



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0038324

(51)^{2020.01} C12N 15/80

(13) B

(21) 1-2021-03934

(22) 29/06/2021

(45) 25/01/2024 430

(43) 27/09/2021 402

(73) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN)

160/10/16 Phạm Văn Đồng, phường 3, quận Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh

(72) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN); Nguyễn Ngọc Bảo Châu (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) BỘ MÔI LAMP-CCAS ĐẶC HIỆU ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH NẤM
CORYNESPORA CASSIICOLA

(57) Sáng chế đề cập đến các đoạn môi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification-LAMP-Ccas) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến cặp đoạn mồi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification- LAMP-Ccas) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Corynespora cassiicola đã được biết đến như một loại nấm gây bệnh cây trồng có khả năng lây nhiễm trên nhiều loại thực vật với hơn 530 loài bao gồm các loại rau, ngũ cốc, trái cây, cây cảnh, cây rừng và cây lâu năm trên khắp thế giới, đặc biệt là vùng nhiệt đới và các nước cận nhiệt đới. Tên thường gọi của bệnh do nấm này gây ra là bệnh rụng lá *Corynespora* (cây cao su), bệnh đốm vằn (cây họ bầu bí), bệnh đốm quả (cà chua), bệnh đốm lá (cây bông vải, thuốc lá, cà chua), đốm thân, đốm quả. (cà tím, đu đủ) và đốm đen (của họ bầu bí, đậu tương). Thông thường, các triệu chứng ban đầu được nhận thấy trên lá là một số lượng lớn các đốm hình thoi với vòng hào quang màu vàng đồng tâm. Trên cà chua, *Corynespora cassiicola* mang một loại độc tố có tính chọn lọc (CCT) gây ra các vòng màu vàng. Các đốm, sau đó nhanh chóng mở rộng góc cạnh, hình tròn hoặc không đều, đường kính lên đến 3-20 mm, rải rác có màu từ nâu nhạt đến đen xám. Các vùng bị ảnh hưởng tiếp tục phát triển thành các vết hoại tử lớn và nhỏ cả trên bề mặt lá và mép lá. Trên cây cao su, *Corynespora cassiicola* sản sinh ra một loại độc tố cassiicolin đặc trưng cho vật chủ gây bệnh rụng lá *corynespora* (CLFD) trên cây cao su. Lá bị bệnh có các vết bệnh hình tròn đến không đều với kích thước khác nhau với tâm màu nâu hoặc trắng, rìa lá màu nâu đỏ sẫm có quầng vàng bao quanh. Các lá non có màu xanh nhạt thường dễ bị nhiễm bệnh hơn. Trong những trường hợp nghiêm trọng, biểu hiện giống “xương cá” hoặc “đường ray” trên bề mặt lá

do các gân chính hoặc các mạch nhỏ tiếp giáp với các đốm dẫn đến hiện tượng rụng lá trên cây cao su.

Việc chẩn đoán nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng, đặc biệt ở giai đoạn đầu xâm nhiễm thường rất khó khăn do không có triệu chứng điển hình. Trên thực tế, các quy trình chẩn đoán nấm gây bệnh đạo ôn thường được thực hiện thông qua việc ủ mẫu bệnh trong ít nhất 24 tiếng đồng hồ, sau đó là kiểm tra bằng kính hiển vi trên các mẫu lá để quan sát sự hiện diện của các bào tử nấm *Corynespora cassiicola*. Các phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian, công sức, chi phí. Hiện tại các phương pháp tiếp cận phân tử cho việc phát hiện, xác định nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng chủ yếu là phương pháp PCR và Nested PCR (Sousa và cộng sự, 2016; Qi và cộng sự, 2009). Tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn chi phí và cần thực hiện trong phòng thí nghiệm có trang bị tốt không thích hợp cho chẩn đoán nhanh tại đồng ruộng. Chính vì vậy việc khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP) đã được coi là một phương pháp mang tính thay thế để phát hiện nhanh nấm *Corynespora cassiicola* đặc biệt là phát hiện nhanh tại đồng ruộng trong thời gian 30 phút. Cho đến nay, chưa có công bố nào cho việc phát hiện nhanh nấm *Corynespora cassiicola* bằng kỹ thuật LAMP.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, nhằm mục đích xác định nhanh và định danh chính xác với ít chi phí và có độ nhạy cao đối với nấm *Corynespora cassiicola*, mục đích của sáng chế đề xuất trình tự của chỉ thị vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (SCAR-Ccas) và các đoạn mồi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP-Ccas) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola*.

Theo một phương án, vùng chỉ thị SCAR-Ccas có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.1 như sau:

TGAACCGGAGAAGCGTGAAACACAATCTGCTATCTCATACGTGTGCATAC
GTTCCGTGTGTGAAATTGTCGATGATGCCGAAGAGTGAACCGTGGGAAAA
AAACCGTCCAAGTATGTCGAGAGGGTTATGATAAGACGTCAGTAGGAACT

GAGTTTACTTGCTAGCAGCCTGCGGGTAGAGCGAGTTGTAAACTTGGTCCA
 CCACGTATGAGGCGCGGATGGGATGGCCGTTGAAACGGCGACCGTTGAGG
 CCTTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGCGAGGGTCTCGAACTTGACATAAACG
 TCTCCGCCAGACTGAGGATCGACTGCCAAGTGTACGACACGTCCATAAGTG
 CTAGAACAACCTCATTCTCGATTTACGCTTCTCCGGTTCA

