



(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)



2-0003451

(51) **C12N 1/20; C12R 1/125; A61K 35/742**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00240

(22) 08/06/2021

(67) 1-2021-03378

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/08/2021 401

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Phổ Nguyễn Văn Trác, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội

(72) Nguyễn Hồng Minh (VN); Võ Hoài Hiếu (VN); Đinh Thị Ngọc Mai (VN).

(54) **CHỦNG BACILLUS SUBTILIS SUBSP. STERCORIS PU10100 THUẦN KHIẾT VỀ
MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYM, CHỊU ĐƯỢC MUỐI MẬT VÀ
KHÁNG NẤM GÂY BỆNH**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ quả dâu tây trồng tại Đà Lạt, Việt Nam. Chủng này có đoạn gen mã hóa 16S rARN với kích thước 1488 bp như nêu trong SEQ ID NO:1, được đăng ký trên Ngân hàng gen DDBJ với mã số LC634053. Chủng này cũng có các đặc tính bao gồm: có khả năng sinh tổng hợp các enzym α -amylaza, proteaza, và carboxymethyl xenlulaza (CMCaza); chịu được muối mật; và có hoạt tính kháng các loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh enzym α -amylaza, proteaza, carboxymetyl xenlulaza (CMCaza), chịu muối mật và kháng nấm bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các thành viên của chi *Bacillus* bao gồm các chủng vi khuẩn Gram dương, có tỷ lệ G+C thấp, thuộc họ *Bacillaceae*, bộ *Bacillales*, lớp *Bacilli*, ngành *Firmicutes*, giới *Bacteria*. Chúng có khả năng sinh trưởng ở nhiều loại môi trường sống khác nhau, kể cả những nơi có điều kiện nhiệt độ, độ mặn và pH cực hạn. Các đặc điểm hình thái và sinh lý của các thành viên chi *Bacillus* cũng rất đa dạng, bao gồm cả những loài tự dưỡng, dị dưỡng, cần hoặc không cần sự có mặt của oxy và một số khác sinh trưởng khi có mặt các chất nhận điện tử thay thế như sắt hay arsenat. Bên cạnh đó, bản chất không gây bệnh, dễ dàng phân lập, thao tác và bảo quản đã mang lại những tiềm năng ứng dụng quan trọng cho các chủng *Bacillus*, đặc biệt trong lĩnh vực thực phẩm, thực phẩm chức năng và nông nghiệp.

Bacillus subtilis subsp. *stercoris* là dưới loài của *Bacillus subtilis*. Năm 1999, Nakamura và cộng sự lần đầu tiên phân chia *Bacillus subtilis* thành hai dưới loài là *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* và *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. Dưới loài thứ 3 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* được Rooney và cộng sự mô tả vào năm 2009. Năm 2016, Adelskov và cộng sự mô tả phân nhóm thứ 4 là *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris*.

Tế bào sinh dưỡng của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* có hình que, kích thước 0,5 x 2-3 μm , đơn lẻ hoặc xếp chuỗi. Gram dương. Chuyển động. Bào tử có

hình trụ đến bầu dục, kỵ khí tùy tiện, catalaza dương tính. Chúng có khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ từ 14-50°C, tối ưu ở 45°C; dải pH từ 5-9, tối ưu ở pH 7; chúng có khả năng chịu muối lên đến 7% NaCl. Thủy phân tinh bột và casein, khử nitrat thành nitrit.

