



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

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

(11)



1-0027456

(51)^{2006.01} C07K 14/14; G01N 33/53; G01N
33/569; C12N 15/46

(13) B

(21) 1-2016-03022

(22) 29/01/2015

(86) PCT/US2015/013449 29/01/2015

(87) WO 2015/116778 06/08/2015

(30) 61/932,995 29/01/2014 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 26/12/2016 345A

(73) University of Georgia Research Foundation, Inc. (US)

809 Boyd Graduate Studies Research Center, University of Georgia Research
Foundation INC. Athens, GA 30602-7411, United States of America

(72) SELLERS, Holly, S. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PROTEIN C SIGMA ĐƯỢC PHÂN LẬP CỦA REOVIRUT Ở CHIM VÀ
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN SỰ PHỐI NHIỄM VỚI REOVIRUT Ở CHIM

(57) Sáng chế đề cập đến protein C sigma được phân lập của reovirut ở chim và phương
pháp phát hiện sự phối nhiễm với reovirut ở chim.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến reovirut ở chim nhóm 1 và nhóm 2.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Reovirut ở chim liên quan đến một số bệnh ở gia cầm, bao gồm hội chứng kém hấp thu và hội chứng còi cọc và chậm phát triển (runting and stunting syndrome - RSS), mặc dù vai trò của chúng dưới dạng tác nhân gây bệnh chính trong các hội chứng lâm sàng này không rõ ràng. Ngược lại, sự kết hợp của reovirut ở chim với các ca lâm sàng của viêm khớp/viêm bao gân virus khá rõ ràng, vì reovirut đã được phân lập từ gân của chim bị nhiễm. Có thể đạt được sự kiểm soát viêm khớp/viêm bao gân virus do reovirut gây ra bằng cách chủng ngừa gà giống gà giò bằng tổ hợp của vaccin sống và/hoặc đã bất hoạt với sự miễn dịch từ mẹ truyền cho con để bảo vệ sớm chống lại thử thách vùng. Ở gà giò, vaccin sống đã giảm độc lực có sẵn để sử dụng vào ngày trứng nở và để sử dụng trong trứng. Các chủng vaccin thương mại hiện nay (S1133, 1733, 2408, và 2177, chỉ mới kể tên một số) đã được sử dụng trong hàng thập kỷ để kiểm soát các bệnh có liên quan đến reovirut. Tuy nhiên, các chủng vaccin thương mại này được phân lập vào những năm 1960-1970 và không tạo ra sự bảo vệ chống lại các thể phân lập reovirut hiện đang lưu hành từ các ca viêm khớp/ viêm bao gân virus đã được xác nhận. Do đó, cần phải phân lập và xác định đặc điểm của reovirut ở chim hiện đang lưu hành và phát triển vaccin hữu hiệu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết nhu cầu nêu trên.

Sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1 và nhóm 2 khác biệt về mặt di truyền và về mặt huyết thanh được phân lập từ các ca lâm sàng của viêm khớp (VA)/viêm bao gân virus ở gà.

Sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1 được phân lập, trong đó reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:2 và/hoặc SEQ ID NO:4. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:2. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:4. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin SEQ ID NO:2. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin SEQ ID NO:4. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bị làm giảm độc lực, bị làm bất hoạt, hoặc bị giết chết. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1 được phân lập, trong đó reovirut ở chim nhóm 1 này bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:1 và/hoặc SEQ ID NO:3. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:1. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:3. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit SEQ ID NO:1. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit SEQ ID NO:3. Theo một số khía cạnh, reovirut ở

chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:4. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bị làm giảm độc lực, bị làm bất hoạt, hoặc bị giết chết. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 2 được phân lập, trong đó reovirut ở chim này nhóm 2 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bị làm giảm độc lực, bị làm bất hoạt, hoặc bị giết chết. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1 được phân lập, trong đó reovirut ở chim nhóm 1 này bao gồm gen S1 chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bao gồm gen S1 có trình tự nucleotit SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bị làm giảm độc lực, bị làm bất hoạt, hoặc bị giết chết. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1, trong đó reovirut ở chim nhóm 1 này bao gồm chủng reovirut ở chim 94594 và dẫn xuất và con cháu của chúng. Theo một số khía cạnh, chủng reovirut ở chim 94595 bị giết chết, bị làm bất hoạt hoặc bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 1, trong đó reovirut ở chim nhóm 1 này bao gồm chủng reovirut ở chim 94826 và dẫn xuất và con cháu của chúng. Theo một số khía cạnh, chủng 948264 bị giết chết, bị làm bất hoạt, hoặc bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất reovirut ở chim nhóm 2, trong đó reovirut ở chim này bao gồm chủng reovirut ở chim 96139 và dẫn xuất và con cháu của chúng. Theo một số khía cạnh, chủng reovirut ở chim 96139 bị giết chết, bị làm bất hoạt, hoặc bị làm giảm độc lực sau ít nhất là 25 lần chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào chủ.

Được bao gồm trong sáng chế là hợp phần bao gồm một hoặc nhiều reovirut ở chim như được mô tả trong bản mô tả này. Hợp phần này có thể còn bao gồm tá dược và/hoặc quyết định kháng nguyên từ một hoặc nhiều tác nhân gây bệnh khác lây nhiễm vào gia cầm.

Được bao gồm trong sáng chế là vaccin bao gồm một hoặc nhiều reovirut ở chim theo sáng chế, như được mô tả trong bản mô tả này. Vaccin này có thể còn bao gồm tá dược và/hoặc quyết định kháng nguyên từ một hoặc nhiều tác nhân gây bệnh khác lây nhiễm vào gia cầm.

Được bao gồm trong sáng chế là hợp phần miễn dịch để làm tăng kháng thể ở gia cầm bao gồm một hoặc nhiều reovirut ở chim được mô tả ở trên và trong bản mô tả này. Hợp phần này có thể còn bao gồm tá dược và/hoặc quyết định kháng nguyên từ một hoặc nhiều tác nhân gây bệnh khác lây nhiễm vào gia cầm.

Sáng chế đề xuất kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều reovirut ở chim được mô tả ở trên và trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng-reovirut ở gia cầm, phương pháp này bao gồm bước dùng reovirut ở chim được phân lập, hợp phần, hoặc vacxin theo sáng chế cho chim.

Sáng chế mô tả phương pháp bảo vệ chim thuộc bộ *Galliformes* chống lại bệnh lý hoặc bệnh gây ra bởi reovirut ở chim, phương pháp này bao gồm bước dùng reovirut ở chim được phân lập, hợp phần, hoặc vacxin theo sáng chế cho chim.

Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tính miễn cảm của chim thuộc bộ *Galliformes* chống lại bệnh lý hoặc bệnh gây ra bởi reovirut ở chim, phương pháp này bao gồm bước dùng reovirut ở chim được phân lập, hợp phần, hoặc vacxin theo sáng chế cho chim.

Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm viêm khớp và/hoặc viêm bao gân virus ở chim thuộc bộ *Galliformes*, phương pháp này bao gồm bước dùng reovirut ở chim được phân lập, hợp phần, hoặc vacxin theo sáng chế cho chim.

Sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa viêm khớp và/hoặc viêm bao gân virus ở chim thuộc bộ *Galliformes*, phương pháp này bao gồm bước dùng reovirut ở chim được phân lập, hợp phần, hoặc vacxin theo sáng chế cho chim.

Theo một số khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, chim bao gồm gà hoặc gà tây.

Theo một số khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, việc dùng bao gồm việc dùng trước hoặc sau khi trứng nở.

Theo một số khía cạnh của các phương pháp theo sáng chế, việc dùng bao gồm việc dùng trong trứng. Theo một số khía cạnh, việc dùng trong trứng bao gồm việc dùng vào khoảng 13 ngày, khoảng 14 ngày, khoảng 15 ngày, khoảng 16 ngày, khoảng 17 ngày, khoảng 18 ngày, khoảng 19 ngày, khoảng 20 ngày, hoặc khoảng thời gian bất kỳ của chúng.

Theo một số khía cạnh của các phương pháp theo sáng chế, việc dùng bao gồm việc dùng cho gà mái giống.

Sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết với reovirut ở chim nhóm 1 hoặc reovirut ở chim nhóm 2, như được mô tả trong bản mô tả này và không liên kết với chủng reovirut ở chim S1133, 1733, 2408, và/hoặc 2177. Theo một số khía cạnh, kháng thể là kháng thể đơn dòng.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut loài chim ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định rằng mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim có liên kết đặc hiệu với reovirut ở chim theo sáng chế, hoặc thành phần của chúng.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut loài chim ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định rằng mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim có liên kết đặc hiệu với protein C sigma của reovirut ở chim nhóm 1 hoặc reovirut ở chim nhóm 2 theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện tác nhân lây nhiễm reovirut ở chim trong mẫu, phương pháp này bao gồm bước phát hiện sự lai hóa của polynucleotit chứa SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, hoặc SEQ ID NO5, hoặc mảnh của chúng, với mẫu.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện reovirut ở chim trong mẫu, phương pháp này bao gồm bước sản xuất sản phẩm khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) có ít nhất là một đoạn mồi được tạo dẫn xuất từ SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, hoặc SEQ ID NO:5.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94594 (SEQ ID NO:1).

Hình 2. Trình tự axit amin S1 mã hóa cho C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94594 (SEQ ID NO:2).

Hình 3. Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94826 (SEQ ID NO:3).

Hình 4. Trình tự axit amin S1 mã hóa cho C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94826 (SEQ ID NO:4).

Hình 5. Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 2 96139 (SEQ ID NO:5).

Hình 6. Trình tự axit amin S1 mã hóa cho protein C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 2 96139 (SEQ ID NO:6).

Hình 7. Sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự của các trình tự axit amin C sigma bằng cách sử dụng Clustal W và tạo ra cây phát sinh loài với 1000 bản sao bootstrap. Độ tin cậy bootstrap được chỉ ra bằng số trên mỗi đốt cây.

Hình 8. Độ tương đồng và độ phân kỳ theo tỷ lệ phần trăm dựa trên sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự được tạo ra bằng cách sử dụng thuật toán Clustal W.

Hình 9. Số đo gan bàn chân trung bình theo milimét vào các ngày được chỉ ra trên trục X. Bắt đầu vào bảy ngày tuổi, quan sát thấy sự khác biệt đáng chú ý về kích thước của chim trong các nhóm đã bị thử thách S1133 và 94286 so với đối chứng âm. Độ lệch chuẩn được thể hiện bằng cột đối với mỗi nhóm.

Hình 10. Khối lượng cơ thể trung bình vào ngày kết thúc (14 ngày tuổi). Độ lệch chuẩn được thể hiện bằng cột đối với mỗi nhóm.

Hình 11. Lấy số đo trên gân cơ gấp ngón chân, ngay dưới khớp khuỷu chân sau, vào 10 ngày tuổi và lấy số đo lại vào ngày kết thúc, 14 ngày tuổi. Quan sát thấy sự sưng tấy rõ ràng trong nhóm bị thử thách 94286 vào 14 ngày. Độ lệch chuẩn được thể hiện bằng cột đối với mỗi nhóm.

Hình 12. Ghi nhận dấu hiệu lâm sàng vào ngày kết thúc. Lưu ý rằng, vào ngày 10 có 6 con chim bị loại bỏ khỏi nhóm S1133 do bị què quặt và không có khả năng lấy được thức ăn hoặc nước uống.

Hình 13. Khối lượng cơ thể trung bình theo gam khi kết thúc nghiên cứu (23 ngày tuổi). Độ lệch chuẩn được thể hiện bằng đường có mũ.

Hình 14. Lấy số đo gan bàn chân trung bình theo milimét vào 12, 14, 16, 19, 21, và 23 ngày tuổi. Lấy số đo lần thứ nhất vào 12 ngày tuổi, ngay trước khi thử thách.

Hình 15. Lấy số đo khuỷu chân sau trung bình theo milimét vào 19, 21, và 23 ngày tuổi. Lấy số đo khuỷu chân sau 1 ở khớp khuỷu chân sau và lấy số đo khuỷu chân sau 2 trên gân cơ gấp ngón chân ngay dưới khớp khuỷu chân sau.

Hình 16. Dấu hiệu lâm sàng và thương tổn vào ngày kết thúc (23 ngày).

Hình 17. Huyết thanh ngày trứng nở.

Hình 18. Khối lượng cơ thể ở chim bị thử thách nhóm 2.

Hình 19. Số đo mức độ sưng tấy gan bàn chân ngày 14 dưới dạng tỷ lệ phần trăm của khối lượng cơ thể đối với chim bị thử thách nhóm 2.

Hình 20. Số đo mức độ sưng tấy gân dưới dạng tỷ lệ phần trăm của khối lượng cơ thể đối với chim bị thử thách nhóm 2.

Hình 21. Mã số truy cập GenBank đối với các thể phân lập nhóm 1 và nhóm 2. Các mục được tô màu xám thể hiện reovirus ở chim nhóm 2. Tất cả các mục khác thể hiện reovirus nhóm 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong sáng chế, hai nhóm phân biệt về mặt di truyền và về mặt huyết thanh của reovirus ở chim đã được phân lập từ các ca lâm sàng của viêm khớp (VA)/viêm bao gân virus từ khắp Hoa Kỳ và Canada. Phân tích di truyền của protein C sigma reovirus ở chim phát hiện ra các kiểu di truyền nhóm 1 và nhóm 2 mới không liên quan đến các chủng vaccin reovirus ở chim hiện nay. Đánh giá huyết thanh của virus phát hiện ra có ít hoặc không có sự trung hòa chéo với kháng huyết thanh đã biết đối với vaccin reovirus thương mại hiện hành. Ngoài ra, các nghiên cứu về khả năng gây bệnh và sự bảo vệ con xác nhận rằng vaccin thương mại hiện hành không tạo ra sự bảo vệ đủ ở con từ gà mái giống đã được chủng ngừa. Các chủng vaccin reovirus hiện hành được phân lập trong những năm 1960-1970 và không tạo ra sự bảo vệ chống lại các thể phân lập reovirus hiện đang lưu hành từ các ca viêm khớp/viêm bao gân virus đã được xác nhận.

Reovirus ở chim, cùng với reovirus ở động vật có vú, bao gồm chi *Orthoreovirus* trong họ *Reoviridae*. Các virus này chứa 10 đoạn hệ gen dsARN được bọc trong capsit

kép hai mươi mặt, không có vỏ xấp xỉ 80 nm. Các đoạn hệ gen này có thể được tách ra dựa trên sự di động điện di thành ba đoạn lớn (L1, L2, L3), ba đoạn vừa (M1, M2, M3) và bốn đoạn nhỏ (S1, S2, S3, S4) mà lần lượt mã hóa cho các protein $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, μNS , $\sigma 3$, $\sigma 1$, $\sigma 2$, σNS . Protein $\sigma 2$ là protein capsit phía ngoài mà mang epitop trung hòa đặc hiệu nhóm. Nó cũng liên kết ARN sợi kép và đã được xác định là kim loại protein kẽm. Protein C sigma, protein capsit phía ngoài nhỏ được mã hóa bởi đoạn $\sigma 1$, là đích để xác định đặc điểm phân tử của reovirut ở chim và chịu trách nhiệm về sự gắn tế bào, cũng như là, sự cảm ứng của kháng thể trung hòa loại cụ thể.

Hạt virut reovirut ở chim bao gồm capsit, lõi, và phức hệ nucleoprotein. Capsit virut này không có vỏ bọc. Capsit/nucleocapsit đẳng cự với sự đối xứng hai mươi mặt và có đường kính bằng khoảng 80-82 nm. Vỏ capsit của hạt virut gồm hai lớp. Thường thì có mặt tất cả các vỏ, hoặc vỏ phía ngoài bị mất đi trong quá trình tạo ra. Capsit có hình tròn. Cấu trúc bề mặt capsit thể hiện mô hình đều đặn với các đặc điểm khác biệt. Sự sắp xếp capsome có thể nhìn thấy rõ ràng. Không có chỗ lõm ra trên bề mặt. Lõi capsit phía trong có đường kính bằng khoảng 60 nm. Chế phẩm virut chứa một thành phần hạt. Lõi có hình cầu và chứa hệ gen dsARN với đường kính bằng khoảng 49 nm. Các đầu của sợi nhô ra gần như là qua tới bề mặt capsit.

Ở chủng vaccin reovirut ở chim S1133, bản phiên mã mARN s1 dài 1644 nucleotit và chứa ba xistron lệch pha và gộp một phần. Xistron thứ nhất (ORF-1, các nucleotit 25–319) biểu hiện p10, xistron thứ hai (ORF-2, các nucleotit 293–731) biểu hiện p17 và xistron thứ ba (ORF-3, các nucleotit 630–1608) biểu hiện protein C gắn tế bào.

Phân tích các trình tự axit amin C sigma của các chủng vaccin reovirut S1133, 1733, 2408 và 2177 thể hiện độ tương tự >99% giữa các chủng vaccin này. Việc xác định đặc điểm kiểu gen của thể phân lập vùng reovirut bao gồm việc so sánh của các thể phân lập vùng với các chủng vaccin, cũng như là, tất cả các trình tự reovirut có sẵn trong cơ sở dữ liệu miễn và PDRC công khai. Độ tương tự của kiểu gen được báo cáo đối với thể phân lập vùng dưới dạng độ tương tự theo tỷ lệ phần trăm cao nhất với trình tự khác mà là thể phân lập vùng hoặc chủng vaccin.

Trong sáng chế, hai nhóm phân biệt về mặt di truyền và về mặt huyết thanh của reovirut ở chim đã được phân lập từ các ca lâm sàng của viêm bao gân. Phân tích di truyền của protein C sigma reovirut ở chim phát hiện ra các kiểu di truyền mới không liên quan đến các chủng vaccin reovirut ở chim hiện nay. Đánh giá huyết thanh của virut phát hiện ra có ít hoặc không có sự trung hòa chéo với kháng huyết thanh đã biết đối với vaccin reovirut thương mại hiện hành. Ngoài ra, các nghiên cứu về khả năng gây bệnh và sự bảo vệ con đã được thực hiện để xác nhận rằng vaccin thương mại hiện hành không tạo ra sự bảo vệ đủ ở con từ gà mái giống đã được chủng ngừa.

Hai nhóm di truyền/huyết thanh của thể phân lập vùng được mô tả trong bản mô tả này được gọi là biến thể 2012 VA nhóm 1 (trong bản mô tả này còn được gọi là “reovirut ở chim nhóm 1”) và biến thể 2012 VA nhóm 2 (trong bản mô tả này còn được gọi là “reovirut ở chim nhóm 2”). Reovirut từ biến thể 2012 VA nhóm 1 và/hoặc biến thể 2012 VA nhóm 2 có thể được sử dụng trong vaccin sống bị làm giảm độc lực và bị giết chết/bị làm bất hoạt. Theo một số khía cạnh, vaccin này có thể là vaccin tự sinh.

Reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:2. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin là SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 như được mô tả trong bản mô tả này có protein C sigma có ít nhất là một cái biến thể đối với SEQ ID NO:2.

Reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:4. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin là SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 như được mô tả trong bản mô tả này có protein C sigma có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:4.

Reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:1. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 như được mô tả trong bản mô tả này có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:1.

Reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương

đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:3. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 như được mô tả trong bản mô tả này có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 là một trong số các reovirut ở chim được thể hiện trên Bảng 21, hoặc con cháu hoặc dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 là reovirut ở chim CK/945494/Gân/ GA/2012 (trong bản mô tả này còn được gọi là “thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94594,” hoặc “94594”), hoặc con cháu hoặc dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 là reovirut ở chim CK/94826/Gân/ GA/2012 (trong bản mô tả này còn được gọi là “thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94826,” hoặc “94826”), hoặc con cháu hoặc dẫn xuất của chúng.

Reovirut ở chim nhóm 2 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 theo sáng chế có thể có protein C sigma có trình tự axit amin là SEQ ID NO:6. Theo một số phương án,

reovirut ở chim nhóm 2 như được mô tả ở trên có protein C sigma có ít nhất là một cái biến thể đối với SEQ ID NO: 6.

Reovirut ở chim nhóm 2 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 theo sáng chế có thể có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 1 như được mô tả trong bản mô tả này có protein C sigma được mã hóa bởi trình tự nucleotit có ít nhất là một cái biến thể đối với SEQ ID NO:5.

Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 2 là một trong số các reovirut ở chim được thể hiện trên Bảng 21, hoặc con cháu hoặc dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, reovirut ở chim nhóm 2 là reovirut ở chim CK/96139/Gân/ GA/2012 (trong bản mô tả này còn được gọi là “thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 2 96139,” hoặc “96139”), hoặc con cháu hoặc dẫn xuất của chúng.

Reovirut ở chim như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc dòng tế bào bị nhiễm virus này, có thể được nộp lưu vào Bảo Tàng Giống Chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Sự nộp lưu này có thể là theo Hiệp Ước Budapest về Sự công nhận Quốc tế đối với việc Nộp lưu Chung vi sinh nhằm các mục đích trong thủ tục về sáng chế.

Reovirut ở chim theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp thông thường, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong phần ví dụ trong bản mô tả này. Nói tóm tắt, chất nền có thể hỗ trợ cho sự sao chép của reovirut ở chim được chủng ngừa bằng reovirut ở chim theo sáng chế và nhân giống cho đến khi virus được sao chép đến độ chuẩn lây

nhuộm mong muốn, hoặc hàm lượng khối kháng nguyên mong muốn. Sau đó thu lấy nguyên liệu chứa reovirut. Chất nền thích hợp có thể bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào (chim) sơ cấp, chẳng hạn như, ví dụ, tế bào gan phôi gà, nguyên bào sợi phôi gà, hoặc tế bào thận gà, các dòng tế bào động vật có vú, chẳng hạn như, ví dụ, dòng tế bào VERO hoặc dòng tế bào BGM-70, hoặc dòng tế bào chim, chẳng hạn như, ví dụ, QT-35, QM-7 hoặc LMH. Trong một số ứng dụng, có thể sử dụng trứng đã thụ tinh.

Sáng chế bao gồm phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut loài chim nhóm 1 và/hoặc nhóm 2 ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định xem có hay không việc mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim liên kết đặc hiệu với virut, dòng tế bào, viên tế bào, dịch nổi bề mặt, và/hoặc polypeptit theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều reovirut ở chim theo sáng chế trong phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut loài chim ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định rằng mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim có liên kết đặc hiệu với reovirut ở chim theo sáng chế. Reovirut ở chim này bao gồm, reovirut ở chim bất kỳ trong số các reovirut ở chim được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở chủng reovirut ở chim bất kỳ được liệt kê trên Hình 21, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các chủng reovirut ở chim 94594, 94826, hoặc 96139. Reovirut ở chim này có thể là bị làm bất hoạt, bị giết chết, và/hoặc được làm đông khô. Sáng chế còn bao gồm bộ kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều reovirut ở chim theo sáng chế. Bộ kit này có thể bao gồm dưới dạng thành phần bổ sung, chẳng hạn như ví dụ, virut đối chứng dương, virut đối chứng âm, kháng thể thứ cấp, và/hoặc chất đánh dấu phát hiện được.

Sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít

nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, và/hoặc SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin là SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, và/hoặc SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, và/hoặc SEQ ID NO:6.

Sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 96%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 97%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, và/hoặc SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, và/hoặc SEQ ID NO:5. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm polypeptit C sigma được phân lập có trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, và/hoặc SEQ ID NO:5.

Sáng chế bao gồm các polypeptit như được mô tả trong bản mô tả này, dạng cắt cụt và mảnh của chúng. Dạng cắt cụt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các trình tự axit amin trong đó một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười axit amin, hoặc nhiều hơn thế bị loại bỏ khỏi đầu tận cùng amin của trình tự axit amin và/hoặc một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười axit amin, hoặc nhiều hơn thế bị loại bỏ khỏi đầu tận cùng carboxy của trình tự axit amin.

Các mảnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, mảnh có khoảng 5, khoảng 10, khoảng 15, khoảng 20, khoảng 25, khoảng 50, khoảng 75, khoảng 100, khoảng

150, khoảng 200, khoảng 250, khoảng 300, khoảng 350, khoảng 400, khoảng 450, khoảng 500, khoảng 550, khoảng 600, khoảng 650, và khoảng 700 gốc axit amin liên tiếp của trình tự được mô tả trong bản mô tả này. Các mảnh còn bao gồm, ví dụ, mảnh có giới hạn kích thước của dạng kết hợp bất kỳ của các kích thước mảnh nêu trên. Các mảnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, mảnh có ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 15, ít nhất là 20, ít nhất là 25, ít nhất là 50, ít nhất là 75, ít nhất là 100, ít nhất là 150, ít nhất là 200, ít nhất là 250, ít nhất là 300, ít nhất là 350, ít nhất là 400, ít nhất là 450, ít nhất là 500, ít nhất là 550, ít nhất là 600, ít nhất là 650, và ít nhất là 700 gốc axit amin liên tiếp của trình tự được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế bao gồm các polypeptit có trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bảy, mười tám, mười chín, hai mươi sự thay đổi axit amin, hoặc nhiều hơn thế so với trình tự axit amin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc mảnh của chúng. Sự thay đổi axit amin này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự thay đổi axit amin bảo toàn.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế trong phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirus loài chim ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định rằng mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim có liên kết đặc hiệu với polypeptit theo sáng chế. Các polypeptit này bao gồm, polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, và SEQ ID NO:6, và dẫn xuất và mảnh của chúng. Sáng chế còn bao gồm bộ kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế. Bộ kit này có thể bao gồm dưới dạng thành phần bổ sung, chẳng hạn như ví dụ, polypeptit đối chứng dương, polypeptit đối chứng âm, kháng thể thứ cấp, chất đánh dấu phát hiện được.

Sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ

tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, hoặc SEQ ID NO:5. Sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập có SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, hoặc SEQ ID NO:5, dạng cắt cụt, hoặc mảnh của chúng. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này có ít nhất là một ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, hoặc SEQ ID NO:5.

Sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 50%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 55%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 60%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 65%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 70%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 75%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 85%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 98%, hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với trình tự nucleotit mã hóa cho SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, hoặc SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập có SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, hoặc SEQ ID NO:6. Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này mã hóa cho trình tự axit amin có ít nhất là một cải biến thể đối với SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, hoặc SEQ ID NO:6.

Sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit mà lai hóa với trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này trong các điều kiện khác nhau, và mảnh của chúng. Điều kiện nghiêm ngặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, độ nghiêm ngặt trung bình và độ nghiêm ngặt cao. Điều kiện lai hóa nghiêm ngặt cao có thể là, ví dụ, 6X SSC, 5X Denhardt, natri dodecyl sulfat 0,5% (SDS), và 100 ug/ml ADN tinh trùng cá hồi đã được biến tính và được phân mảnh được lai hóa qua đêm ở nhiệt độ 65°C và được rửa trong 2X SSC, SDS 0,1% ít nhất là một lần ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian

khoảng 10 phút sau đó là ít nhất là một lần rửa ở nhiệt độ 65°C trong thời gian khoảng 15 phút sau đó là ít nhất là một lần rửa trong 0,2X SSC, SDS 0,1% ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất là từ 3 đến 5 phút.

Sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này có sự thể ở một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, hai mươi nucleotit, hoặc nhiều hơn thế. Sáng chế còn bao gồm trình tự polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này, trong đó việc sử dụng bộ ba mã hóa được làm cho thích ứng để tối ưu hóa sự biểu hiện trong tế bào chủ nhất định. Ví dụ, việc sử dụng bộ ba mã hóa có thể được làm cho thích ứng để tối ưu hóa sự biểu hiện trong tế bào chủ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào baculovirut, tế bào nấm men, tế bào *E. coli*, tế bào gia cầm, hoặc tế bào người. Có thể thực hiện việc làm cho thích nghi này bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực.

Sáng chế bao gồm đoạn môi, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn môi bất kỳ trong số các đoạn môi được mô tả trong bản mô tả này, và đoạn môi mà có thể được sử dụng để tạo ra trình tự được mô tả trong bản mô tả này, hoặc mảnh của chúng, trong phản ứng PCR. Theo một số phương án, đoạn môi có thể bao gồm ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 15, ít nhất là 20, ít nhất là 25, ít nhất là 30, ít nhất là 35, hoặc ít nhất là 40 gốc nucleotit. Theo một số phương án, đoạn môi có thể bao gồm không nhiều hơn 10, không nhiều hơn 15, không nhiều hơn 20, không nhiều hơn 25, không nhiều hơn 30, không nhiều hơn 35, không nhiều hơn 40, không nhiều hơn 45, không nhiều hơn 50, không nhiều hơn 55, hoặc không nhiều hơn 60 gốc nucleotit. Các gốc nucleotit này có thể là trình tự liên tục hoặc thể bổ sung của nó. Cũng được bao gồm trong sáng chế là cặp đoạn môi bao gồm ít nhất là một trong số các đoạn môi được mô tả trong bản mô tả này, thể bổ sung của chúng, hoặc đoạn môi được tạo dẫn xuất từ trình tự này. Cũng được bao gồm trong sáng chế là sản phẩm khuếch đại được sản xuất bằng các đoạn môi này.

Sáng chế bao gồm vật truyền chứa trình tự polynucleotit theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, vật truyền là vật truyền vaccin. Sáng chế bao gồm polypeptit được phân lập được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều trình tự polynucleotit theo sáng chế trong phương pháp phát hiện tác nhân lây nhiễm reovirut ở chim trong mẫu. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, các phương pháp mà bao gồm bước phát hiện sự lai hóa của trình tự polynucleotit theo sáng chế với mẫu và các phương pháp mà bao gồm bước sản xuất sản phẩm khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) bằng ít nhất là một đoạn mồi được tạo dẫn xuất từ trình tự polynucleotit theo sáng chế. Trình tự polynucleotit này bao gồm, trình tự polynucleotit bất kỳ trong số các trình tự polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, và SEQ ID NO:5. Sáng chế còn bao gồm bộ kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều trình tự polynucleotit theo sáng chế. Sáng chế bao gồm bộ kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều virus, dòng tế bào, viên tế bào, dịch nổi bề mặt, trình tự polynucleotit, vật truyền, và/hoặc polypeptit theo sáng chế.

Reovirut ở chim như được mô tả trong bản mô tả này có thể là virus đã bị làm bất hoạt hoặc bị giết chết. Mục đích của việc làm bất hoạt virus là để ngăn chặn virus sao chép, và nhìn chung, có thể đạt được điều này bằng các phương pháp hóa học hoặc vật lý. Có thể thực hiện sự bất hoạt hóa học bằng cách xử lý virus bằng, ví dụ, enzym, formaldehyt, β -propiolacton, etylen-imin hoặc dẫn xuất của chúng. Có thể thực hiện sự bất hoạt vật lý, ví dụ, bằng cách đưa virus vào bức xạ năng lượng cao, chẳng hạn như tia UV.

Reovirut ở chim như được mô tả trong bản mô tả này có thể chứng tỏ độc lực giảm và thích hợp làm virus sống bị làm giảm độc lực nhằm mục đích chủng ngừa. Có thể đạt được sự giảm độc lực của reovirut ở chim hữu dụng trong việc thực hành sáng chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực nhằm đạt được mục đích này. Ví dụ, reovirut ở chim được phân lập theo sáng chế có thể bị làm giảm độc lực bằng cách chuyển trong trứng gà đã thụ tinh, động vật sống hoặc các dòng tế bào thích hợp. Các dòng tế bào này có thể bao gồm, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào (chim) sơ cấp, chẳng hạn như, ví dụ, tế bào gan phôi gà, nguyên bào sợi phôi gà, hoặc tế bào thận gà, các dòng tế bào động vật có vú, chẳng hạn như, ví dụ, dòng tế bào VERO hoặc dòng tế bào BGM-70, hoặc dòng tế bào chim, chẳng hạn như, ví dụ, QT-35, QM-7 hoặc LMH. Virus đã được chuyển trở lại này có thể thu được, ví dụ, bằng từ khoảng 10 đến khoảng

100 lần chuyển. Virut đã được chuyển trở lại này có thể thu được, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần chuyển trở lại, hai hoặc nhiều lần chuyển trở lại, ba hoặc nhiều lần chuyển trở lại, bốn hoặc nhiều lần chuyển trở lại, năm hoặc nhiều lần chuyển trở lại, mười hoặc nhiều lần chuyển trở lại, mười lăm hoặc nhiều lần chuyển trở lại, hai mươi hoặc nhiều lần chuyển trở lại, hai mươi lăm hoặc nhiều lần chuyển trở lại, năm mươi hoặc nhiều lần chuyển, bảy mươi lăm hoặc nhiều lần chuyển, hoặc một trăm hoặc nhiều lần chuyển. Virut đã được chuyển trở lại này có thể thu được, ví dụ, bằng khoảng một lần chuyển trở lại, khoảng hai lần chuyển trở lại, khoảng ba lần chuyển trở lại, khoảng bốn lần chuyển trở lại, khoảng năm lần chuyển trở lại, khoảng mười lần chuyển trở lại, khoảng mười lăm lần chuyển trở lại, khoảng hai mươi lần chuyển trở lại, khoảng hai mươi lăm lần chuyển trở lại, khoảng năm mươi lần chuyển, khoảng bảy mươi lăm, khoảng một trăm lần chuyển, hoặc khoảng giới hạn bất kỳ của chúng.

Ví dụ, sáng chế bao gồm reovirut ở chim bị làm giảm độc lực bằng cách chuyển trong nguyên bào sợi phôi gà sơ cấp sau đó tinh chế mỏng. Quy trình này có thể được lặp lại, ví dụ, từ khoảng 10 đến khoảng 100 lần, để làm giảm độc lực virut. Có thể thực hiện thử nghiệm khả năng gây bệnh vào các thời điểm khác nhau, ví dụ, vào lần chuyển 25, vào lần chuyển 50, vào lần chuyển 75, vào lần chuyển 100, và vào các thời điểm khác.

Sáng chế bao gồm phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng-reovirut ở chim nhóm 1 và/hoặc nhóm 2 ở gia cầm, phương pháp này bao gồm bước dùng virut được phân lập, dòng tế bào, viên tế bào, dịch nổi bề mặt, trình tự polynucleotit, vật truyền, và/hoặc polypeptit theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, sự miễn dịch bao gồm sự miễn dịch thể dịch và/hoặc tế bào. Theo một số khía cạnh, sự miễn dịch bao gồm sự miễn dịch niêm mạc.

Sáng chế bao gồm phương pháp ngăn chặn sự lây nhiễm reovirut ở chim ở gia cầm, phương pháp này bao gồm bước dùng hợp phần chứa virut được phân lập, dòng tế bào, viên tế bào, dịch nổi bề mặt, trình tự polynucleotit, vật truyền, và/hoặc polypeptit theo sáng chế.

Theo một số khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, việc dùng bao gồm tiêm, xịt, dùng qua đường miệng, hoặc dùng qua đường hô hấp. Theo một số khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, việc dùng gây ra sự miễn dịch niêm mạc. Theo một số khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, việc dùng bao gồm việc dùng trong trứng. Theo một số khía cạnh, việc dùng trong trứng bao gồm việc dùng vào khoảng 13 ngày, khoảng 14 ngày, khoảng 15 ngày, khoảng 16 ngày, khoảng 17 ngày, khoảng 18 ngày, khoảng 19 ngày, khoảng 20 ngày, hoặc khoảng thời gian bất kỳ của chúng.

Sáng chế bao gồm hợp phần gây miễn dịch và vacxin bao gồm một hoặc nhiều virut được phân lập, trình tự polynucleotit, vật truyền, và/hoặc các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, virut là virut sống. Theo một số phương án, virut bị làm giảm độc lực hoặc bị làm bất hoạt. Theo một số phương án, virut bị làm bất hoạt hoặc bị giết chết. Theo một số phương án, virut, hợp phần, hoặc vacxin được làm đông khô. Theo một số phương án, virut, hợp phần, hoặc vacxin được kết đông.

Hợp phần và vacxin này có thể được dùng dưới dạng thành phần hoạt tính để gây miễn dịch chim để gây ra đáp ứng miễn dịch đối với reovirut ở chim nhóm 1 và/hoặc nhóm 2 và/hoặc gây ra sự miễn dịch chống lại reovirut ở chim này. Sự miễn dịch có thể bao gồm việc gây ra sự bảo vệ ở mức độ cao hơn trong quần thể chim sau khi chủng ngừa so với nhóm không được chủng ngừa. Đáp ứng miễn dịch có thể mang lại, hoặc có thể không mang lại, sự miễn dịch bảo vệ. Đáp ứng miễn dịch có thể, ví dụ, bao gồm một hoặc nhiều đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, mà bao gồm sự sản xuất tế bào lympho trong đáp ứng với sự phơi nhiễm với kháng nguyên và/hoặc đáp ứng miễn dịch thể dịch, mà bao gồm sự sản xuất tế bào lympho huyết tương (tế bào B) trong đáp ứng với sự phơi nhiễm kháng nguyên với sự sản xuất kháng thể tiếp theo. Sự tạo miễn dịch có thể dẫn đến sự giảm, sự ức chế, hoặc sự ngăn chặn một hoặc nhiều triệu chứng của viêm khớp (VA)/viêm bao gân virut có liên quan đến reovirut ở chim. Các triệu chứng này có thể bao gồm một hoặc nhiều triệu chứng trong số sự sụt giảm khối lượng cơ thể, sự giảm sản xuất trứng, tỷ lệ chết, thương tổn vĩ mô (bao gồm, nhưng không giới hạn ở sự sưng tấy gân, viêm bao gân, đứt gân, và chứng tràn dịch

màng ngoài tim), và sự thay đổi mô (bao gồm, nhưng không giới hạn ở viêm bao gân tế bào lympho, viêm màng ngoài tim tạng tế bào lympho, và viêm cơ tim tế bào lympho).

Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều hợp chất có hoạt tính tá dược. Hợp chất hoặc hợp phần thích hợp cho mục đích này bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm oxit, dầu thực vật, dầu động vật, nhũ tương dầu trong nước hoặc nước trong dầu dựa trên, ví dụ dầu khoáng, chẳng hạn như Bayol F™ hoặc Marcol 52™, tá dược Freund hoàn chỉnh, tá dược Freund không hoàn chỉnh, hoặc dầu thực vật chẳng hạn như vitamin E axetat, và saponin.

Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều chất mang hoặc chất pha loãng được dụng thích hợp. Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định. Chất làm ổn định thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm carbohydrat chẳng hạn như sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, dextrin, hoặc glucoza; các protein chẳng hạn như albumin hoặc casein; và chất đệm chẳng hạn như phosphat kim loại kiềm và chất tương tự. Chất làm ổn định đặc biệt có lợi khi chế phẩm vaccin khô được điều chế bằng cách làm đông khô.

Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất kháng nguyên được tạo dẫn xuất từ tác nhân gây bệnh khác lây nhiễm vào gia cầm. Chất kháng nguyên này có thể là được tạo dẫn xuất từ, ví dụ, virus gây bệnh Marek (MDV), virus gây viêm phế quản truyền nhiễm (IBV), virus gây bệnh Newcastle (NDV), virus gây hội chứng giảm đẻ (EDS), virus gây bệnh viêm mũi-khí quản ở gà tây (TRTV), poxvirus, reovirus, parvovirus ở gà, và virus viêm thận gà (bao gồm, nhưng không giới hạn ở ANV-1 và ANV-2).

Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế có thể được dùng bằng phương pháp đã biết thích hợp bất kỳ để chủng ngừa gia cầm bao gồm qua mũi, qua mắt, bằng cách tiêm, trong nước uống, trong thức ăn, bằng cách phơi nhiễm, *trong trứng*, từ mẹ, bằng cách xông qua đường hô hấp, và phương pháp tương tự. Hợp phần gây miễn dịch hoặc vaccin có thể được dùng bằng các kỹ thuật dùng khối lượng chẳng hạn như bằng cách đặt vaccin trong nước uống hoặc bằng cách xịt môi trường. Khi

được dùng bằng cách tiêm, hợp phần gây miễn dịch hoặc vacxin có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, việc dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, hoặc trong màng bụng.

Theo một số phương án, vacxin sống có thể được dùng ở liều lượng không nhỏ hơn 10^2 đơn vị chuẩn độ (trong đó đơn vị chuẩn độ được xác định trong Mục 9, Phần 113.332, Bộ Pháp Điển Các Quy Định Liên Bang) cho mỗi con chim, và vacxin bị làm bất hoạt có thể chứa đương lượng kháng nguyên bằng 10^4 - 10^{10} TCID₅₀ cho mỗi con chim (trong đó TCID là chữ viết tắt của Liều Gây Nhiễm Nuôi Cây Mô).

Hợp phần và vacxin theo sáng chế có thể về cơ bản là tinh khiết. Như được dùng trong bản mô tả này, "về cơ bản là tinh khiết" có nghĩa là nguyên liệu về bản chất không chứa các đại phân tử tương tự bất kỳ hoặc các thực thể sinh học khác mà thường liên kết với nó trong tự nhiên.

Hợp phần và vacxin theo sáng chế có thể được dùng cho chim thuộc loài bất kỳ trong số các loài chim mà dễ mắc lây nhiễm bởi reovirut ở chim, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gia cầm, chim thuộc bộ *Galliformes*, và các loài chim ngoại lai. Chim thuộc bộ *Galliformes* bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gà, gà tây, gà gô trắng, chim cút, và gà lôi. Như được dùng trong bản mô tả này, gia cầm bao gồm chim đã thuần hóa mà được giữ lại nhằm mục đích lấy trứng, hoặc giết để lấy thịt và/hoặc lông. Thông thường nhất là thành viên của liên bộ *Galloanserae* (gia cầm), cụ thể là bộ *Galliformes* (mà bao gồm, ví dụ, gà, chim cút, gà tây, và gà gô trắng) và họ *Anatidae* (trong bộ *Anseriformes*), thường được biết đến là "chim nước" (bao gồm, ví dụ, vịt, ngỗng, và thiên nga). Gia cầm có thể còn bao gồm các chim khác để giết lấy thịt, chẳng hạn như chim cu hoặc chim bồ câu hoặc chim để thi đấu, như gà lôi. Gà bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gà mái, gà trống nhà, gà giò, gà đẻ nướng, gà đẻ trứng, gà giống, con cháu của gà mái giống, và gà đẻ trứng. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dễ mắc" dùng để chỉ khả năng có thể xảy ra hoặc thực tế của việc đáp ứng bất lợi với vi sinh vật tham chiếu, chẳng hạn như, ví dụ, sức khỏe suy giảm hoặc không lớn, khi so với cá thể hoặc nhóm không dễ mắc, và/hoặc một hoặc nhiều tình trạng bệnh lý biểu thị sự nhiễm virut ở chim.

Vacxin theo sáng chế có thể được dùng cho gia cầm trước hoặc sau khi trứng nở. Gia cầm có thể tiếp nhận vacxin ở các lứa tuổi khác nhau. Ví dụ, gà giò có thể được chủng ngừa trong trứng, vào một ngày tuổi, hoặc vào 2-3 tuần tuổi. Vật nuôi thời kỳ đẻ trứng hoặc vật nuôi sinh sản có thể được chủng ngừa, ví dụ, vào khoảng 6-12 tuần tuổi và được tăng cường vào khoảng 16-20 tuần tuổi. Vật nuôi thời kỳ đẻ trứng hoặc vật nuôi sinh sản này có thể được chủng ngừa vào khoảng 6, vào khoảng 7, vào khoảng 8, vào khoảng 9, vào khoảng 10, vào khoảng 11, hoặc vào khoảng 12 tuần tuổi. Vật nuôi thời kỳ đẻ trứng hoặc vật nuôi sinh sản này có thể được tăng cường vào khoảng 16, vào khoảng 17, vào khoảng 18, vào khoảng 19, hoặc vào khoảng 20 tuần tuổi. Con cháu của vật nuôi thời kỳ đẻ trứng hoặc vật nuôi sinh sản này có thể chứng tỏ độ chuẩn kháng thể với polypeptit như được mô tả trong bản mô tả này, mà có thể ngăn chặn hoặc làm giảm nhẹ triệu chứng của sự lây nhiễm reovirut ở chim ở con cháu. Sự chủng ngừa trong trứng có thể diễn ra, ví dụ, vào khoảng 13 ngày, khoảng 14 ngày, khoảng 15 ngày, khoảng 16 ngày, khoảng 17 ngày, khoảng 18 ngày, khoảng 19 ngày, khoảng 20 ngày, hoặc vào khoảng giới hạn bất kỳ của chúng.

Gà có thể được chủng ngừa ở độ tuổi thích hợp bất kỳ, và thường là khoảng từ một đến ba ngày tuổi trước khi chủng ngừa lần đầu. Gà có thể được chủng ngừa chỉ một lần. Hoặc, nếu sử dụng hai liều vacxin, liều thứ nhất được dùng, ví dụ, khi gà từ 3 ngày đến một tuần tuổi và tiếp đó là sau 1-10 tuần nữa.

Nhiều liều hợp phần có thể được dùng trong suốt đời sống của gà. Khi sự miễn dịch từ mẹ là nguồn cơ bản để tạo ra sự bảo vệ cho con cháu gà giò, gà giống thường được chủng ngừa, mặc dù gà giò có thể được chủng ngừa nếu muốn.

Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng huyết thanh và kháng thể mà liên kết với reovirut ở chim nhóm 1 và/hoặc reovirut ở chim nhóm 2. Theo một số khía cạnh, kháng huyết thanh hoặc kháng thể không phải là các chủng vacxin thương mại hiện hành của reovirut ở chim, chẳng hạn như, ví dụ, chủng reovirut ở chim S1133, 1733, 2408, và/hoặc 2177. Các kháng thể hữu dụng để thực hành sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể được làm cho giống người, kháng thể khảm, hoặc mảnh của chúng, còn bao gồm kháng thể đặc hiệu

kép, kháng thể tổng hợp, mảnh kháng thể, chẳng hạn như mảnh Fab, Fv, F(ab)₂, hoặc scFv, kháng thể chuỗi đơn, hoặc dẫn xuất được cải biến hóa học của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này. Kháng thể này có thể được sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và bộ kit chẩn đoán. Theo một số khía cạnh, kháng thể kháng reovirut ở chim có thể được gắn vào chất nền rắn.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện và/hoặc đo hàm lượng của reovirut ở chim nhóm 1 hoặc nhóm 2 trong mẫu thu được từ chim. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 1 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở protein C sigma có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số khía cạnh, reovirut ở chim nhóm 2 bao gồm protein C sigma có trình tự axit amin như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở protein C sigma có SEQ ID NO:6, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng. Phương pháp này có thể bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với kháng thể mà liên kết chọn lọc với reovirut ở chim như được mô tả trong bản mô tả này và/hoặc protein C sigma như được mô tả trong bản mô tả này và đo hàm lượng của sự liên kết của kháng thể đối với virut hoặc protein trong mẫu. Mẫu có thể là nguyên liệu sinh học bất kỳ, chẳng hạn như mô, xương, máu, nước tiểu hoặc phân. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế hữu dụng, ví dụ, để xác định xem gia cầm có bị nhiễm reovirut ở chim theo sáng chế hay không. Các con vật bị lây nhiễm có thể bị giết chết để ngăn chặn sự lan rộng của reovirut sang các con vật khác.

Như được dùng trong bản mô tả này, "được phân lập" dùng để chỉ nguyên liệu được lấy ra khỏi môi trường gốc của nó (ví dụ, môi trường tự nhiên nếu nó có trong tự nhiên), và do đó được thay đổi "bởi bàn tay con người" từ trạng thái tự nhiên của nó.

Thuật ngữ "và/hoặc" dùng để chỉ một hoặc tất cả các phần tử được liệt kê hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều phần tử được liệt kê bất kỳ.

Các từ "được ưu tiên" và "tốt hơn là" dùng để chỉ các phương án của sáng chế mà có thể mang lại các lợi ích nhất định, trong các trường hợp nhất định. Tuy nhiên, các phương án cũng có thể được ưu tiên, trong cùng trường hợp hoặc trong trường hợp khác. Ngoài ra, việc chỉ ra một hoặc nhiều phương án được ưu tiên không ngụ ý rằng

các phương án khác không hữu dụng, và không nhằm loại trừ các phương án khác ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ "chứa" và các biến thể của nó không có nghĩa giới hạn khi thuật ngữ này xuất hiện trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các mạo từ số ít và "ít nhất là một" được dùng thay thế lẫn nhau và có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một.

Cũng trong bản mô tả này, việc chỉ ra các khoảng giá trị bằng số bằng các đầu mút bao gồm tất cả các số được gộp lại trong khoảng giá trị đó (ví dụ, từ 1 đến 5 bao gồm 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, v.v.).

Đối với phương pháp bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này mà bao gồm các bước riêng biệt, các bước này có thể được thực hiện theo thứ tự khả thi bất kỳ. Và, khi thích hợp, dạng kết hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều bước có thể được thực hiện đồng thời.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các số biểu diễn khối lượng của các thành phần, khối lượng phân tử, và v.v. được dùng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ cần được hiểu là được có thay đổi trong tất cả các trường hợp bằng thuật ngữ "khoảng". Theo đó, trừ khi được chỉ dẫn ngược lại theo cách khác, các tham số bằng số được trình bày trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ là các số gần đúng mà có thể thay đổi tùy thuộc vào tính chất mong muốn được tìm kiếm để thu được bởi sáng chế. Ít nhất là, và không nhằm làm giới hạn học thuyết về dạng tương đương đối với phạm vi của yêu cầu bảo hộ, mỗi tham số bằng số ít nhất là được hiểu theo số lượng của các chữ số có nghĩa được nêu và bằng cách áp dụng phương pháp làm tròn thông thường.

Tuy nhiên, các khoảng giá trị và tham số bằng số nêu ra phạm vi rộng của sáng chế là các số gần đúng, các giá trị bằng số được trình bày trong các ví dụ cụ thể được báo cáo một cách chính xác nhất có thể. Tuy nhiên, tất cả các giá trị bằng số vốn đã chứa khoảng giá trị bắt nguồn một cách cần thiết từ độ lệch chuẩn được tìm thấy trong số đo thử nghiệm tương ứng của chúng.

Tất cả các đề mục là để thuận tiện cho người đọc và không được dùng để làm giới hạn nghĩa của nội dung ở sau đề mục đó, trừ khi được chỉ dẫn như vậy.

Ở một vài chỗ trong bản mô tả, chỉ dẫn được đưa ra thông qua danh sách của các ví dụ, mà các ví dụ này có thể được sử dụng ở các dạng kết hợp khác nhau. Trong mỗi trường hợp, danh sách được chỉ ra chỉ đóng vai trò làm nhóm đại diện và không được hiểu là danh sách tổng thể. Cần hiểu rằng ví dụ, nguyên liệu, hàm lượng, và quy trình cụ thể được hiểu theo nghĩa rộng theo phạm vi và ý tưởng của sáng chế như được trình bày trong bản mô tả này.

Sáng chế được minh họa bằng các ví dụ sau đây. Cần hiểu rằng ví dụ, nguyên liệu, hàm lượng, và quy trình cụ thể được hiểu theo nghĩa rộng theo phạm vi và ý tưởng của sáng chế như được trình bày trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập và xác định đặc điểm của biến thể reovirut

Ví dụ này mô tả sự phân lập của biến thể reovirut từ gân ở nhiều ca lâm sàng của viêm bao gân và/hoặc bị què quặt ở gà giò, ở độ tuổi nằm trong khoảng từ 2,5-8 tuần được nộp cho Trung Tâm Nghiên Cứu và Chẩn Đoán Gia Cầm. Reovirut ở chim được xác định đặc điểm bằng cách xác định trình tự protein C sigma và thử nghiệm huyết thanh.

Nguyên liệu và phương pháp

Phân lập virus. Các thể phân lập vùng reovirut Ck/94594 Gân/GA/2012, Ck/94826 Gân/GA/2012 và Ck/96139 Gân/GA/2012 được phân lập ở Trung Tâm Nghiên Cứu và Chẩn Đoán Gia Cầm tại Đại học Georgia, từ gân của gà giò thương mại thể hiện các dấu hiệu lâm sàng của viêm khớp và viêm bao gân virus. Gân và hoạt dịch hút ra từ gà bị ảnh hưởng lâm sàng được đồng nhất hóa riêng lẻ trong môi trường vận chuyển virus với kháng sinh. Lọc mô đã đồng nhất qua bộ lọc ống bơm 0,45 micromét. Ủ dịch lọc với kháng huyết thanh Reovirut S1133 (Charles River, SPAFAS, Wilmington, MA) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi trung hòa, ủ 0,2 ml

dịch đồng nhất trong tế bào gan phôi gà sơ cấp cho tổng số bốn lần chuyển. Khi phát triển 70-80% hiệu quả gây bệnh tế bào, quan sát sự hình thành hợp bào, môi trường nuôi cấy tế bào được kết đông và được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C. Môi trường nuôi cấy tế bào được kết đông và được rã đông ba lần trước lần chuyển môi trường nuôi cấy tế bào tiếp theo.

Chiết ARN. Chiết ARN virut tổng số từ các lần chuyển tế bào gan phôi gà sơ cấp bằng cách sử dụng bộ kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, 48 giờ sau khi lây nhiễm, môi trường nuôi cấy tế bào được gạn, đơn lớp được phủ bằng 300 µl chất đệm RLT chứa 0,143 M β-mercaptoetanol và được nạo bằng dụng cụ nạo tế bào theo khuyến nghị của nhà sản xuất.

RT-PCR. cADN tương ứng với gen S1 được sản xuất bằng cách phiên mã ngược và PCR bằng cách sử dụng ARNaza H- transcriptaza ngược SUPERSRIPT™ III và ADN polymeraza PLATINUM®Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) với các đoạn mồi đã được công bố trước đây P1 (AGTATTTGTGAGTACG ATTG (SEQ ID NO:7)) và P4 (GGCGCCACACCTTAGGT (SEQ ID NO:8)) (Kant et al., 2003, *Vet Res*; 34:203-212). Tách sản phẩm khuếch đại 1,1 kb trên gel agarosa 1,0%, nhuộm màu bằng ethidii bromua và nhìn bằng mắt bằng thiết bị chiếu tia UV qua mô. Mảnh được cắt, được tinh chế bằng bộ kit chiết gel QIAEX II (Qiagen Inc., Valencia, CA), được rửa giải trong nước đã được xử lý bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), và được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

Xác định trình tự nucleotit của sản phẩm khuếch đại và các dòng S1. Xác định trình tự sản phẩm PCR được tinh chế trên gel trực tiếp bằng cách sử dụng phương pháp xác định trình tự ADN sợi kép với các dideoxynucleotit được gắn nhãn huỳnh quang và Taq polymeraza và được thực hiện trên máy xác định trình tự tự động ABI 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Các đoạn mồi PCR P1 và P4 được dùng để xác định trình tự, cũng như là, các đoạn mồi gen S1 nội tại được bảo toàn khi cần thiết để hoàn thành việc xác định trình tự. Các trình tự đoạn mồi dùng để xác định trình tự có sẵn khi yêu cầu. Ngoài ra, sản phẩm được tinh chế trên gel được tách dòng vào

plasmid pCR2TOPO (Invitrogen) và được biến nạp vào *E. coli* theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Một vài dòng từ mỗi thể phân lập chứa plasmid có đoạn cài xen 1,1 kb được xác định bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi xuôi và ngược M13. Các dòng được mở rộng và plasmid được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit plasmid miniprep (Qiagen, Valencia, CA) theo các phương pháp của nhà sản xuất. Các đoạn mồi xuôi và ngược chung M13 được dùng để xác định trình tự cùng với các đoạn mồi S1 nội tại khi cần để hoàn thành việc xác định trình tự. Ít nhất ba dòng hoặc sản phẩm PCR từ ba lần khuếch đại chứa gen S1 được xác định trình tự theo cả hai hướng và được dùng để thu được sự liên ứng. Các trình tự nucleotit và axit amin đối với các thể phân lập 94594, 94826 và 96139 được xác định trên các hình vẽ từ Hình 1 đến Hình 6.

