



(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) 
2-0001782

(51)⁷ **A01N 63/00**

(13) **Y**

(21) 2-2014-00359

(22) 24.12.2014

(45) 27.08.2018 365

(43) 27.06.2016 339

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Trịnh Thị Thu Hà (VN), Ngô Đình Bính (VN), Lê Thị Minh Thành (VN), Đặng Văn Tiến (VN)**

(54) **CHŨNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *ISRAELENIS*
LNT28.2 VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT BỌ GÂY MUỖI *CULEX*
*QUINQUEFASCIATUS***

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 có hiệu quả cao trong việc chống lại bọ gây muỗi truyền bệnh. Chủng LNT28.2 có khả năng tạo protein nội độc tố dạng tinh thể tinh khiết hình cầu; phản ứng ngưng kết với kiểu huyết thanh HI4; mang gen cry4A và cry4B, các gen này mã hóa cho protein có trọng lượng phân tử 130 kDa và 70 kDa. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus* chứa dịch nuôi cấy cấy của chủng vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến loài vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* dưới loài *israelensis*, cụ thể là chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2. Đặc biệt hơn, chủng vi khuẩn này có hiệu quả cao trong việc chống lại bọ gây muỗi truyền bệnh. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến các đặc tính của chủng vi khuẩn LNT28.2 như: i) Có khả năng tạo protein nội độc tố dạng tinh thể tinh khiết hình cầu; ii) Phản ứng ngưng kết với kiểu huyết thanh H14; iii) Có mang gen cry4A và cry4B, các gen này mã hóa cho protein có trọng lượng phân tử 130 kDa và 70 kDa; iv) Có khả năng diệt bọ gây muỗi truyền bệnh. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus* chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay, trên thế giới có rất nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* thuộc dưới loài *israelensis* (Bti) được sử dụng để sản xuất chế phẩm chứa độc tố sinh học diệt bọ gây muỗi truyền bệnh như được bộc lộ trong các patent Mỹ số 4,609,550; 5,277,906 và 4,166,112.

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* dưới loài *israelensis* được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,609,550 là loài vi khuẩn sinh bào tử và tạo tinh thể độc trong quá trình hình thành bào tử. Chủng đại gây đột biến bằng nhiều cách, chẳng hạn chiếu tia cực tím, cho sinh trưởng ở 43⁰ C và sinh trưởng với sự có mặt của tác nhân gây đột biến, các khuẩn lạc đặc biệt được cấy lại và quan sát dưới kính hiển vi đối pha. Các đột biến được phân lập theo cách này không sinh bào tử nhưng có hình thành tinh thể độc đối với ấu trùng Bộ Hai cánh như ấu trùng của muỗi và ruồi đen.

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* dưới loài *israelensis* được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,277,906 là chủng đột biến được phân lập từ chủng đại qua nhiều ngày, qua nhiều

qua nhiều giai đoạn sử dụng tác nhân gây đột biến, kiểm tra hàng nghìn khuẩn lạc màu trắng đục riêng rẽ dưới kính hiển vi đối pha.

Mặc dù các chủng vi khuẩn nêu trên đều có thể tạo ra các protein nội độc tổ dạng tinh thể tinh khiết, có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi, nhưng các chủng này đều là những chủng đột biến. Quá trình gây đột biến có thể làm thay đổi kiểu gen của chủng vi khuẩn, tạo ra những đột biến ngoài ý muốn, các đột biến không mong muốn có thể gây hại cho môi trường hoặc con người.

Vì vậy, việc sử dụng chủng tự nhiên để sản xuất chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi truyền bệnh là cần thiết, với yêu cầu chủng vi khuẩn tự nhiên phải có khả năng tạo ra các protein nội độc tổ dạng tinh thể tinh khiết, các protein nội độc tổ diệt được bọ gây muỗi, cụ thể là bọ gây muỗi truyền bệnh.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* LNT28.2 thuần khiết về mặt sinh học. Đây là chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* tự nhiên, được phân lập ở Việt Nam.

Chủng *Bacillus thuringiensis* LNT28.2 (dưới đây được gọi tắt là LNT28.2) là một loài phụ của loài vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, có khả năng tạo protein nội độc tổ dạng tinh thể hình cầu và có khả năng diệt bọ gây muỗi. Tinh thể hình cầu của chủng LNT28.2 có kích thước khoảng 0,7 μ -1,2 μ m, có hoạt lực đặc hiệu với côn trùng thuộc bộ 2 cánh (Diptera), cụ thể là ấu trùng của muỗi. Người ta đã xác định thành phần protein của LNT28.2 bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit (PAGE) theo đó tinh thể độc của chủng vi khuẩn này bao gồm các protein có trọng lượng phân tử 130 kDa và 70 kDa do các gen cry4A và cry4B mã hoá. Các protein này thực chất là các tiền độc tố và chỉ có tác dụng gây độc khi được hoà tan và phân giải thành mảnh nhân độc, tác dụng phân giải xảy ra trong môi trường kiềm và dưới tác dụng của proteaza.

Chủng vi khuẩn LNT28.2 có thể được phân loại bằng cách sử dụng phương pháp huyết thanh miễn dịch được bộc lộ trong giải pháp hữu ích. Phương pháp này dựa trên nguyên lý của phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Phân loại theo phương pháp này thì chủng LNT28.2 thuộc tuyp huyết thanh H14.

Việc xác định sự có mặt của gen cry4A và cry4B trong chủng LNT28.2 được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nhân gen với sự tham gia của cặp mồi đặc hiệu. Cặp mồi dùng để nhân gen cry4A có trình tự:

mồi xuôi 5'-CGAGGTGAAATTTGCTCC-3'; và

mồi ngược 5'-ATGGCTTGTTTCGCTACATC-3'.

