



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C12N 15/74; A61P 31/20; C12R 1/225; (13) B
C12N 15/35; A61K 39/12; C12N 1/21



1-0053039

-
- (21) 1-2021-03584 (22) 18/08/2020
(86) PCT/CN2020/109703 18/08/2020 (87) WO 2021/217959 04/11/2021
(30) 202010339345.5 26/04/2020 CN
(45) 25/11/2025 452 (43) 26/09/2022 414A
(73) CHANGSHA LUYE BIOTECHNOLOGY CO. LTD (CN)
2301, Xingsha New Changhai Digital Center, Changsha County, Changsha City,
Hunan 410100, China
(72) DONG, Wei (CN); XIE, Xiaohong (CN); WEN, Lixin (CN); WU, Chaoliang (CN);
LI, Xin (CN); ZHU, Yuanyuan (CN); ZHANG, Yongyong (CN); HUANG, Jiahao
(CN).
(74) Công ty TNHH Tư vấn ALIATLEGAL (ALIAT LEGAL)
-

- (54) CHẾ PHẨM VI KHUẨN SỐNG DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG ĐỂ NGĂN NGỪA
LÂY NHIỄM BỆNH DỊCH TẢ CHÂU PHI

(21) 1-2021-03584

(57) Sáng chế đề cập đến vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virus dịch tả lợn châu Phi, vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng, và phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp và có liên quan đến lĩnh vực kỹ thuật tái tổ hợp gen. Vector tái tổ hợp có thể được sử dụng để tạo ra *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein tạo miễn dịch của virus dịch tả lợn châu Phi, và sau khi trộn dung dịch *Lactobacillus* có thể tiết ra protein p72 và protein p54, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa bệnh dịch tả lợn châu Phi có thể được điều chế. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng được điều chế theo sáng chế này có thể ngăn chặn lây nhiễm virus bệnh dịch tả lợn châu Phi sang lợn một cách an toàn, có hiệu quả và nhanh chóng, và không chứa quá trình miễn dịch.

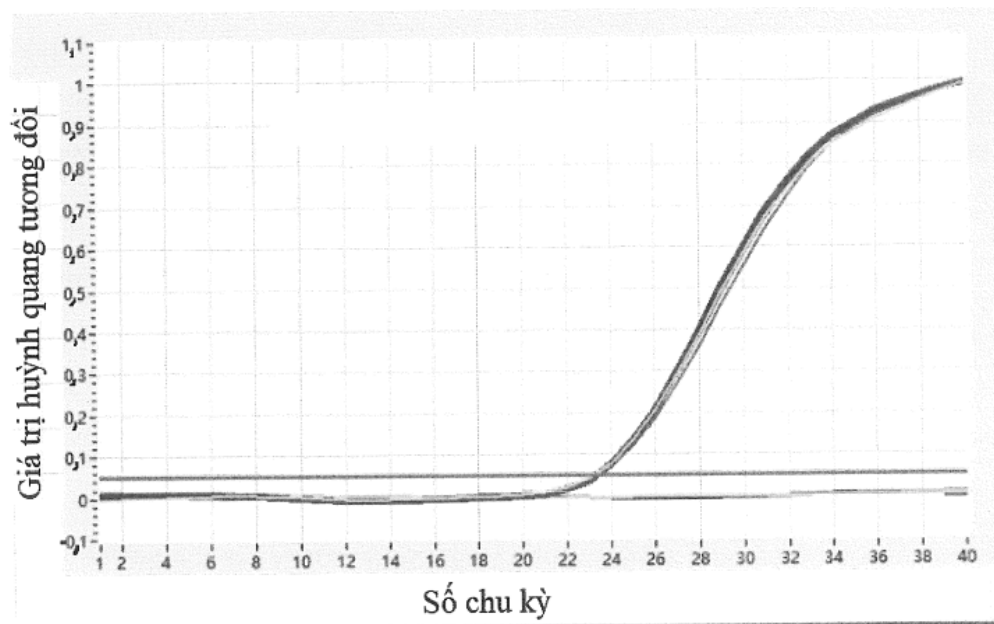


FIG.3

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực kỹ thuật tái tổ hợp gen, và cụ thể là liên quan đến vectơ tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi, vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng, và phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp.

Tham khảo chéo đơn đăng ký patent có liên quan

Đơn đăng ký patent này yêu cầu hưởng lợi ích và quyền ưu tiên của đơn đăng ký patent Trung Quốc số 202010339345.5 được nộp vào ngày 26 tháng 4 năm 2020, toàn bộ nội dung của mô tả sáng chế được kết hợp đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ như một phần của đơn đăng ký patent này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, gây sốt và rất dễ lây ở động vật. Tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của bệnh ASF có thể lên tới 100%, là một trong số nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trong ngành chăn nuôi lợn. Hiện tại, không có vaccine thương mại có sẵn. Virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASFV) là chủng duy nhất thuộc họ virus bệnh dịch tả lợn châu Phi của chi virus bệnh dịch tả lợn châu Phi, có đường kính từ 175 đến 215 nm, có dạng đối xứng hình khối có hai mươi mặt và có màng nang phủ trên vỏ bọc nhân (nucleocapsit nhân của bộ gen virus). Bộ gen của ASFV là ADN mạch thẳng sợi kép có kích cỡ từ 170 đến 190kb.

Virut dịch tả lợn châu Phi có thể làm cho lây truyền qua đường tiếp xúc cao giữa lợn nhà và nhiều loài lợn rừng khác, chủ yếu xâm nhập vào lợn qua đường miệng và hệ hô hấp trên, gây nhiễm trùng ở vòm họng hoặc amidan, sau đó lan nhanh đến các hạch bạch huyết ở hàm dưới và xâm nhập toàn bộ cơ thể qua đường bạch huyết và máu.

Do không có vacxin thương mại ngăn ngừa ASFV trên thị trường, nên phương pháp phòng chống an toàn, tiết kiệm và hiệu quả nhất là phương pháp phòng chống an toàn sinh học, nguyên tắc là ngăn chặn sự tiếp xúc giữa virut và sinh vật. Tuy nhiên, không có phương pháp nào có thể đảm bảo rằng virut sẽ không còn tiếp xúc với cơ thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo quan điểm này, mục đích của sáng chế nhằm đề xuất vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virut bệnh dịch tả lợn châu Phi, vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng, và phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, để tạo ra hệ thống biểu hiện vi khuẩn *Lactobacillus* biểu hiện các protein p72 và p54 của virut bệnh dịch tả lợn châu Phi, và để cung cấp cơ sở lý thuyết cho sự phát triển của tác nhân ngăn chặn nhiễm trùng niêm mạc miệng để ngăn chặn lây nhiễm virut.

