



(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) 
2-0001783

(51)⁷ **A01N 63/00**

(13) **Y**

(21) 2-2014-00360

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

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. KURSTAKI MSS8.4
VÀ CHẾ PHẨM DIỆT ẤU TRÙNG RUỒI NHÀ MUSCA DOMESTICA CHỨA
DỊCH NUÔI CẤY CỦA CHŨNG VI KHUẨN NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4, trong đó chủng này có khả năng tạo protein nội độc tố dạng tinh thể hình lưỡng tháp và hình khối lập phương, có hoạt lực cao với 2 nhóm côn trùng bộ cánh vẩy và bộ hai cánh, mang gen *cry2Aa* được phân lập tại Việt Nam. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Lĩnh vực kĩ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 và chế phẩm diệt ấu trùng (hay còn gọi là giòi) ruồi nhà, *Musca domestica*. Cụ thể, giải pháp hữu ích liên quan đến chủng vi khuẩn có khả năng tạo bào tử và tinh thể độc tố thuộc dưới loài là *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) lần đầu tiên được phân lập tại Việt Nam, có hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà cao và chế phẩm chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Tình trạng kĩ thuật của giải pháp hữu ích

Ruồi nhà (*Musca domestica*), còn được gọi chung là ruồi, sống gần với người trên toàn thế giới. Khoảng 90% ruồi hiện diện xung quanh con người. Chúng thường được tìm thấy ở những khu dân cư hoặc động vật sinh sống, nơi có nhiều thực phẩm và chất thải. Sự có mặt của chúng là dấu hiệu của điều kiện mất vệ sinh vì chúng mang theo nhiều chất bẩn và mầm bệnh.

Ngày nay, có nhiều phương pháp diệt ruồi nhà khác nhau mà con người áp dụng. Biện pháp diệt ruồi nhà được sử dụng phổ biến nhất là dùng các loại thuốc hóa học diệt ruồi. Tuy nhiên, những loại thuốc diệt ruồi hiện nay thường có giá thành cao, có nguồn gốc từ hóa chất nên dễ gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe của con người, động vật, không diệt trừ tận gốc mầm bệnh. Để khắc phục những tồn tại của thuốc diệt ruồi hóa học và các phương pháp diệt ruồi truyền thống, chúng ta cần tạo ra những chế phẩm sinh học vừa có tác dụng tiêu diệt hiệu quả mầm bệnh, lại vừa thân thiện với con người, với môi trường.

Chế phẩm *B.thuringiensis* được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1930 để kiểm soát loài sâu đục thân có tên *Angasta kuehneli* ở châu Âu. Sau đó, người ta tiếp tục nghiên cứu và phát hiện thấy *Bt* có khả năng diệt các loài côn trùng thuộc các bộ cánh cứng, bộ cánh vảy, bộ hai cánh, v.v.. Các chế phẩm thương mại của *Bt* đã được sản

xuất với quy mô khác nhau ở nhiều nơi trên thế giới. Trong nhiều năm qua, Việt Nam cũng đạt được nhiều thành tựu trong nghiên cứu, sản xuất chế phẩm sinh học của *Bt* và đưa những kết quả nghiên cứu đó ứng dụng vào đời sống. Tuy nhiên, chế phẩm *Bt* diệt ruồi vẫn chưa được nghiên cứu. Vì vậy, việc nghiên cứu đặc tính sinh học của các chủng *Bt* có nguồn gốc phân lập tại Việt Nam và chế phẩm diệt ấu trùng ruồi cần được bảo hộ và phát triển.

Bản chất kĩ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 có khả năng diệt côn trùng thuộc hai bộ cánh vẩy và hai cánh. Trong đó, chủng *Bt* này có hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* cao và được ứng dụng trong sản xuất chế phẩm diệt ruồi tại Việt Nam.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề xuất chế phẩm diệt ruồi nhà *Musca domestica* chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện các đặc điểm khuẩn lạc, hình dạng bào tử và tinh thể của chủng vi khuẩn MSS8.4. Trong đó, A: Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường MPA sau 3 ngày nuôi ở 28⁰C; B: Hình dạng tinh thể và bào tử ở độ phóng đại 1000 lần dưới kính hiển vi quang học của chủng MSS8.4 (1: tinh thể, 2: bào tử) và C: Hình dạng tinh thể của chủng MSS8.4 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 2 thể hiện kết quả thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp protein của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4.