Trình tự cặp mồi dùng để nhân gen cry4B là:

mồi xuôi 5'-GGTTTTCAAGACCTAATAATATAATAC-3'; và

mồi ngược 5'-CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT-3'.

Giải pháp hữu ích còn đề cập đến một khía cạnh khác đó là chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus* chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* LNT28.2. Dịch nuôi cấy cấy chủng vi khuẩn này có thể thu được từ quá trình lên men quy mô lớn để làm nguyên liệu ban đầu cho quá trình sản xuất thuốc sinh học diệt ấu trùng thuộc bộ hai cánh, cụ thể là bọ gây muỗi truyền bệnh. Quá trình lên men quy mô lớn có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường và các kỹ thuật lên men tiêu chuẩn. Các tinh thể nội độc tố (cùng với các bào tử), có thể được tách ra từ dịch lên men và đông khô thành dạng bột hoặc để nguyên dạng nước đậm đặc để phun lên mặt đất, hoặc sử dụng chất phụ gia khác như chất mang, chất kết dính tạo dạng hạt áp dụng đối với vùng nước trứng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện hình dạng bào tử và tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 chụp dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 5000 lần (1: Tinh thể, 2: Bào tử).

Hình 2 thể hiện kết quả điện di ADN gen cry4A và cry4B của chủng LNT28.2 trên gel 1% agarosa (Cột 1: Thang ADN chuẩn, Cột 2: sản phẩm PCR của chủng LNT28.2, Cột 3: sản phẩm PCR của chủng đối chứng - chủng chuẩn 4Q1).

Hình 3 thể hiện kết quả xác định trình tự nucleotit của đoạn gen cry4A tách từ chủng LNT28.2 so với trình tự nucleotit của đoạn gen cry4A từ chủng *Bacillus thuringiensis* mã số EF424470.1.

Hình 4 thể hiện kết quả xác định trình tự nucleotit của đoạn gen *cry4B* tách từ chủng LNT28.2 so với trình tự gen *cry4B* của chủng *Bacillus thuringiensis* mã số EF468625.1.

Hình 5 thể hiện kết quả xác định trình tự axit amin tạo protein độc tố Cry4A.

Hình 6 thể hiện kết quả xác định trình tự amin tạo protein độc tố Cry4B.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phân lập vi khuẩn *Bt*

Các mẫu đất và lá sau khi thu thập về được pha loãng với nước cất vô trùng từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-5} , chú ý đối với mẫu lá phải nghiền nát trong cốc sứ vô trùng sau đó mới pha loãng với nước cất. Sau đó hút 100 μ l dịch pha loãng ở các nồng độ từ 10^{-3} đến nồng độ 10^{-5} gọt đều lên đĩa petri chứa môi trường MPA (NaCl 5g/l; cao thịt 5 g/l; pepton 10g/l; aga 20 g/l; độ pH = 7), mỗi nồng độ ba đĩa. Thời gian nuôi cấy là 72 giờ và nhiệt độ thích hợp là 28°C . Sau đó quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đối pha hoặc kính hiển vi quang học. Giữ lại chủng có tinh thể hình cầu phục vụ cho bước tiếp theo.

Xác định khả năng ngưng kết với tuyp huyết thanh H14

Chủng vi khuẩn *Bt* sau khi phân lập có tinh thể hình cầu được cấy vào trong ống craige, ống craige là ống thủy tinh nhỏ, được cắm thẳng đứng vào môi trường craige chứa trong ống nghiệm to. Thời gian nuôi cấy là 18 đến 24 giờ và nhiệt độ nuôi cấy là 28°C . *Bt* là vi khuẩn có khả năng chuyển động sẽ di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường giữa ống craige và ống nghiệm. Cấy chuyển những tế bào này vào ống craige một lần nữa. Khi vi khuẩn phát triển trên ống craige với thời gian chuyển động là 16-18 giờ thì cấy được vào ống nghiệm chứa khoảng 2 ml môi trường MPB rồi nuôi cấy lắc với tốc độ 70 vòng/phút trong 8-12 giờ.

Phản ứng ngưng kết giữa vi khuẩn *Bt* với tuyp huyết thanh H14 được quan sát trên kính hiển vi: lấy 2 μ l dịch nuôi cấy nhỏ lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2 μ l huyết thanh H14 chuẩn có độ pha loãng 50 lần và quan sát dưới kính hiển vi. Chủng vi khuẩn mất khả năng chuyển động hoàn toàn do huyết thanh gây ra hiện tượng ngưng kết được giữ lại để thực hiện bước tiếp theo.

Thành phần các môi trường (gam/lít)

Thành phần	Môi trường Craige	Môi trường MPB
NaCl	5	5
Cao thịt		3-5
Pepton	3-5	10
Bacto aga	10	
Nước cất	1	1
Độ pH	7	7

Đặc điểm phân tử của chủng thu được

Để phát hiện gen *cry4A* và *cry4B* trong chủng *Bt* thu được cần tiến hành theo các bước được mô tả dưới đây, đồng thời thực hiện cả trên chủng vi khuẩn 4Q1 (chủng chuẩn để đối chứng).

Chủng *Bt* thu được và 4Q1 được cấy vào ống nghiệm chứa 1,5 ml môi trường MPB, nuôi cấy lắc ở tốc độ 220 vòng/phút, trong khoảng 12-16 giờ, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 28°C. Sau đó đổ dịch nuôi cấy vào ống eppendorf ly tâm 6000 vòng trong 10 phút, đổ dịch đi, thu cặn, rửa lại cặn 2 lần bằng nước khử ion đã khử trùng. Sau đó hòa tan lại bằng 70µl nước khử ion và xử lý mẫu ở 100°C trong 10 phút bằng cách thả ống chứa mẫu vào nồi nước đang sôi, giữ 10 phút. Li tâm nhanh với tốc độ 6000 vòng/phút trong 3 phút, thu dịch nổi chứa các phân tử ADN làm khuôn cho phản ứng PCR. Thực chất của phản ứng PCR là phản ứng chuỗi trùng hợp để khuếch đại các gen *cry4A* và *cry4B*.

