bước (ii) để tạo kem/thuốc mỡ gốc nước hoặc dầu; và

(iv) chuyển đổi sản phẩm của bước (iii) thành peptit kháng nấm bao gồm các màng làm từ tinh bột/dầu.

8. Phương pháp kiểm soát nấm bệnh ở thực vật hoặc cây trồng, bao gồm: áp dụng polypeptit bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 2, hoặc chế phẩm theo điểm 6, cho thực vật bị nhiễm bệnh, hoặc bộ phận thực vật bị nhiễm bệnh, hoặc cây trồng bị nhiễm bệnh.

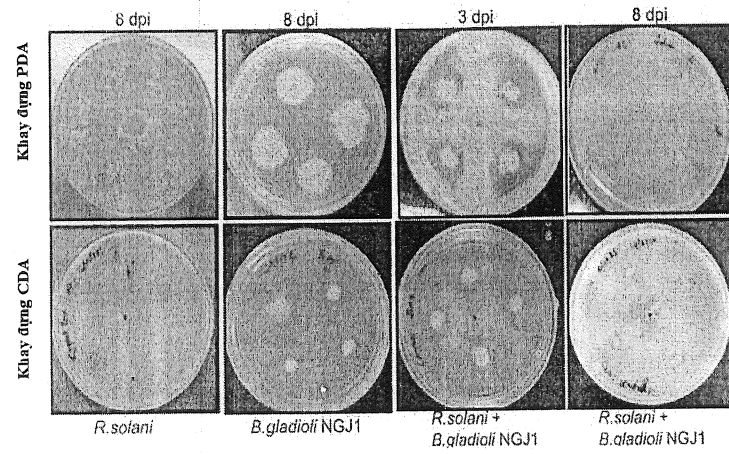


FIG.1

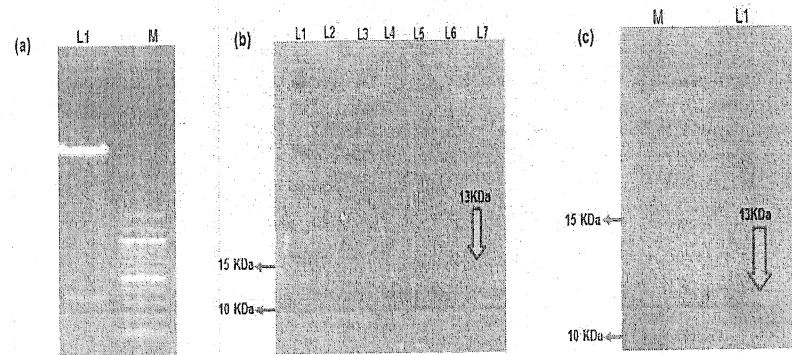


FIG.2

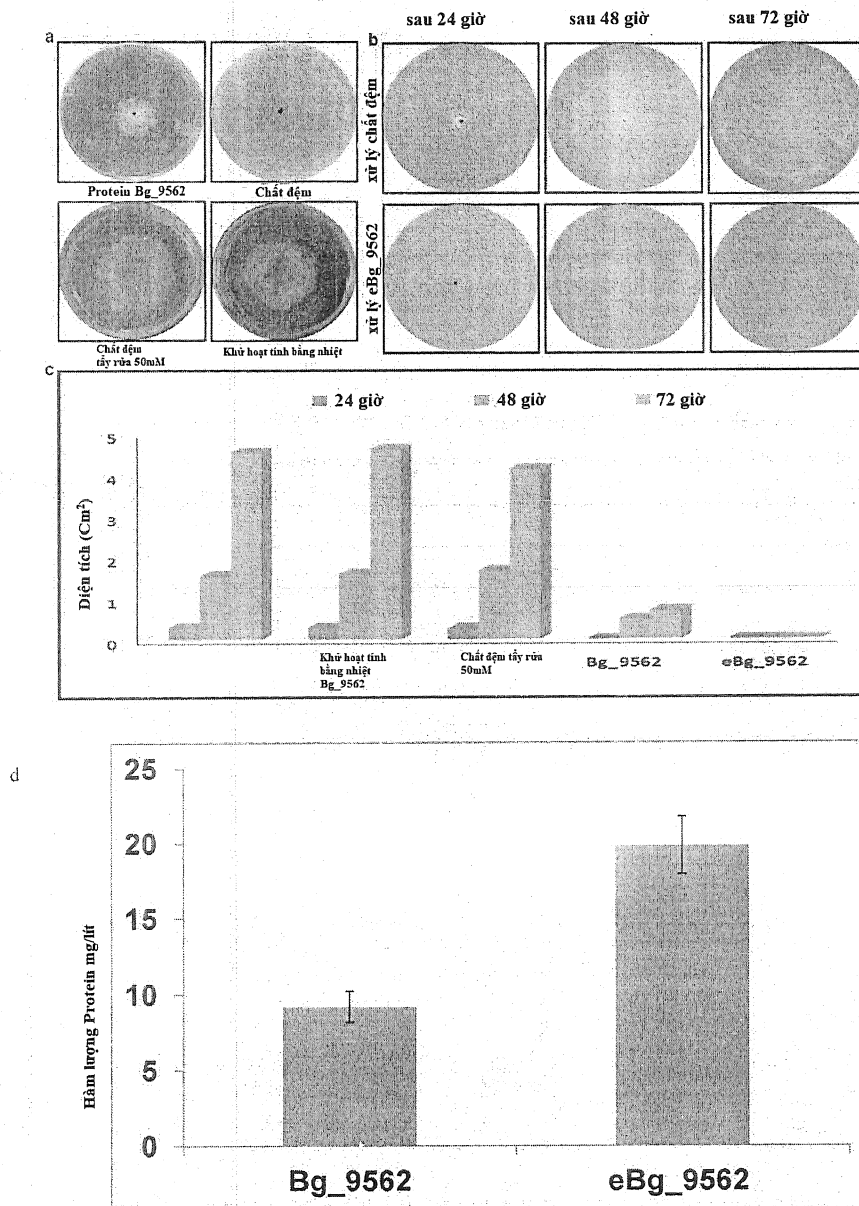


FIG.3

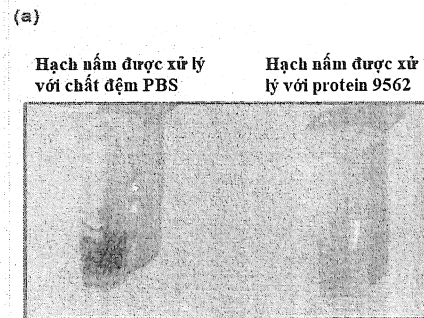


FIG.4

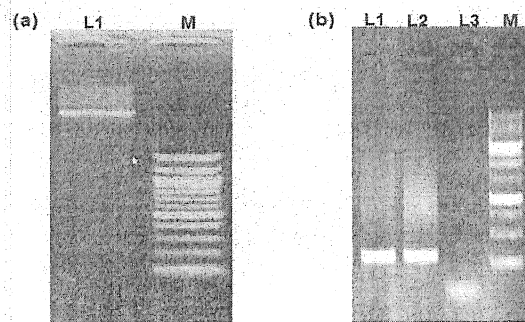


FIG.5

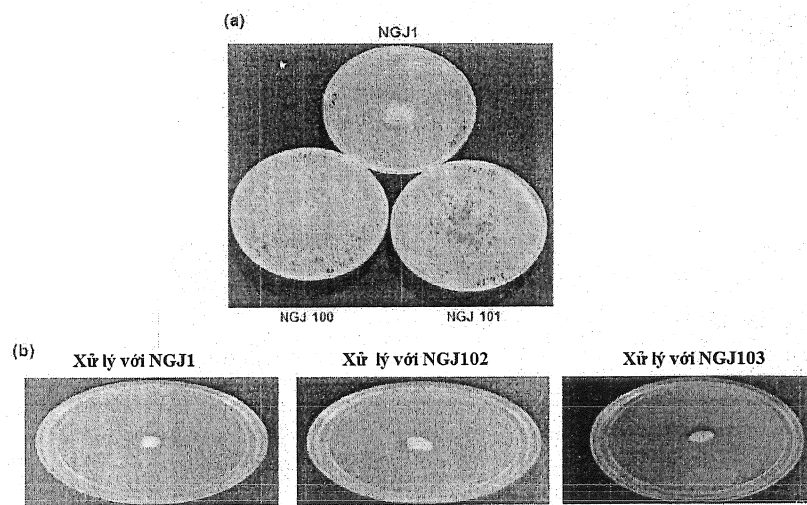


FIG.6

Danh mục trình tự

<110> SWAIN, DURGA M
YADAV, SUNIL K
JHA, GOPALJEE

<120> PROTEIN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM PHỔ RỘNG, CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHÚNG

<130> 5467IN001

<150> 201611024726

<151> 2016-07-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

$\langle 211 \rangle$ 333

<212> ADN

<213> Burkholderia gladioli strain NGJ1

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (333)$