Adelskov và cộng sự lần đầu tiên phân lập được chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* strain D7XPN1 năm 2016 từ bề phản ứng phân hủy thực phẩm thải. Các phân tích hệ gen cho thấy chủng này có chứa một số lượng lớn các gen phân hủy carbohydrat như α -amylaza, pullulanaza, glucosidaza, galactosidaza, glucuroxylanaza, arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidaza. Bên cạnh đó, chủng D7XPN1 có chứa một số gen liên quan đến kích thích sinh trưởng thực vật và hoạt tính kháng nấm tương tự như chủng *Bacillus* sp. strain JS phân lập từ đất bao quanh rễ cây *Miscanthus* sp. Chủng *Bacillus* sp. strain JS cũng được Kim và cộng sự, 2015 chứng minh là có khả năng làm giảm bệnh nhiễm khuẩn trên cây thuốc lá. Do đó, chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* strain D7XPN1 có tiềm năng lớn ứng dụng làm phân bón kích thích sinh trưởng và bảo vệ thực vật. Năm 2021, Nair và cộng sự phân lập được chủng *Bacillus stercoris* MBTDCMFRI Ba37 từ rừng ngập mặn và chủng này có phổ kháng rộng với các vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản như *Vibrio* và *Aeromonas*.

Các nghiên cứu về đặc tính và ứng dụng khác của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* vẫn còn rất hạn chế. Đặc biệt, ở Việt Nam, hiện chưa có nghiên cứu nào về phân lập cũng như đặc tính của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris*.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh enzym, chịu muối mặn và kháng nấm bệnh giải quyết các hạn chế nêu ra ở trên.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ quả dâu tây trồng tại Đà Lạt, Việt Nam, có các đặc tính sau:

- có khả năng sinh tổng hợp các enzym α -amylaza, proteaza, và carboxymetyl xenlulaza (CMCaza);
- chịu được muối mật;
- có hoạt tính kháng các loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola*; và
- chủng này có đoạn gen mã hóa 16S rARN với kích thước 1488 bp như nêu trong SEQ ID NO:1, và được đăng ký trên Ngân hàng gen DDBJ với mã số LC634053 (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/index-e.html>) và được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, trường Đại học Phenikaa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: thể hiện hình ảnh tế bào và khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100. (A) hình ảnh tế bào chụp dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần. (B) hình ảnh khuẩn lạc của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 nuôi cấy ở 37°C sau 2 ngày trên môi trường thạch LB.

Hình 2: thể hiện cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự 16S rARN chỉ ra mối liên hệ giữa chủng PU10100 và các loài gần gũi trong chi *Bacillus*. Trình tự 16S rARN được phân tích bằng phương pháp Neighbour-joining thông qua MEGA7. Phần trăm bootstrap được dựa trên 1000 lần lặp lại.

Hình 3: thể hiện hoạt tính enzym của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100. (A) vòng phân giải tinh bột thể hiện hoạt tính α -amylaza. (B) vòng phân giải protein thể hiện hoạt tính proteaza; (C) vòng phân giải xenluloza thể hiện hoạt tính carboxymetyl xenlulaza (CMCaza).

Hình 4: thể hiện khả năng đối kháng của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 đối với các loại nấm gây bệnh. (A) khả năng đối kháng đối với nấm *Botrytis*

cinerea; (B) khả năng đối kháng đối với nấm *Fusarium proliferatum*; (C) khả năng đối kháng đối với nấm *Collectotrichum gloeosporioides*; (D) khả năng đối kháng đối với nấm *Mucor nidicola*.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết dưới đây có dựa vào các hình vẽ kèm theo, các hình vẽ này nhằm mục đích minh họa các phương án của giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh enzym, chịu muối mật và kháng nấm bệnh bao gồm:

- Chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 có đoạn gen mã hóa 16S rARN với kích thước 1488 bp, được đăng ký trên ngân hàng gen DDBJ với mã số LC634053 (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/index-e.html>) và được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, trường Đại học Phenikaa.

Đặc điểm thứ nhất của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học theo phương án này là:

- chủng này được phân lập từ quả dâu tây trồng tại Đà Lạt, Việt Nam;
- có khả năng sinh tổng hợp các enzym tiêu hóa bao gồm enzym α -amylaza, proteaza, carboxymetyl xenlulaza (CMCaza);
- chịu được muối mật;
- và chủng này có hoạt tính kháng các loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola*.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập chủng PU10100

Chủng PU10100 được phân lập từ quả dâu tây tươi trồng tại Đà Lạt, Việt Nam. Quả dâu tây khi mang về được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, cắt một miếng đường kính 1,5x1,5 cm chuyển vào môi trường LB (NaCl – 5 g/L, Cao nấm men – 5 g/L, Pepton – 10 g/L), ủ ở 37°C trong 15 phút. Mẫu phân lập được ủ trong bể ớn nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Mẫu được pha loãng đến nồng độ 10^{-4} và 10^{-5} và được cấy trải trên môi trường LB ở 37°C trong 24 giờ. Lựa chọn khuẩn lạc điển hình và làm tinh sạch.