Phương pháp này bao gồm việc cho phân tử ADN tách từ chủng *Bt* thu được tiếp xúc với một cặp mồi của gen *cry4A* và cặp mồi của gen *cry4B* để tạo sản phẩm khuếch đại gen *cry4A*, *cry4B*.

Cặp mồi để khuếch đại gen *cry4A* gồm 2 mồi, mồi thứ nhất (mồi xuôi) bao gồm trình tự: 5'-CGAGGTGAAATTTGCTCC-3', mồi thứ hai (mồi ngược) bao gồm trình tự: 5'-ATGGCTTGTTCGCTACATC-3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen *cry4A* là: biến tính ADN khuôn ở 94°C trong 3 phút, phản ứng tiếp diễn theo 34

chu kỳ gồm các bước sau: biến tính ở 94⁰C trong 1 phút, gắn môi ở 56⁰C trong 1 phút, tổng hợp ADN ở 72⁰C trong 1 phút, kéo dài sợi ADN ở 72⁰C trong 10 phút.

Cặp môi để khuếch đại gen cry4B gồm 2 môi, môi thứ nhất (môi xuôi) bao gồm trình tự: 5'-GGTTTTCAAGACCTAATAATATAATAC-3'; môi thứ hai (môi ngược) bao gồm trình tự: 5'-CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT-3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen cry4B là: biến tính ADN khuôn ở 95⁰C trong 2 phút, phản ứng tiếp diễn theo 30 chu kỳ gồm các bước sau: biến tính ở 95⁰C trong 1 phút, gắn môi ở 50⁰C trong 1 phút, tổng hợp ADN ở 72⁰C trong 1 phút, kéo dài sợi ADN ở 72⁰C trong 5 phút.

Thành phần phản ứng PCR cho một chủng và một cặp môi:

Môi xuôi: 1 µl	<i>Taq</i> polymeraza: 0,3 µl
Môi ngược: 1 µl	ADN của chủng: 2 µl
Đệm: 2 µl	Nước cất khử ion: 11,7 µl
dNTP: 2 µl	

Sau đó sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarosa.

Xác định trọng lượng phân tử của protein tinh thể độc của chủng *Bt* thu được do gen cry4A và cry4B mã hóa được thực hiện bằng phân tích SDS-PAGE, theo các bước sau:

Bước 1: Tách protein tinh thể

Chủng *Bt* thu được được nuôi cấy lắc qua đêm 200 vòng/phút ở 28⁰C trong môi trường LB như mô tả ở dưới. Cấy chuyển 5% dịch nuôi cấy sang bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường LB (NaCl 5 g/l ; cao men 5 g/l ; trypton 10 g/l ; độ pH = 7), nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 28⁰C trong 4 ngày. Dịch lên men được ly tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút ở 4⁰C, thu cặn. Tủa này gồm hỗn hợp tất cả bào tử, protein tinh thể diệt côn trùng, mảnh tế bào và các thể rắn được hòa tan. Để xác định nồng độ protein tinh thể diệt côn trùng (nội độc tố) bằng cách rửa cặn 3 lần với dung dịch 0,14M NaCl 0,01% Triton X – 100, nhằm loại bỏ các protein hòa tan và proteaza gây ảnh hưởng đến độ tinh sạch của protein tinh thể sau khi ly tâm. Tủa chứa các protein tinh thể diệt côn trùng được hòa tan với NaOH 0,05M (độ pH = 12,5) lắc trong 3 giờ và khuấy cho tan kết tủa. Dịch huyền phù được ly tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút ở 4⁰C. Loại bỏ

cặn chứa bào tử, mảnh tế bào và các thể rắn được hòa tan. Thu dịch nổi chứa các protein tinh thể diệt côn trùng, hòa tan trong kiềm.

Bước 2 : Đổ bản gel

Gel tách được chuẩn bị bằng cách trộn các thành phần với nhau như mô tả ở dưới, sau đó đổ vào bể điện di protein, chú ý để khoảng trống khoảng 1 cm từ mặt bể xuống để lấy chỗ cắm lược. Sau khi gel tách đông lại thì tiến hành cắm lược và đổ gel cô

Thành phần gel tách, gel cô được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Thành phần	Gel tách	Gel cô
Nước khử ion	1,968 ml	0,85 ml
	Tris HCl 3M, độ pH = 8,8 ; 1 ml	Tris HCl 1,5M, độ pH = 6,8 ; 165,25 µl
Glycerol 50%	1,6 ml	
Acrylamit 30%	3,36 ml	212,5 µl
SDS 10%	40 µl	6,25 µl
APS 10%	40 µl	12,5 µl
Temed	6,8 µl	1 µl

Bước 3: Tra mẫu

Protein trước khi điện di phải biến tính để đưa về cấu trúc đơn giản nhất, biến tính bằng nhiệt, sốc nhiệt 95⁰ C trong 10 phút. Sau đó tra mẫu vào các giếng, 1 giếng tra protein đánh dấu (marker protein). Sau khi chạy xong thì nhuộm bản gel bằng thuốc nhuộm Coomassie Blue, rồi đọc kết quả xác định băng protein.