Theo phương án khác, các đoạn mồi LAMP-Ccas có trình tự như được nêu dưới đây:

Đoạn mồi F3: 5' GCGGGTAGAGCGAGTTGT 3' (SEQ ID NO. 2)

Đoạn mồi B3: 5' GCACTTATGGACGTGTCGTA 3' (SEQ ID NO. 3)

Đoạn mồi FIP: 5'
 CCTCAACGGTCGCCGTTTCAAACTTGGTCCACCACGTATG 3'
 (SEQ ID NO. 4)

Đoạn mồi BIP: 5'
 TTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGGCAGTCGATCCTCAGTCT 3'
 (SEQ ID NO. 5)

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Khảo sát tính đa hình của Pot2 transposon với mồi Pot2L2 giữa các loại nấm gây bệnh trên cây trồng khác nhau. Mũi tên chỉ mục tiêu để phát triển chỉ thị SCAR-Ccas đặc hiệu cho nấm gây bệnh cây trồng, *Corynespora cassiicola*. M-Ladder 1 kb; 1-*Antrodia serialis*; 2- *Fusarium* sp.; 3- *Fomitopsis* cf. *meliae*; 4-*Trametes polyzona*; 5-*Magnaporthe oryzae*; 6-*Curvularia lunata*; 7-*Lasiodiplodia theobromae*; 8,9,10,11- *Corynespora cassiicola* (BT11;DN31;QN01;LK17); 12- *Pleurotus ostreatus*; 13- *Auricularia auricularjudae*; 14-*Colletotrichum gloeosporioides*; 15-*Corticium* sp.; 16- đối chứng âm

Hình 2. Sơ đồ plasmit pJET1.2 dùng để chèn sản phẩm PCR khuếch đại từ mồi Pot2L2 cho việc giải trình tự chỉ thị SCAR-Ccas đặc hiệu cho nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng

Hình 3. Tính tương đồng về trình tự của chỉ thị SCAR-Ccas với nấm gây bệnh rụng lá cao su, *Corynespora cassiicola* bằng công cụ BLAST (Hình 3A) và phân tích cây thư mục di truyền (Hình 3B). Kết quả cho thấy trình tự của chỉ thị SCAR-Ccas tương đồng 97% trình tự của nấm *Corynespora cassiicola* trong cơ sở dữ liệu của NCBI. Phân tích cây thư mục di truyền cũng chỉ ra rằng chỉ thị SCAR-Ccas có mối quan hệ chắc chắn với các mẫu phân lập *Corynespora cassiicola* bất kể vật chủ và nguồn gốc khác nhau của chúng. Nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được sử dụng là đối chứng (outgroup) của cây di truyền.

Hình 4. Phản ứng LAMP với cặp mồi đặc hiệu cho *Corynespora cassiicola* phát triển từ vùng trình tự SCAR-CCas cho việc phát hiện nấm *Corynespora cassiicola* với các nấm gây bệnh cây trồng khác. (A) Đường khuếch đại sản phẩm LAMP được quan sát chỉ trên mẫu nấm *Corynespora cassiicola* mà không có trên các nấm khác. (B) đường cong nóng chảy của phản ứng LAMP được quan sát chỉ trên mẫu nấm *Corynespora cassiicola* mà không có trên các nấm khác. (C) Sản phẩm LAMP được điện di trên 1% agarose gel. Sản phẩm LAMP dạng thang ADN được quan sát chỉ trên mẫu nấm *Corynespora cassiicola* mà không có trên các nấm khác. Hình bên trái bao gồm *Corynespora cassiicola* (1), *Antrodia serialis* (2), *Fusarium sp.* (3), *Fomitopsis cf. meliae* (4), *Trametes polyzona* (5), *Magnaporthe oryzae* (6), *Curvularia lunata* (7), - LAMP: đối chứng âm (8). Hình bên phải bao gồm *Corynespora cassiicola* (1), *Lasiodiplodia theobromae* (2), *Pleurotus ostreatus* (3), *Auricularia auricularudae* (4), *Colletotrichum gloeosporioides* (5), *Corticium sp* (6), *Phytophthora sp.* (7), LAMP: đối chứng âm (8).

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế đề xuất trình tự của chỉ thị vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (SCAR-Ccas) và các đoạn mồi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP-Ccas) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh cây trồng. Tác giả sáng chế đã sử dụng 4 đoạn mồi của 2 trình tự LTR-retrotransposon Pyret và Pot2 transposon để khảo sát tính đa hình của các yếu tố nhảy (transposon) trên các mẫu nấm khác nhau (Bảng 1 và Bảng 2). Phản ứng PCR với mồi Pot2L2 cho ra 2 sản phẩm khuếch đại trên nấm *Corynespora*

cassiicola và 1 trong 2 sản phẩm đó với kích thước khoảng 400 bp được cắt, tinh sạch ADN từ agarose gel và chèn vào trong plasmid pJET1.2 để giải trình tự (Hình 1). Trình tự của chi thị SCAR-Ccas được sử dụng cho việc thiết kế mỗi PCR bằng phần mềm Primer 3 (Untergasser và cộng sự, 2012) và mỗi LAMP-Ccas bằng phần mềm PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo).