Chủng PU10100 là vi khuẩn Gram dương; hình que (Hình 1A); sinh bào tử; kỵ khí tùy tiện. Trên môi trường LB khuẩn lạc PU10100 có dạng hình tròn, mép viền, bề mặt khô màu trắng sữa và có đường kính từ 2 – 2,5 mm sau 2 ngày ủ ở 37°C (Hình 1B). Chủng được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu nguồn gen, trường Đại học Phenikaa.

Ví dụ 2: Định danh chủng PU10100

Từ chủng PU10100 phân lập được ở trên, thực hiện tách chiết ADN và nhân gen 16S rARN sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự 16S rARN được sử dụng để dựng cây phân loại dựa trên phương pháp thống kê Neighbor-Joining (NJ) thông qua chương trình MEGA7. Giá trị bootstrap xuất hiện ở mỗi nhánh được thiết lập từ sau 1000 lần lặp lại. Cây phát sinh chủng loại được thể hiện ở hình 2. Kết quả xác định được trình tự gen 16S rARN có kích thước 1488 nucleotide, mã đăng ký trên ngân hàng gen thế giới DDBJ là LC634053 (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/index-e.html>). Chủng PU10100 có độ tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* JCM 30051^T.

Ví dụ 3: Đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng PU10100

Khả năng sinh enzyme α -amylaza, proteaza, carboxymetyl xenlulaza (CMCaza) của chủng PU10100 được kiểm tra bằng cách bổ sung 1% cơ chất tương ứng là tinh bột, protein và xenluloza vào môi trường thạch nước. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, đĩa nuôi

cấy được nhuộm với thuốc thử Lugol 1% để kiểm tra hoạt tính α -amylaza, congo đỏ 0,1% để xác định hoạt tính carboxymetyl xenlulaza (CMCaza) và quan sát vòng phân giải đối với hoạt tính proteaza. Kết quả cho thấy chủng PU10100 có khả năng sinh cả ba enzym ngoại bào là α -amylaza (Hình 3A), proteaza (Hình 3B) và carboxymetyl xenlulaza (CMCaza) (Hình 3C).

Chủng PU10100 có khả năng sinh trưởng ở dải pH 3-9, tối ưu ở pH7. Về khả năng chịu nhiệt, chủng PU10100 có khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ thí nghiệm từ 20-50°C, tốt nhất ở 37-45°C. Về khả năng chịu muối, chủng PU10100 sinh trưởng được trong dải nồng độ muối rộng, từ 0-9%, tốt nhất ở nồng độ NaCl 0-1%.

Ví dụ 4: Đặc tính probiotic của chủng PU10100

Thông thường, muối mật trong dịch tiêu hóa của động vật có vú dao động từ 0,1-0,3%. Do đó, các chủng vi sinh vật hữu ích muốn khu trú và phát huy tác dụng được trong đường tiêu hóa của động vật phải có khả năng tồn tại và phát triển trong nồng độ muối mật tương ứng. Như vậy, khả năng chịu được muối mật ở các nồng độ khác nhau là tiêu chí quan trọng để đánh giá các đặc tính probiotic của chủng vi sinh. Theo Gilliland và cộng sự (1984), nồng độ 0,3% được coi là nồng độ quan trọng để sàng lọc các chủng chịu được muối mật.