Chủng vi khuẩn *Bt* phân lập được là chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2. Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 thu được được lưu giữ dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học trong Bộ sưu tập chủng giống *Bacillus thuringiensis* của Việt Nam, tại Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chế phẩm diệt bọ gậy muỗi *Culex quinquefasciatus* chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 với nồng độ 10^{11} bào tử/g chế phẩm. Chế phẩm được sản xuất bằng cách trộn dịch nuôi cấy vi khuẩn LNT28.2 với chất mang là lõi ngô nghiền nhỏ có bổ sung các chất hoạt động bề mặt và các chất phụ gia thông thường trong lĩnh vực.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1:

Các mẫu đất và lá sau khi thu thập về được pha loãng với nước cất vô trùng từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-5} , chú ý đối với mẫu lá phải nghiền nát trong cối sứ vô trùng sau đó mới pha loãng với nước cất. Sau đó hút 100 μ l dịch pha loãng ở các nồng độ từ 10^{-3} đến nồng độ 10^{-5} gạt đều lên đĩa petri chứa môi trường MPA có thành phần NaCl 5g/l, cao thịt 5 g/l, pepton 10 g/l, aga 20 g/l và độ pH = 7, mỗi nồng độ ba đĩa. Thời gian nuôi cấy là 72 giờ và nhiệt độ thích hợp là 28°C . Sau đó quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đối pha hoặc kính hiển vi quang học. Thu được chủng LNT28.2 có hình dạng bào tử và tinh thể độc tố chụp dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 5000 lần (1: Tinh thể, 2: Bào tử) như được thể hiện trên Hình 1. Chủng LNT28.2 được sử dụng để thực hiện các bước tiếp theo.

Xác định khả năng ngưng kết với tuyp huyết thanh H14

Các chủng vi khuẩn LNT28.2 sau khi phân lập có tinh thể hình cầu được cấy vào trong ống craige, ống craige là ống thủy tinh nhỏ, được cắm thẳng đứng vào môi trường craige chứa trong ống nghiệm to. Thời gian nuôi cấy là 18 đến 24 giờ và nhiệt độ nuôi cấy là 28°C . Bt là vi khuẩn có khả năng chuyển động sẽ di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường giữa ống craige và ống nghiệm. Cấy chuyển những tế bào này vào ống craige một lần nữa. Khi vi khuẩn phát triển trên ống craige với thời gian chuyển động là 16-18 giờ thì cấy được vào ống nghiệm chứa khoảng 2 ml môi trường MPB rồi nuôi cấy lắc với tốc độ 70 vòng/phút trong 8-12 giờ.

Phản ứng ngưng kết giữa vi khuẩn *Bt* với tuyp huyết thanh H14 được quan sát trên kính hiển vi: lấy 2 μ l dịch nuôi cấy nhỏ lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2 μ l huyết thanh H14 chuẩn có độ pha loãng 50 lần và quan sát dưới kính hiển vi. Chủng vi khuẩn LNT28.2 bị mất khả năng

chuyển động hoàn toàn do huyết thanh gây ra hiện tượng ngưng kết, thể hiện đây là chủng *Bt*.

Đặc điểm phân tử của chủng LNT28.2

Để phát hiện gen *cry4A* và *cry4B* trong chủng LNT28.2 cần tiến hành theo các bước được mô tả dưới đây, đồng thời thực hiện cả trên chủng vi khuẩn 4Q1 (chủng chuẩn để đối chứng).

Chủng LNT28.2 và 4Q1 được cấy vào ống nghiệm chứa 1,5 ml môi trường MPB, nuôi cấy lắc ở tốc độ 220 vòng/phút, trong khoảng 12-16 giờ, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 28°C. Sau đó đổ dịch nuôi cấy vào ống eppendorf ly tâm 6000 vòng trong 10 phút, đổ dịch đi, thu cặn, rửa lại cặn 2 lần bằng nước khử ion đã khử trùng. Sau đó hòa tan lại bằng 70µl nước khử ion và xử lý mẫu ở 100°C trong 10 phút bằng cách thả ống chứa mẫu vào nồi nước đang sôi, giữ 10 phút. Li tâm nhanh tốc độ 6000 vòng/phút trong 3 phút, thu dịch nổi có chứa các phân tử ADN làm khuôn cho phản ứng PCR. Thực chất của phản ứng PCR là phản ứng chuỗi trùng hợp để khuếch đại các gen *cry4A* và *cry4B*.

Phương pháp này bao gồm việc tiếp xúc của phân tử ADN tách từ chủng LNT28.2 với một cặp mồi của gen *cry4A* và cặp mồi của gen *cry4B* để tạo sản phẩm khuếch đại gen *cry4A*, *cry4B*.

Cặp mồi để khuếch đại gen *cry4A* gồm 2 mồi, mồi thứ nhất (mồi xuôi) bao gồm trình tự: 5'-CGAGGTGAAATTTGCTCC-3', mồi thứ hai (mồi ngược) bao gồm trình tự: 5'-ATGGCTTGTTCGCTACATC-3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen *cry4A* là: biến tính ADN khuôn ở 94°C trong 3 phút, phản ứng tiếp diễn theo 34 chu kỳ gồm các bước sau: biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở 56°C trong 1 phút, tổng hợp ADN ở 72°C trong 1 phút, kéo dài sợi ADN ở 72°C trong 10 phút.

Cặp mồi để khuếch đại gen *cry4B* gồm 2 mồi, mồi thứ nhất (mồi xuôi) bao gồm trình tự: 5'-GGTTTTCAAGACCTAATAATATAATAC-3'; mồi thứ hai (mồi ngược) bao gồm trình tự: 5'-CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT-3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen *cry4B* là: biến tính ADN khuôn ở 95°C trong 2 phút, phản ứng tiếp diễn theo 30 chu kỳ gồm các bước sau: biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 50°C trong 1 phút, tổng hợp ADN ở 72°C trong 1 phút, kéo dài sợi ADN ở 72°C trong 5 phút.

Thành phần phản ứng PCR cho một chủng và một cặp mồi:

Mồi xuôi: 1 μ l	<i>Taq</i> polymeraza: 0,3 μ l
Mồi ngược: 1 μ l	ADN của chủng: 2 μ l
Đệm: 2 μ l	Nước cất khử ion: 11,7 μ l
dNTP: 2 μ l	

Sau đó sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarosa. Chủng LNT28.2 mang gen *cry4A* và *cry4B* với kích thước lần lượt là 1035 bp và 321 bp (Hình 2).

