



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



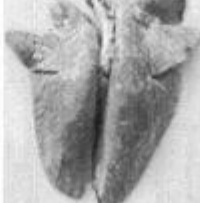
1-0028170

(51)⁷ C07K 14/30; C12N 15/31; C12N 15/11; (13) B
A61K 39/02; C12N 15/10

-
- (21) 1-2015-02801 (22) 05/02/2013
(86) PCT/CN2013/071379 05/02/2013 (87) WO2014/121433 A1 14/08/2014
(45) 25/05/2021 398 (43) 25/02/2016 335A
(73) AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)
No. 1, Ln. 51 Dahu Road, Xiangshan Dist., Hsinchu City, Taiwan 300
(72) Jiunn-Horng, LIN (TW); Jyh-Perng Wang (TW); Ming-Wei Hsieh (TW); Zeng-
Weng Chen (TW); Chien-Yu Fang (TW); Hsueh-Tao Liu (TW); Ping-Cheng Yang
(TW).
(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)
-

(54) CHẾ PHẨM NGĂN NGỪA BỆNH GÂY RA BỞI MYCOPLASMA SPP.

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm ngăn ngừa bệnh gây ra bởi *Mycoplasma* spp.. Chế phẩm này bao gồm: hoạt chất chứa protein của Mhp145 và tá dược được dụng. Chế phẩm này được chứng minh bằng thực nghiệm có khả năng cảm ứng đáp ứng miễn dịch đủ để tránh cho lợn khỏi sự nhiễm *Mycoplasma* spp.. Chế phẩm này không chỉ an toàn hơn chế phẩm thông thường mà còn có hiệu quả miễn dịch tương đương hoặc thậm chí tốt hơn so với các chế phẩm thông thường.

Kháng nguyên	Điểm	Phổi, phía lưng	Phổi, phía ngực
XylF+Mhp145	13		
PdhA+P78	15		
P132	26		
XylF	27		

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm ngăn ngừa bệnh gây ra bởi *Mycoplasma* spp..

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mycoplasma spp. được biết đến là vi khuẩn nhỏ nhất có khả năng tự nhân lên bên ngoài tế bào vật chủ. Mặc dù bệnh suyễn lợn không phải là nguyên nhân gây chết ở lợn, nhưng nó làm giảm hiệu quả chăn nuôi và gây ra sự chậm tăng trưởng, viêm, và ức chế miễn dịch cũng như là làm cho lợn dễ tổn thương hơn với sự nhiễm các yếu tố gây bệnh khác, do đó gây nguy hại về mặt kinh tế cho nền nông nghiệp.

Hơn nữa, bệnh suyễn lợn được phòng trừ bằng ba cách bao gồm: Sử dụng thuốc, quản lý môi trường, và tiêm chủng. Thấy rằng hiệu quả ngăn ngừa kém của kháng sinh với *Mycoplasma hyopneumoniae*, việc áp dụng thuốc có thể chỉ để cho mục đích điều trị và nó khó đáp ứng được nhu cầu phòng trừ. Ngoài ra, việc lạm dụng thuốc có thể dẫn đến sự nhiễm lớn hơn gây ra do vi khuẩn kháng thuốc, việc áp dụng thuốc cần kế hoạch thận trọng và tồn tại hạn chế.

Quản lý môi trường tạo ra nền tảng cho việc phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp.. Quản lý và vệ sinh chuồng lợn tốt có thể hữu ích để giảm sự xuất hiện nhiễm bệnh. Mặt khác, phòng trừ có thể toàn diện hơn thông qua tiêm chủng.

Các vaccin thông thường trong lĩnh vực này sử dụng vi khuẩn bất hoạt/chết làm hoạt chất của nó. Tuy nhiên, giá của vaccin thông thường rất cao vì *Mycoplasma* spp. là vi khuẩn khó nuôi và khó để nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Để giảm giá thành vaccin *Mycoplasma* spp., các nhà khoa học tiếp tục cố gắng phát triển các loại vaccin khác, như: (1) vaccin được làm yếu, (2) vaccin vector, (3) vaccin thể hệ hai, và (4) vaccin ADN. Trong số chúng, vaccin thể hệ hai thể hiện tiềm năng nhất vì những ưu điểm dễ dàng trong sản xuất và độ an toàn cao.

Đến nay, có một số protein tiềm năng có thể được sử dụng cho vaccin *M. hyopneumoniae*; tuy nhiên, không có báo cáo nào xác nhận protein thích hợp cho vaccin *M. hyopneumoniae*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo quan điểm trên, mục đích của sáng chế là đề xuất kháng nguyên thích hợp để được sử dụng trong vaccin *M. hyopneumoniae* và nhờ đó sản xuất vaccin *M. hyopneumoniae* mới sao cho giảm chi phí phòng bệnh.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất sự kết hợp các kháng nguyên thích hợp để được sử dụng trong vaccin *M. hyopneumoniae* và nhờ đó tạo ra vaccin thể hệ hai với hiệu suất tốt hơn; do đó, có nhiều lựa chọn hơn cho nhiệm vụ phòng chống.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất protein tái tổ hợp ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp., chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, hoặc sự kết hợp chúng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp., chứa: hoạt chất bao gồm protein PdhA, XylF, EutD, Mhp145, P78, P132, Mhp389, hoặc sự kết hợp chúng; và tá dược được dụng.

Tốt hơn nữa, hoạt chất này có nồng độ từ 50 đến 3500 µg/mL tính theo tổng thể tích của chế phẩm này.

Tốt hơn nữa, hoạt chất này bao gồm ít nhất hai protein được chọn từ nhóm bao gồm PdhA, XylF, EutD, Mhp145, P78, P132, và Mhp389.

Tốt hơn nữa, hoạt chất này bao gồm PdhA và P78.

Tốt hơn nữa, hoạt chất này bao gồm XylF và Mhp145.

Tốt hơn nữa, tá dược được dụng là tá dược Freund hoàn chỉnh, tá dược Freund không hoàn chỉnh, gel nhôm, chất hoạt động bề mặt, tá dược polyanion, peptit, chất nhũ hóa dầu, hoặc sự kết hợp chúng.

Tốt hơn nữa, chế phẩm này còn bao gồm chất phụ gia được dụng. Tốt hơn nữa, chất phụ gia được dụng là dung môi, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp thụ, hoặc sự kết hợp chúng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm: hoạt chất bao gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 08, SEQ ID

NO: 09, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, hoặc sự kết hợp chúng; và tá dược dụng.

Tốt hơn nếu, hoạt chất này có nồng độ từ 50 đến 3500 µg/mL tính theo tổng thể tích của chế phẩm này.

Tốt hơn nếu, hoạt chất này bao gồm ít nhất hai trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 14.

Tốt hơn nếu, hoạt chất này bao gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 08 và SEQ ID NO: 12.

Tốt hơn nếu, hoạt chất này bao gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 09 và SEQ ID NO: 11.