Phân tích trình tự. Phân tích trình tự axit amin dự đoán, nucleotit và sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự của gen S1 và protein C sigma được thực hiện bằng cách sử dụng CLUSTAL W (Lasergene, v. 5.0, DNASTAR, Madison, WI). Các trình tự đối với các gen S1 của reovirus ở chim đã được công bố trước đây thu được từ GenBank.

So sánh các trình tự được sắp xếp thẳng hàng và tạo ra cây phát sinh loài bằng cách sử dụng sự tạo chùm Neighbor-Joining và 1000 bản sao bootstrap (độ tin cậy được liệt kê trong ngoặc đơn) trong tra cứu nghiệm suy bằng cách sử dụng phần mềm Phylogenetic Analysis Using Parsimony v 4.10b (PAUP).

Mã số truy cập GenBank. Các trình tự thu được đối với các thể phân lập gà 94594, 94826 và 96139 đã được nộp cho GenBank và lần lượt được cấp các mã số truy cập sau đây: KJ803966, KJ803967, và KJ803990.

Kết quả và thảo luận

Cho đến nay, hai kiểu di truyền biến thể sơ cấp của thể phân lập vùng reovirus nổi bật trong các ca lâm sàng của VA/viêm bao gân và được xác định đặc điểm là các kiểu di truyền biến thể do thiếu độ tương tự với các chủng vacxin reovirus hiện hành (S1133, 1733, 2408, 2177) và các virus khác trong cơ sở dữ liệu (Hình 7). Phần lớn các thể phân lập vùng thuộc vào nhóm 1 (được xác định là biến thể 2012 VA nhóm 1). Các trình tự axit amin C sigma của reovirus thuộc vào kiểu gen này tương tự >99% với nhau và tương tự <50% so với các chủng vacxin khi so với các trình tự trong cơ sở dữ

liệu miễn và PDRC công khai (Hình 8). Reovirut trong nhóm 2 (được xác định là biến thể 2012 VA nhóm 2) tương tự > 99% với nhau và tương tự <50% so với biến thể 2012 VA nhóm 1 (Hình 8). Độ tương tự C sigma giữa biến thể 2012 VA nhóm 2 và các chủng vacxin là 80% (Hình 8). Mặc dù nhóm này có độ tương tự trình tự cao hơn, nhưng không rõ rằng liệu độ tương tự 80% này có chuyển thành sự bảo vệ chéo ở mức độ nào đó với các chủng vacxin hiện hành hay không. Đánh giá huyết thanh của thể phân lập vùng từ cả hai nhóm được thực hiện để mang lại thông tin cần thiết về sự liên quan huyết thanh của virut.

Virut đại diện từ các biến thể nhóm 1 và 2 được đánh giá trong thử nghiệm trung hòa chéo một chiều bằng cách sử dụng kháng huyết thanh với S1133, 2408 và huyết thanh siêu miễn dịch được điều chế chống lại biến thể 2012 VA nhóm 1. Độ chuẩn VN giữa thể phân lập vùng và bảng huyết thanh nằm trong khoảng từ 2 đến 16, cung cấp bằng chứng rằng thể phân lập vùng không có liên quan về mặt huyết thanh với S1133, 2408 hoặc với nhau.

Ví dụ 2

Nghiên cứu khả năng gây bệnh và sự bảo vệ con cháu đối với biến thể reovirut nhóm 1

Ví dụ này xác định khả năng gây bệnh của các thể phân lập 2012 VA biến thể reovirut nhóm 1 94826 và 94594 ở gà.

Thí nghiệm #1

Thí nghiệm này là để xác định liệu chương trình chủng ngừa con giống của Công ty A có tạo ra sự bảo vệ thích hợp chống lại thể phân lập 2012 VA biến thể nhóm 1 ở các con vật được thử thách bằng thể phân lập vùng reovirut 94826 hay không.

Gà. Sử dụng 80 con gà giò thương mại 1 ngày tuổi từ con giống đã được chủng ngừa của Công ty A.

Bảng 1. Nhóm điều trị

Số lượng gà	ID nhóm	Điều trị nhóm
20 con gà	1	Lấy máu để ELISA reovirut (IDEXX)
20 con gà	2	Được ủ với S1133
20 con gà	3	Được ủ với thể phân lập 94826
20 con gà	4	Được ủ với PBS tiệt trùng

Virut. Thể phân lập vùng 94826 được nhân giống và được chuẩn độ trong tế bào gan phôi gà sơ cấp và được dùng để ủ gan bàn chân của con gà một ngày tuổi ở liều lượng thử thách là 10^3 TCID₅₀/con. Kho dự trữ S1133 cũng đã được chuẩn độ trong tế bào gan phôi gà sơ cấp được dùng để ủ gan bàn chân của con gà một ngày tuổi ở liều lượng là 10^3 TCID₅₀/con. Đối chứng âm được thử thách mô phỏng thông qua gan bàn chân bằng PBS tiệt trùng.

Thử thách reovirut. Sáu mươi con gà giò thương mại được tiếp nhận vào ngày trứng nở và được chia thành 3 nhóm mỗi nhóm 20 con và được đặt vào đơn vị phân lập Horsfall Bauer. Các con gà từ nhóm 1 được lấy máu để ELISA reovirut (IDEXX) và bị giết chết. Các con gà từ các nhóm 2-4 được ủ qua gan bàn chân với 1) PBS tiệt trùng, 2) S1133, hoặc 3) 94826. Chi tiết về việc này được trình bày trong Bảng 1. Quan sát các con vật hàng ngày và đo sự sưng tấy khuỷu chân sau bằng thước kẹp ngón trong mỗi nhóm điều trị và ghi lại 2 ngày một lần. Vào ngày 14, tất cả các con vật được cho chết êm ái, cân và khám nghiệm tử thi. Đánh giá các con vật về thương tổn vĩ mô bất kỳ và đánh giá khớp khuỷu chân sau về sự sưng tấy, xuất huyết và/hoặc đứt. Các tham số về sự bảo vệ bao gồm huyết thanh vào ngày trứng nở, các dấu hiệu lâm sàng, tỷ lệ chết, khối lượng cơ thể, thương tổn vĩ mô và đánh giá/đo sự sưng tấy khuỷu chân sau trong suốt nghiên cứu.

Thí nghiệm #2

Thí nghiệm này là để xác định xem chương trình chủng ngừa con giống của Công ty B có tạo ra sự bảo vệ thích hợp chống lại viêm khớp virut ở các con vật được

thử thách bằng các thể phân lập vùng reovirut của Công ty B gần đây hay không và việc sử dụng hay không sử dụng vacxin reovirut thương mại vào một ngày tuổi có tạo ra sự bảo vệ bất kỳ hay không.

Gà. Sử dụng 100 con gà giò thương mại 1 ngày tuổi từ con giống đã chủng ngừa của Công ty B.

Bảng 2. Nhóm điều trị

Số lượng gà	ID nhóm	Điều trị nhóm
20 con gà	1	Lấy máu để ELISA reovirut (IDEXX)
20 con gà	2	Ủ với PBS tiệt trùng
20 con gà	3	Liều lượng đầy đủ VA ChickVac vào 1 ngày tuổi sau đó thử thách w/94594
20 con gà	4	½ liều lượng VA ChickVac vào 1 ngày tuổi sau đó thử thách w/94594
20 con gà	5	Thử thách bằng thể phân lập vùng Sanderson 94594

Virut. Các thể phân lập vùng reovirut 94594 được nhân giống và được chuẩn độ trong tế bào gan phôi gà sơ cấp trước khi nghiên cứu. VA ChickVac (Zoetis) được dùng để chủng ngừa vào ngày trứng nở theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Đối chứng âm được thử thách mô phỏng bằng PBS tiệt trùng.

Thử thách reovirut. Một trăm con gà thương mại được tiếp nhận vào ngày trứng nở và được chia thành 5 nhóm bằng nhau mỗi nhóm gồm 20 con gà. Nhóm 1 được lấy máu để ELISA reovirut (IDEXX). 4 nhóm gà còn lại được đặt vào đơn vị phân lập Horsfall Bauer dưới áp suất dương không khí cưỡng bức. Vào ngày trứng nở, nhóm 3 được chủng ngừa bằng VA ChickVac ở liều lượng đầy đủ bằng cách dùng dưới da trong khi nhóm 4 được chủng ngừa bằng VA ChickVac ở liều lượng một nửa bằng cách dùng dưới da. Chi tiết về việc này được trình bày trong Bảng 2. Vào ngày 10, thu lấy số đo gan bàn chân đối với tất cả các con gà. Vào ngày 10, nhóm 2 được ủ qua gan bàn chân với 0,1 ml nước muối đệm phosphat tiệt trùng trong khi các con gà trong các

nhóm 3-5 được thử thách bằng cách ủ gan bàn chân với thể phân lập vùng 94594 ở 10^3 TCID₅₀ cho mỗi con. Theo dõi các con vật hàng ngày và thu lấy số đo của khuỷu chân sau cứ 2 ngày một lần bắt đầu từ 10 ngày tuổi. Vào 22 ngày tuổi, nghiên cứu kết thúc. Các tham số được dùng đối với sự bảo vệ là huyết thanh ngày trứng nở, các dấu hiệu lâm sàng, tỷ lệ chết, khối lượng cơ thể, thương tổn vĩ mô.

Kết quả và thảo luận

Các nghiên cứu về khả năng gây bệnh và sự bảo vệ con được thực hiện ở gà giò thương mại bằng cách sử dụng các chủng đại diện từ kiểu gen biến thể 2012 VA nhóm 1. Trong nghiên cứu thứ nhất, các con gà vào ngày trứng nở được thử thách qua gan bàn chân bằng S1133 hoặc thể phân lập biến thể 2012 VA nhóm 1 và một nhóm được đặt làm đối chứng âm. Ngoài ra, nhóm riêng rẽ gồm hai mươi con gà vào ngày trứng nở được lấy máu để ELISA reovirut. Tất cả các con gà được đặt trong chỗ quây rào trên sàn trong chuồng phân lập riêng rẽ trên phoi bào mới và tiếp cận tự do tới thức ăn và nước uống. Số đo gan bàn chân được lấy 2 ngày một lần và các con vật được theo dõi hàng ngày về các dấu hiệu lâm sàng đến khi kết thúc thí nghiệm vào ngày 14 (Hình 9). Độ chuẩn trung bình hình học ELISA reovirut (GMT) đối với đàn gà này là 1.212 mà được coi là thấp đối với con gà ngày trứng nở. Quan sát thấy viêm bao gân lâm sàng và sự sụt giảm khối lượng cơ thể đáng kể ở cả nhóm S1133 và nhóm biến thể reovirut đã bị thử thách (Hình 10 và Hình 12). Mặc dù các con gà S1133 bị ảnh hưởng nghiêm trọng hơn bởi sự què quặt so với các con gà được thử thách bằng biến thể, nhưng có sự tác động cao hơn của sự sưng tấy xung quanh gân cơ gấp ngón chân trong nhóm bị thử thách biến thể (Hình 11). Các dấu hiệu lâm sàng khác quan sát thấy trong các nhóm bị thử thách bao gồm chứng tràn dịch màng ngoài tim và viêm khuỷu chân sau (Hình 12). Độ chuẩn ngày trứng nở reovirut là thấp và do đó kháng thể có nguồn gốc từ mẹ từ chương trình chủng ngừa của Công ty A không tạo ra sự bảo vệ đủ chống lại thử thách bằng biến thể nhóm 1. Ngoài ra, thể phân lập vùng làm tái sinh bệnh lâm sàng quan sát thấy trong vùng và được xác nhận là tác nhân gây bệnh.

Trong nghiên cứu thứ hai, các con gà giò thương mại được thử thách bằng biến thể nhóm 1 vào 12 ngày tuổi bằng gan bàn chân và nghiên cứu kết thúc vào 23 ngày

tuổi. GMT ELISA reovirut thu được từ huyết thanh được lấy vào ngày trứng nở là 4.900. Trong nghiên cứu này, khối lượng cơ thể trung bình chỉ thấp hơn một chút ở nhóm bị thử thách so với đối chứng âm (Hình 13). Tuy nhiên, nhóm bị thử thách thể hiện các dấu hiệu lâm sàng và đặc điểm thương tổn vĩ mô của viêm khớp/viêm bao gân virut (Hình 14). Như trong nghiên cứu thứ nhất, quan sát thấy sự sưng tấy xung quanh gân cơ gấp ngón chân cũng như là chứng tràn dịch màng ngoài tim ở các con vật bị thử thách (Hình 12 và Hình 13). Từ nghiên cứu này, ta có thể kết luận rằng các con gà có hàm lượng kháng thể reovirut có nguồn gốc từ mẹ cao hơn không được bảo vệ chống lại thử thách bằng biến thể nhóm 1.

Ngoài ra, việc sử dụng vacxin reovirut thương mại được dùng dưới da ở liều lượng đầy đủ và liều lượng một nửa ở gà giò thương mại ngày trứng nở sau đó là thử thách bằng biến thể nhóm 1 vào 12 ngày tuổi được đánh giá. Bằng cách sử dụng cùng các tham số như trong các nghiên cứu trước, tác giả sáng chế đã quan sát các dấu hiệu lâm sàng và đặc điểm thương tổn vĩ mô của VA/viêm bao gân ở tất cả các nhóm đã bị thử thách. Thú vị là, sự tác động của chứng tràn dịch màng ngoài tim và khuỷu chân sau sưng tấy cao hơn ở nhóm đã được chủng ngừa và được thử thách, bất kể liều lượng nào, so với nhóm chỉ bị thử thách (Hình 14).

Tóm lại, biến thể reovirut đã được phân lập từ các ca lâm sàng của viêm khớp/viêm bao gân virut và khác biệt về mặt di truyền và về mặt kháng nguyên so với các chủng vacxin reovirut hiện hành. Hai nhóm phân biệt được xác định là biến thể 2012 VA reovirut nhóm 1 và nhóm 2 dựa trên sự xác định đặc điểm di truyền và huyết thanh. Các nghiên cứu *in vivo* cho thấy rằng vacxin thương mại hiện hành không tạo ra sự bảo vệ chống lại thử thách bởi biến thể 2012 nhóm 1 ở các con gà có kháng thể reovirut có nguồn gốc từ mẹ. Các nghiên cứu *in vivo* với thể phân lập nhóm 2 đại diện được nêu dưới đây, trong Ví dụ 3. Biến thể reovirut nhóm 1 và 2 được phân lập hoặc được phát hiện từ các ca lâm sàng của viêm bao gân từ nhiều bang ở Hoa Kỳ và từ Canada với số lượng của các thể phân lập thuộc vào nhóm 1 vượt quá số lượng của các thể phân lập thuộc vào nhóm 2. Nguồn gốc của các virut này chưa được biết đến.

Ví dụ 3

Nghiên cứu khả năng gây bệnh đối với biến thể reovirut nhóm 2

Quy trình được mô tả chi tiết hơn trong Ví dụ 2 được dùng để xác định đặc điểm khả năng gây bệnh của biến thể reovirut nhóm 2 ở gà giò thương mại. Sử dụng chủng đại diện từ kiểu gen biến thể 2012 VA nhóm 2 (Ck/96139 Gân/GA/2012). Các nhóm điều trị được mô tả trong Bảng 3.

Bảng 3. Nhóm điều trị

Nhóm	Điều trị
10 con gà giò thương mại 1 ngày tuổi	Lấy máu để ELISA reovirut (IDEXX)
10 con gà giò thương mại 1 ngày tuổi	Ủ với biến thể nhóm 2
10 con gà giò thương mại 1 ngày tuổi	Ủ với PBS tiệt trùng

Các con gà được ủ qua gan bàn chân với 0,1 ml nước muối đệm phosphat tiệt trùng hoặc thể phân lập vùng 996139 ở 10^3 TCID₅₀ cho mỗi con. Các tham số được sử dụng đối với sự bảo vệ là huyết thanh ngày trứng nở, các dấu hiệu lâm sàng, tỷ lệ chết, khối lượng cơ thể, và thương tổn vĩ mô. Sự sưng tấy gan bàn chân và sự sưng tấy gân được đánh giá và được đo trong suốt nghiên cứu.

Kết quả và thảo luận

Huyết thanh ngày trứng nở bằng ELISA reovirut (IDEXX) được thể hiện trên Hình 17. Cụ thể là, trung bình là 511, GMT là 385, SD là 343, và %CV là 66,8%.

Như thể hiện trên Hình 18, thử thách nhóm 2 làm giảm khối lượng cơ thể. Cụ thể là, quan sát thấy sự sụt giảm khối lượng cơ thể 8% ở các chim bị thử thách nhóm 2.

Hình 19 thể hiện số đo ngày 14 của sự sưng tấy gan bàn chân dưới dạng tỷ lệ phần trăm của khối lượng cơ thể trong khi Hình 20 thể hiện số đo của sự sưng tấy gân dưới dạng tỷ lệ phần trăm của khối lượng cơ thể đối với chim bị thử thách nhóm 2.

Các phát hiện khám nghiệm và mô học đối với các con chim bị thử thách nhóm 2 như sau: 2/10 con chim có gân bị đứt; 5/10 con chim có viêm bao gân tế bào lympho (bao gân); 2/10 con chim có chứng tràn dịch màng ngoài tim; và 2/10 con chim có viêm màng ngoài tim tạng tế bào lympho và viêm cơ tim. Không quan sát thấy thương tổn đáng kể ở gan hoặc tá tràng.

Do đó, thử thách nhóm 2 dẫn đến sự sụt giảm khối lượng nhẹ. Quan sát thấy chứng tràn dịch màng ngoài tim, gân sưng tấy, và gân bị đứt một ít ở các con chim bị thử thách nhóm 2. Và, quan sát thấy thương tổn mô nhất quán với reovirus ở tim và gân.

Kết luận là, cả hai biến thể nhóm 1 và nhóm 2 được phân lập từ các ca lâm sàng của viral viêm khớp ở gà giò thương mại. Cả hai biến thể nhóm 1 và nhóm 2 gây ra viêm bao gân, bao gồm chứng tràn dịch màng ngoài tim và sự sưng tấy gân được quan sát thấy toàn bộ và quan sát thấy sự thay đổi mô nhất quán với reovirus ở tim và gân. Biến thể nhóm 1 phổ biến hơn. Vacxin thương mại hiện hành không tạo ra sự bảo vệ thích hợp ở gà giò. Do đó, sự chủng ngừa tự sinh có vẻ là lựa chọn duy nhất hiện nay để kiểm soát.