Để đạt được mục đích nêu trên của sáng chế, sáng chế đưa ra giải pháp kỹ thuật sau: Sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virut dịch tả lợn châu Phi, trong đó vector tái tổ hợp lấy vector biểu hiện *Lactobacillus* pVE5523 làm vector cơ bản và trình tự nucleotit mã hóa protein tạo miễn dịch của virut dịch tả lợn châu Phi được nhân bản giữa các vị trí giới hạn EcoRV và Sall của vector cơ bản.

Theo một số phương án thực hiện sáng chế này, protein tạo miễn dịch của virut bệnh dịch tả lợn châu Phi bao gồm protein p72 và protein p54 của virut bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc. Trình tự nucleotit

mã hóa protein p72 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit mã hóa protein p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

Sáng chế đề xuất vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein tạo miễn dịch của virus dịch tả lợn châu Phi, trong đó *Lactobacillus* tái tổ hợp bao gồm vector tái tổ hợp ở trên. Sáng chế này cũng đề xuất phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, trong đó bao gồm:

(1) nhân bản tương ứng trình tự nucleotit mã hóa protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và trình tự nucleotit mã hóa protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi vào vector biểu hiện *Lactobacillus* pVE5523 để tạo ra các plasmit tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-tr54;

(2) biến đổi tương ứng các plasmit tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54 thành các tế bào khả biến của *Lactobacillus* để thu được vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa lây nhiễm bệnh dịch tả lợn châu Phi, trong đó các thành phần hoạt tính của chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng bao gồm *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi và *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi được cấu tạo bằng phương pháp tạo ra nêu trên.

Theo một số phương án, tỷ lệ vi khuẩn sống của *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi với vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi là $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu: $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu.

Sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi, có thể được sử dụng để tạo ra các vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein tạo miễn dịch của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi và sau khi trộn các vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện các protein kháng nguyên virus bệnh dịch tả lợn châu Phi p72 và p54, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa lây nhiễm virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi được điều chế. Theo sáng chế, sau khi lợn được uống chế phẩm, protein kháng nguyên (hỗn hợp của protein p72 và p54) do *Lactobacillus* tiết ra trong chế phẩm sẽ bám vào màng nhầy trên bề mặt tế bào sinh vật, và tạo thành màng sinh học protein kháng nguyên trên niêm mạc bề mặt màng.

Protein của kháng nguyên có thể kết hợp với vị trí gắn kết của virus trên tế bào đích để niêm phong vị trí protein thụ thể của virus trên bề mặt màng nhầy, do đó có vai trò chiếm lĩnh sinh thái. Khi virus sống trong môi trường xâm nhập vào cơ thể, vị trí liên kết của virus trên tế bào đích đã bị ngăn chặn hoàn toàn bởi màng sinh học protein kháng nguyên, và virus không thể liên kết với vị trí liên kết của virus trên tế bào đích, do đó ngăn chặn hiệu quả sự kết hợp của virus với thụ thể trên bề mặt tế bào và ngăn ngừa bệnh dịch tả lợn châu Phi.

So với vaccin, chế phẩm uống được điều chế theo sáng chế này an toàn hơn, hiệu quả hơn và nhanh hơn. Tính an toàn của chế phẩm uống theo sáng chế được thể hiện ở chỗ các thành phần hữu hiệu chỉ tiết ra protein chức năng của virus, không tồn tại gen virus và không thể gây ra biến thể virus. Tính hiệu quả được thể hiện ở chỗ các thành phần hữu hiệu của chế phẩm uống chỉ tiết ra các kháng nguyên bảo vệ, tác động lên vị trí niêm mạc trên bề mặt cơ thể và bao phủ bề mặt niêm mạc nơi chứa các tế bào đích của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi. Khi virus xâm nhập, vị trí liên kết giữa protein kháng nguyên và tế bào bề mặt niêm mạc sẽ bị chặn lại và bịt kín, do đó ngăn chặn đường lây nhiễm của virus. Sự nhanh chóng được thể hiện ở chỗ protein được tiết ra bởi *Lactobacillus* trực tiếp tấn công thụ thể mà virus liên kết với tế bào đích, do đó ngăn chặn sự lây nhiễm của virus và không cần quá trình đáp ứng miễn dịch.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ cấu trúc plasmit của vector tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 theo sáng chế này;

Fig. 2 là sơ đồ cấu trúc plasmit của vector tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p54 theo sáng chế này;

Fig. 3 là đường cong khuếch đại để xác thực biểu thức p72 theo sáng chế này;

Fig. 4 là đường cong khuếch đại để xác thực biểu thức p54 theo sáng chế này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được giải thích rõ hơn thông qua các phương án thực hiện sáng chế sẽ trình bày dưới đây. Sáng chế này đề xuất vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virus dịch tả lợn châu Phi, trong đó vector tái tổ hợp lấy vector biểu hiện *Lactobacillus* pVE5523 làm vector cơ bản và trình tự nucleotit mã hóa protein tạo miễn dịch của virus dịch tả lợn châu Phi được nhân bản giữa các vị trí giới hạn EcoRV và SalI của vector cơ bản.

Protein tạo miễn dịch của virus bệnh dịch tả lợn Châu Phi bao gồm protein p72 và protein p54 của virus bệnh dịch tả lợn Châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc. Trình tự nucleotit mã hóa protein p72 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit mã hóa protein p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 được nhân bản giữa các vị trí giới hạn EcoRV và SalI của vector cơ bản để tạo thành vector tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72, và cấu trúc của plasmit tái tổ hợp được trình bày trong Fig. 1. Trình tự nucleotit

được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 được nhân bản giữa các vị trí giới hạn EcoRV và SalI của vector cơ bản để tạo thành vector tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p54, và cấu trúc của plasmid tái tổ hợp như được trình bày trong Fig. 2. Sáng chế không có giới hạn cụ thể nào về phương pháp tạo ra vector tái tổ hợp và phương pháp tạo ra thông thường vector tái tổ hợp sẽ được thực hiện.

Sáng chế đề xuất *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein tạo miễn dịch của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi, trong đó *Lactobacillus* tái tổ hợp bao gồm vector tái tổ hợp nêu ở trên.

Sáng chế này cũng đề xuất phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, trong đó bao gồm:

(1) nhân bản tương ứng trình tự nucleotit mã hóa protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và trình tự nucleotit mã hóa protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi vào vector biểu hiện *Lactobacillus* pVE5523 để tạo ra các plasmid tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-tr54;

(2) biến đổi tương ứng các plasmid tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54 thành các tế bào khả biến của *Lactobacillus* để thu được *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi.