Hình 3 thể hiện kết quả khuếch đại nhóm gen *cryI* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4. Trong đó, A: khuếch đại gen *cryIAa* (cột 1: thang đánh dấu (marker); cột 2: chủng MSS8.4; cột 3: chủng đối chứng *B.thuringiensis* 4D4); B: khuếch đại gen *cryIAb* và *cryIAc* (cột 1: *cryIAc* của chủng 4D4; 2: *cryIAc* của chủng MSS8.4; cột 3: thang đánh dấu (marker); cột 4: *cryIAb* của chủng 4D4; cột 5: *cryIAb* của chủng MSS8.4); và C: khuếch đại gen *cryIc*: cột 1: thang đánh dấu (marker); cột 2: MSS8.4; 3: 4D4.

Hình 4 thể hiện kết quả khuếch đại gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4: cột 1,2: *cry2A* cột 3: thang đánh dấu (marker).

Hình 5 thể hiện kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1%.

Hình 6 thể hiện kết quả điện di sản phẩm cắt ADN plasmit từ các dòng khuẩn lạc pGEM- T Easy- *cry2A*- MSS8.4 trên agarosa 1%.

Hình 7 (phần 1, phần 2 và phần cuối) thể hiện kết quả so sánh trình tự gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 với trình tự *cry2Aa* và *cry2Ad* có mã số trên ngân hàng gen quốc tế lần lượt là: AJ488143.1 và AJ132463.1.

Hình 8 thể hiện cây phát sinh chủng loại của các gen trong nhóm *cry2A*.

Hình 9 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin của protein Cry2Aa –MSS8.4 với protein có mã số CAD32378.1.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Nguồn gốc phân lập, đặc điểm hình thái khuẩn lạc và phân loại chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4.

Chủng *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được phân lập từ mẫu đất vùng trồng mía không sử dụng thuốc trừ sâu Bt của vùng Sóc Sơn – Hà Nội bằng cách: 1 g đất được hòa trong 9 ml dung dịch muối đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS) vô trùng, lắc 220 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 1 ml huyền phù vào ống Eppendorf ủ ở nhiệt độ 70°C trong 10 phút. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với PBS vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10} . Hút 100 μ l dịch pha loãng đưa lên đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt thủy tinh vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng MPA (1% cao thịt, 1% polypepton, 0.2% NaCl và 2% aga; độ pH = 7,6), nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Sau đó, quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đối pha hoặc kính hiển vi quang học. Chủng MSS8.4 có bào tử hình oval sinh ra hai loại tinh thể hình lưỡng tháp và hình lập phương (Hình 1).

Chủng *Bt* MSS8.4 được phân loại tới dưới loài bằng phản ứng ngưng kết huyết thanh với các tuyp huyết thanh chuẩn khác nhau. Kháng nguyên của chủng MSS8.4

ngưng kết với tuyp huyết thanh H3a3b thuộc dưới loài *kurstaki* trong bộ kit huyết thanh của Phòng Di truyền Vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam. Như vậy, có thể xác định chủng vi khuẩn *Bt* phân lập được là chủng *Bacillus thuringiensis* thuộc dưới loài (subsp.) *kurstaki*.

Chủng MSS8.4 được đặt tên là *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4. Chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 thu được này 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.

Chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 thu được này được tiến hành các thử nghiệm để xác định các đặc điểm sinh học như khả năng sinh tổng hợp protein tinh thể, đặc tính hệ gen, v.v..

Khả năng sinh tổng hợp protein tinh thể của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được thực hiện như mô tả sau đây. Chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MPA trong 72 giờ ở 28°C, sau đó thu nhận toàn bộ sinh khối và tiến hành tách chiết protein tinh thể theo phương pháp Parasporal proteins và SDS-PAGE của N. Wasano và cộng sự năm 1998, kết quả thu được thể hiện dưới đây (Hình 2).

Đặc tính hệ gen diệt côn trùng của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được xác định dựa trên khả năng mang các gen *cry*. Chủng vi khuẩn thuộc *Bt*. Subsp. *kurstaki* nói chung có khả năng diệt côn trùng thuộc bộ cánh vẩy và bộ 2 cánh, nên chủng này có khả năng mang gen thuộc họ gen *cry2* và *cry1*. Để xác định khả năng mang các gen này, thực hiện phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu với các chu trình nhiệt tương ứng.