Tốt hơn nếu, chế phẩm này còn bao gồm chất phụ gia dược dụng. Tốt hơn nếu, chất phụ gia dược dụng này là dung môi, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp thụ, hoặc sự kết hợp chúng.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm: plasmid; trong đó plasmid này bao gồm: trình tự nucleotit chứa ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, SEQ ID NO: 04, SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, và SEQ ID NO: 07; và yếu tố điều hòa.

Tốt hơn nếu, yếu tố điều hòa này bao gồm vùng khởi động và vị trí gắn kết ribosom.

Tốt hơn nếu, plasmid này là pET-MSY, pET-YjgD, pET-D, hoặc pET-SUMO.

Tốt hơn nếu, plasmid này còn bao gồm gen mã hóa phần dung hợp. Tốt hơn nếu, phần dung hợp này là MsyB của *E. coli*, YjgD của *E. coli*, protein D của thực khuẩn thể Lambda, hoặc SUMO của *S. cerevisiae*.

Tốt hơn nếu, vector biểu hiện được sử dụng cho hệ thống biểu hiện gen *E. coli*.

Tóm lại, sáng chế đề cập đến kháng nguyên thích hợp để được sử dụng làm hoạt chất của vacxin *M. hyopneumoniae* thể hệ hai và vacxin *M. hyopneumoniae* thể hệ

hai/chế phẩm được điều chế bằng cách sử dụng kháng nguyên này. Vaccin thể hệ hai không chỉ có thể có hiệu quả được sử dụng trong việc ngăn ngừa để làm giảm chi phí, mà sự bộc lộ của sáng chế còn thể hiện rằng vaccin “hỗn hợp” thể hệ hai (tức là, có ít nhất hai kháng nguyên làm hoạt chất) sử dụng ít nhất hai kháng nguyên của sáng chế có cảm ứng đáp ứng miễn dịch được cải thiện.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả của điện di protein trên gel hai chiều được tiến hành trong ví dụ thứ nhất của sáng chế.

Fig. 2 thể hiện kết quả của phản ứng màu của Western blot tiến hành trong ví dụ thứ nhất của sáng chế.

Fig. 3 thể hiện kết quả điện di sản phẩm PCR thu được trong ví dụ thứ hai của sáng chế.

Fig. 4 thể hiện sự ghi nhận thử nghiệm thử thách được tiến hành trong ví dụ thứ ba của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một trong những khái niệm mấu chốt của sáng chế là khảo sát kháng nguyên thử nghiệm tiềm năng thích hợp cho vaccin thể hệ hai bằng cách sử dụng điện di protein trên gel hai chiều cùng với kỹ thuật sàng lọc miễn dịch và xác định kháng nguyên bằng khối phổ. Sau đó, hiệu suất của vaccin thể hệ hai được xác nhận kháng nguyên bằng thử nghiệm trên mô hình động vật.

Tóm lại, tiến trình phát triển sáng chế là:

(1) Cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở lợn thí nghiệm bằng cách tiêm vaccin *M. hyopneumoniae* thông thường và thu huyết thanh chứa kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*. (2) Thu protein tổng số của *M. hyopneumoniae* để điện di protein trên gel hai chiều. (3) Tiến hành lai kết quả điện di protein trên gel hai chiều của bước (2) bằng cách sử dụng huyết thanh của bước (1) làm kháng thể thứ nhất, và sau đó thu protein thể hiện dương tính (tức là, kháng nguyên thử nghiệm) từ gel sau khi khuếch đại bằng kháng thể thứ hai và quy trình phát triển sau đây. (4) Xác định kháng nguyên thử nghiệm thu được trong bước (3). (5) Biểu hiện kháng nguyên thử nghiệm này với lượng lớn bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện gen *E. coli*. (6) Kiểm tra hiệu quả của

vacxin thể hệ hai này trong việc làm giảm các đặc điểm gây bệnh ở phổi bằng thử nghiệm thử thách ở lợn và nhờ đó xác minh giá trị của kháng nguyên thử nghiệm này trong việc được sử dụng làm hoạt chất của vacxin thể hệ hai.

Chế phẩm ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp. bao gồm hoạt chất và tá dược được dụng. Theo phương án của sáng chế, hoạt chất này có thể là PdhA, XylF, EutD, Mhp145, P78, P132, hoặc Mhp389. Theo phương án thay thế, miễn là yếu tố quyết định kháng nguyên của protein bất kỳ nêu trên không bị cản trở, hoạt chất này có thể là protein dung hợp của hai protein bất kỳ nêu trên. Theo hương án thay thế khác, hoạt chất này bao gồm ít nhất hai protein nêu trên; nên được gọi là vacxin “hỗn hợp” của sáng chế.

Theo phương án khác của sáng chế, hoạt chất này có thể bao gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, hoặc sự kết hợp chúng. Theo phương án thay thế, miễn là yếu tố quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng cách gấp peptit của trình tự axit amin này không bị cản trở, hoạt chất này có thể là protein dung hợp với ít nhất hai trình tự đã nêu. Theo phương án thay thế khác, hoạt chất này bao gồm hai hoặc nhiều protein tương ứng bao gồm một trong các trình tự axit amin nêu trên; nên được gọi là vacxin “hỗn hợp” của sáng chế.

Tá dược được dụng được sử dụng để cải thiện hiệu quả miễn dịch của hoạt chất này, làm ổn định hoạt chất này, và/hoặc làm tăng tính an toàn của vacxin. Tá dược được dụng của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở: tá dược Freund hoàn chỉnh, tá dược Freund không hoàn chỉnh, gel nhôm, chất hoạt động bề mặt, tá dược polyanion, peptit, chất nhũ hóa dầu, hoặc sự kết hợp chúng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể có một hoặc ít nhất hai hoạt chất này (tức là vacxin hỗn hợp). Trong ví dụ của sáng chế, hoạt chất này có nồng độ từ 50 đến 3500 µg/mL tính theo tổng thể tích của chế phẩm này. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, khi chế phẩm chứa chỉ một hoạt chất đã nêu, hoạt chất này có nồng độ 50 đến 500 µg/mL tính theo tổng thể tích của chế phẩm này. Theo phương án thay thế của sáng chế, chế phẩm bao gồm ít nhất một hoạt chất đã nêu; trong đó nồng độ tổng số của hoạt chất này có trong chế phẩm này là từ 50 đến 1000 µg/mL, từ 50 đến 1500

$\mu\text{g/mL}$, từ 50 đến 2000 $\mu\text{g/mL}$, từ 50 đến 2500 $\mu\text{g/mL}$, từ 50 đến 3000 $\mu\text{g/mL}$, hoặc từ 50 đến 3500 $\mu\text{g/mL}$ tính theo tổng thể tích của chế phẩm này.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất vector biểu hiện để ngăn ngừa sự nhiễm *Mycoplasma* spp.. Đặc biệt là, vector biểu hiện có thể được sử dụng cho hệ thống biểu hiện gen *E. coli*. Tuy nhiên, không nằm ngoài phạm vi của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể cải biến vector nêu trên căn cứ vào sự bộc lộ của sáng chế và tạo ra vector thích hợp cho hệ thống biểu hiện gen khác trong khi vẫn thuộc phạm vi của sáng chế.