Trước khi thực hiện bước nhân bản, trình tự gen p72 và p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được tìm kiếm trong ngân hàng gen tốt nhất là được tối ưu hóa để tạo thành các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, tiếp theo là nhân bản được thực hiện.

Khi quá trình nhân bản được thực hiện, tốt nhất là vector pVE5523 được tiêu hóa bằng SalI/EcoRV, và các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 được tiêu hóa bằng cùng một loại enzyme. Sau khi kết hợp các mảnh đã tiêu hóa ở trên, các plasmid tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54 được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2 được hình thành.

Theo sáng chế này, plasmit tái tổ hợp được sử dụng để biến đổi các tế bào khả biến ATCC393 *Lactobacillus casei* bằng cách biến đổi điện để thu được *Lactobacillus* tái tổ hợp. Sau khi thu được *Lactobacillus* tái tổ hợp, tốt nhất là các *Lactobacillus* tái tổ hợp được khuếch đại trong môi trường lỏng MRS, và plasmit tái tổ hợp được chiết tách để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang. Các đoạn môi và trình tự khuếch đại được sử dụng để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang trong sáng chế này chế như sau:

Phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72:

mồi thuận P72 (SEQ ID NO: 3): AGTTCGGATGTCACAACGCTTG;

mồi ngược P72 (SEQ ID NO: 4): TTTGCTTTGGTGCGGCTTGT;

trình tự khuếch đại P72 (SEQ ID NO: 5):

AGTTCGGATGTCACAACGCTTGTGCGCAAATTTTGCATCCCAGGGGAT
AAAATGACTGGATATAAGCACTTGGTTGGCCAGGAGGTATCGGTGGA
GGGAACCAGTGGCCCTCTCCTATGCAACATTCATGATTTGCACAAGCC
GCACCAAAGCAAA;

PCR định lượng huỳnh quang P54:

mồi thuận P54 (SEQ ID NO: 6): AGCCACTCCACAACCAGGTAC;

mồi ngược P54 (SEQ ID NO: 7): GCCCTCCAGTTGCCATGATTAG;

trình tự khuếch đại P54 (SEQ ID NO: 8):

AGCCACTCCACAACCAGGTACCTCTAAACCGGCTGGAGCCACTACAG
GCAACGTAGGCAAGCCAATTACAGACAGGCCAGTTGCCATGAATAGG
CCAGTTACGAACAGCTCGGTCGCGGACAGGCCAGTTATGAACAACCC
AGTTACGGACAGACTAATCATGGCAACTGGAGGGC.

Vì khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp tạo ra có thể tiết ra các protein tạo miễn dịch tái tổ hợp p72 và p54 của virus dịch tả lợn châu Phi tương ứng theo các plasmit tái tổ hợp khác nhau.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa lây nhiễm bệnh dịch tả lợn châu Phi, trong đó các thành phần hoạt tính

của chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng bao gồm *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi được tạo ra bằng phương pháp như đã nêu trên.

Trong chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng, tỷ lệ vi khuẩn sống của *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi với *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi là $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu: $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu, tốt hơn là 1×10^8 cfu.

Sau đây, vector tái tổ hợp chứa protein tạo miễn dịch của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi, vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp, chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng, và phương pháp tạo ra vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp theo sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết có tham chiếu đến các Ví dụ, nhưng chúng không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Thu nhận trình tự gen p72 và p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi

Protein p54 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi tồn tại trong lớp vỏ bên trong của các hạt virus, là một trong những protein cấu trúc chính và protein tạo miễn dịch mạnh của ASFV, tham gia vào quá trình hấp phụ và xâm nhập của virus vào các tế bào đích. Trình tự gen p72 và p54 (P72: ngân hàng gen: MK189456.1; P54: ngân hàng gen: MK214679.1) của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc trong ngân hàng gen đã được tối ưu hóa và cải biến, sau đó được tổng hợp bởi Công ty Nanjing Genescript Biotechnology Co., Ltd và các trình tự cơ sở được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.

Ví dụ 2

Thu nhận vector biểu hiện tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54

(I) Vật liệu và phương pháp

(i) Vật liệu và nguồn

Các enzym giới hạn SalI và EcoRV đều được mua từ Công ty NEB, và enzym Taq, dNTP, đánh dấu ADN DL2000, DL15000, Bộ tinh lọc ADN Agarose Gel và Bộ tinh sạch Plasmid Mini BEST được mua từ công ty Dalian Takara và vector nhân bản pVE5523 đã được cung cấp bởi Nanjing Genescript Biotechnology Co., Ltd.

(ii) Phương pháp thử nghiệm

Các đoạn của vector nhân bản pVE5523 được tiêu hóa bởi SalI/EcoRV được nối với các đoạn của gen p72 và p54 được tiêu hóa bởi cùng một loại enzym SalI/EcoRV, sau khi biến đổi điện, plasmid tái tổ hợp được chiết xuất và gửi đến Nanjing Genescript Biotechnology Co., Ltd để kiểm chứng giải trình tự.

(II) Kết quả thử nghiệm

Kết quả giải trình tự của plasmid tái tổ hợp: plasmid tái tổ hợp sau khi giải trình tự gen được so sánh với các đoạn gen p72 và p54 được chèn vào, và kết quả giải trình tự phù hợp với mong đợi, cho thấy rằng các đoạn gen p72 và p54 tổng hợp đã được chèn vào thành công vào vector Lactobacillus pVE552, và plasmid tái tổ hợp được tạo ra thành công, các plasmid dương tính lần lượt được đặt tên là pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54 tương ứng.

Ví dụ 3

Chuẩn bị và phát hiện các gen p72 và p54 biểu hiện virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi

(I) Vật liệu và phương pháp

(i) Vật liệu và nguồn

Erythromycin (Emr) được mua từ Công ty Biodee Biotechnology Co., Ltd.