Kiểm tra khả năng mang gen *cry1* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 bằng cách sàng lọc bằng PCR với các cặp mồi và chu trình nhiệt như được thể hiện trong các Bảng 1 và 2, tương ứng, dưới đây.

Bảng 1 – Các cặp mồi sử dụng để kiểm tra khả năng mang gen *cryI* của chủng *Bt* MSS8.4

Cặp mồi	Trình tự nucleotit	Gen	Kích thước sản phẩm (bp)
TYIAA	5'- GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC ¹	<i>cryIA(a)</i>	724
TYIAB	5' – TCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTA ¹	<i>cryIA(b)</i>	238
TYIAC	5' - TCACTTCCCATCGACATCTACC ¹	<i>cryIA(c)</i>	487
TYIB	5' – GTCAACCTTATGATGCACCTGGGCTTC ¹	<i>cryIB</i>	830
TYIC	5' – CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTC ¹	<i>cryIC</i>	288
TYID	5' – GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC ¹	<i>cryID</i>	414
TYIE	5' – CTTAGGGATAAATGTAGTACAG ¹	<i>cryIE</i>	880
TYIF	5' – CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC ¹	<i>cryIF</i>	368
TYIUNI	5' - TCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC ²	<i>cryI</i>	

¹Mỗi xuôi (8 mồi cho các gen tương ứng)

²Mỗi ngược vạn năng cho 8 mồi xuôi ở trên.

Bảng 2 - Chu trình nhiệt của phản ứng PCR kiểm tra khả năng mang gen *cryI*

94 ⁰ C	94 ⁰ C	52 ⁰ C	72 ⁰ C	72 ⁰ C	4 ⁰ C
2 phút	1 phút	1 phút	1 phút	10 phút	∞
30 chu kỳ					

Kết quả thu được cho thấy chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 có khả năng mang các gen *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* và *cryIC* (Hình 3).

Theo như các tài liệu đã công bố trên thế giới, gen *cry2* của vi khuẩn *Bt* có khả năng diệt ấu trùng ruồi nhà, vì vậy, để khẳng định hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà của chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4, tiến hành kiểm tra khả năng mang gen *cry2* bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt như được thể hiện trong các Bảng 3 và 4 dưới đây. Kết quả phân lập gen *cry2* được thể hiện trên Hình 4 và Hình 5.

Bảng 3 – Cặp mồi kiểm tra khả năng mang gen *cry2*

Cặp mồi	Trình tự	Kích thước (bp)
<i>Cry2AaF</i>	5'....ATGGATCCATGAATAATGTATTGAATAG....3'	1902
<i>Cry2AaR</i>	5'....TACTCGAGTTAATAAAGTGGTGGGAAGAT....3'	1902

Bảng 4 – Chu trình nhiệt kiểm tra khả năng mang gen *cry2*

94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
3 phút	1 phút	1 phút 20 giây	2 phút	10 phút	∞
	30 chu kỳ				

Kết quả khuếch đại gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 cho thấy có xuất hiện 1 băng có kích thước tương đương với kích thước gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 4D4 (chủng chuẩn). Để khẳng định đoạn gen trên chính xác là gen *cry2A*, tiến hành tách dòng trong vectơ pGEM – Teasy (Hình 6).

Gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được tách dòng trong vectơ tách dòng pGEM- T Easy, xác định trình tự gen *cry2A* của chủng này (Hình 7) và sau đó so sánh với gen *cry2A* trên Ngân hàng gen quốc tế. Trình tự nucleotit đoạn gen mã hóa trình tự axit amin tạo protein độc tố Cry2Aa của chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (GenBank) số hiệu KM588296 có kích thước 1902 bp, mã hóa 634 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 70 kDa. Trình tự gen *cry2A* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 có độ tương đồng 99% với các gen thuộc nhóm *cry2A*. Vì vậy, tiến hành dựng cây phát sinh chủng loại với các gen nhóm *cry2A* (Hình 8).

Từ kết quả trên cho thấy gen *cry2A* của chủng MSS8.4 là một gen thuộc nhóm *cry2Aa*. Có 5 điểm sai khác về trình tự gen là A305G, A500G, G1054T, A1308G,

T1575C. Độ tương đồng về axit amin là 99% với 4 vị trí sai khác N102S, Q167R, G352W và N435D (Hình 9).