Vector biểu hiện nêu trên bao gồm plasmit. Plasmit này chứa: trình tự nucleotit bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm trình tự SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, SEQ ID NO: 04, SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07, và sự kết hợp chúng; và yếu tố điều hòa.

Vector nêu trên được sử dụng trong hệ thống biểu hiện gen *E. coli* và để sản xuất kháng nguyên của sáng chế thông qua *E. coli*. Nói cách khác, trình tự nucleotit này có thể được dịch mã thành trình tự amin của kháng nguyên này thông qua hệ thống biểu hiện gen *E. coli* và do đó trình tự axit amin có thể gấp lại thành kháng nguyên.

Theo phương án thay thế, miễn là sự hoạt động của hệ thống biểu hiện gen *E. coli* không bị cản trở và sản phẩm của trình tự nucleotit và sự gấp lại của trình tự axit amin sau đó không bị cản trở, plasmit này có thể bao gồm hai hoặc nhiều trình tự nucleotit.

Yếu tố điều hòa nêu trên được đề cập đến là yếu tố cần thiết cho sự khởi đầu phiên mã và dịch mã trong hệ thống biểu hiện. Yếu tố điều hòa nêu trên sẽ ít nhất bao gồm vùng khởi động, và vị trí gắn kết ribosom. Tốt hơn nếu, yếu tố điều hòa nêu trên có thể còn bao gồm: vùng vận hành, trình tự tăng cường, hoặc sự kết hợp chúng.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, plasmit này còn bao gồm gen mã hóa phần dung hợp. Phần dung hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở MsyB của *E. coli*, YjgD của *E. coli*, protein D của thực khuẩn thể Lambda, hoặc SUMO của *S. cerevisiae*. MsyB giàu axit amin loại axit và có thể thuận lợi để cải thiện tính hòa tan của protein được sản xuất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau thuật lại các thử nghiệm và các thí nghiệm theo sáng chế để giải thích thêm các đặc trưng và các lợi ích của sáng chế. Sẽ được lưu ý rằng các ví dụ sau minh họa và sẽ không được sử dụng để giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Sàng lọc kháng nguyên thử nghiệm thích hợp để được sử dụng làm hoạt chất của vacxin thể hệ hai.

Điều chế huyết thanh chứa kháng thể kháng *Mycoplasma* spp. ở lợn.

Theo nghiên cứu, có bảy chủng *Mycoplasma* spp. có thể được phân lập từ lợn: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma bovis* (Gourlay *et al.*, 1978; Blank *et al.*, 1996; Assuncao *et al.*, 2005). Trong số đó, *M. hyopneumoniae* là yếu tố gây bệnh chính của bệnh suyễn lợn với tỷ lệ nhiễm là từ 25 đến 93%. Do đó, sáng chế đã sử dụng *M. hyopneumoniae* (chủng PRIT-5) cho nghiên cứu proteomic miễn dịch và làm nguồn gen mã hóa kháng nguyên. Môi trường Friis (Friis *et al.*, 1975) được sử dụng trong nuôi cấy *M. hyopneumoniae*. Theo thiết kế thí nghiệm, lượng thích hợp kháng sinh hoặc thạch có nồng độ 1,5% được bổ sung để tạo môi trường rắn.

Ba lợn SPF 4 tuần tuổi được mua từ Viện nghiên cứu kỹ thuật nông nghiệp và nuôi với thức ăn giống nhau và được giữ ở môi trường và điều kiện sinh trưởng giống nhau trong chuồng lợn trước khi thí nghiệm. Sau đó lợn được nuôi đến 32 ngày, 46 ngày, và 60 ngày tuổi, lợn được cho dùng 2 mL vacxin Bayovac® MH-PRIT-5 (*M. hyopneumoniae* PRIT-5) thông qua tiêm bắp. Sau đó, lợn được nuôi tiếp tục đến 74 ngày tuổi và thu máu từ tĩnh mạch cảnh của nó. Máu thu được được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Trong ngày tiếp theo, ly tâm máu thu được ở 1107×g trong 30 phút và dịch nổi được chuyển sang ống sạch và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Điện di protein trên gel hai chiều protein tổng số của *Mycoplasma* spp.

Kit chiết protein ReadyPrep™ (protein tổng số) (Bio-Rad, CA, USA) được sử dụng để tách chiết protein tổng số của *Mycoplasma* spp.. Sau đó, nồng độ protein thu được được xác định bằng cách sử dụng Kit phân tích protein Bio-Rad RC DC (CA,

USA). Quy trình chi tiết có thể được tham khảo từ mô tả sản phẩm và có thể được cải biến từ quy trình đã biết trong lĩnh vực này.

Điện di protein trên gel hai chiều được tiến hành theo hai bước: điện di theo điểm đẳng điện (IEF) và điện di trên gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (SDS-PAGE). IEF để tách protein trong mẫu theo điểm đẳng điện của nó; SDS-PAGE để tách protein theo trọng lượng phân tử của nó. Xem Fig. 1, thể hiện kết quả điện di protein trên gel hai chiều.

Lai hóa

Huyết thanh thu được trong bước (1) được sử dụng là kháng thể thứ nhất để lai với kết quả điện di protein trên gel hai chiều trong bước (2). Sau đó được khuếch đại bằng kháng thể thứ hai và được phát triển bằng quy trình phát triển sau, protein thể hiện dương tính được thu lại. Các protein này được xác nhận bằng kháng thể kháng *Mycoplasma* spp. và do đó có thể thích hợp làm kháng nguyên thử nghiệm của hoạt chất của vacxin thể hệ hai.

Sự lai hóa được tiến hành bằng Western blotting. Tóm lại, gel 2D sau điện di được chuyển lên màng PVDF. Sau đó, màng được ủ và sau đó được lai với kháng thể thứ nhất (huyết thanh chứa kháng thể kháng *Mycoplasma* spp.) và kháng thể thứ hai (kháng IgG lợn liên hợp AP). Sau đó, phản ứng màu được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch NBT/BCIP.

Kết quả của phản ứng màu Western blotting được thể hiện trong Fig. 2; trong đó 10 protein dương tính với lai miễn dịch bằng kháng thể kháng *Mycoplasma* spp. được đánh dấu làm kháng nguyên thử nghiệm để được sử dụng làm hoạt chất của vacxin thể hệ hai.

Nhận biết kháng nguyên thử nghiệm thu được

Theo phản ứng màu của Western blotting, gel tương ứng với vị trí dương tính trên màng được cắt mảnh micropeptit và được phân tích bằng khối phổ. Dữ liệu khối phổ thu được sau đó được so sánh với dữ liệu trình tự axit amin để xác định protein.

Xem bảng 1 sau, 10 protein dương tính với lai miễn dịch bằng kháng thể kháng *Mycoplasma* spp. được liệt kê.