Đoạn gen 1031 bp và 321 bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* LNT28.2 được tách dòng trong véc tơ pGEM-Teasy và biến nạp vào vi khuẩn DH5 α . Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pGEM-*cry4A* và pGEM-*cry4B*.

Trình tự gen *cry4A* và *cry4B* trong plasmit tái tổ hợp pGEM-*cry4A* và pGEM-*cry4B* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm phân tích độ tương đồng Basic Local Alignment Sequence Tool – Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih>) đã xác định đoạn gen *cry4A* có kích thước 1031 bp mã hóa trình tự 345 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 130 kDa (SEQ ID No.1), gen *cry4B* có kích thước 321 bp, mã hóa 107 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 70 kDa (SEQ ID No.2). Đoạn gen *cry4A* của chủng *Bacillus thuringiensis* LNT28.2 được so sánh với trình tự gen *cry4A* của chủng *Bacillus thuringiensis* có mã số EF424470.1 trên Ngân hàng gen quốc tế cho thấy: trình tự đoạn gen *cry4A* tách từ chủng LNT28.2 có độ tương đồng cao so với trình tự gen *cry4A* của chủng *Bacillus thuringiensis* mã số EF424470.1. Trình tự gen *cry4A* của chủng LNT28.2 có 6 vị trí sai khác so với trình tự gen *cry4A* của chủng *Bacillus thuringiensis* mã số EF424470.1: ở vị trí nucleotit số 29 (C thay cho T), ở vị trí nucleotit số 328 (C thay cho A), ở vị trí nucleotit số 606 (A thay cho T), ở vị trí nucleotit số 619 (A thay cho C), ở vị trí nucleotit số 659 (T thay cho G), ở vị trí nucleotit số 671 (A thay cho C). Trình tự gen *cry4B* của chủng *Bacillus thuringiensis* LNT28.2 có 1 vị trí sai khác so với trình tự gen *Bacillus thuringiensis* của chủng *Bacillus thuringiensis* mã số EF468625.1 trên Ngân hàng gen: ở vị trí 246 mất 1 nucleotit.

Protein tinh thể độc của chủng LNT28.2 do gen *cry4A* và *cry4B* mã hóa có trọng lượng phân tử khoảng 130 kDa và 70 kDa. Phân tích SDS-PAGE phát hiện sự có mặt của băng protein 70 và 130 kDa được thực hiện theo các bước sau:

Bước 1: Tách protein tinh thể

Chủng LNT28.2 được nuôi cấy lắc qua đêm 200 vòng/phút ở 28⁰C trong môi trường LB như miêu tả ở dưới. Cấy chuyển 5% dịch nuôi cấy sang bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường LB, nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 28⁰C trong 4 ngày. Dịch lên men được ly tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút ở 4⁰C, thu cặn. Tủa này gồm hỗn hợp tất cả bào tử, protein tinh thể diệt côn trùng, mảnh tế bào và các thể rắn được hòa tan. Để xác định nồng độ protein tinh thể diệt côn trùng (nội độc tố) bằng cách rửa cặn 3 lần với dung dịch 0,14M NaCl 0,01% Triton X – 100, nhằm loại bỏ các protein hòa tan và proteaza gây ảnh hưởng đến độ tinh sạch của protein tinh thể sau khi ly tâm. Tủa chứa các protein tinh thể diệt côn trùng được hòa tan với NaOH 0,05M (độ pH = 12,5) lắc trong 3 giờ và khuấy cho tan kết tủa. Dịch huyền phù được ly tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút ở 4⁰C. Loại bỏ cặn chứa bào tử, mảnh tế bào và các thể rắn được hòa tan. Thu dịch nổi chứa các protein tinh thể diệt côn trùng, hòa tan trong kiềm.

Bước 2 : Đổ bản gel

Gel tách được chuẩn bị bằng cách trộn các thành phần với nhau như mô tả ở dưới, sau đó đổ vào bể điện di protein, chú ý để khoảng trống khoảng 1 cm từ mặt bể xuống để lấy chỗ cắm lược. Sau khi gel tách đông lại thì tiến hành cắm lược và đổ gel cô

Thành phần gel tách, gel cô như được thể hiện trong Bảng 1 trong phần Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích.

Bước 3: Tra mẫu

Protein trước khi điện di phải biến tính để đưa về cấu trúc đơn giản nhất, biến tính bằng nhiệt, sốc nhiệt 95⁰ C trong 10 phút. Sau đó tra mẫu vào các giếng, 1 giếng tra protein đánh dấu (marker protein). Sau khi chạy xong thì nhuộm bản gel bằng thuốc nhuộm Coomassie Blue, rồi đọc kết quả xác định bằng protein.

Các kết quả được thể hiện trên các Hình 3 – 6.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 được lưu trữ tại Bộ sưu tập chủng giống *Bacillus thuringiensis* của Việt Nam tại Viện Công nghệ sinh học dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus*

Để đánh giá mức độ hoạt tính diệt bọ gây muỗi gây bệnh, sử dụng bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus* và thử theo phương pháp của Finney, 1971. Protein tinh thể hòa tan tách được được xác định nồng độ theo phương pháp Bradford (1976) sử dụng albumin huyết thanh bò làm protein chuẩn.

Liều áp dụng: 0,81; 1,35; 1,86; 2,40; 2,95 μg protein/mL.

Số bọ gây muỗi thử nghiệm: 30 bọ gây tuổi 2 hoặc tuổi 3 mỗi nồng độ, thí nghiệm được làm lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được ghi lại sau 24 giờ thử nghiệm.