Bảng 1. Trình tự đoạn mỗi được dùng để khảo sát tính đa dạng di truyền của các nấm gây bệnh cây trồng khác nhau dựa trên trình tự của các yếu tố nhảy (transposable elements)

STT	Tên mỗi	Trình tự (5' – 3')	Tham khảo
3	Pot2-F3	AACCAACGCTACTTCTTCACG	Tự thiết kế (SEQ ID NO.6)
4	Pot2-B3	CGGTTCATTAACCTCTTCTTCA	Tự thiết kế (SEQ ID NO.7)
5	Pyr1	CCCTTGTCCGTTTGAGATCA	Chadha và Sharma, 2014 (SEQ ID NO.8)
6	Pot2L2	TGAACCGGAGAAGCGTGAAA	Chadha và Sharma, 2014 (SEQ ID NO.9)

Bảng 2. Các mẫu nấm được sử dụng cho việc đánh giá tính chuyên biệt của mỗi LAMP trong việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola*

STT.	Tên nấm	Địa điểm
1	<i>Antrodia serialis</i>	RIBE-R.304
2	<i>Fusarium sp</i>	RIBE-R.304
3	<i>Fomitopsis cf. meliae</i>	RIBE-R.304
4	<i>Trametes polyzona</i>	RIBE-R.304
5	<i>Magnaporthe oryzae</i>	RIBE-R.304
6	<i>Curvularia lunata</i>	RIBE-R.304
7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	RIBE-R.304
8	<i>Corynespora cassiicola</i> – BT11	RIBE-R.304
9	<i>Corynespora cassiicola</i> – DN31	RIBE-R.304
10	<i>Corynespora cassiicola</i> – QN01	RIBE-R.304
11	<i>Corynespora cassiicola</i> – LK17	RIBE-R.304
12	<i>Pleurotus ostreatus</i>	RIBE-R.304
13	<i>Auricularia auricularjudae</i>	RIBE-R.304
14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	RIBE-R.304
15	<i>Corticium sp.</i>	RIBE-R.304

Trình tự đoạn mồi LAMP-Ccas để phát hiện tính chuyên biệt của nấm *Corynespora cassiicola*:

Đoạn mồi F3: 5' GCGGGTAGAGCGAGTTGT 3' (SEQ ID NO. 2)

Đoạn mồi B3: 5' GCACTTATGGACGTGTCGTA 3' (SEQ ID NO. 3)

Đoạn mồi FIP: 5'

CCTCAACGGTCGCCGTTTCAAACCTTGGTCCACCACGTATG 3'

(SEQ ID NO. 4)

Đoạn mồi BIP: 5'

TTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGGCAGTCGATCCTCAGTCT 3'

(SEQ ID NO. 5)

Kích thước khuếch đại đẳng nhiệt dạng vòng của trình tự khi sử dụng 4 đoạn môi này như được nêu trong SEQ ID NO.10 như sau: (183 bp)

GCGGGTAGAGCGAGTTGTAAACTTGGTCCACCACGTATGAGGCGCGGATG
GGATGGCCGTTGAAACGGCGACCGTTGAGGCCTTCGATCGCCTTCTTGCTA
CCGGCGAGGGTCTCGAACTTGACATAAACGTCTCCGCCAGACTGAGGATC
GACTGCCAAGTGTACGACACGTCCATAAGTGC

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Minh chứng tính chuyên biệt của trình tự SCAR-Ccas (SEQ ID NO.1) đối với nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng.

Sản phẩm PCR với môi Pot2L2 trên nấm *Corynespora cassiicola* được tinh sạch ADN từ gel agarosa và chèn vào trong plasmit pJET1.2 để giải trình tự (Hình 1 và Hình 2). Trình tự của chỉ thị SCAR-Ccas được so sánh trong cơ sở dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả trên Hình 3A chỉ ra rằng trình tự của chỉ thị SCAR-Ccas tương đồng trên 97,38% với duy nhất trình tự của nấm *Corynespora cassiicola* mà không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác. Hơn nữa, phân tích cây thư mục di truyền cũng chỉ ra rằng chỉ thị SCAR-Ccas có mối quan hệ chắc chắn với các mẫu phân lập *Corynespora cassiicola* (Hình 3B). Điều này chỉ ra rằng trình tự SCAR-Ccas là đặc hiệu cho nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng và có thể sử dụng cho việc thiết kế môi của các phản ứng PCR, qPCR, hay LAMP.

Ví dụ 2: Đánh giá tính chuyên biệt của môi LAMP-Ccas cho việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng

Bước 1: Ly trích ADN tổng số của các mẫu nấm gây cây trồng (Bảng 2) bằng Kit ADN GeneJet Plant Genomic (Thermoscientific, USA):

- Cân 0,1 g nấm (sợi nấm) cho vào ống Eppendorf 1,5 ml; thêm vào 350 µl dung dịch đệm tan A và tạo lốc xoáy trong 10 – 20 giây

- Thêm 50 µl dung dịch đệm tan B, 20 µl RNaza và ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút
- Thêm 130 µl dung dịch tiền kết tủa, tạo lốc xoáy trong 5 giây, sau đó ủ 5 phút ở -20°C, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 5 phút, thu 450 – 500 µl dịch nổi và cho vào ống Eppendorf sạch
- Thêm 400 µl dung dịch gắn kết và 400 µl etanol 96%, tạo lốc xoáy trong 5 giây, tính tổng thể tích vừa thu được
- Chuyển ½ thể tích vừa thu được vào cột, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 1 phút và loại bỏ dịch ở đáy cột, chuyển phần thể tích còn lại vào cột, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 1 phút
- Thêm 500 µl dung dịch đệm rửa I đã được thêm etanol 96%, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng trong 1 phút, loại bỏ dịch dưới và giữ lại cột
- Thêm 500 µl dung dịch đệm rửa II đã được thêm etanol 96%, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch dưới
- Thay ống Eppendorf mới, thêm 100 µl dung dịch tách rửa bằng cách nhỏ giọt ở giữa cột, ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút, thu ADN và bảo quản ở -20°C.