Bảng 1: 10 protein dương tính với lai miễn dịch bằng kháng thể kháng *Mycoplasma* spp. và trình tự amin của nó.

Kháng nguyên thử nghiệm	Tên	SEQ ID NO
1	XylF (lipoprotein liên kết xyloza)	SEQ ID NO: 09
2	XylF (lipoprotein liên kết xyloza)	SEQ ID NO: 09
3	XylF (lipoprotein liên kết xyloza)	SEQ ID NO: 09
4	PdhA (pyruvat dehydrogenaza E1-tiểu đơn vị alpha)	SEQ ID NO: 08
5	Mhp145 (protein liên kết đường chu chất)	SEQ ID NO: 11
6	EutD (phosphotransaxetylaza)	SEQ ID NO: 10
7	EutD (phosphotransaxetylaza)	SEQ ID NO: 10
8	Mhp389	SEQ ID NO: 14
9	P78 (lipoprotein)	SEQ ID NO: 12
10	P132	SEQ ID NO: 13

*XylF và EutD có trạng thái nạp khác nhau trong tế bào và do đó trở thành vị trí dương 3 và 2 trên màng.

Ví dụ 2: Biểu hiện kháng nguyên thử nghiệm ở lượng lớn bằng hệ thống biểu hiện gen *E. coli*.

Escherichia coli JM109 được sử dụng làm tế bào vật chủ để tách dòng và *Escherichia coli* BL21 (DE3) được sử dụng làm tế bào vật chủ để biểu hiện protein. Các tế bào *Escherichia coli* được nuôi cấy trong môi trường LB (Luria-Bertani; Difco, Michigan, USA). Theo thiết kế thí nghiệm, lượng thích hợp kháng sinh hoặc thạch có nồng độ 1,5% được bổ sung để tạo môi trường rắn.

Khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên thử nghiệm.

Sau khi kháng nguyên thử nghiệm được xác định, gen mã hóa các kháng nguyên này được tra cứu trong cơ sở dữ liệu NCBI (Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học - National Center for Biotechnology Information). Theo đó, môi đặc hiệu hướng đích gen kháng nguyên được thiết kế. Sau đó, gen kháng nguyên được khuếch đại bằng cách sử dụng môi đặc hiệu và nhiễm sắc thể của *M. hyopneumoniae* PRIT-5 làm khuôn. Môi đặc hiệu được liệt kê trong bảng 2 sau.

Bảng 2: Bộ mồi

Kháng nguyên	Trình tự bộ mồi
PdhA	PdhAF (SEQ ID NO: 15) 5'-GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCGCTATGTAAAGCCTG-3' PdhAR (SEQ ID NO: 16) 5'-CAATATGTCGACTTATTTTACTCCTTTAAAAAATTCAAGCGCTTC-3'
XylF	XylFF (SEQ ID NO: 17) 5'-GATATAGGATCCATGAATGGAATAAATTTCTTGGCTTAGGCTTAGTTTTTC-3' XylFR (SEQ ID NO: 18) 5'-CAATATGTCGACTTAATTTTTATTAATATCGGTAATTAGTTTGTCTAAGC-3'
EutD	EUTDF (SEQ ID NO: 19) 5'-GATATAGGATCCATGACATACCAAGAATATCTTCAAGCAAG-3') EUTDR (SEQ ID NO: 20) 5'-CAATATGTCGACCTATTTACCTTCTTCAAC TTGTAGAGCGCT-3')
Mhp145	Mhp145F (SEQ ID NO: 21) 5'-GATATAGGATCCATAGCTTCAAGGTCGAA TACAAGTGC-3' Mhp145R (SEQ ID NO: 22) 5'-CAATATGTCGACTTAATTTACCTTTTGGAG TATCCCATTTTC-3'
P78	P78F (SEQ ID NO: 23) 5'-GATATAGGATCCTTATCCTATAAATTTAGGCGTTTTTTCC-3' P78R (SEQ ID NO: 24) 5'-CAATATGTCGACTTATTTTGATTAAAAGCAGGACCTAAT-3'
P132	P132F (SEQ ID NO: 25) 5'-GATATAGGATCCATTGGACTAACAATTTTGTGAGAAATCATTAG-3' P132R (SEQ ID NO: 26) 5'-CAATATGTCGACTTATTCCTAAATAGCCCC ATAAAGTG-3'
Mhp389	Mhp389F (SEQ ID NO: 27) 5'-GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCACGA ACTGTTCT-3' Mhp389R (SEQ ID NO: 28) 5'-CAATATGTCGACCTAGATTTTAAAGGATTTTTTTAATTCAATAATATAATC-3'

Phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase chain reaction - PCR) được tiến hành với các bộ mồi được liệt kê trong bảng 2 trên để khuếch đại gen kháng nguyên thử nghiệm. Sau đó gen đã khuếch đại được sử dụng trong hệ thống biểu hiện gen *E. coli*.

Điều kiện PCR là: 5 phút ở nhiệt độ 98°C (1 chu kỳ); 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, X giây ở nhiệt độ 68°C (35 chu kỳ); 5 phút ở nhiệt độ 68°C (1 chu kỳ). X nêu trên là thời gian kéo dài của ADN polymeraza và được thiết lập phụ thuộc vào kích thước của đoạn được khuếch đại. Sau phản ứng PCR, tiến hành điện di để xác định nếu sản phẩm PCR chứa đoạn ADN có kích thước mong muốn. Xem Fig. 3, thể hiện kết quả điện di của sản phẩm PCR; trong đó đường chạy 1 là gen *eutD*; đường chạy 2 là gen *pdhA*; đường chạy 3 là gen *xylF*; đường chạy 4 là gen P78; đường chạy 5 là gen P132; đường chạy 6 là gen *mhp145*; đường chạy 7 là gen *mhp389*.

Tách dòng sản phẩm PCR

Sự tách dòng được tiến hành bằng kit tách dòng CloneJET PCR, và hỗn hợp gắn ADN được biến nạp vào *E. coli* ECOSTM 9-5 (Yeastern, Taipei, Taiwan). Quy trình chi tiết có thể được tham khảo từ hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc được cải biến từ quy trình đã biết đến trong lĩnh vực này.

Sau biến nạp, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB rắn chứa ampicillin (100µg/mL) đến khi khuẩn lạc của nó được tạo ra. Sau đó, tiến hành PCR khuẩn lạc để sàng lọc chủng được biến nạp thành công. Điều kiện PCR là: 5 phút ở nhiệt độ 95°C (1 chu kỳ); 30 giây ở nhiệt độ 95°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, X giây ở nhiệt độ 72°C (25 chu kỳ); 7 phút ở nhiệt độ 72°C (1 chu kỳ). X nêu trên là thời gian kéo dài của ADN polymeraza và được thiết lập phụ thuộc vào kích thước của đoạn được khuếch đại. Tốc độ kéo dài của Taq ADN polymeraza (Genomics, Taipei, Taiwan) là 1 kb/phút; do đó, nếu Taq ADN polymeraza được sử dụng để khuếch đại đoạn ADN 1 kb, thì X sẽ được thiết lập là 1 phút.