Dựa trên các đặc điểm sinh học và hoạt tính diệt ruồi nhà *Musca domestica* của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 theo giải pháp hữu ích, chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* chứa dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 này đã được nghiên cứu và tạo ra.

Đây là chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi đầu tiên của Việt Nam có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* có thành phần là dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 với nồng độ 10^{11} tế bào/g chế phẩm với các chất phụ gia như diatomit, galactosa, v.v.. Đây đều là các chất phụ gia thông thường trong lĩnh vực vi sinh, nên người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện việc lựa chọn các chất phụ gia theo ý muốn. Độ ẩm thích hợp của chế phẩm nằm trong khoảng 9 – 11% khối lượng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Tiến hành thử hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* của dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 ở các nồng độ protein từ 0 – 500 $\mu\text{g/g}$ và đã xác định được giá trị $\text{LC}_{50} = 238,5 \mu\text{g/g}$ chế phẩm trên đối tượng ấu trùng ruồi nhà tuổi 2 - 3.

Tỷ lệ ấu trùng ruồi nhà chết được xác định sau 3 và 5 ngày thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm được trình bày trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5 – Tỷ lệ chết của ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* sau 3 và 5 ngày

Tên chủng	Liều thử nghiệm ($\mu\text{g/g}$)	Tỷ lệ ấu trùng chết (%)	Giá trị LC_{50} ($\mu\text{g/g}$)
MSS8.4	0	0	283,5
	100	$17,6 \pm 3,36$	
	200	$35,3 \pm 1,25$	
	300	$53 \pm 1,26$	

Tên chủng	Liều thử nghiệm ($\mu\text{g/g}$)	Tỷ lệ ấu trùng chết (%)	Giá trị LC_{50} ($\mu\text{g/g}$)
	400	$70,5 \pm 4,3$	
	500	100	

Từ kết quả trên cho thấy hoạt lực diệt ấu trùng ruồi nhà của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 chiếm tỷ lệ rất cao với giá trị $\text{LC}_{50} = 283,5 \mu\text{g/g}$. Đây là cơ sở để lựa chọn chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 cho sản xuất chế phẩm sinh học diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* tại Việt Nam.

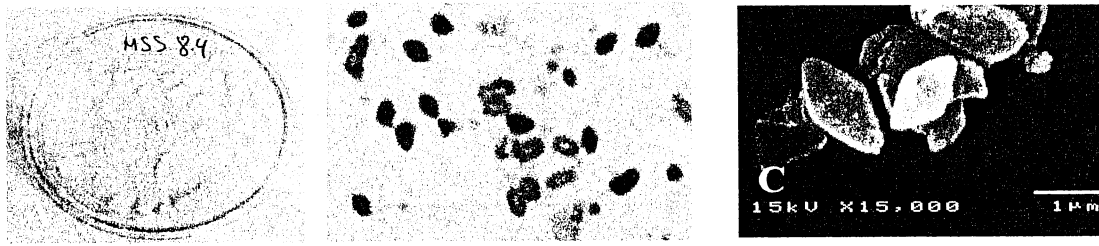
Chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* có thành phần là dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 với nồng độ 10^{11} tế bào/g chế phẩm, chất phụ gia là các chất phụ gia thông thường trong lĩnh vực và độ ẩm 9 – 11% khối lượng. Chế phẩm này được thử nghiệm trên quy mô hiện trường tại khu vực xã Phù Vân, thành phố Phủ Lý, tỉnh Hà Nam và đạt hiệu quả diệt ấu trùng khoảng 90%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đã phân lập được chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 tại Việt Nam, đây là chủng có hoạt tính diệt côn trùng bộ hai cánh (Diptara) và bộ cánh vẩy (Lepidoptera) cao và có nhiều ứng dụng hữu ích. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica* chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này, đây là chế phẩm có hiệu quả tốt và là dạng chế phẩm mới được nghiên cứu tại Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