Bước 2. Chuẩn bị hỗn hợp môi LAMP

Thành phần	Thể tích
F3	4 µL
B3	4 µL
FIP	20 µL
BIP	20 µL
Nước cất	152 µL

Bước 3: Thực hiện phản ứng LAMP sử dụng Isothermal MasterMix (Optigene, UK) với bộ môi phù hợp theo thành phần cho 8 phản ứng sau đây:

Thành phần	Thể tích 20 µL
MasterMix đẳng nhiệt	115 µL

Hỗn hợp môi LAMP	23 μ L
Nước cất	46 μ L
Mẫu ADN	1 -2 μ L

Chuyển 20 μ L/phản ứng vào 8 ống phản ứng. Lưu ý, vị trí thứ 8 phải đóng nắp ngay lập tức –LAMP (đối chứng âm). Chu trình nhiệt phản ứng LAMP bao gồm:

- Gia nhiệt sơ bộ 40°C trong 2 phút, tốc độ gia nhiệt 4,8°C/s
- Khuếch đại ở 63°C - 65°C trong 30 phút, tốc độ gia nhiệt 2,6°C/s
- Nung ở khoảng nhiệt độ từ 95°C trong vòng 30 giây đến 70°C trong vòng 30 giây, tốc độ gia nhiệt 0,11°C/s

Trong đó, đối chứng âm là phản ứng LAMP không bỏ ADN. Thiết bị chạy phản ứng LAMP là máy MyGo Mini thời gian thực (IT IS, UK) và GenieIII (Optigen, UK). Sản phẩm LAMP sau đó được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1% trong dung dịch đệm TBE 0,5X.

Hỗn hợp các môi LAMP được sử dụng để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng bao gồm đoạn môi nêu trong SEQ ID NO.2; đoạn môi nêu trong SEQ ID NO. 3; đoạn môi nêu trong SEQ ID NO. 4 và đoạn môi nêu trong SEQ ID NO. 5.

Kết quả: Kết quả cho thấy chỉ có duy nhất đường khuếch đại của nấm *Corynespora cassiicola* mà không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác (Hình 4). Khả năng phát hiện ADN của nấm *Corynespora cassiicola* là trong khoảng 30 phút. Điều này cho thấy môi LAMP-Ccas đặc hiệu cho nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh cây trồng và có khả năng ứng dụng cho việc phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh này tại đồng ruộng.

Hiệu quả của sáng chế

Trình tự chỉ thị SCAR-Ccas trong sáng chế này là chuyên biệt cho nấm *Corynespora cassiicola*. Trình tự này có thể được sử dụng cho việc thiết kế các đoạn môi, đầu dò cho các tiếp cận phân tử trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh này.

Các mồi LAMP-Ccas đặc hiệu được thiết kế trong sáng chế này có khả năng phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh trên cây trồng. Các mồi LAMP-Ccas giúp tiết kiệm rất nhiều thời gian, công sức và tiền bạc, độ tin cậy cao so với các phương pháp truyền thống dựa trên hình thái bào tử trong việc phát hiện tác nhân này.

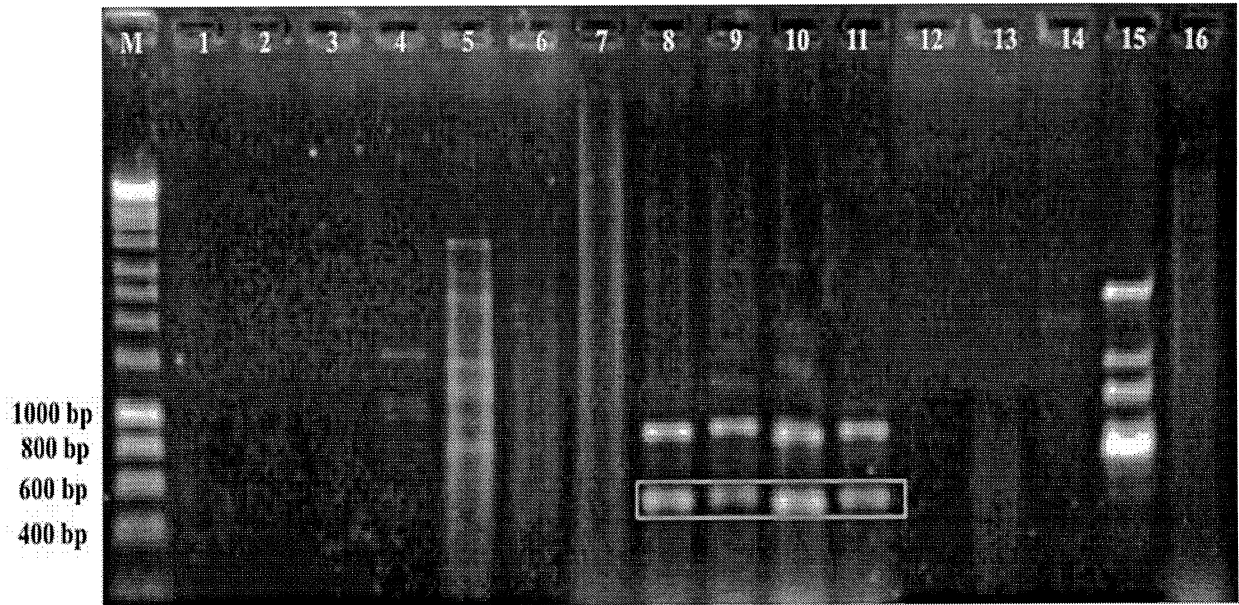
Lợi ích của sáng chế là có thể ứng dụng cặp mồi đặc hiệu này không chỉ cho các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm mà còn cho các công tác kiểm định, chẩn đoán nhanh tác nhân gây bệnh trong giai đoạn vườn ươm và đồng ruộng nhằm có những giải pháp kịp thời trong phòng trừ bệnh do nấm *Corynespora cassiicola* gây ra