Plasmid của các chủng, mà plasmid tái tổ hợp của nó được xác nhận có ADN chèn vào, sau đó được thực hiện giải trình tự ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Plasmid chứa *eutD*, *pdhA*, *xylF*, gen P78, gen P132, *mhp145*, và *mhp389* được đặt tên tương ứng là pJET-eutD, pJET-pdhA, pJET-xylF, pJET-P78, pJET-P132, pJET-mhp145, pJET-mhp389.

Tạo đột biến điểm và tách dòng gen kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*.

Trước khi khuếch đại kháng nguyên thử nghiệm trong hệ thống biểu hiện gen *E. coli*, việc sử dụng mã bộ ba trong các sinh vật khác nhau sẽ được xem xét. Đó là, nếu

gen chứa mã bộ ba được mã hóa không rõ ràng giữa sinh vật gốc và *E. coli*, gen sẽ được cải biến bằng đột biến điểm.

Gen kháng nguyên *M. hyopneumoniae*, *pdhA*, *xylF*, gen P78, gen P132, *mhp145*, và *mhp389*, chứa mã bộ ba TGA (*eutD* không có sự liên quan đến mã bộ ba được sử dụng giống như gen khác). Mã bộ ba TGA được dịch mã thành tryptophan trong *Mycoplasma* spp. nhưng được dịch mã dưới dạng mã bộ ba kết thúc ở *E. coli*. Để tránh khỏi việc không có khả năng sản xuất toàn bộ protein trong hệ thống biểu hiện gen *E. coli*, các môi hướng đích ở vị trí TGA được thiết kế và đột biến điểm thay thế TGA bằng TGG được tiến hành bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza kéo dài chồng. Kết quả là, gen được biểu hiện trong hệ thống biểu hiện gen *E. coli* có thể được dịch mã trung thực thành kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế. Bên cạnh đó, vị trí cắt của *Bam*HI của gen P78, gen P132, và *mhp389* được trải qua đột biến câm để tiện lợi cho việc tách dòng.

Môi được sử dụng trong đột biến điểm được thiết kế để đặt vị trí đột biến điểm ở phần trung tâm của môi và có trị số T_m cao hơn nhiệt độ 78°C. Trị số T_m của môi đối với đột biến điểm được tính bằng cách sử dụng công thức được cung cấp bởi Invitrogen Co.: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \%bất\ cặp\ sai$; trong đó %GC được đề cập dưới dạng phần trăm của GC theo tổng số nucleotit có trong môi liên quan; N được đề cập dưới dạng chiều dài của môi liên quan; %bất cặp sai được đề cập dưới dạng phần trăm của bazơ bị đột biến theo tổng số nucleotit chứa trong môi liên quan. Môi thiết kế được sử dụng cho các gen nêu trên được liệt kê trong bảng 3 đến bảng 8 sau đây.

Bảng 3: Bộ môi cho đột biến điểm của *pdhA*.

Môi	Trình tự ADN (5' đến 3')
PdhAF SEQ ID NO: 29	GATATAGGATCCATGGACAAATTCGCTATGTAAAGCCTG
PdhAM1 SEQ ID NO: 30	GCTAACAAAAGATGACTGGTTTGTCCCAGCTTTTCG
PdhAM2 SEQ ID NO: 31	CGAAAAGCTGGGACAAACCAGTCATCTTTTGTTAGC
PdhAM3 SEQ ID NO: 32	CTTGCAAATGCAATATTGGAATGGTAGCGAAAAAGG
PdhAM4 SEQ ID NO: 33	CCTTTTTCGCTACCATTTCCAATATTGCATTTGCAAG

PdhAM5 SEQ ID NO: 34	CGAGGCGCTAAATATTGCAAGTATTTGGAAATGGCCAGTT GTTTTTTGCGTAAATAAC
PdhAM6 SEQ ID NO: 35	GTTATTTACGCAAAAAACAACCTGGCCATTTCCAAATACTT GCAATATTTAGCGCCTCG
PdhAM7 SEQ ID NO: 36	GTTTTTTGCGTAAATAACAATCAATGGGCAATTTCAACCCC AAATAAATATG
PdhAM8 SEQ ID NO: 37	CATATTTATTTGGGGTTGAAATTGCCCATTTGATTGTTATTT ACGCAAAAAAC
PdhAM9 SEQ ID NO: 38	GTTGAGTTTGTAACCTTGGCGTCAAGGTGTTTCATACC
PdhAM10 SEQ ID NO: 39	GGTATGAACACCTTGACGCCAAGTTACAAACTCAAC
PdhAM11 SEQ ID NO: 40	GAGAACACGAAAAATGGGAACCAATGCACCGG
PdhAM12 SEQ ID NO: 41	CCGGTGCATTGGTTCCCATTTTTCGTGTTCTC
PdhAM13 SEQ ID NO: 42	CCGAAAAACAAAAAATTTGGGATGAAGCGCTTGCGATTG
PdhAM14 SEQ ID NO: 43	CAATCGCAAGCGCTTCATCCCAAATTTTTTGTTCG
PdhAR SEQ ID NO: 44	CAATATGTCGACTTATTTTACTCCTTTAAAAAATTCAAGCG CTTC

Bảng 4: Bộ môi cho đột biến điểm của *xylF*.

Môi	Trình tự ADN (5' đến 3')
XylFF SEQ ID NO: 45	GATATAGGATCCATGAAATGGAATAAATTTCTTGGCTTAG GCTTAGTTTTTC
XylFM1 SEQ ID NO: 46	CATTTAACCAATCAAGTTGGGAGGCAATTCAACAACCTTGG
XylFM2 SEQ ID NO: 47	CCAAGTTGTTGAATTGCCTCCCAACTTGATTGGTTAAATG
XylFM3 SEQ ID NO: 48	CTAATACCAACAAAAATGTTTGGGTACTTTCTGGTTTTCAA CACG
XylFM4 SEQ ID NO: 49	CGTGTTGAAAACCAGAAAGTACCCAAACATTTTTGTGTTGGT ATTAG
XylFM5 SEQ ID NO: 50	CGGTGATGCGATCACAAAATGGTTAAAAATCCCTGAAAAT AAGC
XylFM6 SEQ ID NO: 51	GCTTATTTTCAGGGATTTTAAACCATTTTGTGATCGCATCA CCG
XylFM7 SEQ ID NO: 52	TTATCATACTCGGAATTGACTGGACTGATACTGAAAATGT AATTC
XylFM8 SEQ ID NO: 53	GAATTACATTTTCAGTATCAGTCCAGTCAATTCCGAGTATG ATAA

XylFM9 SEQ ID NO: 54	GAAGAAGCCGGATGGCTTGCAGGATATGC
XylFM10 SEQ ID NO: 55	GCATATCCTGCAAGCCATCCGGCTTCTTC
XylFM11 SEQ ID NO: 56	GGTTATCTAGCCGGAATTAAAGCTTGGAATCTAAAAAATT CTGATAAAAAAAC
XylFM12 SEQ ID NO: 57	GTTTTTTTATCAGAATTTTTTAGATTCCAAGCTTTAATTCCG GCTAGATAACC
XylFR SEQ ID NO: 58	CAATATGTCGACTTAATTTTTATTAATATCGGTAATTAGTT TGTCTAAGC

Bảng 5: Bộ mồi cho đột biến điểm của gen P78.