Tỷ lệ chết 50% - nồng độ gây chết một nửa (LC_{50}) được xác định theo Finney, 1971. Các số liệu được thể hiện dưới dạng số học trung bình $\pm$ sai số chuẩn. Phân tích thống kê, phân tích phương sai (ANOVA). Mức ý nghĩa được thể hiện như P – giá trị nhỏ hơn 0,05.

Kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây cho thấy tỷ lệ phần trăm bọ gây chết khi thử nghiệm bằng protein tinh thể tách từ chủng LNT28.2 là rất cao.

Bảng 2 - Tác dụng của LNT28.2 đối với bọ gây *C. quinquefasciatus*

Tên chủng	Liều thử nghiệm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Tỷ lệ ấu trùng chết (%)	Giá trị LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (Độ tin cậy 95%)
LNT28.2	0		1,48
	0,81	$18 \pm 1,47$	
	1,35	$45 \pm 3,79$	
	1,86	$58 \pm 2,76$	
	2,40	$78 \pm 3,3$	
	2,95	$90 \pm 4,8$	

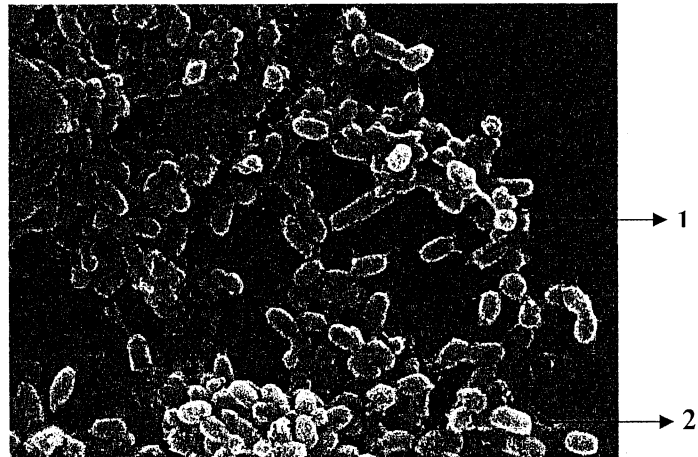
Chế phẩm diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus* chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 với nồng độ 10^{11} bào tử/g chế phẩm. Chế phẩm được sản xuất bằng cách trộn dịch nuôi cấy vi khuẩn LNT28.2 với chất mang là lõi ngô nghiền nhỏ có bổ sung các chất hoạt động bề mặt và các chất phụ gia thông thường trong lĩnh vực.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

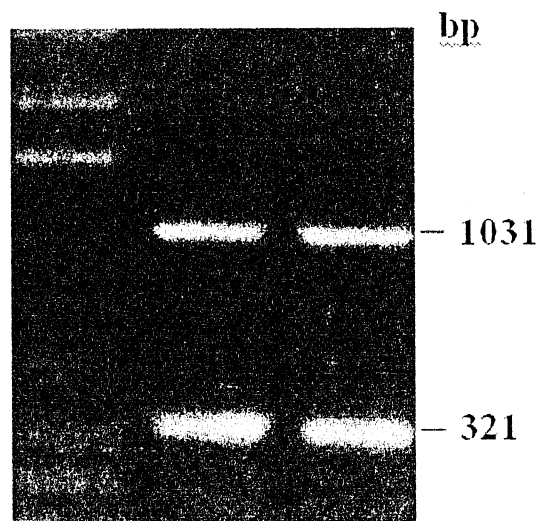
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 là chủng được phân lập tại Việt Nam, có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm sinh học BT.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* LNT28.2 thuần khiết về mặt sinh học, trong đó chủng này có khả năng tạo protein nội độc tổ dạng tinh thể hình cầu với kích thước khoảng 0,7 - 1,2 μm , có hoạt lực đặc hiệu với bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus*, mang các gen cry4A có trình tự SEQ ID No.1 và cry4B có trình tự SEQ ID No.2 mã hoá lần lượt các protein nội độc tổ với kích thước 130 kDa và 70 kDa, ngưng kết với kiểu huyết thanh H14.
2. Chế phẩm sinh học diệt bọ gây muỗi *Culex quinquefasciatus*, trong đó chế phẩm này chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn theo điểm 1 với nồng độ 10^{11} bào tử/g chế phẩm.