Tài liệu tham khảo

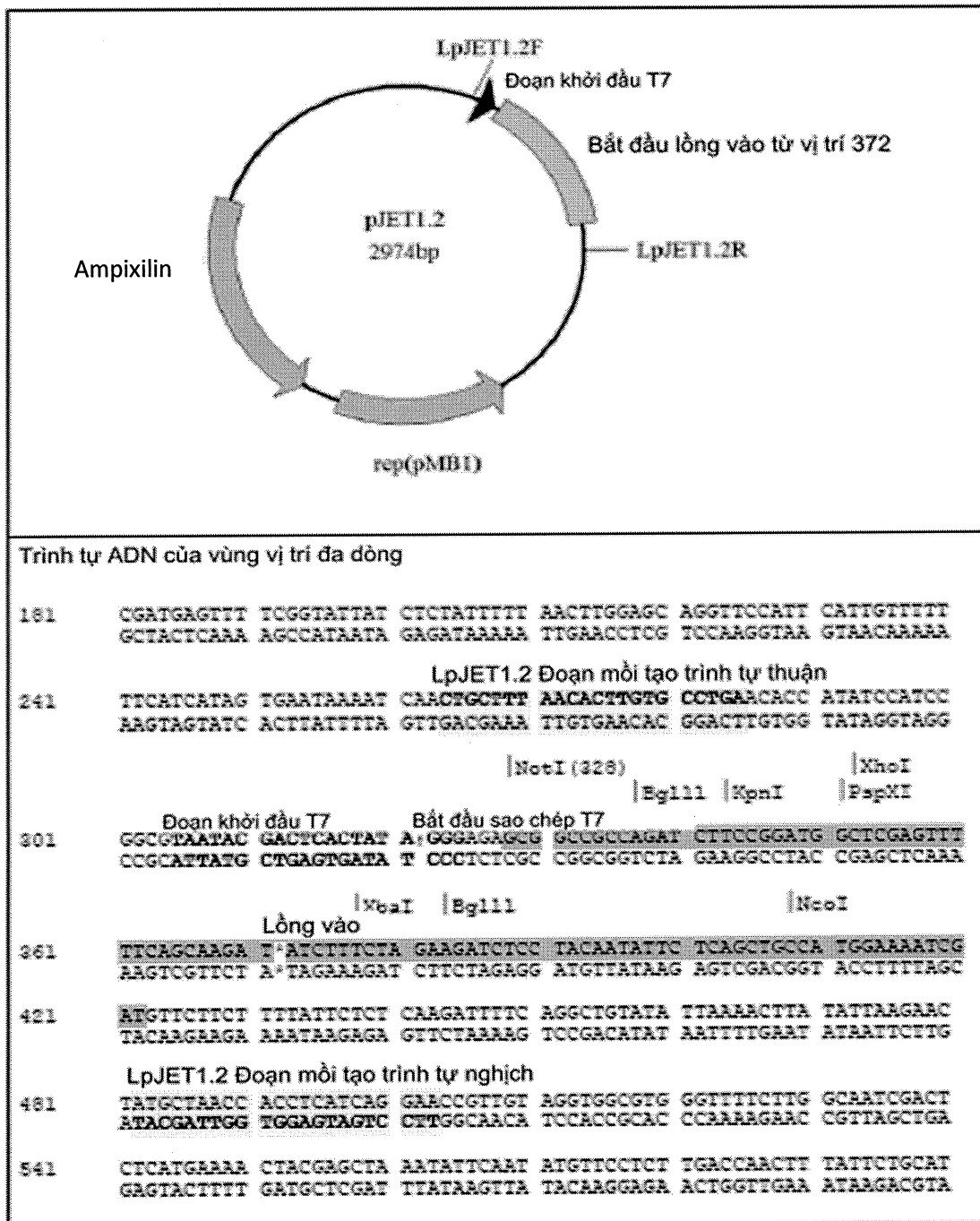
1. Chadha S, Gopalakrishna T. (2006) Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 100(5): 1147-1153.
2. Qi YX, Zhang X, Pu JJ, Xie YX, Zhang HQ, Huang SL, et al. (2009). Nested PCR assay for detection of *Corynespora* leaf fall disease caused by *Corynespora cassicola*. *Australasian Plant Pathology* 38(2): 141.
3. Sousa MV de, Siqueira C da S, Machado J da C. (2016). Conventional PCR for detection of *Corynespora cassicola* in soybean seeds. *Journal of Seed Science* 38(2): 85–91
4. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15): e115.