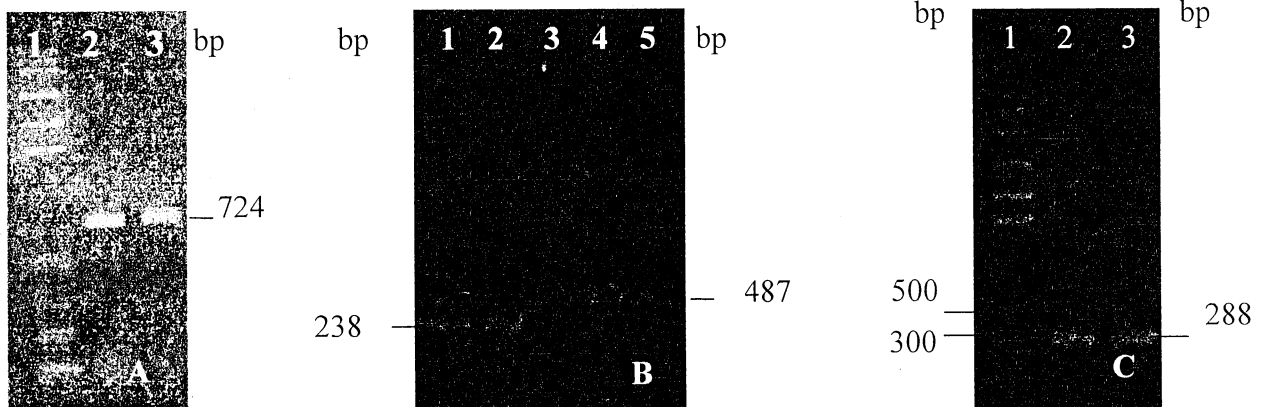
1. Chúng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* MSS8.4 thuần khiết về mặt sinh học, trong đó chủng này có khả năng tạo protein nội độc tổ dạng tinh thể hình lưỡng tháp và hình khối lập phương, có hoạt lực cao với 2 nhóm côn trùng bộ cánh vẩy và bộ hai cánh, chủng này mang gen *cry2Aa* có trình tự được đăng ký trên Ngân hàng gen với số hiệu KM588296.
2. Chế phẩm vi sinh diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica*, trong đó chế phẩm này chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn theo điểm 1 với nồng độ 10^{11} tế bào/g chế phẩm.



Hình 1



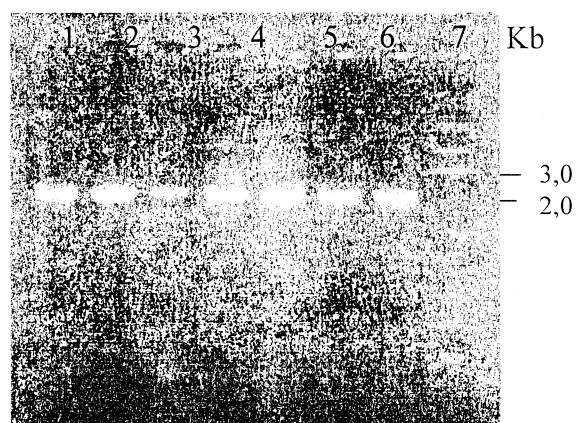
Hình 2



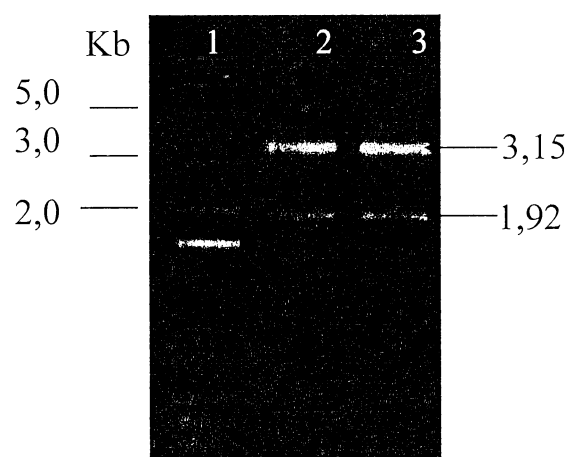
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6