Ví dụ 4

Thử nghiệm mẫn cảm đối với reovirus ở chim

Cấy tế bào gan phôi gà trong đĩa 35 mm:

-ngày trước khi tiến hành thử nghiệm, bổ sung tế bào gan phôi gà (CELiC) trong 35 đĩa petri (2 ml/đĩa petri).

-đặt đĩa 35 mm trong lò ủ ở nhiệt độ 37°C (qua đêm, ít nhất là hơn 12 giờ).

Quy trình thử nghiệm mẫn cảm:

-Loại bỏ môi trường (M199/F10+FBS 10%) ra khỏi CELiC hợp lưu.

-Bổ sung 200 µl virus (10^2 TCID₅₀) vào đĩa.

-Ba mươi phút sau, bổ sung 2 ml M199/F10+CS 2% với virus đã pha loãng vào đĩa và xoay đĩa nhẹ nhàng.

-Ủ đĩa trong thời gian 3-4 giờ ở nhiệt độ 37°C.

-Trong thời gian đó điều chế 2 ml cho mỗi đĩa: 1 ml (2x chất cô của M199/F10 +CS 5%) + và 1 ml SeaPlaque Agarosa 3% trong H₂O loại nuôi cấy tế bào.

-Sau thời gian 3-4 giờ lấy đĩa ra từ lò ủ và loại bỏ dịch nổi bề mặt (1.200 µl).

-Bây giờ 2 ml/ giếng của lớp phủ đã được điều chế, và ủ trong thời gian 2-3 ngày ở nhiệt độ 37°C.

Nhuộm màu sau thời gian 2-3 ngày (thường cố gắng nhuộm màu 2 ngày sau khi ủ, nếu lâu hơn 3 ngày các tế bào sẽ bắt đầu chết và các mảnh có thể không được tốt):

-Điều chế đồ trung tính đã được lọc 10% được pha loãng trong nước loại nuôi cấy tế bào.

-Bổ sung 1 ml/đĩa.

-Ủ trong thời gian ít nhất là 2 giờ (2- 4 giờ) trong lò ủ.

-Sau hai giờ, các mảng bắt đầu xuất hiện rõ ràng.

Kết quả: Các tế bào sống được nhuộm màu đỏ. Các mảng sẽ vẫn không được nhuộm màu.

Ví dụ 5

Các trình tự protein C sigma nhóm 1 và nhóm 2

Sau quy trình được mô tả chi tiết hơn trong Ví dụ 1, các trình tự nucleotit mã hóa cho protein C sigma và các trình tự axit amin C sigma được mã hóa của 122 biến thể reovirus ở chim nhóm 1 và nhóm 2 được xác định. Hình 21 thể hiện mã số truy cập GenBank, ID trình tự, danh mục thể phân lập, loại mô mà virus được phân lập từ đó, ngày lấy, bang và nước phân lập, và nguồn phân lập đối với 122 thể phân lập. Tế bào gan phôi gà phù hợp làm vật chủ trong phòng thí nghiệm đối với tất cả 122 thể phân lập.

Ví dụ 6

Sự giảm độc lực của biến thể reovirus ở chim nhóm 1 và nhóm 2

Các thể phân lập reovirut ở chim nhóm 1 và nhóm 2 được liệt kê trên Hình 21, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các thể phân lập 94826 và 94594 (cả hai thể phân lập thuộc nhóm 1) và thể phân lập 96139 (thể phân lập nhóm 2), bị làm giảm độc lực bằng cách chuyển trong trứng hoặc dòng tế bào, chẳng hạn như ví dụ, tế bào gan phôi gà (CELiC). Chế phẩm virut được tinh chế mỏng, tách dòng được điều chế sau mỗi lần chuyển và được dùng cho chu kỳ làm giảm độc lực tiếp theo. Khả năng gây bệnh và hiệu quả vacxin của thể phân lập được thử nghiệm sau khoảng 25 lần chuyển, ví dụ sau khoảng 25, khoảng 50, khoảng 75, khoảng 100, và khoảng 125 lần chuyển. Trình tự axit amin của protein C sigma có thể thu được đối với các chủng bị làm giảm độc lực.

Sự bộc lộ hoàn chỉnh của tất cả các bằng sáng chế, đơn sáng chế, và các tài liệu công bố, và các vật liệu có sẵn dưới dạng điện tử (bao gồm, ví dụ, nộp trình tự nucleotit ở, ví dụ, GenBank và RefSeq, và nộp trình tự axit amin ở, ví dụ, SwissProt, PIR, PRF, PDB, và bản dịch từ các vùng mã hóa được chú thích ở GenBank và RefSeq) được viện dẫn trong bản mô tả này để tham khảo. Trong trường hợp có sự không thống nhất bất kỳ giữa sự bộc lộ của đơn sáng chế này và (các) bộc lộ của tài liệu bất kỳ được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo, thì sự bộc lộ của đơn sáng chế này sẽ chi phối. Phần mô tả chi tiết và các ví dụ trên đây được trình bày chỉ để hiểu rõ. Không được hiểu là có sự giới hạn bất kỳ nào từ đó. Sáng chế không bị giới hạn ở các chi tiết chính xác được thể hiện và được mô tả, để các cải biến hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ được bao gồm trong sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ.

Danh mục trình tự tự do

SEQ ID NO:1

Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94594

SEQ ID NO:2

Trình tự axit amin S1 của C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94594

SEQ ID NO:3

Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94826

SEQ ID NO:4

Trình tự axit amin S1 của C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 1 94826

SEQ ID NO:5

Trình tự nucleotit S1 mã hóa cho protein C sigma (các cặp bazơ 1-931) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 2 96139

SEQ ID NO:6

Trình tự axit amin S1 của protein C sigma (các axit amin 1-310) từ thể phân lập vùng biến thể 2012 VA nhóm 2 96139

SEQ ID NO:7 đoạn mồi PCR P1

SEQ ID NO:8 đoạn mồi PCR P4

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein C sigma được phân lập của reovirut ở chim, trong đó protein C sigma được phân lập này chứa:

(a) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:2

(b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:4; hoặc

(c) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 99% so với SEQ ID NO:6.

2. Phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut ở chim, phương pháp này bao gồm bước xác định rằng mẫu kháng huyết thanh thu được từ chim có liên kết đặc hiệu với protein C sigma được phân lập theo điểm 1.

FIG. 1

ATGGACGGATTAACTCAACAGCAGCGAAGAGAAGTCGTGGGGTTGATAC
 TGTCGTTGACTTCGAGCGTGAGTACAAGTTCTGGCGATTTGACGCAAAT
 TCGTGAACGTCTTTCCGCTTTGGAATCTGCGACTGCGTCGTTGAACGAA
 TCTATTAATACAGCTTTGTCTAAGTTAGTGGATTTGTCTGCATCGCTTG
 ACAACGTGGCGGCCTCGTTAGCGGAGACGAAAGTGGAAGTGAAGTCATT
 GGTTCGACGTTTCAAGGGTTTGCGAACTTCTCTTGATTCTTCTGCTTCA
 GAGCTGGCTTCTCTATCTTCGTTGGTGCGTGATCACGGCTCTTCGATTG
 CTAGCCTACAGAAAGAAGTAAGTGTCTTATCGGGTGAGGTAGGCAACCT
 TAAAACCTCGGTATCATCGCAGGGCCTTACTATCACTAGCCTTGAGAAA
 CGAGTGGAAGCTTTGGAAGGTGGTTCTAGTACGACTCTGTCATTTGCTG
 ATCCTCTTAAGTTAGAGGCTGGGACCGTGTCACTCGAGGTAGATCCATA
 TTTCTGCTCTGTAAATCGTAATCTGACGTCGTATTCTGCTAATGCTCAG
 TTGATGCAATTTTCAAGTGGTCTGTGAAAGGGGAAGATGGCGCGGCCAACT
 CTATTGATATGGACGTGAATGCTCACTCTCATGGTTTACGCACTGATTA
 TCTGATGTCAACCAAGCAATCATTGACTGTTACAACGTCTCCCGCTACT
 CTCGTCTTTGAACTGGATAGGATTGCTGCTCTTCCCTCTGACCTTTCTC
 GCCTAATTCCATGTTATGGTTTTTTCAGCAAGCTACTTTTCCTGTTGATAT
 CTCCTTCCAGCGAGATGGCGTCTCGCATACTATCAAGTCTATGGGACG
 TACACATCTTCTCGCGTCTTCAAGATTACGTTCTCGCCTGGCTCCTCGG

FIG. 2

MDGLTQQQRREVVGILSLTSSVSTSSGDLTQIRERLSALESATASLNE
 SINTALSKLVDLSASLDNVAASLAETKVEVNSLVSDVQGLRTSLDSSAS
 ELASLSSLVRDHGSSIASLQKEVSVLSGEVGNLKTSVSSQGLTITSLEK
 RVEALEGGSSTTLSFADPLKLEAGTVSLEVDPYFCSVNRNLTSYSANAQ
 LMQFQWSVKGEDGAANSIDMDVNAHSHGSRTDYLMSTKQSLTVTTSPAT
 LVFELDRIAALPSDLSRLIPCYGFQQATFPVDISFQRDGVSHTYQVYGT
 YTSSRVFKITFSPGSS

FIG. 3

ATGGACGGATTAACTCAACAGCAGCGAAGAGAAGTCGTGGGGTTGATAC
 TGTCGTTGACTTCGAGCGTGAGTACAAGTTCTGGCGATTTGACGCAAAT
 TCGTGAACGTCTTTCCGCTTTGGAATCTGCGACTGCGTCGTGTAACGAA
 TCTATTAATACAGCTTTATCTAAGTTAGTGGATTTGTCTGCATCGCTTG
 ACAACGTGGCGGCCTCGTTAGCGGAGACGAAAGTGGAAGTGAACTCATT
 GGTTTCCGACGTTTCAGGGTTTGCGAACTTCTCTTGATTCTTCTGCTTCA
 GAGCTGGCTTCTCTATCTTCGTTGGTGCGTGATCACGGCTCTTCGATTG
 CTAGCCTACAGAAAGAAGTAAGTGTCTTATCGGGTGAGGTAGGCAACCT
 TAAAACCTCGGTATCATCGCAGGGCCTTACTATCACTAGCCTTGAGAAA
 CGAGTGGAAGCTTTGGAAGGTGGTTCTAGTACGACTCTGTCATTTGCTG
 ATCCTCTTAAGTTAGAGGCTGGGACCGTGTCACTCGAGGTAGATCCATA
 TTTCTGCTCTGTAAATCGTAATCTGACGTCGTATTCTGCTAATGCTCAG
 TTGATGCAATTTTCAGTGGTCTGTGAAAGGGGAAGATGGCGCGGCCAACT
 CTATTGATATGGACGTGAATGCTCACTCTCATGGTTCACGCACTGATTA
 TCTGATGTCAACCAAGCAATCATTGACTGTTACAACGTCTCCCGCTACT
 CTCGTCTTTGAACTGGATAGGATTGCTGCTCTTCCCTCTGACCTTTCTC
 GCCTAATTCCATGTTATGGTTTTTCAGCAAGCTACTTTTCCTGTTGATAT
 CTCCTTCCAGCGAGATGGCGTCTCGCATACTATCAAGTCTATGGGACG
 TACACATCTTCTCGCGTCTTCAAGATTACGTTCTCGCCTGGCTCCTCAG

FIG. 4

MDGLTQQQRREVVGILSLTSSVSTSSGDLTQIRERLSALESATASLNE
 SINTALSKLVDLSASLDNVAASLAETKVEVNSLVSDVQGLRTSLDSSAS
 ELASLSSLVRDHGSSIASLQKEVSVLSGEVGNLKTSSVSSQGLTITSLEK
 RVEALEGGSSTTLSFADPLKLEAGTVSLEVDPYFCSVNRNLTSYSANAQ
 LMQFQWSVKGEDGAANSIDMDVNAHSHGSRTDYLMSTKQSLTVTTSPAT
 LVFELDRIAALPSDL SRLIPCYGFQQATFPVDISFQRDGVSHQVYGT
 YTSSRVFKITFSPGSS

FIG. 5

ATGGCGGGTCTCAGTCCATCACAGCGAAGAGAGGTCGTCAGCTTGATAC
 TGTCATTGACTTCGAACGCGACTATAAGTCCTGGCGATTTGACGACAAT
 CCATGAGCGGTTGACTAATTTGGAAGCGTCTACAGAATCACTATACCGC
 TCCATCTCCAGCATGTCTGTTACTGTTTCCGACGTTTCTACAGATTTGC
 AGAACGTGACTCGCGCTCTGGATGATGTGATCACCAACTTAAATGGTAT
 GAGAGCCACCATTACTGCACTTCAAGATTCTGTTTCCACTCTCTCAACA
 ACTGTGACCGACTTATCAAGCACTTCTTCTGCGCATTCGGAACTCTAT
 CTTCACTCCGAAATACAGTTAATGGGAACTCCACTACCATTGGTAATTT
 GAAAAGTGATGTATCATCAAATGGCCTAGCTATCACAGACCTGCAGAGT
 CGCGTTAAATCCTTGGAGTCTACTTCGAGTCACGGACTGTCCTTTTCTC
 CTCCTCTTAGTGTCGCTGACGGCGTGGTGTCGTTGAATATGGACCCGTA
 CTTTTGCTCTCAGCGAGTTTCCTTGACATCTTACTCAGCAGAGGCTCAA
 CTAATGCAATTCCAATGGATGGCCAGAGGTTCTAACGGATCATCGGACA
 ATATTGACATGAACGTTAACGCCCACTGTTCATGGGAGACGCACTGACTA
 TATAATGTCGTCTACGGGAGGTCTTACGGTTACTCGTAATGCCGTGTCC
 TTAACCTTCGATTTGAGTTATATTACAAAGCTCCCATCGGACCTCTCAC
 GTCTTATCCCCAGTGCGGGATTTCAAGCCGCGTCGTTTCCAGCGGATGT
 ATCCTTCACCAGAGATTCCACAACCCATGCGTATCAAGCTTATGgAGTA
 TATTCCAGCTCTCGCGTATTTACTATTACTTTCCCGACTGGTGGTGACG

FIG. 6

MAGLSPSQRRREVSLILSLTSNATISPGDLTTIHERLTNLEASTESLYR
 SISSMSVTVSDVSTD LQNVTRALDDVITNLNGMRATITALQDSVSTLST
 TVTDLSSTSSAHSETLSSLRNTVNGNSTTIGNLKSDVSSNGLAITDLQS
 RVKSLESTSSHGLSFSPPLSVADGVVSLNMDPYFCSQRVSLTSYSAEAQ
 LMQFQWMARGSNSSDNIDMNVNAHCHGRRTDYIMSSTGGLTVTRNAVS
 LTFDLSYITKLPSDLSRLIPSAGFQAASFPAADVSEFTRDSTTHAYQAYGV
 YSSSRVFTITFPTGGD