Khả năng kháng muối mật của chủng PU10100 được khảo sát thông qua khả năng phát triển của chúng ở các nồng độ muối mật 0; 0,1; 0,3; 0,5%. Môi trường dùng để thử khả năng kháng muối mật là môi trường MRS (Pepton – 10 g/L, Cao thịt – 5 g/L, Cao nấm men – 5 g/L, Glucose – 20 g/L, Tween 80 – 1 g/L, Sodium acetate – 5 g/L, Amonium acetate – 2 g/L, MgSO₄ – 2 g/L, MnSO₄ – 0,05 g/L) có bổ sung muối mật có các nồng độ thay đổi từ 0 - 0,5%. Sinh trưởng của chủng vi khuẩn được theo dõi ở các thời điểm 1, 2, 3, 4 và 24 giờ bằng cách đo OD ở bước sóng 600 nm.

Bảng 1: Kết quả đo OD₆₀₀ của chủng PU10100 ở các nồng độ muối mật khác nhau

Nồng độ muối mật (%)	0	0,1	0,3	0,5
Thời gian (giờ)				
0	0,355	0,367	0,762	1,013
1	0,443	0,331	0,471	0,771
2	0,448	0,291	0,327	0,768
3	0,453	0,326	0,359	0,765
4	0,461	0,377	0,365	0,782
24	0,728	0,531	0,445	0,868

Kết quả cho thấy, mật độ vi khuẩn giảm dần trong 2 giờ đầu tại nồng độ muối mật 0,1% và 0,3%, giảm trong 3 giờ đầu tại nồng độ muối mật 0,5%. Sau đó vi khuẩn thích nghi và bắt đầu tăng trưởng trở lại. Như vậy, có thể khẳng định rằng chủng PU10100 có khả năng chịu muối mật tốt và do đó có thể phát triển tốt trong đường tiêu hóa của động vật.

Ví dụ 5: Khả năng kháng nấm của chủng PU10100

Chủng PU10100 được nuôi cấy trong các ống nghiệm chứa 5 mL môi trường LB, tốc độ lắc 160 vòng/phút, nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy vi khuẩn được xác định hoạt tính kháng các chủng nấm gây bệnh thực vật *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola* theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Phương pháp này được thực hiện như sau: Các chủng nấm được nuôi cấy trên đĩa thạch PDA (Himedia) trong 7 ngày ở 25°C. Thỏi thạch nấm ($\Phi = 5$ mm) được đặt vào tâm đĩa petri ($\Phi = 6$ cm) chứa môi trường PDA. 50 μ l dịch nuôi cấy vi khuẩn sau ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào được nhỏ vào trong giếng thạch ($\Phi = 5$ mm) đã được đục sẵn cách tâm đĩa 2 cm. Ủ đĩa trong 3 ngày ở 25°C. Tỷ lệ kháng nấm của chủng vi khuẩn được tính theo công thức: $S = (R-r)/R \times 100\%$. Trong đó, S: Phần trăm ức chế, R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí giếng nhỏ dịch nuôi vi khuẩn, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía có giếng nhỏ dịch nuôi vi khuẩn.

Khả năng đối kháng của chủng PU10100 với các chủng nấm gây bệnh thực vật được thể hiện trong hình 6, 7, 8, 9. Tỷ lệ ức chế nấm *Botrytis cinerea* của chủng PU10100 đạt 52% (Hình 4A). Tỷ lệ ức chế nấm *Fusarium proliferatum* đạt 16% (Hình 4B). Tỷ lệ ức chế nấm *Collectotrichum gloeosporioides* đạt 33% (Hình 4C). Tỷ lệ ức chế nấm *Mucor nidicola* đạt 42% (Hình 4D).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đã phân lập và định danh thành công chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100. Lần đầu tiên, chủng này được phân lập từ quả dâu tây trồng tại Đà Lạt, Việt Nam. Chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 có khả năng sản sinh các enzym α -amylaza, proteaza, carboxymetyl xenlulaza (CMCaza) với hoạt tính cao, chịu được muối mật và có hoạt tính kháng với các nấm gây bệnh thực vật. Hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật cũng là đặc tính được phát hiện lần đầu tiên đối với chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris*. Do vậy, chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 là đối tượng tiềm năng để phát triển các sản phẩm probiotics, phát triển các chế phẩm vi sinh trong bảo quản hoa quả và bảo vệ thực vật.