	10	20	30	40	50	60
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	ATGAATAATG	TATTGAATAG	TGGAAGAACA	ACTATTTGTG	ATGCGTATAA	TGTAGTAGCC
AJ132463.1-cry2Ad			CC.....			
	70	80	90	100	110	120
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CATGATCCAT	TTAGTTTTGA	ACATAAATCA	TTAGATACCA	TCCAAAAAGA	ATGGATGGAG
AJ132463.1-cry2Ad						
	130	140	150	160	170	180
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	TGGAAAAGAA	CAGATCATAG	TTTATATGTA	GCTCCTGTAG	TCGGAAGTGT	GTCTAGTTTT
AJ132463.1-cry2Ad						
	190	200	210	220	230	240
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	TTGCTAAAGA	AAGTGGGGAG	TCTTATTGGA	AAAAGGATAT	TGAGTGAATT	ATGGGGGATA
AJ132463.1-cry2Ad						
	250	260	270	280	290	300
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	ATATTTCCCTA	GTGGTAGTAC	AAATCTAATG	CAAGATATTT	TAAGGGAGAC	AGAACAATTC
AJ132463.1-cry2Ad		A.....				
	310	320	330	340	350	360
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CTAAATCAAA	GACTTAATAC	AGATACCCTT	GCTCGTGTAA	ATGCAGAATT	GATAGGGCTC
AJ132463.1-cry2Ad	G.....					
	370	380	390	400	410	420
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CAAGCGAATA	TAAGGGAGTT	TAATCAACAA	GTAGATAATT	TTTTAAACCC	TACTCAAAC
AJ132463.1-cry2Ad						
	430	440	450	460	470	480
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CCTGTTCCCTT	TATCAATAAC	TTCTTCGGTT	AATACAATGC	AGCAATTATT	TCTAAATAGA
AJ132463.1-cry2Ad						
	490	500	510	520	530	540
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	TTACCCAGT	TCCAGATACA	AGGATACCAG	TTGTTATTAT	TACCTTTATT	TGCACAGGCA
AJ132463.1-cry2Ad		G.....				
	550	560	570	580	590	600
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GCCAATATGC	ATCTTCTTT	TATTAGAGAT	GTTATTCTTA	ATGCAGATGA	ATGGGGTATT
AJ132463.1-cry2Ad						
	610	620	630	640	650	660
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	TCAGCAGCAA	CATTACGTAC	GTATCGAGAT	TACCTGAGAA	ATTATACAAG	AGATTATCTT
AJ132463.1-cry2Ad						

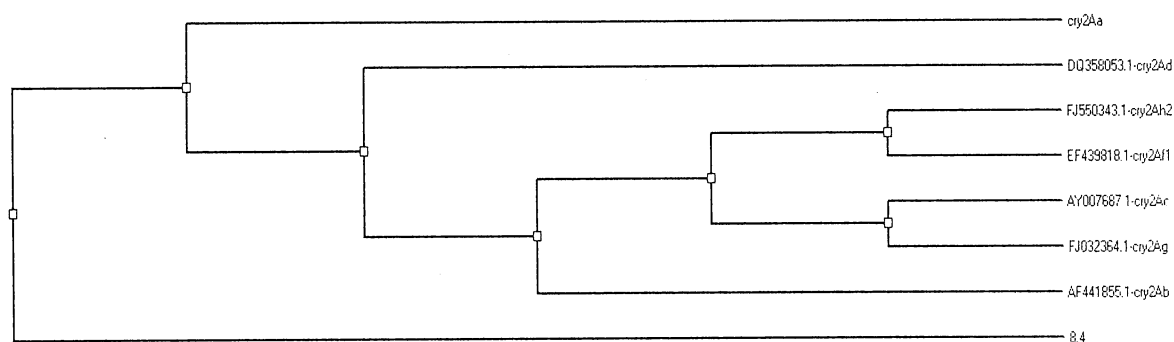
Hình 7 (phần 1)