FIG. 7

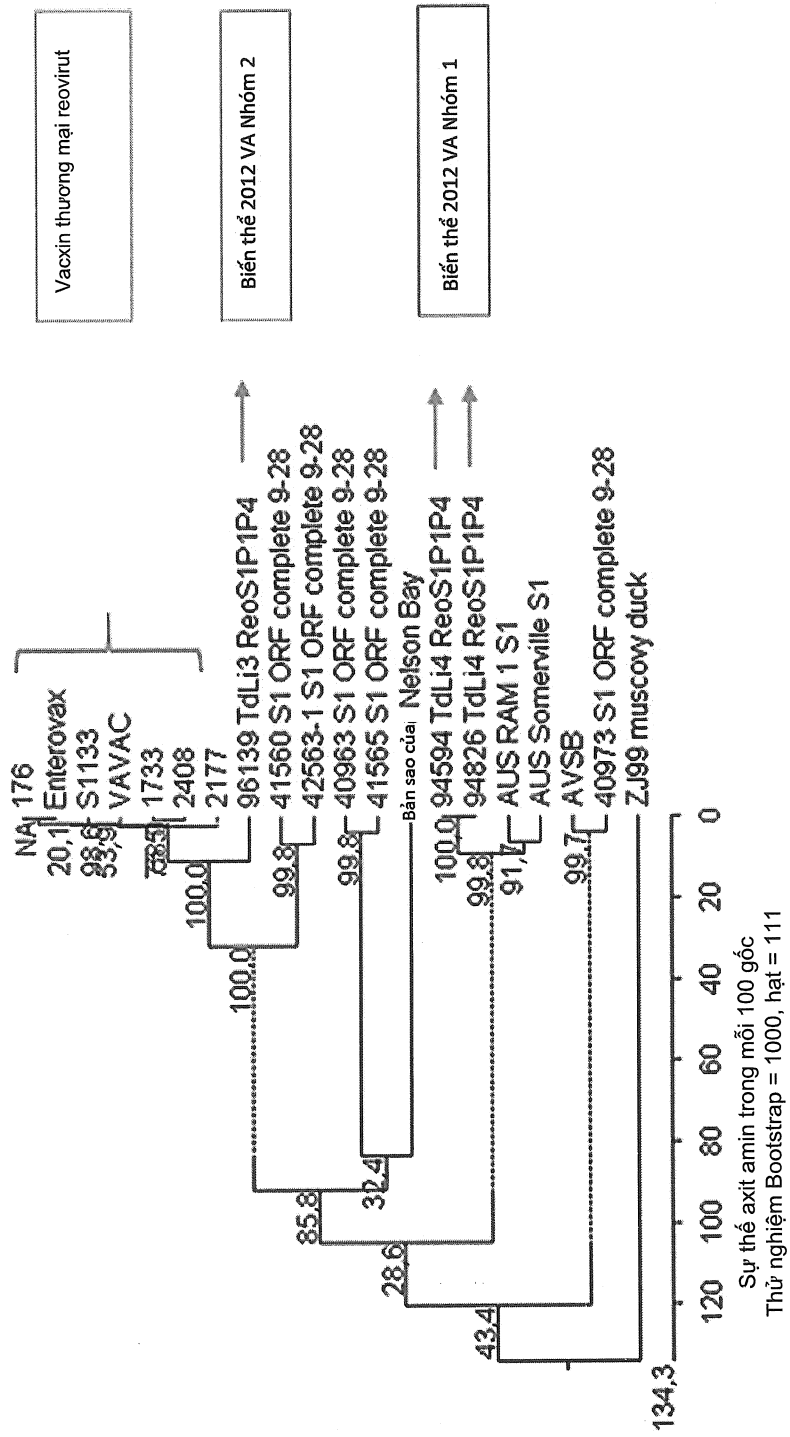


FIG. 8

Độ tương đồng theo tỷ lệ phần trăm																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	████	47,4	47,4	47,4	45,8	46,8	47,1	47,4	28,1	59,4	49,7	53,5	92,9	49,4	53,9	52,3	59,0	60,3	26,7	1	
2	87,0	████	99,7	99,4	96,8	98,7	99,0	100,0	23,3	48,4	48,4	82,6	50,6	57,1	51,9	55,8	49,7	48,1	25,1	2	
3	87,0	0,3	████	99,7	96,5	98,4	98,7	99,7	23,3	48,4	48,4	82,6	50,6	57,1	51,9	55,8	49,7	48,1	25,1	3	
4	87,0	0,6	0,3	████	96,1	98,1	98,4	99,4	23,3	48,4	48,4	82,6	50,6	57,1	51,9	55,8	49,7	48,1	25,4	4	
5	91,8	3,3	3,6	4,0	████	98,1	95,8	96,8	22,9	47,1	47,1	79,4	48,7	44,8	56,5	50,0	54,8	47,7	46,1	24,8	5
6	88,9	1,3	1,6	2,0	2,0	████	97,7	98,7	23,7	48,1	48,1	81,3	50,3	45,8	57,4	51,6	55,8	49,0	47,4	24,8	6
7	87,9	1,0	1,3	1,6	4,3	2,3	████	99,0	23,3	48,4	48,4	82,6	51,0	46,1	57,4	51,9	56,1	49,7	48,1	25,4	7
8	87,0	0,0	0,3	0,6	3,3	1,3	1,0	████	23,3	48,4	48,4	82,6	50,6	46,5	57,1	51,9	55,8	49,7	48,1	25,1	8
9	172,7	210,0	210,0	210,0	214,0	207,0	210,0	210,0	████	24,9	24,9	24,9	24,5	27,3	26,1	24,9	25,7	24,9	25,3	16,6	9
10	57,9	84,3	84,3	84,3	87,9	85,2	84,3	84,3	196,0	████	100,0	50,6	51,3	58,4	51,3	51,0	52,9	84,8	83,2	28,0	10
11	57,9	84,3	84,3	84,3	87,9	85,2	84,3	84,3	196,0	0,0	████	50,6	51,3	58,4	51,3	51,0	52,9	84,8	83,2	28,0	11
12	80,7	19,9	19,9	20,3	24,2	21,6	19,9	19,9	196,0	78,1	78,1	████	51,3	47,4	57,7	51,9	56,8	50,3	49,7	25,4	12
13	70,9	78,1	78,1	78,1	83,4	79,0	77,3	78,1	200,0	76,5	76,5	76,5	████	53,4	53,4	92,6	54,9	54,6	54,9	28,7	13
14	7,5	89,9	89,9	89,9	94,8	91,8	90,8	89,9	178,7	59,9	59,9	87,0	71,3	████	50,6	53,4	53,1	59,8	61,3	26,8	14
15	81,6	62,7	62,7	62,7	64,1	62,0	62,0	62,7	188,5	76,5	76,5	61,3	71,3	78,2	████	53,7	89,0	51,5	52,5	27,1	15
16	70,1	74,8	74,8	74,8	79,9	75,7	74,8	74,8	196,0	77,3	77,3	74,8	7,8	71,3	70,5	████	54,9	54,9	54,3	29,3	16
17	74,0	65,6	65,6	65,6	67,8	65,6	64,9	65,6	192,0	72,4	72,4	63,4	67,6	72,0	12,0	67,6	████	53,7	54,6	26,5	17
18	58,6	80,7	80,7	80,7	86,1	82,5	80,7	80,7	196,0	17,0	17,0	78,0	68,4	56,9	75,9	87,6	70,5	████	89,6	28,3	18
19	55,9	85,2	85,2	85,2	90,8	87,0	85,2	85,2	195,6	19,0	19,0	80,7	67,6	53,9	73,5	69,1	68,4	11,3	████	27,7	19
20	183,5	197,6	197,6	194,6	197,0	197,0	194,6	197,6	298,0	173,5	173,5	194,6	188,8	182,8	180,3	184,6	185,3	171,0	175,8	████	20
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Bản sao của Nelson Bay.pro																					

AVSB.pro
 176.pro
 1733.pro
 2408.pro
 S1133.pro
 VAVAC.pro
 2177.pro
 Enterovax.pro
 ZJ99 muscovy duck.pro
 94594 TdLI4 ReoS1P1P4.pro
 94826 TdLI4 ReoS1P1P4.pro
 96139 TdLI3 ReoS1P1P4.pro
 40963 S1 ORF complete 9-28.pro
 40973 S1 ORF complete 9-28.pro
 41560 S1 ORF complete 9-28.pro
 41565 S1 ORF complete 9-28.pro
 42563-1 S1 ORF complete 9-28.pro
 AUS RAM 1 S1.pro
 AUS Somerville S1.pro
 Bàn sao của Nelson Bay.pro