(ii) Phương pháp thử nghiệm

Biến đổi điện của các gen mục tiêu trong *Lactobacillus* ATCC393 và sàng lọc các chủng kháng: *Lactobacillus* ATCC393 đã được biến đổi điện được trải trên đĩa nuôi cấy rắn MRS có chứa 5µg/ml erythromycin, đĩa được nuôi cấy trong tủ ấm ở 30 °C trong 72 giờ, và các khuẩn lạc trên đĩa được chọn lọc và cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng MRS chứa 5µg/ml erythromycin, và nuôi cấy ở 30 °C trong 72 giờ. Các plasmit trong vi khuẩn được chiết tách và xác định bằng PCR định lượng huỳnh quang. Các đoạn mồi được xác định và trình tự khuếch đại như sau:

Phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72:

mồi thuận P72 (SEQ ID NO: 3): AGTTCGGATGTCACAACGCTTG;

mồi ngược P72 (SEQ ID NO: 4): TTTGCTTTGGTGC GGCTTGT;

trình tự khuếch đại P72 (SEQ ID NO: 5):

AGTTCGGATGTCACAACGCTTGTGCGCAAATTTGCATCCCAGGGGATAAA
ATGACTGGATATAAGCACTTGGTTGGCCAGGAGGTATCGGTGGAGGGAACC
AGTGGCCCTCTCCTATGCAACATTCATGATTTGCACAAGCCGCACCAAAGCA
AA;

PCR định lượng huỳnh quang P54:

mồi thuận P54 (SEQ ID NO: 6): AGCCACTCCACAACCAGGTAC;

mồi ngược P54 (SEQ ID NO: 7): GCCCTCCAGTTGCCATGATTAG;

trình tự khuếch đại P54 (SEQ ID NO: 8):

AGCCACTCCACAACCAGGTACCTCTAAACCGGCTGGAGCCACTACAGGCAA
CGTAGGCAAGCCAATTACAGACAGGCCAGTTGCCATGAATAGGCCAGTTAC
GAACAGCTCGGTCGCGGACAGGCCAGTTATGAACAACCCAGTTACGGACAG
ACTAATCATGGCAACTGGAGGGC.

(II) Kết quả thử nghiệm

Các plasmit tái tổ hợp đã khuếch đại được phát hiện bằng PCR định lượng huỳnh quang, và các đường cong khuếch đại được thể hiện trong Fig. 3 và Fig. 4 tương ứng. Các plasmit tái tổ hợp dương tính có đường cong khuếch đại điển

hình với các giá trị CT nằm trong khoảng từ 19 đến 22, trong khi đối chứng tế bào khả biến ATCC393 không có đường cong khuếch đại, cho thấy rằng các plasmid tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p54 và pVE5523-ASFV-p72 đã được biến nạp thành công thành các tế bào khả biến ATCC393.

Ví dụ 4

Phương pháp nuôi cấy hệ biểu hiện Lactobacillus tái tổ hợp

Hệ thống biểu hiện Lactobacillus tái tổ hợp được cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng Lactobacillus MRS với lượng cấy 1%, và môi trường lên men thu được ở 35 °C trong 72 giờ. Số lượng vi khuẩn sống sót của Lactobacillus tái tổ hợp

Với phương pháp phân tán bề mặt phẳng:

(i) Đánh số: 9 bộ đĩa nuôi cấy thạch đặc MRS vô trùng được đánh dấu là 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} (3 bộ cho mỗi độ pha loãng) bằng một điểm đánh dấu tương ứng. 6 ống nghiệm khác chứa 4,5mL nước vô trùng được lấy ra và đánh dấu lần lượt là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} .

(ii) Pha loãng: 0,5ml huyền phù Lactobacillus (mẫu cần thử nghiệm) đã trộn đều được hút vào ống nghiệm 10^{-1} bằng pipet 1mL, đây là dung dịch pha loãng 10 lần. Thực hiện đặt ống nghiệm 10^{-1} lên bộ lắc ống nghiệm để làm cho chất lỏng vi khuẩn được trộn đều. Một pipet 1ml khác được sử dụng để đưa vào ống nghiệm 10^{-1} để thổi và hút huyền phù vi khuẩn qua lại ba lần, để phân tán và trộn đều vi khuẩn. 0,5ml chất lỏng vi khuẩn trong ống nghiệm 10^{-1} được hút sang ống nghiệm 10^{-2} bằng pipet đã sử dụng ở bước trước, thu được chất pha loãng gấp 100 lần, và phần còn lại có thể được suy ra bằng phép tương tự.

(iii) Lấy mẫu và tráng phủ: Lấy 0,2ml huyền phù vi khuẩn đã pha loãng lần lượt từ các ống nghiệm 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} cho vào đĩa môi trường thạch vô trùng đã đánh số tương ứng, dung dịch vi khuẩn được phân tán đồng đều trong thạch. môi trường có que phủ thủy tinh vô trùng, và vi khuẩn được nuôi cấy trong tủ ẩm nhiệt độ không đổi ở 37 °C.

(iv) Tính toán: Sau khi nuôi cấy 48 giờ, đĩa môi trường thạch được lấy ra để đếm khuẩn lạc, và tính số khuẩn lạc trung bình trên 3 đĩa có cùng độ pha loãng, công thức tính như sau: Đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit (cfu) = số khuẩn lạc trung bình lặp lại ba lần với cùng một độ pha loãng $\times$ số lần pha loãng $\times 5$.

Ví dụ 5

Lactobacillus có thể tiết ra protein p72 và p54 tái tổ hợp được điều chế trong Ví dụ 4 được pha loãng thành chất lỏng vi khuẩn $0,8-1,2 \times 10^8$ cfu/ml và trộn theo tỷ lệ 1: 1. Dung dịch hỗn hợp vi khuẩn được sử dụng cho thỏ SPF New Zealand và chuột SD ở dạng dung dịch uống. Trong khi đó, nhóm đối chứng âm tính A được cho cùng một thể tích nước muối thông thường và nhóm đối chứng B được cho cùng một thể tích dung dịch nuôi cấy MRS. Bốn con thỏ New Zealand và chuột SD trong mỗi nhóm được quan sát trong 2 tuần, và không có hiện tượng bất thường nào như thân nhiệt bất thường và dị ứng xảy ra ở 24 con. Do đó, vi khuẩn Lactobacillus có thể tiết ra protein p72 và p54 tái tổ hợp được điều chế theo sáng chế này là an toàn và không có tác dụng phụ.

Ví dụ 6

Có khoảng 300 con lợn trong một trang trại ở huyện Thái Hồ, tỉnh An Huy, với kích cỡ từ 20 kg đến 100 kg, được chia thành ba khu chăn nuôi, một số con lợn ở khu chăn nuôi thứ hai đã bị bệnh và chết một con sau đó. Ngày 23/01/2020, việc thử nghiệm chế phẩm Lactobacillus tái tổ hợp được thực hiện tại trang trại này, thử nghiệm kéo dài trong 21 ngày và được chia thành ba nhóm, lợn được cho uống với liều lượng 5ml/con. Nhóm đối chứng được bố trí tại khu chăn nuôi thứ nhất với tổng số 112 con lợn, nhóm thử nghiệm được bố trí ở khu chăn nuôi thứ hai và thứ ba. Trước khi thử nghiệm, lợn ở khu vực thứ nhất và thứ ba ở trạng thái khỏe mạnh, và khu vực thứ hai đang trong tình trạng bùng phát dịch tả lợn châu Phi trước khi thử nghiệm được thực hiện vào ngày 23 tháng 1. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 1, trong đó số lượng lợn ở nhóm đối chứng

dao động từ 112 đến 66 con, và 46 con bị chết, với tỷ lệ chết là 41,07%. Do khu vực nuôi thứ hai đang trong giai đoạn bệnh trước khi thí nghiệm, số lượng giảm từ 45 xuống 28 con sau khi sử dụng chế phẩm *Lactobacillus* tái tổ hợp và 17 con chết, với tỷ lệ chết là 37,78%. Một con lợn chết trong quá trình thử nghiệm ở khu chăn nuôi thứ ba, tỷ lệ chết là 1,08%. Trong toàn bộ đợt thử nghiệm, có 18 con lợn chết ở nhóm thử nghiệm (khu chăn nuôi thứ 2 và thứ 3), tỷ lệ chết là 13,04%. Kết quả cho thấy chế phẩm *Lactobacillus* tái tổ hợp có hiệu quả tốt.