Mồi	Trình tự ADN (5' đến 3')
P78F SEQ ID NO: 59	GATATAGGATCCTTATCCTATAAATTTAGGCGTTTTTCC
P78M1 SEQ ID NO: 60	CAATTAATAAAGTTTTGTTTGGTTGGATGATTAATAAAGCA CTTGCTGATCC
P78M2 SEQ ID NO: 61	GGATCAGCAAGTGCTTTATTAATCATCCAACCAACAAAA CTTTATTAATTG
P78M3 SEQ ID NO: 62	GATATTAAAGAAATTGAAAGAATCTGGAAAAAATATGTCT CCGATGATCAAGG
P78M4 SEQ ID NO: 63	CCTTGATCATCGGAGACATATTTTTTCCAGATTCTTTCAAT TTCTTTAATATC
P78M5 SEQ ID NO: 64	GCCCTTTCAGGAGGCTCCACTGATTCGGCA
P78M6 SEQ ID NO: 65	TGCCGAATCAGTGGAGCCTCCTGAAAGGGC
P78M7 SEQ ID NO: 66	GCCGCAAAAGCTTTTGTTAAATGGCTTTTGACAGAAAAAA TAGTCT
P78M8 SEQ ID NO: 67	AGACTATTTTTTCTGTCAAAAGCCATTTAACAAAAGCTTTT GCGGC
P78R SEQ ID NO: 68	CAATATGTCGACTTATTTTGATTTAAAAGCAGGACCTAAAT

Bảng 6: Bộ mồi cho đột biến điểm của gen P132.

Mồi	Trình tự ADN (5' đến 3')
P132F SEQ ID NO: 69	GATATAGGATCCATTGGACTAACAATTTTTGAGAAATCAT TTAG
P132M1 SEQ ID NO: 70	CTAACTTCTCTAAAAGGTTGGAAAGAAGAAGATGATTTTG

P132M2 SEQ ID NO: 71	CAAAATCATCTTCTTCTTTCCAACCTTTTAGAGAAGTTAG
P132M3 SEQ ID NO: 72	CTTTCTATTACTTTTGAACCTCTGGGACCCAAATGGTAAATT AGTATC
P132M4 SEQ ID NO: 73	GATACTAATTTACCATTTGGGTCCCAGAGTTCAAAAGTAA TAGAAAG
P132M5 SEQ ID NO: 74	CCCTGAAGGAGATTGGATAACTTTAGGGAG
P132M6 SEQ ID NO: 75	CTCCCTAAAGTTATCCAATCTCCTTCAGGG
P132M7 SEQ ID NO: 76	CTACCAGGAACCTACCTGGGATTTCATGTTGAAC
P132M8 SEQ ID NO: 77	GTTCAACATGGAAATCCCAGGTAGTTCCTGGTAG
P132M9 SEQ ID NO: 78	GGACAACATAATTTGGAGCCAGTTAGCTTCC
P132M10 SEQ ID NO: 79	GGAAGCTAACTGGCTCCAAATTAGTTGTCC
P132M11 SEQ ID NO: 80	GGAACAAAAAAGGAATGGATTCTTGTAGGATCTGG
P132M12 SEQ ID NO: 81	CCAGATCCTACAAGAATCCATTCCTTTTTTGTTC
P132M13 SEQ ID NO: 82	CCAATACGCAAATATGGATAACCCGTCTAGGAAC
P132M14 SEQ ID NO: 83	G TTCCTAGACGGGTTATCCATATTTGCGTATTGG
P132M15 SEQ ID NO: 84	CCAAGGGGAAGTTCTCTGGACTACTATTAAATCCAAAC
P132M16 SEQ ID NO: 85	GTTTGGATTTAATAGTAGTCCAGAGAACTTCCCCTTGG
P132M17 SEQ ID NO: 86	CAAAAACTTCACCTTTGGTGGATTGCTAATGATAGC
P132M18 SEQ ID NO: 87	GCTATCATTAGCAATCCACCAAAGGTGAAGTTTTTTG
P132R SEQ ID NO: 88	CAATATGTCGACT TATTCCTAAATAGCCCCATAAAGTG

Bảng 7: Bộ môi cho đột biến điểm của *mhp145*.

Môi	Trình tự ADN (5' đến 3')
Mhp145F SEQ ID NO: 89	GATATAGGATCCAT AGCTTCAAGGTCGAATACAACCTGC
Mhp145M1 SEQ ID NO: 90	AATAATTGCAGAAAAAATTCTTAAAGATCAATGGAAAACA AGTAAATATTCTGATTTTTATTACAAT

Mhp145M2 SEQ ID NO: 91	ATTGTGAATAAAAATCAGAATATTTACTTGTTTTCCATTGA TCTTTAAGAATTTTTTCTGCAATTATT
Mhp145R SEQ ID NO: 92	CAATATGTCGACTTA ATTTACCTTTTGGAGTATCCCATTTTC

Bảng 8: Bộ mồi cho đột biến điểm of *mhp389*.

Mồi	Trình tự ADN (5' đến 3')
Mhp389F SEQ ID NO: 93	GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCACGAACTGTTCT
Mhp389M1 SEQ ID NO: 94	CAATAGTGACAATGGACCCCCCAAATGTTGGTTCG
Mhp389M2 SEQ ID NO: 95	CGACCAACATTTGGGGGGTCCATTGTCACCTATTG
Mhp389M3 SEQ ID NO: 96	GATAAAGGCGCATCATGGCTTGCGCTTGCACCAAC
Mhp389M4 SEQ ID NO: 97	GTTGGTGCAAGCGCAAGCCATGATGCGCCTTTATC
Mhp389M5 SEQ ID NO: 98	GGAAAACTTAAAGGTAAATGGACTTTTGGACTAACCTATTT
Mhp389M6 SEQ ID NO: 99	AAATAGGTTAGTCCAAAAGTCCATTTACCTTTAAGTTTTCC
Mhp389R SEQ ID NO: 100	CAATATGTCGACCTAGATTTTAAAGGATTTTTTTAATTCAA TAATATAATC

Phương pháp tạo đột biến điểm được giải thích vắn tắt như sau. Nhiễm sắc thể của *M. hyopneumoniae* PRIT-5 được sử dụng làm khuôn và đoạn ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng bộ mồi được thiết kế trong các Bảng 3 đến Bảng 8 trên đây.