YÊU CẦU BẢO HỘ

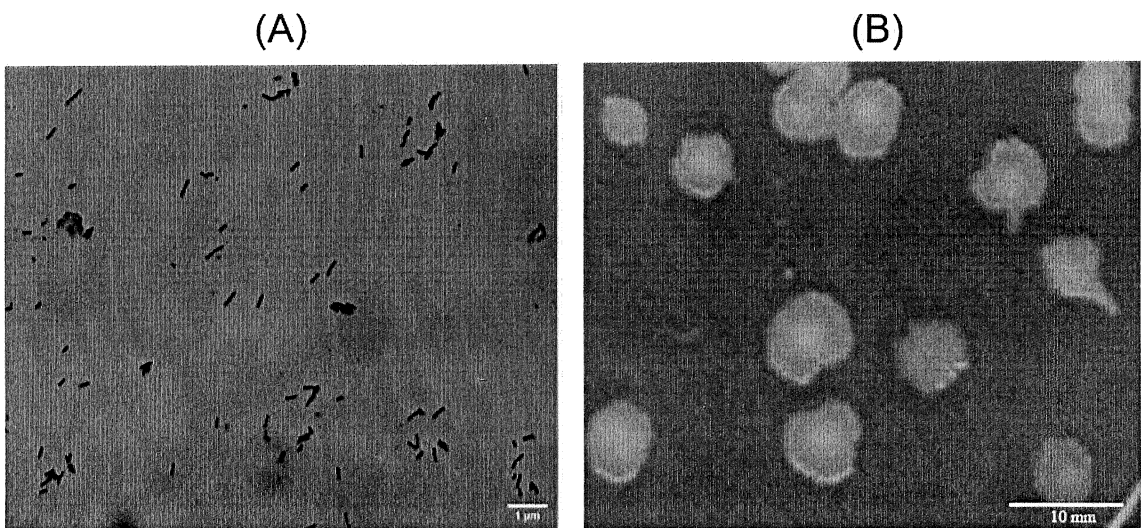
1. Chủng *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* PU10100 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ quả dâu tây trồng tại Đà Lạt, Việt Nam, có các đặc tính sau:

- có khả năng sinh tổng hợp các enzym α -amylaza, proteaza, và carboxymethyl xenlulaza (CMCaza);