YÊU CẦU BẢO HỘ

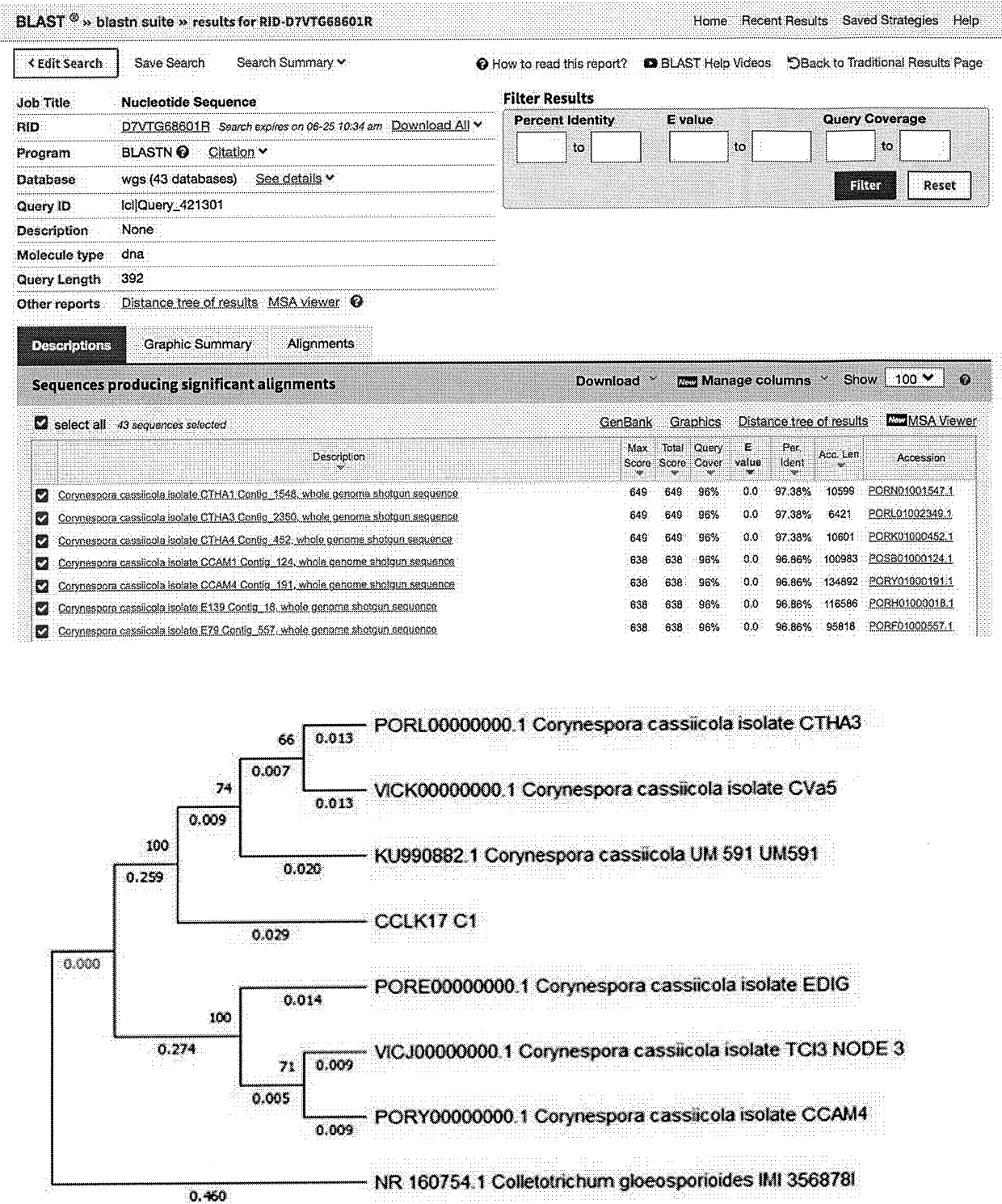
1. Bộ mồi LAMP-Ccas bao gồm các đoạn mồi F3, B3, FIP và BIP, trong đó đoạn mồi F3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2: GCGGGTAGAGCGAGTTGT; đoạn mồi B3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3: GCACTTATGGACGTGTCGTA; đoạn mồi FIP có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4: CCTCAACGGTCGCCGTTTCAAACTTGGTCCACCACGTATG, và đoạn mồi BIP có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5: TTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGGCAGTCGATCCTCAGTCT.

**Hình 1**

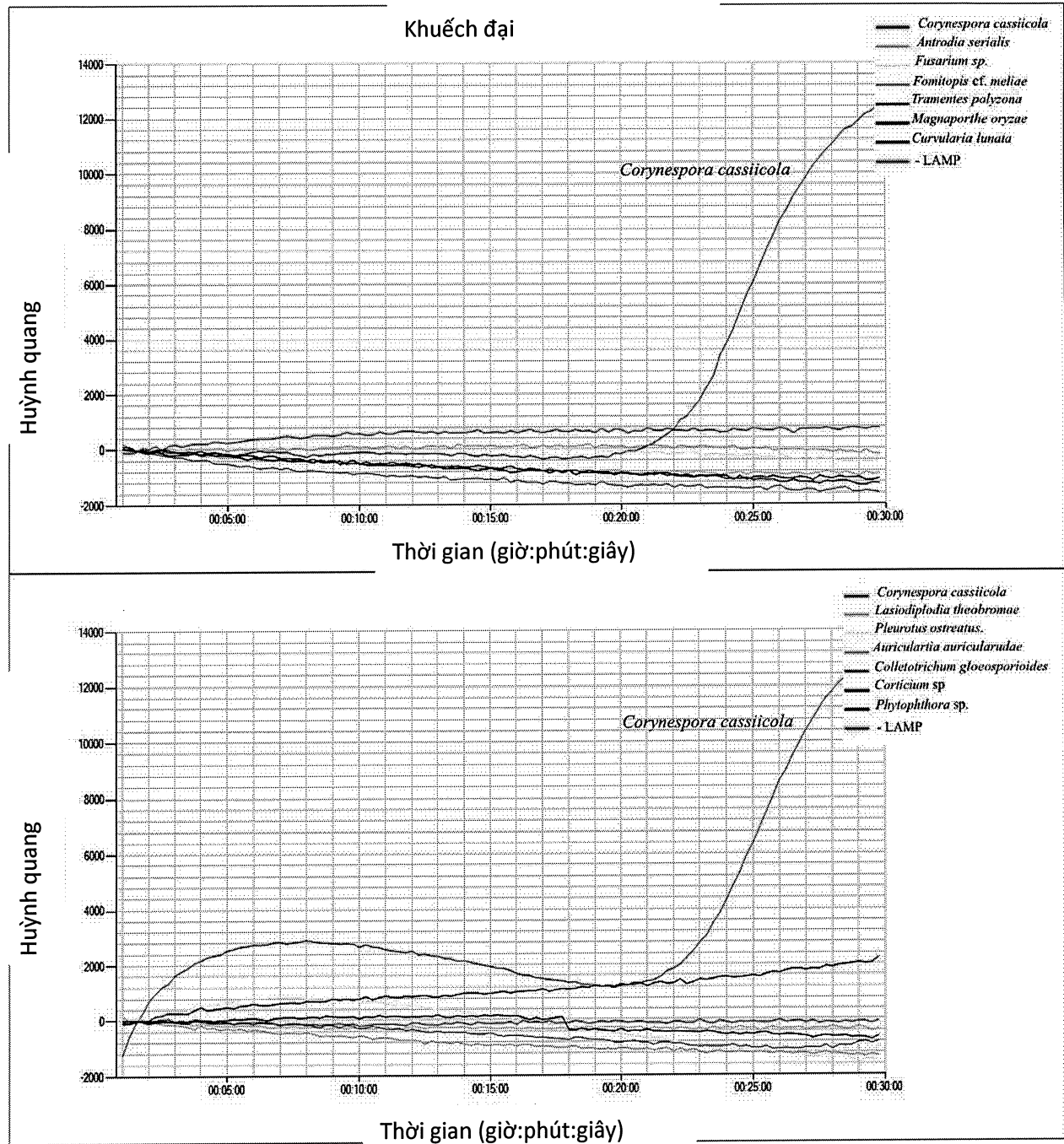
Tạo dòng trong pJET1.2: Hướng dẫn thu được trình tự lồng vào