<400> 1

atgaacacgg aaaaccagga tccgacgagc accagcgaca acgccgcgaa cacgcacacg 60

ctcgacacgc cgctcgcgcg cggcgagcag acgatcacc aggtgacgct ggccaagccc 120

gatgccggcg cgctgcgcgg cacctcgcctg tcggcgctcg tcaacctcga cgtcgacgcg 180

ctgtgcaagg caactccgcg cgctacgagc ccggcggtca ccgcggccga catccgcgcc 240

atggaccccg ccgacgcaat ctcggtcgga ggcattcttcg ccggttttgt tatgccgaag 300

tcgatcaaag cgagcatgga atccccgagc gcg 333

 $\langle 210 \rangle \quad 2$ $\langle 211 \rangle$ 111

<212> PRT

<213> Burkholderia gladioli strain NGJ1

 $\langle 220 \rangle$

<221> PRT

$\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (111)$

 $\langle 400 \rangle$ 2

Met Asn Thr Glu Asn Gln Asp Pro Thr Ser Thr Ser Asp Asn Ala Ala
1 5 10 15

Asn Thr His Thr Leu Asp Thr Pro Leu Ala Arg Gly Glu Gln Thr Ile
20 25 30

Thr Gln Val Thr Leu Ala Lys Pro Asp Ala Gly Ala Leu Arg Gly Thr
35 40 45

Ser Leu Ser Ala Leu Val Asn Leu Asp Val Asp Ala Leu Cys Lys Ala
50 55 60

Ile Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ala Val Thr Ala Ala Asp Ile Arg Ala
65 70 75 80

Met Asp Pro Ala Asp Ala Ile Ser Val Gly Gly Ile Phe Ala Gly Phe
85 90 95

Val Met Pro Lys Ser Ile Lys Ala Ser Met Glu Ser Pro Ser Ala
100 105 110