	670	680	690	700	710	720
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	AATTATTGTA	TAAATACGTA	TCAAACGCG	TTTAGAGGGT	TAAACACCCG	TTTACACGAT
AJ132463.1-cry2Ad						
	730	740	750	760	770	780
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	ATGTTAGAAT	TTAGAACATA	TATGTTTTTA	AATGTATTG	AATATGTATC	CATTTGGTCA
AJ132463.1-cry2Ad						
	790	800	810	820	830	840
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	TTTTTTAAAT	ATCAGAGTCT	TATGGTATCT	TCTGGCGCTA	ATTATATATC	TAGCGGTAGT
AJ132463.1-cry2Ad						
	850	860	870	880	890	900
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GGACCACAGC	AGACACAATC	ATTTACAGCA	CAAAACTGGC	CATTTTTATA	TTCTCTTTTC
AJ132463.1-cry2Ad						
	910	920	930	940	950	960
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CAAGTTAATT	CGAATTATAT	ATTATCTGGT	ATTAGTGGTA	CTAGGCTTTC	TATTACCTTC
AJ132463.1-cry2Ad						
	970	980	990	1000	1010	1020
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CCTAATA	TTGGTGG	TTTACCGGGT	AGTACTACAA	CTCATTTCATT	GAATAGTGCC
AJ132463.1-cry2Ad						
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	AGGGTTAATT	ATAGCGGAGG	AGTTTCATCT	GGTCTCATAG	GGGCGACTAA	TCTCAATCAC
AJ132463.1-cry2Ad						
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	AACTTTAATT	GCAGCAGCGT	CCTCCCTCCT	TTATCAACAC	CATTGTGTTAG	AAGTTGGCTG
AJ132463.1-cry2Ad						
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GATTCAGGTA	CAGATCGAGA	GGGCGTTGCT	ACCTCTACGA	ATTGGCAGAC	AGAATCCTTT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CAAACAACCTT	TAAGTTTAAG	GTGTGGTGCT	TTTTTCAGCCC	GTGGAATTC	AAACTATTTC
AJ132463.1-cry2Ad						
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CCAGATTATT	TTATCCGTAA	TATTTCTGGG	GTTCTTTTAG	TTATTAGAAA	CGAAGATCTA
AJ132463.1-cry2Ad						

Hình 7 (phần 2)

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	ACAAGACCGT	TACACTATAA	CCAAATAAGA	AATATAGAAA	GTCCTTCGGG	AACACCTGGT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GGAGCACGGG	CCTATTTGGT	ATCTGTGCAT	AACAGAAAAA	ATAATATCTA	TGCCGCTAAT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GAAAATGGTA	CTATGATCCA	TTTGGCGCCA	GAAGATTATA	CAGGATTTAC	TATATCGCCA
AJ132463.1-cry2Ad						
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	ATACATGCCA	CTCAAGTGAA	TAATCAAAC	CGAACATTTA	TTTCTGAAAA	ATTGGGAAAT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CAAGGTGATT	CCTTAAGATT	TGAACAAAGC	AACACGACAG	CTCGTTATAC	GCTTAGAGGG
AJ132463.1-cry2Ad						
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	AATGGAAATA	GTTACAATCT	TTATTTAAGA	GTATCTTCAA	TAGGAAATTC	AACTATTCTGA
AJ132463.1-cry2Ad						
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GTTACTATAA	ACGGTAGAGT	TTATACTGTT	TCAAATGTTA	ATACCACTAC	AAATAACGAT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GGAGTTAATG	ATAATGGAGC	TCGTTTTTCA	GATATTAATA	TCGGTAATAT	AGTAGCAAGT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	GATAATACTA	ATGTAACGCT	AGATATAAAT	GTGACATTAA	ACTCCGGTAC	TCCATTTGAT
AJ132463.1-cry2Ad						
	1870	1880	1890	1900	1910	
AJ488143.1-cry2Aa-x						
8.4	CTCATGAATA	TTATGTTTGT	GCCAACTAAT	CTTCCACCAC	TTTATTAA	
AJ132463.1-cry2Ad						

Hình 7 (phần cuối)



Hình 8

	70	80	90	100	110	120
cry2A-MSS8.4	LLKKVGS	SLIG KR	ILSELW	CI IFPS	GSTNLM	QDILRETEQF LSQRLNTDTL ARVNAELIGL
CAD32378.1						N.....
	130	140	150	160	170	180
cry2A-MSS8.4	QANIREFN	QQ VDN	FLNPTQ	N PVPL	SITSSV	NTMQQLFLNR LPQEQIRGYQ LLLLPLEAQA
CAD32378.1						Q.....
	310	320	330	340	350	360
cry2A-MSS8.4	QVNSNYIL	SG ISG	TRLSIT	F PNIG	GLPGST	TTHSLNSARV NYSGEVSSGL IWATNLNHNH
CAD32378.1						C.....
	430	440	450	460	470	480
cry2A-MSS8.4	YFIRNISG	VP LVIR	DEDLTR	PLHYNQ	IRNI ESP	SGTPGGA RAYLVSVHNR KNNIYAANEN
CAD32378.1			N.....			

Hình 9