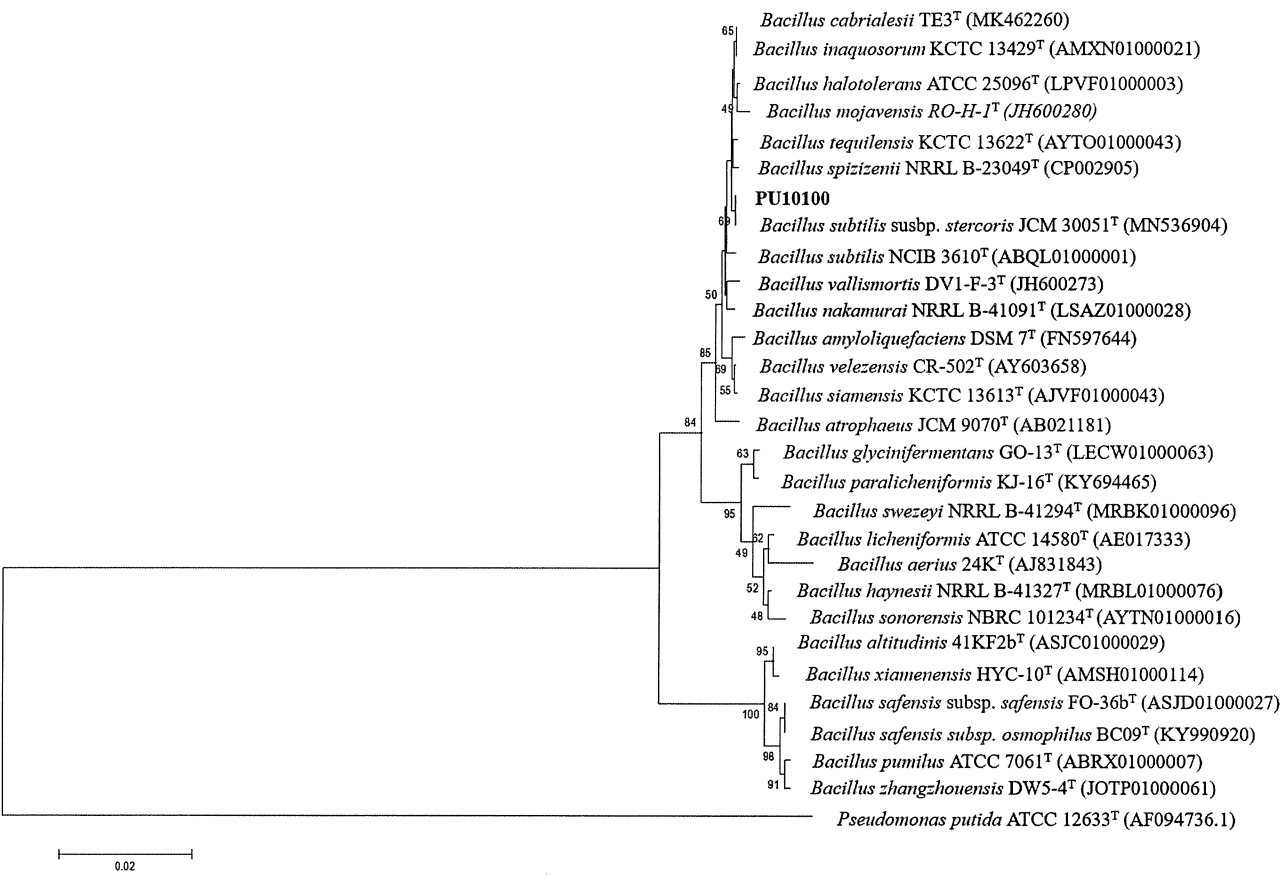
- chịu được muối mật;

- có hoạt tính kháng các loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola*; và

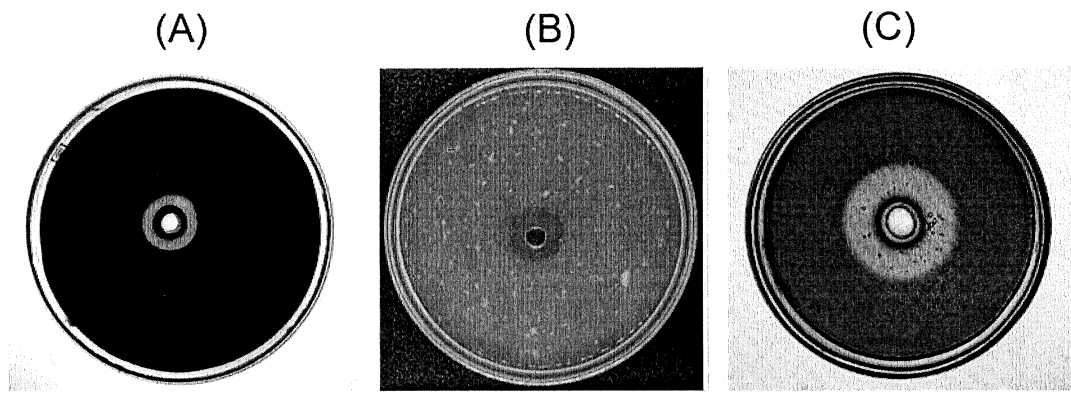
- chủng này có đoạn gen mã hóa 16S rARN với kích thước 1488 bp như nêu trong SEQ ID NO:1, và được đăng ký trên Ngân hàng gen DDBJ với mã số LC634053.