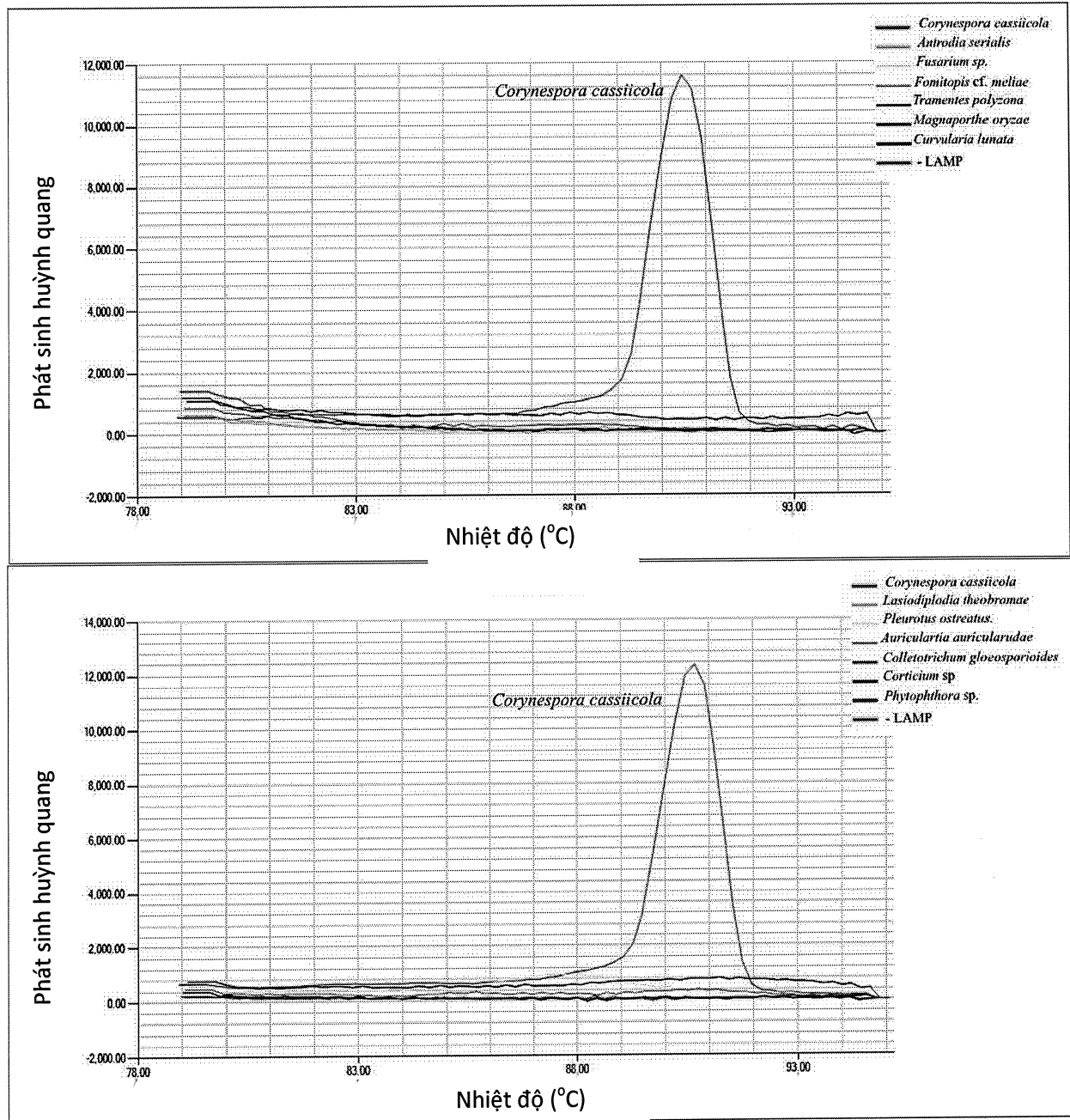
Hình 2



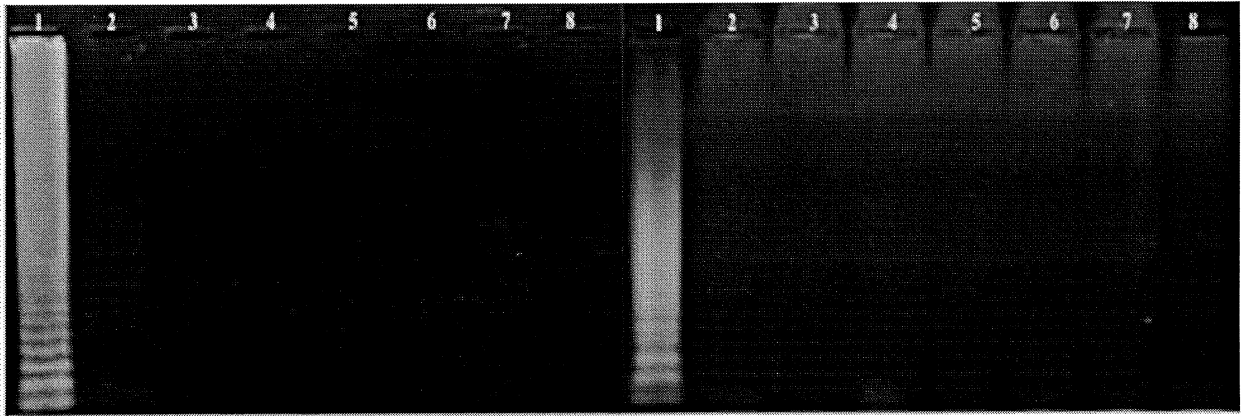
Hình 3



Hình 4A



Hình 4B



Hình 4C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NGUYỄN BẢO QUỐC

<120> BỘ MÔI LAMP-Ccas ĐẶC HIỆU ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH NẤM
CORYNESPORA CASIICOLA

<160> 1

<210> SEQ ID NO.1

<211> 392

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

TGAACCGGAGAAGCGTGAAACACAATCTGCTATCTCATACGTGTGCAT
 ACGTTCCGTGTGTGAAATTGTCGATGATGCCGAAGAGTGAACCGTGGG
 AAAAAAACCGTCCAAGTATGTCGAGAGGGTTATGATAAGACGTCAGTA
 GGAAGTGAAGTTTACTTGCTAGCAGCCTGCGGGTAGAGCGAGTTGTAAA
 CTTGGTCCACCACGTATGAGGCGCGGATGGGATGGCCGTTGAAACGGC
 GACCGTTGAGGCCTTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGCGAGGGTCTCGAA
 CTTGACATAAACGTCTCCGCCAGACTGAGGATCGACTGCCAAGTGTAC
 GACACGTCCATAAGTGCTAGAACACTCATTCTCGATTTACGCTTCTCC
 GGTTC

<160> 2

<210> SEQ ID NO.2

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

GCGGGTAGAGCGAGTTGT

<160> 3

<210> SEQ ID NO.3

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

GCACTTATGGACGTGTCGTA

<160> 4
<210> SEQ ID NO.4
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

CCTCAACGGTCGCCGTTTCAAACTTGGTCCACCACGTATG

<160> 5
<210> SEQ ID NO.5
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

TTCGATCGCCTTCTTGCTACCGGGCAGTCGATCCTCAGTCT

<160> 6
<210> SEQ ID NO.6
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

AACCAACGCTACTTCTTCACG

<160> 7
<210> SEQ ID NO.7
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

CGGTTCATTAACCTCTTCTTCA

<160> 8
<210> SEQ ID NO.8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự tham khảo
<400>

CCCTTGTCCGTTTGAGATCA

<160> 9
<210> SEQ ID NO.9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự tham khảo
<400>

TGAACCGGAGAAGCGTGAAA

<160> 10
<210> SEQ ID NO.10
<211> 183
<212> ADN
<213> Trình tự khuếch đại
<400>

GCGGGTAGAGCGAGTTGTAACTTGGTCCACCACGTATGAGGCGCGGA
TGGGATGGCCGTTGAAACGGCGACCGTTGAGGCCTTCGATCGCCTTCTT
GCTACCGGCGAGGGTCTCGAACTTGACATAAACGTCTCCGCCAGACTG
AGGATCGACTGCCAAGTGTACGACACGTCCATAAGTGC