Độ phân kỳ

FIG. 9

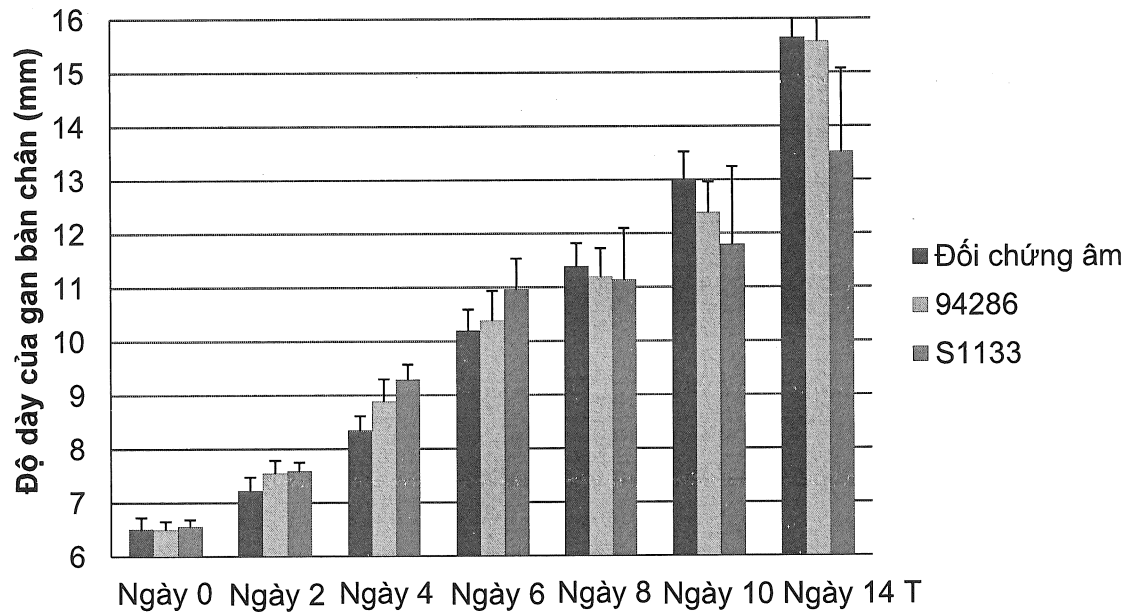


FIG. 10

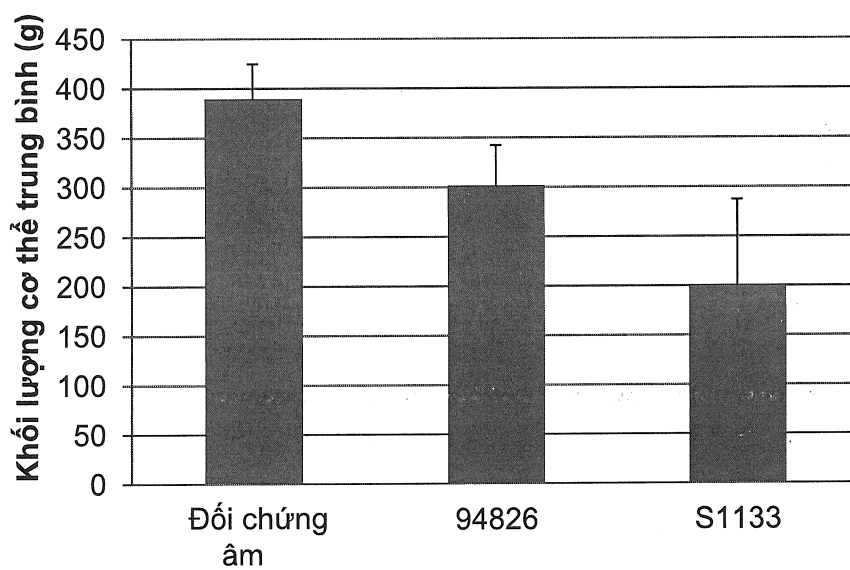


FIG. 11

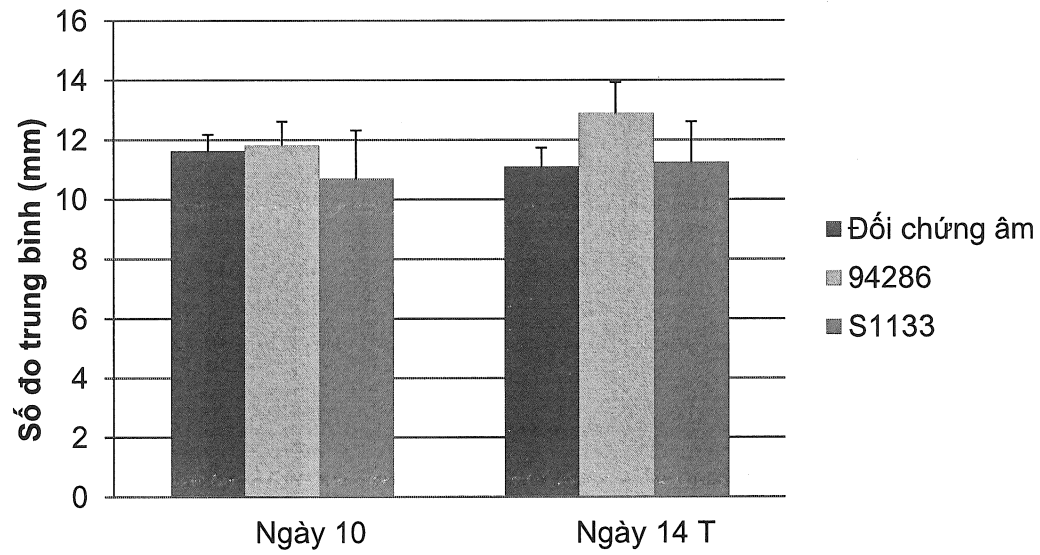


FIG. 12

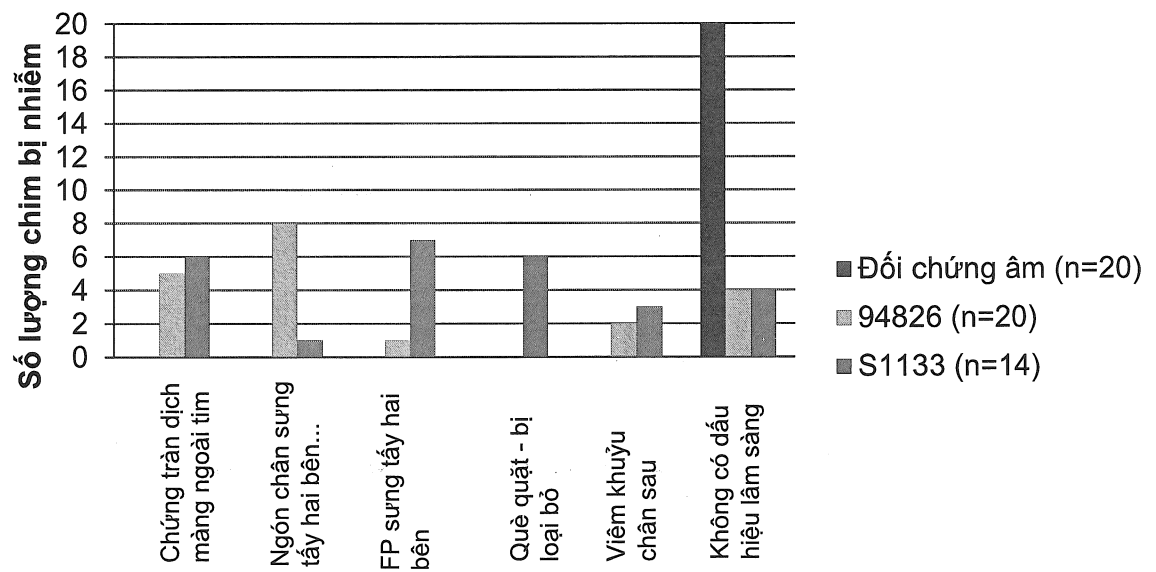


FIG. 13

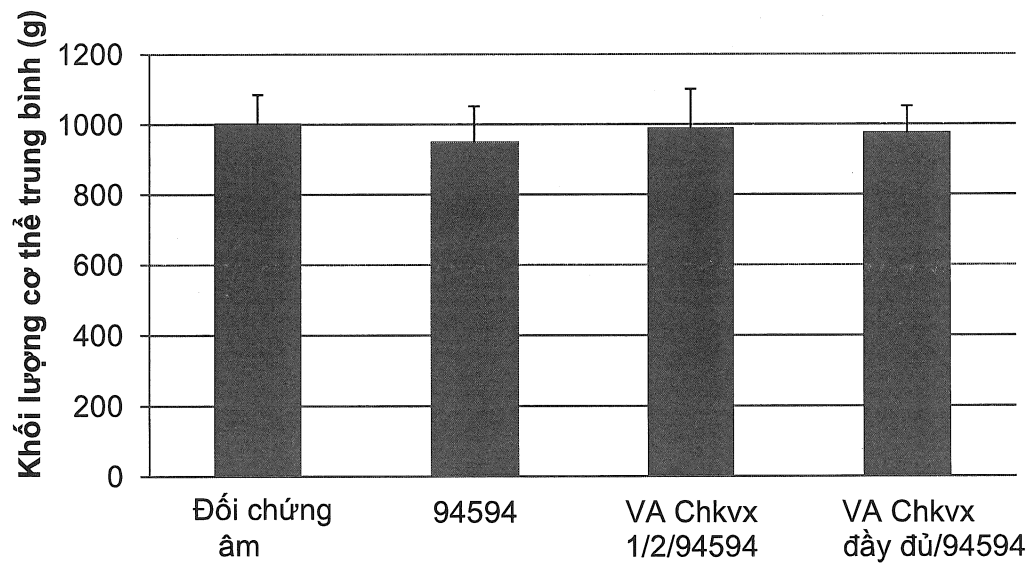


FIG. 14

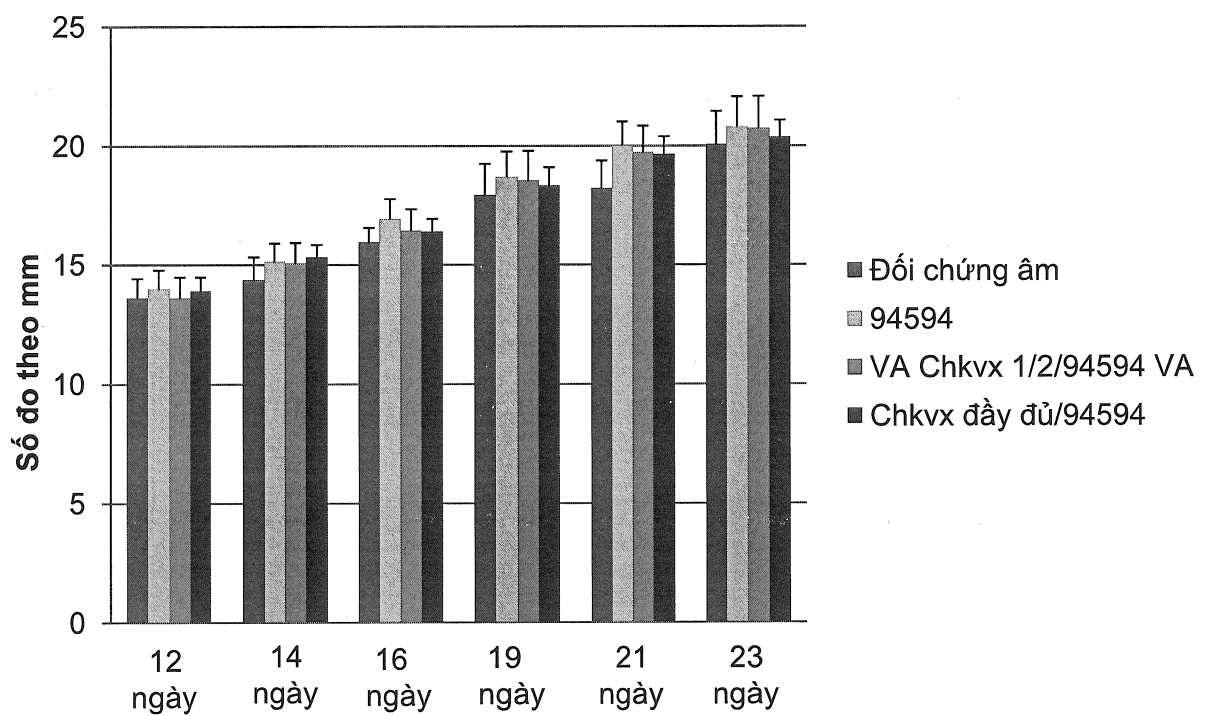


FIG. 15

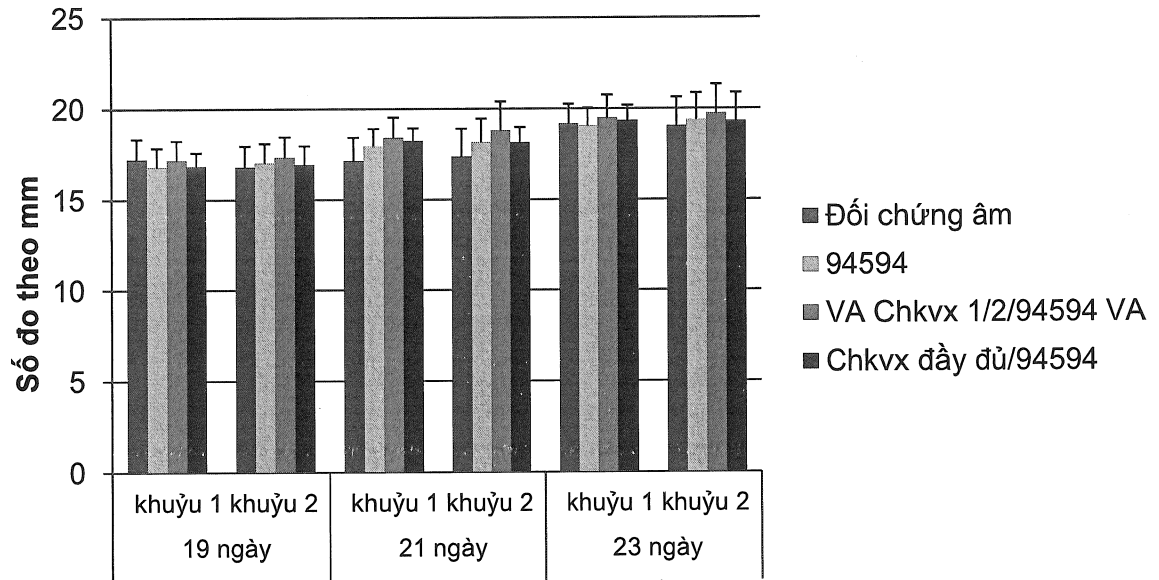


FIG. 16

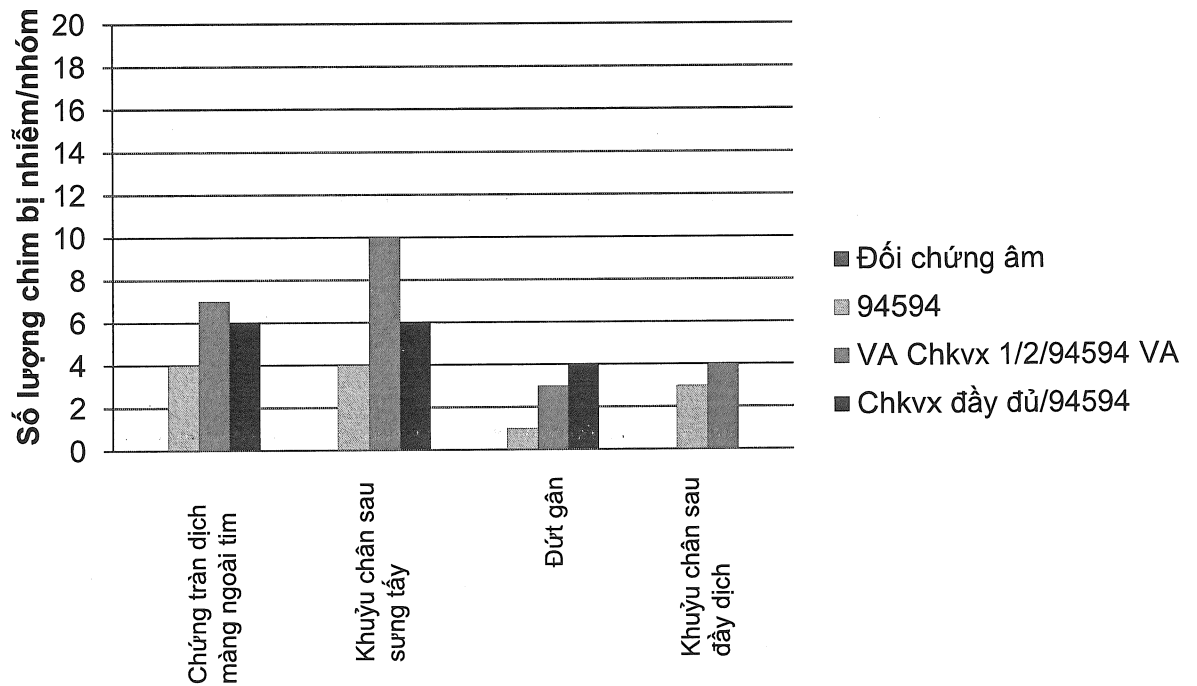


FIG. 17

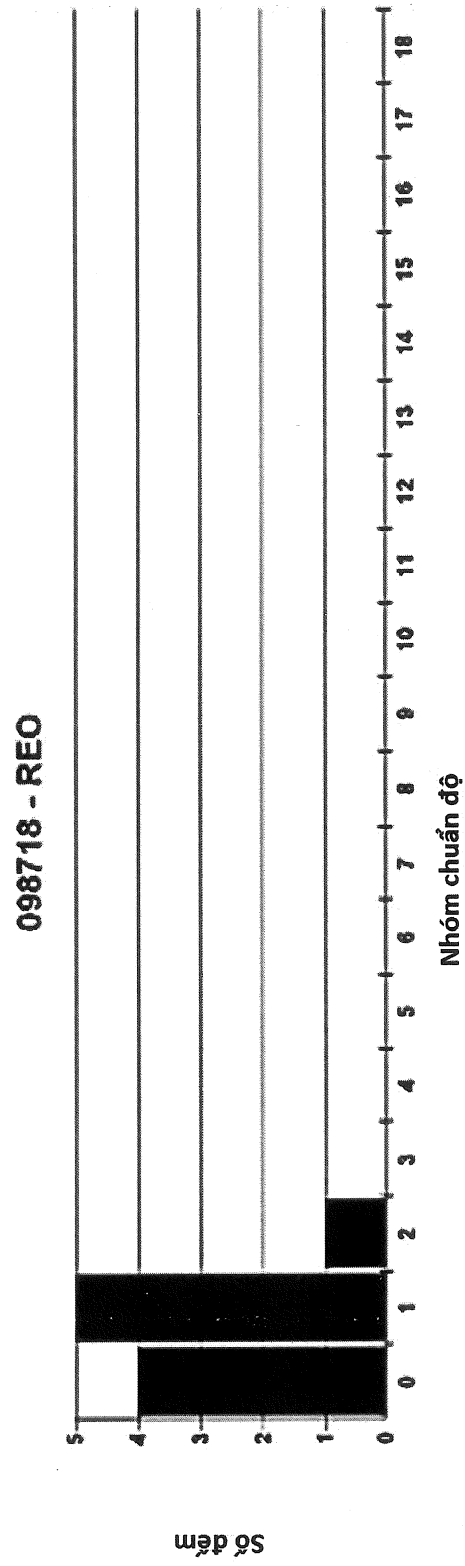


FIG. 18

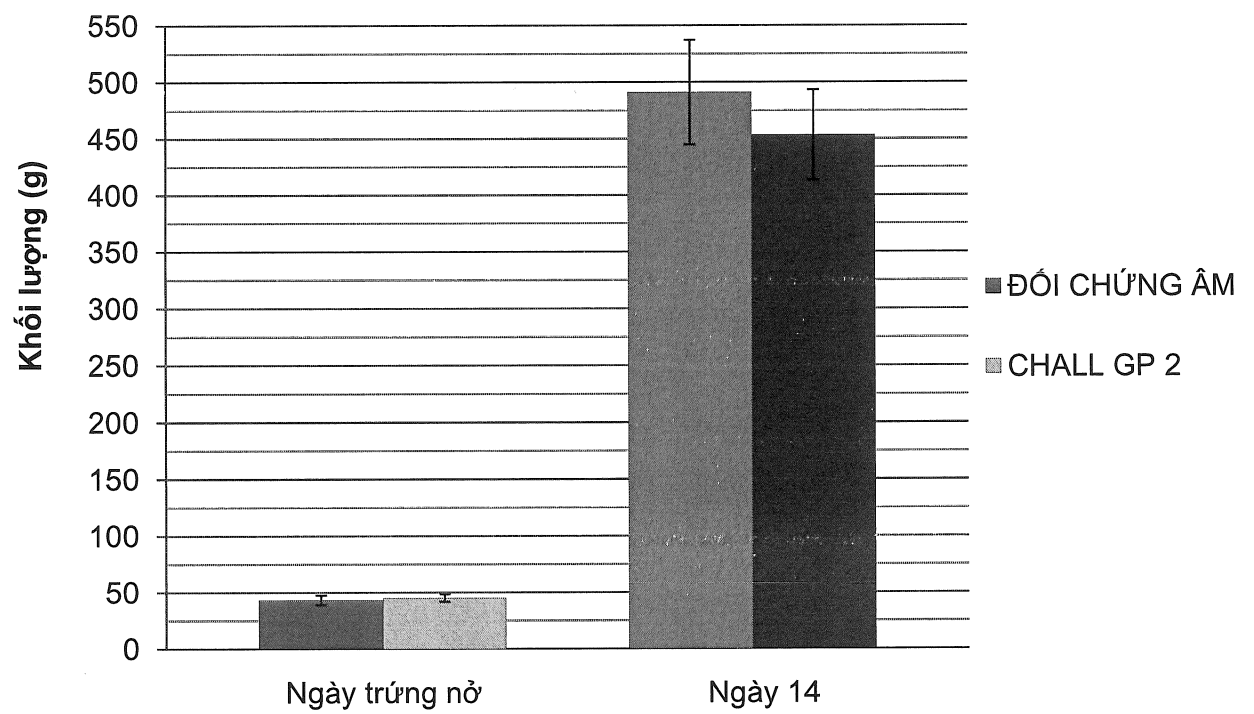


FIG. 19

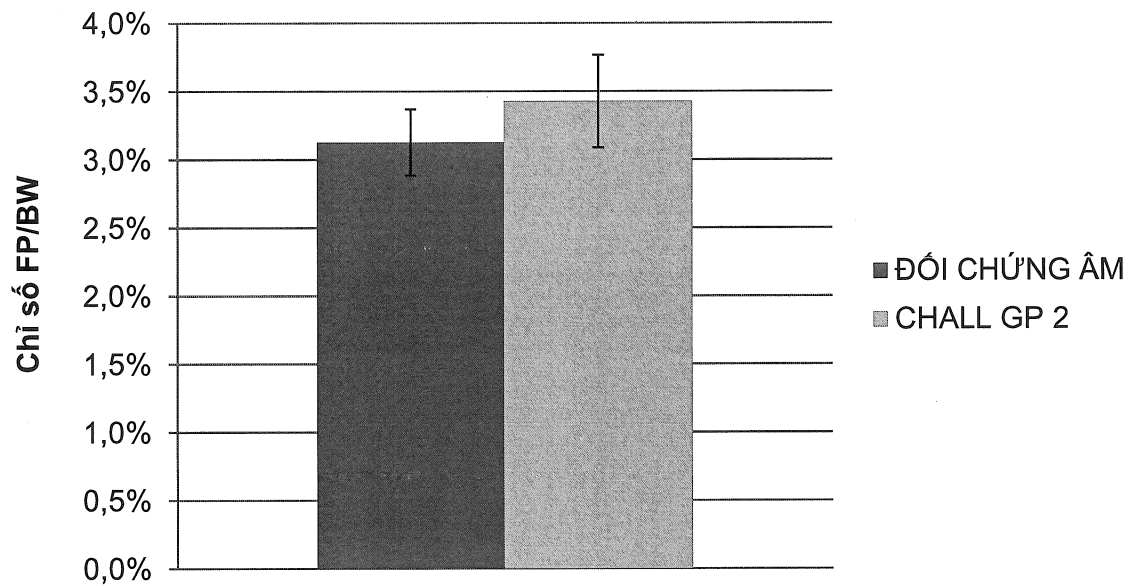


FIG. 20

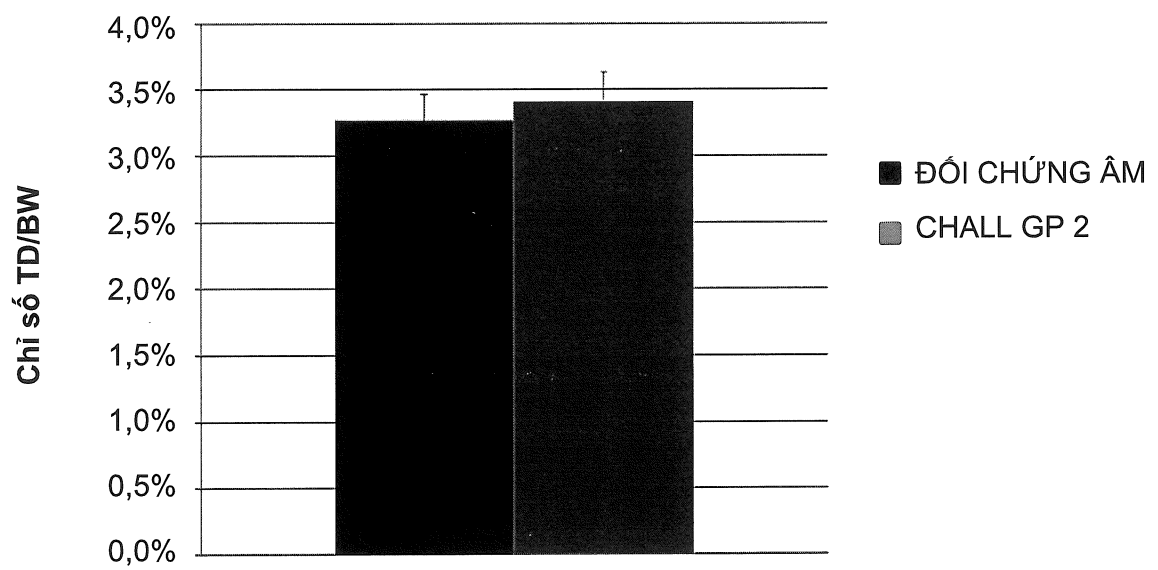


FIG. 21

Mã Số Truy cập	ID Trình tự	Thế phân lập	Loại mô	Ngày lấy	Nước	Nguồn phân lập
KJ803958	GA_91955Td_2011	91955	Gân	8-12-2011	USA: GA	Gà giò
KJ803959	GA_92715Td_2012	92715	Gân	9-2-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803962	GA_93116Td_2012	93116	Gân	5-3-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803963	GA_93117Td_2012	93117	Gân	5-3-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803964	GA_94592Td_2012	94592	Gân	7-6-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803965	GA_94593Td_2012	94593	Gân	7-6-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803966	GA_94594Td_2012	94594	Gân	7-6-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803967	GA_94826Td_2012	94826	Gân	15-6-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803968	AR_95212Td_2012	95212	Gân	26-7-2012	USA: AR	Gà giò
KJ803970	GA_95432Td_2012	95432	Gân	20-8-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803971	AL_95436Td_2012	95436	Gân	21-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803972	AL_95437Ht_2012	95437	Tim	21-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803973	AL_95438Td_2012	95438	Gân	21-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803974	AL_95522Td_2012	95522	Gân	24-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803975	AL_95523Td_2012	95523	Gân	24-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803976	AL_95524Td_2012	95524	Gân	24-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803977	AL_95583Td_2012	95583	Gân	30-8-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803978	AL_95647Td_2012	95647	Gân	5-9-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803980	AL_95873Td_2012	95873	Gân	25-9-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803981	AL_95930Td_2012	95930	Gân	2-10-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803982	AL_95931Td_2012	95931	Gân	2-10-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803983	AL_95932Td_2012	95932	Gân	2-10-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803984	AL_95933Td_2012	95933	Gân	2-10-2012	USA: AL	Gà giò
KJ803987	NC_96034Td_2012	96034	Gân	9-10-2012	USA: NC	Gà giò
KJ803990	GA_96139Td_2012	96139	Gân	17-10-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803991	GA_96317Td_2012	96317	Gân	5-11-2012	USA: GA	Gà giò
KJ803995	AR_96670Td_2012	96670	Gân	7-12-2012	USA: AR	Gà giống gà giò
KJ804002	NC_96824Td_2012	96824	Gân	17-12-2012	USA: NC	Gà giò
KJ804003	NC_96828Td_2012	96828	Gân	17-12-2012	USA: NC	Gà giò
KJ804004	KY_96837Td_2012	96837	Gân	18-12-2012	USA: KY	Gà giò
KJ804006	GA_96916Td_2012	96916	Gân	20-12-2012	USA: GA	Gà giò
KJ804007	GA_96917Td_2012	96917	Gân	20-12-2012	USA: GA	Gà giò
KJ879626	GA_96985Td_2013	96985	Gân	3-1-2013	USA: GA	Gà giò
KJ879627	GA_96986Td_2013	96986	Gân	3-1-2013	USA: GA	Gà giò
KJ879628	NC_97037Td_2013	97037	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879630	NC_97039Td_2013	97039	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879631	NC_97040Td_2013	97040	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879632	NC_97041Td_2013	97041	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879633	NC_97042Td_2013	97042	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879634	NC_97043Td_2013	97043	Gân	4-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879637	AR_97224Td_2013	97224	Gân	17-1-2013	USA: AR	Gà giò
KJ879638	AR_97225Td_2013	97225	Gân	17-1-2013	USA: AR	Gà giò
KJ879639	AR_97227Td_2013	97227	Gân	17-1-2013	USA: AR	Gà giò

FIG. 21 (tiếp)

Mã số truy cập	ID Trình tự	Thẻ phân lập	Loại mô	Ngày Lấy	Nước	Nguồn phân lập
KJ879640	AR_97230Td_2013	97230	Gân	17-1-2013	USA: AR	Gà giò
KJ879647	NC_97361Td_2013	97361	Gân	24-1-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879649	AR_97407Td_2013	97407	Gân	29-1-2013	USA: AR	Gà giò
KJ879650	GA_97415Td_2013	97415	Gân	29-1-2013	USA: GA	Gà giò
KJ879654	FL_97480Td_2013	97480	Gân	6-2-2013	USA: FL	Gà giò
KJ879655	AB_97590Tdsd_2013	97590	Que bôi dịch gân	12-2-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879657	AB_97594Tdsd_2013	97594	Que bôi dịch gân	12-2-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879658	AB_97595Tdsd_2013	97595	Que bôi dịch gân	12-2-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879659	AB_97596Tdsd_2013	97596	Que bôi dịch gân	12-2-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879662	TX_97925Td_2013	97925	Gân	5-3-2013	USA: TX	Gà giò
KJ879663	TX_97926Td_2013	97926	Gân	5-3-2013	USA: TX	Gà giò
KJ879666	NC_97970Td_2013	97970	Gân	6-3-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879668	MS_97993Td_2013	97993	Gân	7-3-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879669	MS_98000Td_2013	98000	Gân	8-3-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879670	SC_98005Td_2013	98005	Gân	8-3-2013	USA: SC	Gà giò
KJ879671	AB_98098Td_2013	98098	Gân	13-3-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879672	AB_98099Td_2013	98099	Gân	13-3-2013	Canada: AB	Gà giò
KJ879673	GA_98175Td_2013	98175	Gân	18-3-2013	USA: GA	Gà giò
KJ879675	SC_98694Td_2013	98694	Gân	17-4-2013	USA: SC	Gà giò
KJ879678	MS_98953Td_2013	98953	Gân	30-4-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879679	MS_98955Td_2013	98955	Gân	30-4-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879680	SC_99112Td_2013	99112	Gân	9-5-2013	USA: SC	Gà giò
KJ879684	NC_99272Td_2013	99272	Gân	17-5-2013	USA: NC	Gà giò
KJ879687	TN_99845Td_2013	99845	Gân	21-6-2013	USA: TN	Gà giò
KJ879692	GA_99952Td_2013	99952	Gân	27-6-2013	USA: GA	Gà giò
KJ879695	MS_100042Td_2013	100042	Gân	3-7-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879702	MS_100201Td_2013	100201	Gân	11-7-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879709	AR_100557Td_2013	100557	Gân	1-8-2013	USA: AR	Gà giống gà giò
KJ879710	AR_100558Td_2013	100558	Gân	1-8-2013	USA: AR	Gà giống gà giò
KJ879711	AR_100560Td_2013	100560	Gân	1-8-2013	USA: AR	Gà giống gà giò
KJ879712	AR_100561Td_2013	100561	Gân	1-8-2013	USA: AR	Gà giống gà giò
KJ879713	MS_100697Td_2013	100697	Gân	9-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879714	MS_100782Td_2013	100782	Gân	15-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879715	MS_100783Td_2013	100783	Gân	15-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879716	MS_100810Td_2013	100810	Gân	16-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879717	MS_100946Td_2013	100946	Gân	29-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879718	MS_100947Td_2013	100947	Gân	29-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879719	MS_100948Td_2013	100948	Gân	29-8-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879720	TX_100970Td_2013	100970	Gân	30-8-2013	USA: TX	Gà giò
KJ879723	MS_101021Td_2013	101021	Gân	5-9-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879724	MS_101039Td_2013	101039	Gân	6-9-2013	USA: MS	Gà giò
KJ879725	TX_101078Td_2013	101078	Gân	10-9-2013	USA: TX	Gà giò