Hình 1



Hình 2

```

      10      20      30      40      50      60
LNT28.2 4A  CAGGTGAAAT TTGCTCCAAA TCAAAACACA TCTCTTGTGT TTAATCGTTC GGATGTATAT
EF424470.1  CAGGTGAAAT TTGCTCCAAA TCAAAACATA TCTCTTGTGT TTAATCGTTC GGATGTATAT
      70      80      90     100     110     120
LNT28.2 4A  ACAAACACAA CAGTACTTAT TGATAAAATT GAATTTCTGC CAATTACTCG TTCTATAAGA
EF424470.1  ACAAACACAA CAGTACTTAT TGATAAAATT GAATTTCTGC CAATTACTCG TTCTATAAGA
      130     140     150     160     170     180
LNT28.2 4A  GAGGATAGAG AGAAACAAAA ATTAGAAACA GTACAACAAA TAATTAATAC ATTTTATGCA
EF424470.1  GAGGATAGAG AGAAACAAAA ATTAGAAACA GTACAACAAA TAATTAATAC ATTTTATGCA
      190     200     210     220     230     240
LNT28.2 4A  AATCCTATAA AAAACACTTT ACAATCAGAA CTTACAGATT ATGACATAGA TCAAGCCGCA
EF424470.1  AATCCTATAA AAAACACTTT ACAATCAGAA CTTACAGATT ATGACATAGA TCAAGCCGCA
      250     260     270     280     290     300
LNT28.2 4A  AATCTTGTTG AATGTATTTC TGAAGAATTA TATCCAAAAG AAAAAATGCT GTTATTAGAT
EF424470.1  AATCTTGTTG AATGTATTTC TGAAGAATTA TATCCAAAAG AAAAAATGCT GTTATTAGAT
      310     320     330     340     350     360
LNT28.2 4A  GAACTTAAAA ATGCGAAACA ACTTAGTCAA TCTCGAAATG TACTTCAAAA CGGGGATTTT
EF424470.1  GAACTTAAAA ATGCGAAACA ACTTAGTCAA TCTCGAAATG TACTTCAAAA CGGGGATTTT
      370     380     390     400     410     420
LNT28.2 4A  GAATCGGCTA CGCTTGGTTG GACAACAAGT GATAATATCA CAATTCAGA AGATGATCCT
EF424470.1  GAATCGGCTA CGCTTGGTTG GACAACAAGT GATAATATCA CAATTCAGA AGATGATCCT
      430     440     450     460     470     480
LNT28.2 4A  ATTTTAAAG GGCATTACCT TCATATGTCT GGGCGAGAG ACATTGATGG TACGATATTT
EF424470.1  ATTTTAAAG GGCATTACCT TCATATGTCT GGGCGAGAG ACATTGATGG TACGATATTT
      490     500     510     520     530     540
LNT28.2 4A  CCGACCTATA TATTCCAAAA AATTGATGAA TCAAAAATTA AACCGTATAC ACGTTACCTA
EF424470.1  CCGACCTATA TATTCCAAAA AATTGATGAA TCAAAAATTA AACCGTATAC ACGTTACCTA
      550     560     570     580     590     600
LNT28.2 4A  GTAAAGGGAT TTGTAGGAAG TAGTAAAGAT GTAGAACTAG TGGTTTCACG CTATGGGGAA
EF424470.1  GTAAAGGGAT TTGTAGGAAG TAGTAAAGAT GTAGAACTAG TGGTTTCACG CTATGGGGAA
      610     620     630     640     650     660
LNT28.2 4A  GAAATAGATG CCATCATGAA TGTTCAGCTT GATTAAACTT ATCTGTATCC TTCTACCTTT
EF424470.1  GAAATAGATG CCATCATGAA TGTTCAGCTT GATTAAACTT ATCTGTATCC TTCTACCTTT
      670     680     690     700     710     720
LNT28.2 4A  GATTGCAAG AGTCTAATCG TTGTGAGACG TCCGCTGTGC CGGCTAACAT TGGGAACACT
EF424470.1  GATTGCAAG AGTCTAATCG TTGTGAGACG TCCGCTGTGC CGGCTAACAT TGGGAACACT
      730     740     750     760     770     780
LNT28.2 4A  TCTGATATGT TGTATTCATG CCAATATGAT ACAGGGAAAA AGCATGTCGT ATGTCAGGAT
EF424470.1  TCTGATATGT TGTATTCATG CCAATATGAT ACAGGGAAAA AGCATGTCGT ATGTCAGGAT
      790     800     810     820     830     840
LNT28.2 4A  TCCCATCAAT TTAGTTTCAC TATTGATACA GGGGCATTAG ATACAAATGA AAATATAGGG
EF424470.1  TCCCATCAAT TTAGTTTCAC TATTGATACA GGGGCATTAG ATACAAATGA AAATATAGGG
      850     860     870     880     890     900
LNT28.2 4A  GTTTGGGTCA TGTTTAAATT ATCTTCTCCA CATGGATACG CATCATAGA TAATTTAGAA
EF424470.1  GTTTGGGTCA TGTTTAAATT ATCTTCTCCA CATGGATACG CATCATAGA TAATTTAGAA
      910     920     930     940     950     960
LNT28.2 4A  GTAATTGAAG AAGGGCCAAT AGATGGGGAA GCACGTCTAC GCGTGAAACA CATGGAGAAG
EF424470.1  GTAATTGAAG AAGGGCCAAT AGATGGGGAA GCACGTCTAC GCGTGAAACA CATGGAGAAG
      970     980     990     1000    1010    1020
LNT28.2 4A  AAATGGAACG ATCAAATGGA AGCAAAACGT TCGGAAACAC AACAAGCATA TCATGTAGCG
EF424470.1  AAATGGAACG ATCAAATGGA AGCAAAACGT TCGGAAACAC AACAAGCATA TCATGTAGCG
      1030
LNT28.2 4A  AAACAAGCCA T
EF424470.1  AAACAAGCCA T

```

Hình 3

	10	20	30	40	50	60
LNT28.2						
EF468625.1	CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACCTACAGATTTAAATATGAAGAGTTTAGATACA					
	70	80	90	100	110	120
LNT28.2						
EF468625.1	AAGATCCTTTTGATGCAATTGTACCGATGAGATTATCTTCTAATCAACTGATAACTATAG					
	130	140	150	160	170	180
LNT28.2						
EF468625.1	CTATTCAACCATTAAACATGACTTCAAATAATCAAGTGATTATTGACAGAATCGAAATTA					
	190	200	210	220	230	240
LNT28.2						
EF468625.1	TTCCAATCACTCAATCTGTATTAGATCAGACAGAGAACC AAAATTTAGAATCAGAACGAG					
	250	260	270	280	290	300
LNT28.2						
EF468625.1	AAGTTTGAATGCACTGTTTACAAATGACGCGAAAGATGCATTAAACATTGGGACGACAG					
	310	320				
LNT28.2						
EF468625.1	ATTATGACATAGATCAAGCCG					