Bảng 1 So sánh kết quả xét nghiệm *Lactobacillus* tái tổ hợp

Thời gian/Nhóm	Nhóm đối chứng	Nhóm thử nghiệm	
	Khu chăn nuôi 1	Khu chăn nuôi 2	Khu chăn nuôi 3
Từ 23/1 đến 13/2	Số lợn trong lô đối chứng dao động từ 112 đến 66 con, chết 46 con.	Khu vực nhân giống thứ hai ở giai đoạn bệnh trước khi thí nghiệm, số lượng giảm từ 45 xuống 28 con sau khi sử dụng chế phẩm <i>Lactobacillus</i> tái tổ hợp, còn 17 con chết	Đàn lợn từ 93 con đến 92 con, chết 1 con
Tỷ lệ tử vong	41,07%	13,04%	

Ví dụ 7

Một vụ dịch tả lợn châu Phi đã xảy ra tại một trang trại ở thành phố Nghi Dương, tỉnh Hồ Nam vào năm 2019, hơn 400 con lợn vỗ béo được đối xử vô hại và trang trại đã được khử trùng hoàn toàn. Vào tháng 4 năm 2020, tổng số 120 con lợn con và lợn vỗ béo được đưa vào, và 402 con lợn được đưa vào ngày 27

tháng 5, việc phát hiện mầm bệnh của bệnh dịch tả lợn châu Phi không được tiến hành trước khi đưa vào. Trong số lợn được nhập vào tháng 4, một số lợn bị bỏ ăn, trạng thái tinh thần kém và tương tự, và 1 con lợn chết. Sau đó, 40 con lợn được lấy mẫu ngẫu nhiên để phát hiện mầm bệnh của bệnh dịch tả lợn châu Phi, và 2 con lợn đang bú mẹ nghi ngờ bệnh dịch tả lợn châu Phi, người nuôi ngay lập tức cách ly những con lợn nghi mắc bệnh và tăng cường các biện pháp an toàn sinh học của trang trại, hai con lợn nghi ngờ chết trong vòng một tuần, rồi lần lượt chết đi. Vào ngày 21 tháng 5, 500ml chế phẩm Lactobacillus tái tổ hợp được điều chế trong Ví dụ 4 được hòa tan trong 30 kg nước và trộn với 25 kg thức ăn (lượng cho 100 con lợn mỗi ngày) và cho ăn hai lần một ngày, từ 2 đến 3 lần một tuần. Sau khi sử dụng chế phẩm, tình trạng sức khỏe tổng thể của lợn được cải thiện rõ rệt, không có hiện tượng lợn chết.

Bảng 2 Bảng tổng hợp hiệu quả sử dụng các chế phẩm Lactobacillus tái tổ hợp của trại lợn

	Thông tin đưa vào	Trước khi sử dụng sản phẩm	Sau khi sử dụng sản phẩm
Khu số 5	Vào ngày 1 tháng 4 năm 2020, 60 con lợn được đưa vào	Từ ngày 13/4, lần lượt xảy ra lợn chết, có 9 con bị chết	Tình trạng sức khỏe của lợn được cải thiện rõ ràng, không xảy ra hiện tượng lợn bị chết
Khu số 9	Vào ngày 1 tháng 4 năm 2020, 60 con lợn được đưa vào	Từ ngày 19/4, lần lượt tiếp theo xảy ra lợn chết, có 18 con bị chết.	Tình trạng sức khỏe của lợn được cải thiện rõ ràng, không xảy ra hiện tượng lợn bị chết

Tất cả 402 con lợn được đưa vào hồi tháng 5 đều tăng trưởng tốt theo phác đồ của Ví dụ 4 và không có con lợn nào bị nhiễm bệnh.

Ví dụ 8

Trang trại lợn ở thành phố Kim Hoa, tỉnh Chiết Giang, không nhiễm dịch bệnh vào tháng 11 năm 2019. Hiện tại, có 380 con lợn nái và khoảng 3900 con lợn vỗ béo. Tất cả lợn nái và lợn vỗ béo đều được sử dụng các chế phẩm *Lactobacillus* tái tổ hợp được điều chế trong Ví dụ 4. Từ đầu năm đến tháng 5, mỗi con lợn được uống 10 ml, 3 lần một ngày. Từ ngày 17 tháng 5, 500ml chế phẩm *Lactobacillus* tái tổ hợp được điều chế ở Ví dụ 4 được hòa tan trong 30 kg nước và trộn với 25 kg thức ăn (lượng cho ăn 100 con/ngày) và cho ăn 2 lần/ngày, từ 2 đến 3 lần/tuần. Sau lễ hội mùa xuân năm 2020, đã có một đợt bùng phát không phải bệnh dịch hạch ở quận Wucheng, Kim Hoa, và đến ngày 10 tháng 8, tình hình trong trại lợn vẫn diễn ra bình thường.

Trên đây chỉ là các phương án thực hiện được ưu tiên theo sáng chế này. Cần lưu ý là đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, có thể thực hiện một số cải tiến và sửa đổi, mà vẫn thuộc bản chất kỹ thuật và nguyên tắc của sáng chế này, và những cải tiến và sửa đổi này cũng vẫn thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa lây nhiễm bệnh dịch tả lợn châu Phi, trong đó các thành phần hoạt tính của chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng bao gồm *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi và *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus bệnh dịch tả lợn châu Phi được tạo ra theo phương pháp xây dựng bao gồm:
 - (1) nhân bản tương ứng trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 mã hóa protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 2 mã hóa protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi vào vector biểu hiện *Lactobacillus* pVE5523 để tạo ra các plasmit tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-tr54;
 - (2) biến đổi tương ứng các plasmit tái tổ hợp pVE5523-ASFV-p72 và pVE5523-ASFV-p54 thành các tế bào khả biến của vi khuẩn *Lactobacillus* để thu được *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi và *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi.
2. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó tỷ lệ vi khuẩn sống của *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi với *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi là $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu : $(0,8-1,2) \times 10^8$ cfu.
3. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng theo điểm 2, trong đó tỷ lệ vi khuẩn sống của *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p72 của virus dịch tả lợn châu Phi với *Lactobacillus* tái tổ hợp biểu hiện protein p54 của virus dịch tả lợn châu Phi là 1×10^8 cfu : 1×10^8 cfu.
4. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó trước khi thực hiện nhân bản ở bước (1), phương pháp này còn bao gồm việc tối ưu hóa trình tự gen p72 và p54 của virus dịch tả lợn châu Phi thuộc chủng Cát Lâm ở Trung Quốc được

tìm kiếm trong ngân hàng gen để tạo thành các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, và tiếp theo thực hiện nhân bản.

5. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó sau khi thu được vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp ở bước (2), phương pháp này còn bao gồm việc nhân giống vi khuẩn *Lactobacillus* tái tổ hợp trong môi trường dung dịch MRS, và chiết xuất plasmit tái tổ hợp để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang.
6. Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng theo điểm 5, trong đó các cặp môi được sử dụng để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang tương ứng bao gồm:

môi để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72 bao gồm môi thuận p72 với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và môi ngược p72 với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 4;

môi để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p54 bao gồm môi thuận p54 với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, và môi ngược p54 với trình tự nucleotit được quy định trong SEQ ID NO: 7.

- 1/3 -

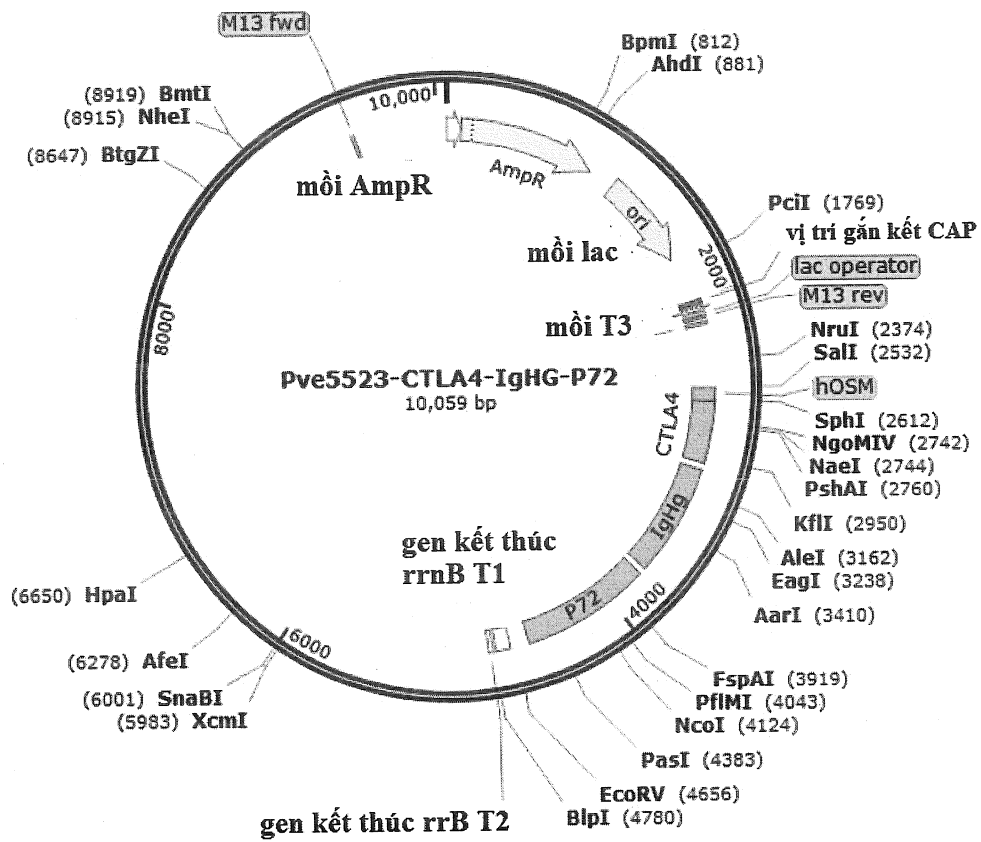


FIG.1

- 2/3 -

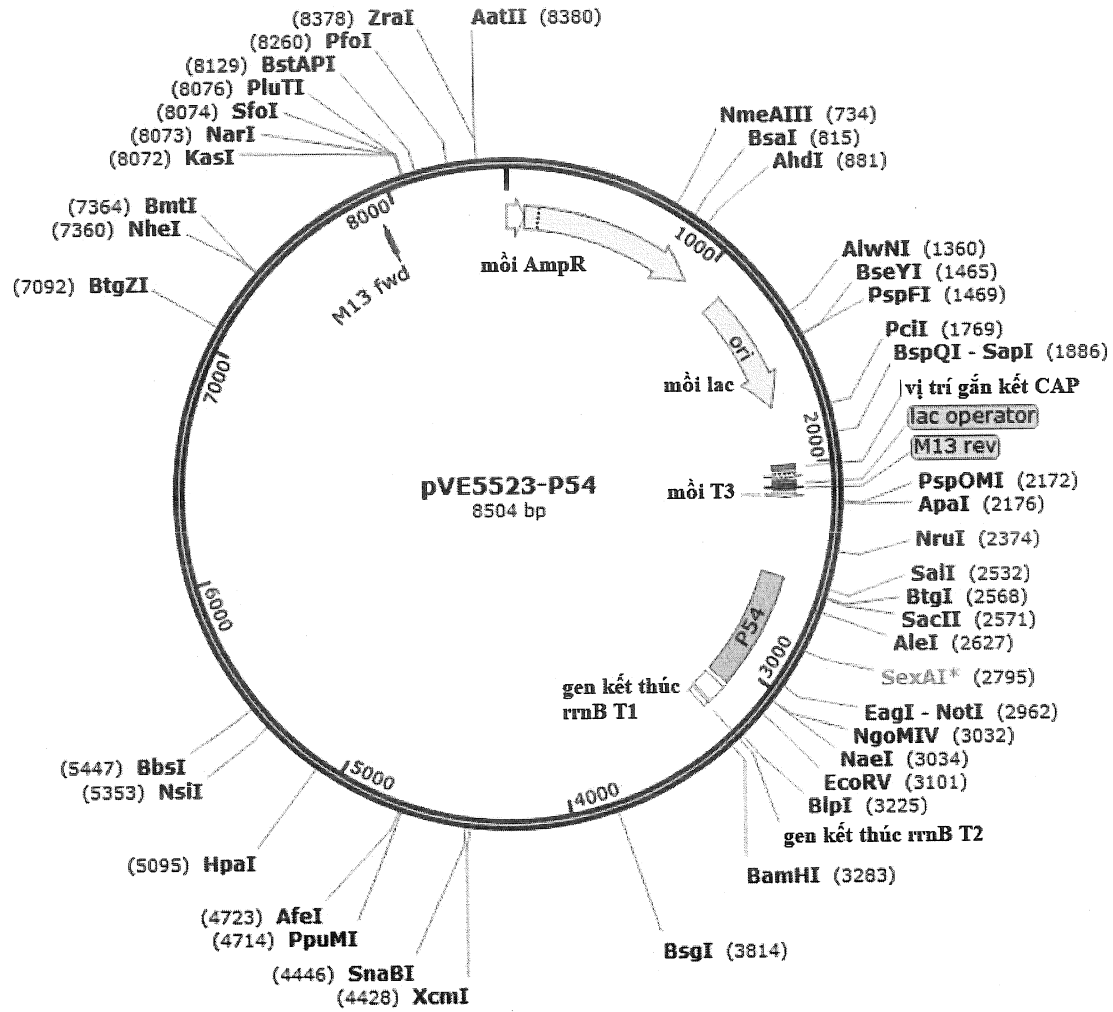


FIG.2

- 3/3 -

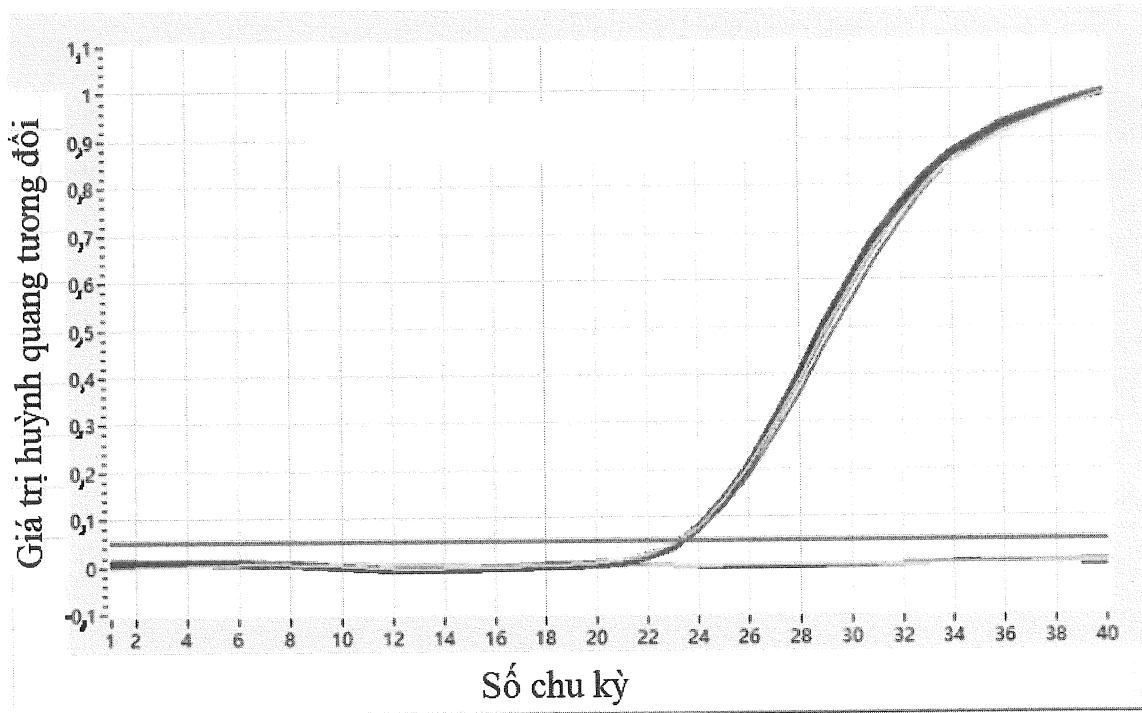


FIG.3

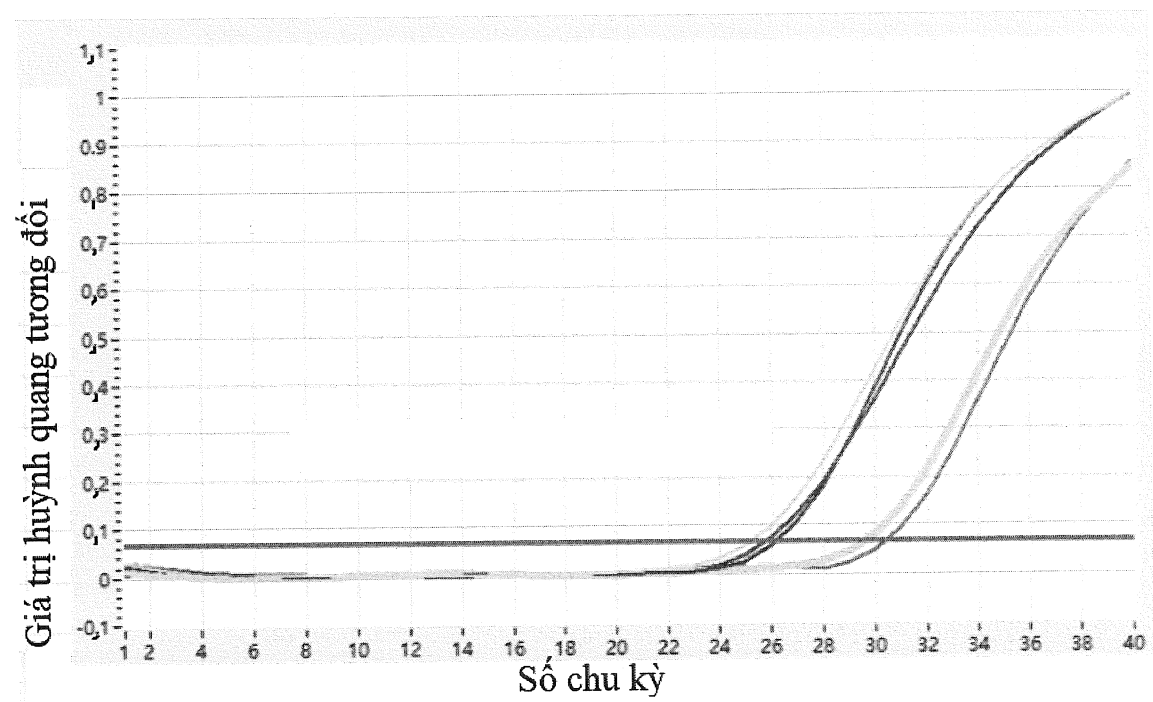


FIG.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Công ty Changsha Lvye Biotechnology Co., Ltd.