FIG. 21 (tiếp)

Mã số truy cập	ID Trình tự	Thế phân lập	Loại mô	Ngày Lấy	Nước	Nguồn phân lập
KJ879726	TN_101279Td_2013	101279	Gân	24-9-2013	USA: TN	Gà giò
KJ879728	TN_101282Td_2013	101282	Gân	24-9-2013	USA: TN	Gà giò
KJ879729	TN_101291Td_2013	101291	Gân	25-9-2013	USA: TN	Gà giò
KM282057	TN_101293Td_2013	101293	Gân	25-9-2013	USA: TN	Gà giò
KM282058	SC_101343Td_2013	101343	Gân	27-9-2013	USA: SC	Gà giò
KM282059	TN_101490Td_2013	101490	Gân	4-10-2013	USA: TN	Gà giò
KM282060	TN_101491Td_2013	101491	Gân	4-10-2013	USA: TN	Gà giò
KM282061	TN_101492Td_2013	101492	Gân	4-10-2013	USA: TN	Gà giò
KM282062	TN_101493Td_2013	101493	Gân	4-10-2013	USA: TN	Gà giò
KM282063	TN_101494Td_2013	101494	Gân	4-10-2013	USA: TN	Gà giò
KM282064	AR_101548Td_2013	101548	Gân	9-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282065	AR_101549Td_2013	101549	Gân	9-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282066	AR_101550Td_2013	101550	Gân	9-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282067	MO_101582Td_2013	101582	Gân	10-10-2013	USA: MO	Gà giò
KM282068	AR_101604Td_2013	101604	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282069	AR_101605Td_2013	101605	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282070	AR_101606Td_2013	101606	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282071	AR_101607Td_2013	101607	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282072	AR_101608Td_2013	101608	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282073	AR_101609Td_2013	101609	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282074	AR_101610Td_2013	101610	Gân	11-10-2013	USA: AR	Gà giò
KM282076	TX_101782Td_2013	101782	Gân	22-10-2013	USA: TX	Gà giò
KM282079	MS_102033Td_2013	102033	Gân	5-11-2013	USA: MS	Gà giò
KM282080	MS_102036Td_2013	102036	Gân	5-11-2013	USA: MS	Gà giò
KM282081	GA_102492Td_2013	102492	Gân	5-12-2013	USA: GA	Gà giò
KM282082	AR_103077Td_2014	103077	Gân	8-1-2014	USA: AR	Gà giò
KM282083	MS_103097Td_2014	103097	Gân	9-1-2014	USA: MS	Gà giò
KM282084	MS_103124Td_2014	103124	Gân	10-1-2014	USA: MS	Gà giò
KM282088	GA_103671Td_2014	103671	Gân	5-2-2014	USA: GA	Gà giò
KM282089	AR_103754Td_2014	103754	Gân	7-2-2014	USA: AR	Gà giò
KM282090	TN_103959Td_2014	103959	Gân	19-2-2014	USA: TN	Gà giò
KM282091	GA_104190Td_2014	104190	Gân	27-2-2014	USA: GA	Gà giò
KM282092	TN_104248Td_2014	104248	Gân	28-2-2014	USA: TN	Gà giò
KM282093	OH_104254Td_2014	104254	Gân	3-3-2014	USA: OH	Gà giò
KM282095	KY_104414Td_2014	104414	Gân	14-3-2014	USA: KY	Gà giò
KM282096	KY_104415Td_2014	104415	Gân	14-3-2014	USA: KY	Gà giò
KM282097	IN_104533Td_2014	104533	Gân	18-3-2014	USA: IN	Gà giò

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.
SELLERS, Holly S.

<120> Protein C sigma được phân lập của reovirut ở chim và phương pháp phát hiện sự phơi nhiễm với reovirut ở chim

<130> 235.02410201

<150> US 61/932,995

<151> 2014-01-29

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 931

<212> ADN

<213> Reovirut ở chim

<400> 1

atggacggat taactcaaca gcagcgaaga gaagtcgtgg ggttgatact gtcgttgact	60
tcgagcgtga gtacaagttc tggcgatttg acgcaaattc gtgaacgtct ttccgctttg	120
gaatctgcga ctgcgtcggt gaacgaatct attaatacag ctttgtctaa gttagtggat	180
ttgtctgcat cgcttgacaa cgtggcggcc tcgttagcgg agacgaaagt ggaagtgaac	240
tcattggttt ccgacgttca gggtttgca acttctcttg attcttctgc ttcagagctg	300
gcttctctat cttcgttggt gcgtgatcac ggctcttcga ttgctagcct acagaaagaa	360
gtaagtgtct tatcgggtga ggtaggcaac cttaaaacct cggtatcatc gcagggcctt	420
actatcacta gccttgagaa acgagtggaa gctttggaag gtggttctag tacgactctg	480
tcatttgctg atcctcttaa gttagaggct gggaccgtgt cactcgaggt agatccatat	540
ttctgctctg taaatcgtaa tctgacgtcg tattctgcta atgctcagtt gatgcaattt	600
cagtggctctg tgaaagggga agatggcgcg gccaaactcta ttgatatgga cgtgaatgct	660
cactctcatg gttcacgcac tgattatctg atgtcaacca agcaatcatt gactgttaca	720
acgtctcccg ctactctcgt ctttgaactg gataggattg ctgctcttcc ctctgacctt	780

tctcgcctaa ttccatgtta tggttttcag caagctactt ttctgttga tatctccttc 840
 cagcgagatg gcgtctcgca tacgtatcaa gtctatggga cgtacacatc ttctcgcgtc 900
 ttcaagatta cgttctcgcc tggctcctcg g 931

<210> 2
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Reovirut ở chim

<400> 2

Met Asp Gly Leu Thr Gln Gln Gln Arg Arg Glu Val Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Ser Ser Val Ser Thr Ser Ser Gly Asp Leu Thr Gln
 20 25 30

Ile Arg Glu Arg Leu Ser Ala Leu Glu Ser Ala Thr Ala Ser Leu Asn
 35 40 45

Glu Ser Ile Asn Thr Ala Leu Ser Lys Leu Val Asp Leu Ser Ala Ser
 50 55 60

Leu Asp Asn Val Ala Ala Ser Leu Ala Glu Thr Lys Val Glu Val Asn
 65 70 75 80

Ser Leu Val Ser Asp Val Gln Gly Leu Arg Thr Ser Leu Asp Ser Ser
 85 90 95

Ala Ser Glu Leu Ala Ser Leu Ser Ser Leu Val Arg Asp His Gly Ser
 100 105 110

Ser Ile Ala Ser Leu Gln Lys Glu Val Ser Val Leu Ser Gly Glu Val
 115 120 125

Gly Asn Leu Lys Thr Ser Val Ser Ser Gln Gly Leu Thr Ile Thr Ser
 130 135 140

Leu Glu Lys Arg Val Glu Ala Leu Glu Gly Gly Ser Ser Thr Thr Leu
 145 150 155 160

Ser Phe Ala Asp Pro Leu Lys Leu Glu Ala Gly Thr Val Ser Leu Glu
 165 170 175

Val Asp Pro Tyr Phe Cys Ser Val Asn Arg Asn Leu Thr Ser Tyr Ser
 180 185 190

Ala Asn Ala Gln Leu Met Gln Phe Gln Trp Ser Val Lys Gly Glu Asp
 195 200 205

Gly Ala Ala Asn Ser Ile Asp Met Asp Val Asn Ala His Ser His Gly
 210 215 220

Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Met Ser Thr Lys Gln Ser Leu Thr Val Thr
 225 230 235 240

Thr Ser Pro Ala Thr Leu Val Phe Glu Leu Asp Arg Ile Ala Ala Leu
 245 250 255

Pro Ser Asp Leu Ser Arg Leu Ile Pro Cys Tyr Gly Phe Gln Gln Ala
 260 265 270

Thr Phe Pro Val Asp Ile Ser Phe Gln Arg Asp Gly Val Ser His Thr
 275 280 285

Tyr Gln Val Tyr Gly Thr Tyr Thr Ser Ser Arg Val Phe Lys Ile Thr
 290 295 300

Phe Ser Pro Gly Ser Ser
 305 310

<210> 3
 <211> 931
 <212> ADN
 <213> Reovirut ở chim

<400> 3
 atggacggat taactcaaca gcagcgaaga gaagtcgtgg ggttgatact gtcgttgact 60
 tcgagcgtga gtacaagttc tggcgatttg acgcaaattc gtgaacgtct ttccgctttg 120
 gaatctgcga ctgcgtcgtt gaacgaatct attaatacag ctttatctaa gttagtggat 180
 ttgtctgcat cgcttgacaa cgtggcggcc tcgttagcgg agacgaaagt ggaagtgaac 240
 tcattggttt ccgacgttca gggtttgca acttctcttg attcttctgc ttcagagctg 300
 gcttctctat cttcgttggt gcgtgatcac ggctcttcga ttgctagcct acagaaagaa 360
 gtaagtgtct tatcgggtga ggtaggcaac cttaaaacct cggtatcatc gcagggcctt 420
 actatcacta gccttgagaa acgagtggaa gctttggaag gtggttctag tacgactctg 480
 tcatttgctg atcctcttaa gttagaggct gggaccgtgt cactcgaggt agatccatat 540
 ttctgctctg taaatcgtaa tctgacgtcg tattctgcta atgctcagtt gatgcaattt 600
 cagtggctctg tgaaagggga agatggcgcg gccaaactcta ttgatatgga cgtgaatgct 660
 cactctcatg gttcacgcac tgattatctg atgtcaacca agcaatcatt gactgttaca 720
 acgtctcccg ctactctcgt ctttgaactg gataggattg ctgctcttcc ctctgacctt 780
 tctcgcttaa ttccatgtta tggttttcag caagctactt ttcctgttga tatctccttc 840
 cagcgagatg gcgtctcgca tacgtatcaa gtctatggga cgtacacatc ttctcgcgtc 900
 ttcaagatta cgttctcgcc tggctcctca g 931

<210> 4
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Reovirut ò chim

<400> 4

Met Asp Gly Leu Thr Gln Gln Gln Arg Arg Glu Val Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Ser Ser Val Ser Thr Ser Ser Gly Asp Leu Thr Gln
 20 25 30

Ile Arg Glu Arg Leu Ser Ala Leu Glu Ser Ala Thr Ala Ser Leu Asn
 35 40 45

Glu Ser Ile Asn Thr Ala Leu Ser Lys Leu Val Asp Leu Ser Ala Ser
 50 55 60

Leu Asp Asn Val Ala Ala Ser Leu Ala Glu Thr Lys Val Glu Val Asn
 65 70 75 80

Ser Leu Val Ser Asp Val Gln Gly Leu Arg Thr Ser Leu Asp Ser Ser
 85 90 95

Ala Ser Glu Leu Ala Ser Leu Ser Ser Leu Val Arg Asp His Gly Ser
 100 105 110

Ser Ile Ala Ser Leu Gln Lys Glu Val Ser Val Leu Ser Gly Glu Val
 115 120 125

Gly Asn Leu Lys Thr Ser Val Ser Ser Gln Gly Leu Thr Ile Thr Ser
 130 135 140

Leu Glu Lys Arg Val Glu Ala Leu Glu Gly Gly Ser Ser Thr Thr Leu
 145 150 155 160

Ser Phe Ala Asp Pro Leu Lys Leu Glu Ala Gly Thr Val Ser Leu Glu
 165 170 175

Val Asp Pro Tyr Phe Cys Ser Val Asn Arg Asn Leu Thr Ser Tyr Ser
 180 185 190

Ala Asn Ala Gln Leu Met Gln Phe Gln Trp Ser Val Lys Gly Glu Asp
 195 200 205

Gly Ala Ala Asn Ser Ile Asp Met Asp Val Asn Ala His Ser His Gly
 210 215 220

Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Met Ser Thr Lys Gln Ser Leu Thr Val Thr
 225 230 235 240

Thr Ser Pro Ala Thr Leu Val Phe Glu Leu Asp Arg Ile Ala Ala Leu
 245 250 255

Pro Ser Asp Leu Ser Arg Leu Ile Pro Cys Tyr Gly Phe Gln Gln Ala
 260 265 270

Thr Phe Pro Val Asp Ile Ser Phe Gln Arg Asp Gly Val Ser His Thr
 275 280 285

Tyr Gln Val Tyr Gly Thr Tyr Thr Ser Ser Arg Val Phe Lys Ile Thr
 290 295 300

Phe Ser Pro Gly Ser Ser
 305 310

<210> 5
 <211> 931
 <212> ADN
 <213> Reovirut ở chim

<400> 5
 atggcgggtc tcagtccatc acagcgaaga gaggtcgtca gcttgatact gtcattgact 60
 tcgaacgcga ctataagtcc tggcgatttg acgacaatcc atgagcgggt gactaatttg 120
 gaagcgtcta cagaatcact ataccgctcc atctccagca tgtctgttac tgtttccgac 180
 gtttctacag atttgcagaa cgtgactcgc gctctggatg atgtgatcac caacttaaatt 240
 ggtatgagag ccaccattac tgcacttcaa gattctgttt ccactctctc aacaactgtg 300
 accgacttat caagcacttc ttctgcgcac tcggaaaactc tatcttcact ccgaaatata 360
 gttaatggga actccactac cattggtaat ttgaaaagtg atgtatcatc aaatggccta 420
 gctatcacag acctgcagag tcgcgttaaa tccttggagt ctacttcgag tcacggactg 480
 tccttttctc ctctcttag tgcgctgac ggcgtggtgt cgttgaatat ggacccgtac 540
 ttttgctctc agcgagtttc cttgacatct tactcagcag aggctcaact aatgcaattc 600

caatggatgg ccagaggttc taacggatca tcggacaata ttgacatgaa cgtaaagccc 660
 cactgtcatg ggagacgcac tgactatata atgtcgtcta cgggaggtct tacggttact 720
 cgtaatgccg tgtccttaac cttcgatttg agttatatta caaagctccc atcggacctc 780
 tcacgtctta tccccagtgc gggattttcaa gccgcgtcgt ttccagcgga tgtatccttc 840
 accagagatt ccacaacca tgcgtatcaa gcttatggag tatattccag ctctcgcgta 900
 ttactatta ctttcccgac tgggtggtgac g 931

<210> 6
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Reovirut ở chim

<400> 6

Met Ala Gly Leu Ser Pro Ser Gln Arg Arg Glu Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Ser Asn Ala Thr Ile Ser Pro Gly Asp Leu Thr Thr
 20 25 30

Ile His Glu Arg Leu Thr Asn Leu Glu Ala Ser Thr Glu Ser Leu Tyr
 35 40 45

Arg Ser Ile Ser Ser Met Ser Val Thr Val Ser Asp Val Ser Thr Asp
 50 55 60

Leu Gln Asn Val Thr Arg Ala Leu Asp Asp Val Ile Thr Asn Leu Asn
 65 70 75 80

Gly Met Arg Ala Thr Ile Thr Ala Leu Gln Asp Ser Val Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Thr Thr Val Thr Asp Leu Ser Ser Thr Ser Ser Ala His Ser Glu
 100 105 110

Thr Leu Ser Ser Leu Arg Asn Thr Val Asn Gly Asn Ser Thr Thr Ile
 115 120 125

Gly Asn Leu Lys Ser Asp Val Ser Ser Asn Gly Leu Ala Ile Thr Asp
 130 135 140

Leu Gln Ser Arg Val Lys Ser Leu Glu Ser Thr Ser Ser His Gly Leu
 145 150 155 160

Ser Phe Ser Pro Pro Leu Ser Val Ala Asp Gly Val Val Ser Leu Asn
 165 170 175

Met Asp Pro Tyr Phe Cys Ser Gln Arg Val Ser Leu Thr Ser Tyr Ser
 180 185 190

Ala Glu Ala Gln Leu Met Gln Phe Gln Trp Met Ala Arg Gly Ser Asn
 195 200 205

Gly Ser Ser Asp Asn Ile Asp Met Asn Val Asn Ala His Cys His Gly
 210 215 220

Arg Arg Thr Asp Tyr Ile Met Ser Ser Thr Gly Gly Leu Thr Val Thr
 225 230 235 240

Arg Asn Ala Val Ser Leu Thr Phe Asp Leu Ser Tyr Ile Thr Lys Leu
 245 250 255

Pro Ser Asp Leu Ser Arg Leu Ile Pro Ser Ala Gly Phe Gln Ala Ala
 260 265 270

Ser Phe Pro Ala Asp Val Ser Phe Thr Arg Asp Ser Thr Thr His Ala
 275 280 285

Tyr Gln Ala Tyr Gly Val Tyr Ser Ser Ser Arg Val Phe Thr Ile Thr
 290 295 300

Phe Pro Thr Gly Gly Asp

305

310

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp

<400> 7
 agtattttgtg agtacgattg 20

<210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi oligonucleotit tổng hợp

<400> 8
 ggcgccacac cttaggt 17