Hình 4

gaggtgaaatttgctccaaatcaaaacacatctcttgtgtttaatcgttcggatgtatat
 E V K F A P N Q N T S L V F N R S D V Y
 acaaacacaacagtacttattgataaaattgaatttctgccaaactactcgttctataaga
 T N T T V L I D K I E F L P I T R S I R
 gaggatagagagaaacaaaaattagaaacagtaacaaataattaatacattttatgca
 E D R E K Q K L E T V Q Q I I N T F Y A
 aatcctataaaaaaacactttacaatcagaacttacagattatgacatagatcaagcggca
 N P I K N T L Q S E L T D Y D I D Q A A
 aatccttgggaatgtatttctgaagaattatatccaaaagaaaaaatgctgttattagat
 N L V E C I S E E L Y P K E K M L L L D
 gaagttaaaaatgcgaaacaacttagtcaatctcgaaatgtacttcaaaacggggatttt
 E V K N A K Q L S Q S R N V L Q N G D F
 gaatcggtacgcttggttgacaacaagtgataaatcacaattcaagaagatgacct
 E S A T L G W T T S D N I T I Q E D D P
 atttttaaaagggcattaccttcataatgtctgtggcgagagacattgatggtacgatattt
 I F K G H Y L H M S G A R D I D G T I F
 ccgacctatatattccaaaaattgatgaatcaaaattaaaaccgtatacacgttaccta
 P T Y I F Q K I D E S K L K P Y T R Y L
 gtaaggggattttaggaagtagtaaaagatgtagaaactagtggtttcacgctatggggaa
 V R G F V G S S K D V E L V V S R Y G S
 gsaatagatgccatcatgaatgttccagctgattttaaactatctgtatccttctacctit
 E I D A I M N V P A D L N Y L Y P S T F
 gattgtgaagagtctaactcgttgtgagacgtccgctgtgcccgttaacattgggaacact
 D C E E S N R C E T S A V P A N I G N T
 tctgatatgttgtattcatgccaatatgatacagggaaaaagcatgtcgtatgtcaggat
 S D M L Y S C Q Y D T G K K H V V C Q D
 tcccatcaattttagtttccactattgatacaggggcattagatacaaatgaaaatataggg
 S H Q F S F T I D T G A L D T N E N I G
 gtttgggtcatgtttaaaatatcttctccagatggatacgcacatcattagataatttagaa
 V W V M F K I S S P D G Y A S L D N L E
 gtaattgaagaagggccaatagatgggggaagcactgtcacgcgtgaaacacatggagaag
 V I E E G P I D G E A L S R V K H M E K
 aaatggaacgatcaaatggaagcaaaacggttcggaacacacaagcatatgatgtageg
 K W N D Q M E A K R S E T Q Q A Y D V A
 aaacaagccat
 K Q A

Hình 5

cgttttcaagacctaataataataacctacagattttaaataatgaagagtttagataga
 R F Q D L I I - Y L Q I - N M K S L D T
 aagatccttttgatgcaattgtacgatgagattatcttctaatacactgataactatag
 K I L L M Q L Y R - D Y L L I N - - L -
 ctattcaaccattaaacatgacttcaaataatcaagtgattattgacagaatcgaaatta
 L F N H - T - L Q I I K - L L T E S K L
 ttccaatcaactcaatctgtatttagatgagacagagaacccaaaatttagaatcagaacgag
 F Q S L N L Y - M R Q R T K I - N Q N E
 aagttntgaatgcactgtttacaaatgacgcgaaagatgcattaaacattggaacgacaga
 K F E C T V Y K - R E R C I K H W N D R
 ttatgacatagatcaagccg
 L - H R S S

Hình 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVA
ISRAELENSIS LNT28.2 VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT BỌ GÂY MUỖI
CULEX QUINQUEFASCIATUS

<160> 2

<210> SEQ ID NO 1

<211> 1031

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

<400>

```

1 gaggtgaaat ttgctccaaa tcaaaacaca tctcttgtgt ttaatcggtc
ggatgtatat
61 acaaacacaa cagtacttat tgataaaatt gaatttctgc caattactcg ttctataaga
121 gaggatagag agaaacaaaa attagaaaca gtacaacaaa taattaatac attttatgca
181 aatcctataa aaaacacttt acaatcagaa cttacagatt atgacataga tcaagccgca
241 aatcttgtgg aatgtatttc tgaagaatta tatccaaaag aaaaaatgct gttattagat
301 gaagttaaaa atgCGaaaca acttagtcaa tctCGaaatg tacttcaaaa cggggatttt
361 gaatcggcta cgcttggttg gacaacaagt gataatatca caattcaaga agatgatcct
421 atttttaaaag ggcattacct tcatatgtct gggcgagag acattgatgg tacgatattt
481 ccgacctata tattccaaaa aattgatgaa tcaaaattaa aaccgtatac acgttaccta
541 gtaaggggat ttgtaggaag tagtaaagat gtagaactag tggtttcacg ctatggggaa
601 gaaatagatg ccatcatgaa tgttccagct gatTTAAact atctgtatcc ttctaccttt
661 gattgtgaag agtctaactg ttgtgagacg tccgctgtgc cggctaacat tgggaacact
721 tctgatatgt tgtattcatg ccaatatgat acagggaaaa agcatgtcgt atgtcaggat
781 tcccatcaat ttagtttcac tattgataca ggggcattag atacaaatga aaatataggg
841 gtttggttca tgtttaaaat atcttctcca gatggatagc catcattaga taatttagaa
901 gtaattgaag aagggccaat agatggggaa gcactgtcac gcgtgaaaca catggagaag
961 aatggaacg atcaaatgga agcaaaacgt tcggaaacac aacaagcata tgatgtagcg
1021 aaacaagcca t

```

<210> SEQ ID NO 2

<211> 321

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

<400>

```

1 cgttttcaag acctaataat ataataccta cagattttaa atatgaagag tttagataca
61 aagatccttt tgatgcaatt gtaccgatga gattatcttc taatcaactg ataactatag
121 ctattcaacc attaaacatg acttcaaata atcaagtgat tattgacaga atcgaaatta
181 ttccaatcac tcaatctgta ttagatgaga cagagaacca aaatttagaa tcagaacgag
241 aagttntgaa tgcactgttt acaaatgacg cgaaagatgc attaaacatt ggaacgacag
301 attatgacat agatcaagcc g

```