<120> Chế phẩm vi khuẩn sống dùng qua đường miệng để ngăn ngừa lây nhiễm bệnh dịch tả châu Phi

<130> GWPCTP202103495

<160> 8

<170> Phiên bản PatenIn 3.5

<210> 1

<211> 2128

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa protein p72 của virus gây bệnh dịch tả châu Phi thuộc chủng Cát Lâm, Trung Quốc

<400> 1

gtcgacatgg gtgtactgct cacacagagg acgctgctca gtctggctcct tgcactcctg	60
tttccaagca tggcgagcat gcatatgaaa gggatgcacg tggcccaacc tgcagtagtg	120
ctggccaaca gccgggggtgt tgccagcttt gtgtgtgagt atgggtctgc aggcaaagct	180
gccgaggtcc gggtgacagt gctgcggcgg gccggcagcc agatgactga agtctgtgcc	240
gcgacatata ctgtggagga tgagttgacc ttccttgatg actctacatg cactggcacc	300
tccaccgaaa acaaagtga cctcaccatc caagggctga gagccgtgga cactgggctc	360
tacatctgca aggtggagct cctgtaccca ccaccctact atgtgggtat gggcaacggg	420
accagatatt atgtcattga tccagaacca tgcccagatt ctgatgggtg cggtggctcg	480
ggcgggtgtg gatctggtgg cggcggtatc acaaagacca aaccaccatc ccccatatcg	540
ccaggctccg aagtggccgg gtcctcgggc ttcattcttc ctccaaaacc caaggacacc	600
ctcatgatct ccagacccc cgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtcag caaggagcac	660
gccgaggtcc agttctcctg gtacgtggac ggcgtagagg tgcacacggc cgagacgaga	720
ccaaaggagg agcagttcaa cagcacctac cgtgtgtgta gcgtcctgcc catccagcac	780
caggactggc tgaaggggaa ggagttcaag tgcaaggta acaacgtaga cctcccagcc	840
cccatcacga ggaccatctc caaggctata gggcagagcc gggagccgca ggtgtacacc	900
ctgccccac ccgccgagga gctgtccagg agcaaagtca ccgtaacctg cctgggtcatt	960
ggcttctacc cacctgacat ccatgttgag tggaagagca acggacagcc ggagccagag	1020
ggcaattacc gcaccacccc gcccagcag gacgtggacg ggaccttctt cctgtacagc	1080
aagctcgcgg tggacaaggc aagatgggat catggagaaa catttgagtg tgcgggtgatg	1140
cacgaggctc tgcacaacca ctacacccag aagtccatct ccaagactca gggtaaacct	1200
cctccatacc agcctctcgg cggcggcggc agcgaattcg gatcccatat ggacaagatt	1260
atattggccc aagacttgct gaatagcagg atctctaaca ttaaaaatgt gaacaaaagt	1320
tatgggaaac ccgatcccga acccactttg agtcaaatac aagaaacaca tttgggtgcat	1380
tttaatgcgc attttaagcc ttatgttcca gtagggtttg aatacaataa agtacgcccc	1440
catacgggta cccccacctt gggaaacaag cttacctttg gtattcccca gtacggagac	1500

```

tttttccatg atatggtggg ccatcatata ttgggtgcat gtcattcatc ctggcaggat 1560
gctccgattc agggcacgtc ccagatgggg gcccatgggc agcttcaaac gtttcctcgc 1620
aacggatatg actgggacaa ccaaacaccc ttagagggcg ccgtttacac gcttgtagat 1680
ccttttgga gacccattgt acccggcaca aagaatgcgt accgaaactt gggttactac 1740
tgcgaaatacc ccggagaacg actttatgaa aacgtaagat tcgatgtaaa tggaaattcc 1800
ctagacgaat atagttcggg tgtcacaacg cttgtgcgca aattttgcat ccaggggat 1860
aaaatgactg gatataagca cttggttggc caggaggtat cgggtggaggg aaccagtggc 1920
cctctcctat gcaacattca tgatttgcac aagccgcacc aaagcaaacc tattcttacc 1980
gatgaaaatg atacgcagcg aacgtgtagc cataccaacc cgaaatttct ttcacagcat 2040
tttcccgaga actctcacia tatccaaaca gcaggtaaac aagatattac tcctatcacg 2100
gacgcaacgt atctggacat aagatc 2128

```

<210> 2

<211> 574

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa protein p54 của virus gây bệnh dịch tả châu Phi thuộc chủng Cát Lâm, Trung Quốc

<400> 2

```

gtcgacatgg attctgaatt ttttcaaccc gtttatccgc ggcattatgg cgaatgtttg 60
tcaccaacct ctacaccgag cttcttctcc acacatatgt gtactattct cgttgctatc 120
gtggtcttaa tcattattat catcggttcta atttatctgt tttcttcaag aaagaaaaaa 180
gctgctgccc ccgctattga ggaggaagat atacagttta taaatcctta tcaagatcag 240
cagtgggcag gagccactcc acaaccagggt acctctaaac cggctggagc cactacaggc 300
aacgtaggca agccaattac agacaggcca gttgcatga ataggccagt tacgaacagc 360
tcggtcgcgg acaggccagt tatgaacaac ccagttacgg acagactaat catggcaact 420
ggagggccag cggccgcaag tgctccttcg gatgagcttt atacaacagc cactactcag 480
aacactgctt cacaacaat gccggctgtt gaagctctac ggcaaagaag cacctataca 540
cacaagacc tggaaaactc cttgtaagat atca 574

```

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi thuận để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72

<400> 3

agttcggatg tcacaacgct tg

22

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu ngược để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72

<400> 4

tttgcttttg tgcggttgt

20

<210> 5

<211> 156

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khuếch đại để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p72

<400> 5

agttcggatg tcacaacgct tgtgcgcaaa ttttgcattcc caggggataa aatgactgga 60

tataagcact tgggttgcca ggaggtatcg gtggaggga cagtggtccc tctcctatgc 120

aacattcatg atttgcacaa gccgcaccaa agcaaa 156

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu thuận để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p54

<400> 6

agccactcca caaccaggta c

21

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi ngược để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p54

<400> 7

gccctccagt tgccatgatt ag

22

<210> 8

<211> 176

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khuếch đại để phát hiện PCR định lượng huỳnh quang p54

<400> 8

agccactcca caaccaggta cctctaaacc ggctggagcc actacaggca acgtaggcaa	60
gccaattaca gacaggccag ttgcatgaa taggccagtt acgaacagct cggtcgcgga	120
caggccagtt atgaacaacc cagttacgga cagactaatc atggcaactg gagggc	176