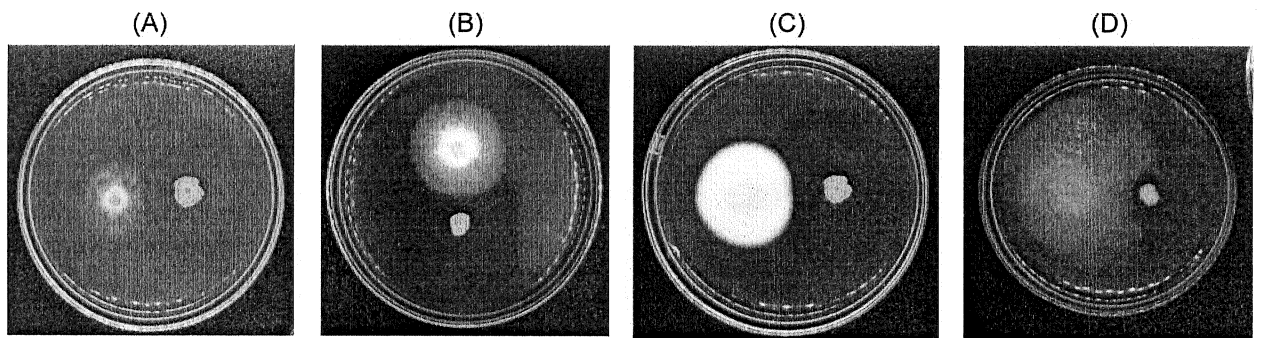
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

Danh mục trình tự

<110>	Trường Đại học Phenikaa	
<120>	Chủng <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stercoris</i> PU10100 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh enzym, chịu được muối mật và kháng nấm gây bệnh	
<130>		
<160>	1	
<170>		
<210>	1	
<211>	1488	
<212>	ADN	
<213>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stercoris</i> PU10100	
<220>		
<223>	16S rARN	
<400>	1	
	CATGGCTCAG GACGAACGCT GCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACAGATGG	60
	GAGCTTGCTC CCTGATGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CTGCCTGTA	120
	AGACTGGGAT AACTCCGGGA AACCGGGGCT AATACCGGAT GCTTGTTTGA ACCGCATGGT	180
	TCAAACATAA AAGGTGGCTT CGGCTACCAC TTACAGATGG ACCCGCGGCG CATTAGCTAG	240
	TTGGTGAGGT AATGGCTCAC CAAGGCGACG ATGCGTAGCC GACCTGAGAG GGTGATCGGC	300
	CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG	360
	CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGTTTT CGGATCGTAA	420
	AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA ACAAGTACCG TTCGAATAGG GCGGTACCTT GACGGTACCT	480
	AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG	540
	TTGTCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGGGCTC GCAGGCGGTT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG	600
	CCCCCGGCTC AACCGGGGAG GGTCATTGGA AACTGGGGAA CTTGAGTGCA GAAGAGGAGA	660
	GTGGAATTCC ACGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATGTG GAGGAACACC AGTGGCGAAG	720
	GCGACTCTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAG GAGCGAAAGC GTGGGGAGCG AACAGGATTA	780
	GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAGTGCTAAG TGTTAGGGGG TTTCCGCCCC	840
	TTAGTGCTGC AGCTAACGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGACTGAAA	900
	CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA	960
	CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATCC TCTGACAATC CTAGAGATAG GACGTCCCCT	1020
	TCGGGGGCGAG AGTGACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG	1080
	TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCTTGAT CTTAGTTGCC AGCATTCACT TGGGCACTCT	1140
	AAGGTGACTG CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC	1200
	TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACAGAACA AAGGGCAGCG AAACCGCGAG	1260
	GTTAAGCCAA TCCACAAAT CTGTTCTCAG TTCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT	1320
	GAAGCTGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG GGTGAATACG TTCCCGGGCC	1380
	TTGTACACAC CGCCGTCAC ACCACGAGAG TTTGTAACAC CCGAAGTCGG TGAGGTAACC	1440
	TTTAGGAGC CAGCCGCCGA AGGTGGGACA GATGATTGGG GTGAAGTC	1488