50 μ L hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm đệm 1 $\times$ GDP-HiFi PCR, 200 μ M hỗn hợp dATP, dTTP, dGTP, và dCTP, 1 μ M mồi, 100 ng nhiễm sắc thể của *M. hyopneumoniae* PRIT-5, và 1 U GDP-HiFi ADN polymeraza. Điều kiện PCR là: 5 phút ở nhiệt độ 98°C (1 chu kỳ); 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, X

giây ở nhiệt độ 68°C (35 chu kỳ); 5 phút ở nhiệt độ 68°C (1 chu kỳ). X là thời gian kéo dài của ADN polymeraza và được thiết lập phụ thuộc vào kích thước của đoạn được khuếch đại. Tốc độ kéo dài của GDP-HIFI ADN polymeraza (GeneDirex, Las Vegas, USA) là 1 kb/15 giây; do đó, nếu GDP-HIFI ADN polymeraza được sử dụng để khuếch đại đoạn ADN 1 kb, X sẽ được thiết lập là 15 giây. Sau phản ứng PCR, tiến hành điện di để xác định nếu sản phẩm PCR chứa đoạn ADN có kích thước mong đợi. Sau đó, tái chế sản phẩm PCR bằng cách sử dụng hệ kit chiết gel Gel-M™.

Sau đó, sản phẩm PCR được sử dụng làm khuôn và được khuếch đại bằng cách sử dụng bộ mồi được thiết kế trong Bảng 2 trên đây. Điều kiện PCR là: 2 phút ở 98°C (1 chu kỳ); 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ 55°C, X giây ở nhiệt độ 68°C (35 chu kỳ); 5 phút ở nhiệt độ 68°C (1 chu kỳ). X nêu trên là thời gian kéo dài của ADN polymeraza và được thiết lập phụ thuộc vào kích thước của đoạn được khuếch đại. Tốc độ kéo dài của GDP-HIFI ADN polymeraza (GeneDirex, Las Vegas, USA) là 1 kb/15 giây; do đó, nếu GDP-HIFI ADN polymeraza được sử dụng để khuếch đại mảnh ADN 1 kb, X sẽ được thiết lập là 15. Sau bước khuếch đại nêu trên, trình tự gen kháng nguyên thử nghiệm có độ dài hoàn chỉnh có thể thu được.

Sau đó, sản phẩm PCR được tái chế bằng cách sử dụng hệ kit làm sạch PCR-M™ Clean Up (GeneMark, Taichung, Taiwan) và tách dòng nó được tiến hành bằng cách sử dụng kit tách dòng CloneJET PCR. Tiến hành PCR khuôn lạc để xác nhận chủng sau khi biến nạp plasmit mang ADN chèn vào và sau đó plasmit này được phân lập để giải trình tự ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Plasmit chứa gen kháng nguyên thử nghiệm bị đột biến được đặt tên tương ứng là pJET-pdhAM, pJET-xylFM, pJET-P78M, pJET-P132M, pJET-mhp145M, pJET-mhp389M.

Theo kết quả giải trình tự, trình tự ADN của gen kháng nguyên thử nghiệm sau khi tạo đột biến điểm được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO:01 (*pdhA*), SEQ ID NO:02 (*xylF*), SEQ ID NO:03 (*eutD*, không có đột biến điểm), SEQ ID NO:04 (*mhp145*), SEQ ID NO:05 (gen P78), SEQ ID NO:06 (gen P132), SEQ ID NO:07 (*mhp389*).

Tạo cấu trúc của Vector biểu hiện để biểu hiện kháng nguyên *M. hyopneumoniae*

Trong phần này của thí nghiệm, plasmit pET-MSY được sử dụng như là tương đương để tạo cấu trúc của vector biểu hiện để biểu hiện kháng nguyên *M. hyopneumoniae*. pET-MSY là sự biến đổi của pET29a và có *E. coli msyB*. Do đó, kháng nguyên tái tổ hợp được biểu hiện của nó sẽ có phần dung hợp MsyB. MsyB giàu axit amin loại axit và có khả năng làm tăng tính tan của protein được biểu hiện.

Sau khi pJET-eutD, pJET-pdhA, pJET-xylF, pJET-P78, pJET-P132, pJET-mhp145 và pJET-mhp389 được cắt bằng *Bam*HI và *Sal*I, đoạn ADN thu được được chèn vào pET-Msy được cắt trước đó với enzym giới hạn bằng ligaza. Sau đó, pET-Msy với đoạn ADN được biến nạp vào *E. coli* ECOS 9-5. Tiến hành PCR khuôn lạc để xác nhận chủng sau biến nạp chứa plasmit có ADN chèn vào và sau đó phân lập plasmit để giải trình tự ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Plasmit được xác nhận có trình tự ADN đúng được đặt tên tương ứng là pET-MSYEutD, pET-MSYPdhA, pET-MSYXylF, pET-MSYP78, pET-MSYP132, pET-MSYMhp145, và pET-MSYMhp389. Plasmit thu được này là các ví dụ của vector biểu hiện dùng để ngăn ngừa sự lây nhiễm *Mycoplasma* spp. của sáng chế.

Biểu hiện và phân lập kháng nguyên *M. hyopneumoniae*

Vector biểu hiện kháng nguyên được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3). Khuẩn lạc đơn của chủng sau khi biến nạp được cấy trong môi trường LB lỏng chứa kháng sinh kanamycin (nồng độ hoạt động: 30 µg/mL). Sau khi nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C, 180 rpm, pha loãng dịch huyền phù vi khuẩn ở tỷ lệ 1:100 và cấy lại vào môi trường LB lỏng khác có chứa kháng sinh kanamycin (nồng độ hoạt động: 30 µg/mL). Vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 180 rpm đến OD₆₀₀ đạt khoảng 0,6 đến 0,8. Sau đó, bổ sung 0,1 mM IPTG để cảm ứng biểu hiện. Sau khi cảm ứng trong 4 giờ, thu phần lắng bằng ly tâm (10000×g, 10 phút, nhiệt độ 4°C) và kiểm tra sự biểu hiện bằng điện di protein.

Sau đó, sử dụng sắc ký ái lực cố định ion kim loại (immobilized-metal affinity chromatography - IMAC) để phân lập protein thông qua liên kết đồng hóa trị giữa đuôi His tag của đầu N của protein tái tổ hợp và ion niken hoặc ion coban. Quy trình phân lập protein được thực hiện theo mô tả sản phẩm của QIAexpressionist™ (fourth edition, Qiagen). Phần lắng được tạo huyền phù trong đệm ly giải (50 mM NaH₂PO₄,

300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) bằng máy siêu âm. Sau khi ly tâm (8000×g, 15 phút), thu dịch nổi để đưa vào cột nhựa Ni-NTA 1 mL. Kháng nguyên tái tổ hợp sẽ dính vào nhựa này. Sau đó, đưa 15 mL đệm rửa (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) vào cột để rửa nhựa sao cho protein không đặc hiệu dính vào đó có thể được loại bỏ. Cuối cùng, bổ sung 20 mL đệm rửa giải (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) để rửa sạch kháng nguyên tái tổ hợp trên nhựa; trong đó imidazol có nồng độ cao có thể cạnh tranh vị trí gắn kết trên nhựa với protein tái tổ hợp và nhờ đó làm cho kháng nguyên tái tổ hợp được rửa sạch. Sau đó kiểm tra kết quả phân lập này bằng điện di protein.

Kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế được thu được bằng phân lập sau đó có thể được sử dụng cho thử nghiệm miễn dịch sau để xác định khả năng của nó để được sử dụng làm hoạt chất của vaccin kháng *Mycoplasma* spp. thể hệ hai.

Ví dụ 3: Thử nghiệm thử thách miễn dịch ở lợn với kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế.

Trong ví dụ này, kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế được sử dụng làm hoạt chất để điều chế vaccin thể hệ hai và được kiểm tra hiệu quả miễn dịch của nó ở lợn sống.

Điều chế vaccin

Một kháng nguyên tái tổ hợp được phân lập hoặc vài kháng nguyên tái tổ hợp được phân lập được trộn với gel nhôm làm chất phụ gia để điều chế vaccin thể hệ hai hoặc vaccin thể hệ hai hỗn hợp. Mỗi liều của vaccin được điều chế là 2 mL về thể tích và mỗi loại kháng nguyên có trong đó là 100 µg.

Bảng 9 sau liệt kê mẫu được điều chế trong ví dụ này cho thử nghiệm thử thách miễn dịch.

Bảng 9: Các mẫu vaccin được điều chế trong Ví dụ 3

Mẫu	Hoạt chất (Kháng nguyên)
1	PdhA
2	XylF
3	EutD
4	Mhp145
5	P78
6	P132
7	Mhp389

8	PdhA + P78
9	XylF + Mhp145

Thử nghiệm thử thách miễn dịch ở lợn sẽ được tiến hành bằng cách sử dụng Bayovac® MH-PRIT-5 (được sản xuất bằng cách sử dụng *M. hyopneumoniae* PRIT-5, làm nhóm đối chứng dương), vaccin thể hệ hai (các mẫu 1-7 của sáng chế), và vaccin hỗn hợp (các mẫu 8 và 9 của sáng chế).

33 con lợn SPF 4 tuần tuổi được mua từ Viện nghiên cứu kỹ thuật nông nghiệp và được nuôi với ăn thức ăn, môi trường và điều kiện tăng trưởng giống nhau trong chuồng lợn trước khi thử nghiệm.

Sau khi lợn được nuôi đến 35 ngày và 49 ngày tuổi, lợn được cho dùng 2 mL vaccin trên thông qua tiêm bắp.

Thử nghiệm thử thách

Các con lợn nêu trên được cảm ứng đáp ứng miễn dịch được thử thách bằng *Mycoplasma* spp. ở 109 ngày tuổi để xác định hiệu quả miễn dịch của các vaccin nêu trên.

Trước tiên, phổi thu được từ lợn nhiễm *Mycoplasma* spp. được nghiền trong 20 mL môi trường Friis và li tâm ở 148,8×g trong thời gian 10 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống sạch và ly tâm lại ở 7870×g trong thời gian 40 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ và phần kết tủa được tạo huyền phù trong 6 mL môi trường Friis để thu được dịch huyền phù. Sau đó, dịch huyền phù được lọc bằng màng 5 µm và 0,45 µm sau đó để thu được dung dịch vi khuẩn cần cho thử nghiệm thử thách.

Dung dịch vi khuẩn (5 mL) được sử dụng cho lợn bị gây mê thông qua khí quản của nó. Sau 28 ngày từ ngày sử dụng, giết lợn và mổ để thu phổi của nó. Hiệu quả miễn dịch được kiểm tra bằng cách quan sát phổi và ghi nhận theo tiêu chuẩn sau: bất kỳ thùy trên giữa và thùy trên của bất kỳ bên phổi quan sát được đặc điểm bệnh lý được ghi 10 điểm; bất kỳ của thùy trên giữa và thùy cơ hoành của bất kỳ bên phổi quan sát được đặc điểm bệnh lý được ghi 5 điểm. Điểm tuyệt đối là 55 điểm. Sự ghi nhận quan sát được thể hiện trong Fig. 4.

So sánh với kết quả của lợn không tiêm, bảy kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế có thể tạo ra hiệu quả miễn dịch tương đương với vaccin thông thường (Bayovac®

MH-PRIT-5). Nếu tính ăn toàn cao hơn của vaccin thể hệ hai được xem xét, thì vaccin chứa kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế sẽ được đánh giá thêm.

Theo cách khác, không phổ biến để sử dụng hai hay nhiều kháng nguyên có thể gây hiệu quả miễn dịch trong một vaccin bởi vì hai hay nhiều kháng nguyên có thể không tạo ra hiệu quả miễn dịch gấp đôi. Trên thực tế, có cơ hội cao hơn là hai hay nhiều kháng nguyên có thể cản trở nhau hoặc chống lại nhau và hậu quả là làm giảm hiệu quả miễn dịch của vaccin. Theo kết quả của ví dụ này, mẫu 8 và mẫu 9 của sáng chế (tức là vaccin hỗn hợp) bất ngờ tạo ra sự tăng đáng kể trong hiệu quả miễn dịch. Đó là, vaccin thể hệ hai của sáng chế không chỉ có tính an toàn cao mà còn tạo ra hiệu quả miễn dịch tốt hơn khi kháng nguyên thử nghiệm của sáng chế được sử dụng kết hợp.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể hiểu rằng bất kỳ sự cải biến có thể nào căn cứ vào mô tả của sáng chế không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Do đó, ví dụ trên sẽ không được sử dụng để giới hạn sáng chế mà mong đợi để bao trùm hết các sự cải biến đổi có thể theo phạm vi của sáng chế theo yêu cầu bảo hộ được đề cập dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm ngăn ngừa bệnh gây ra bởi *Mycoplasma* spp., bao gồm:
hoạt chất chứa protein của Mhp145; và
tá dược được dụng;
trong đó Mhp145 nêu trên chứa trình tự SEQ ID NO: 11.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hoạt chất nêu trên bao gồm XylF và Mhp145, trong đó XylF nêu trên chứa trình tự SEQ ID NO: 09.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hoạt chất nêu trên có nồng độ từ 50 đến 3500 µg/mL tính theo tổng thể tích của chế phẩm nêu trên.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tá dược được dụng nêu trên là tá dược Freund hoàn chỉnh, tá dược Freund không hoàn chỉnh, gel nhôm, chất hoạt động bề mặt, tá dược polyanion, peptit, chất nhũ hóa dầu, hoặc sự kết hợp chúng.
5. Chế phẩm theo điểm 1, còn bao gồm chất phụ gia được dụng.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chất phụ gia được dụng nêu trên là dung môi, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp thụ, hoặc sự kết hợp chúng.

Fig. 1

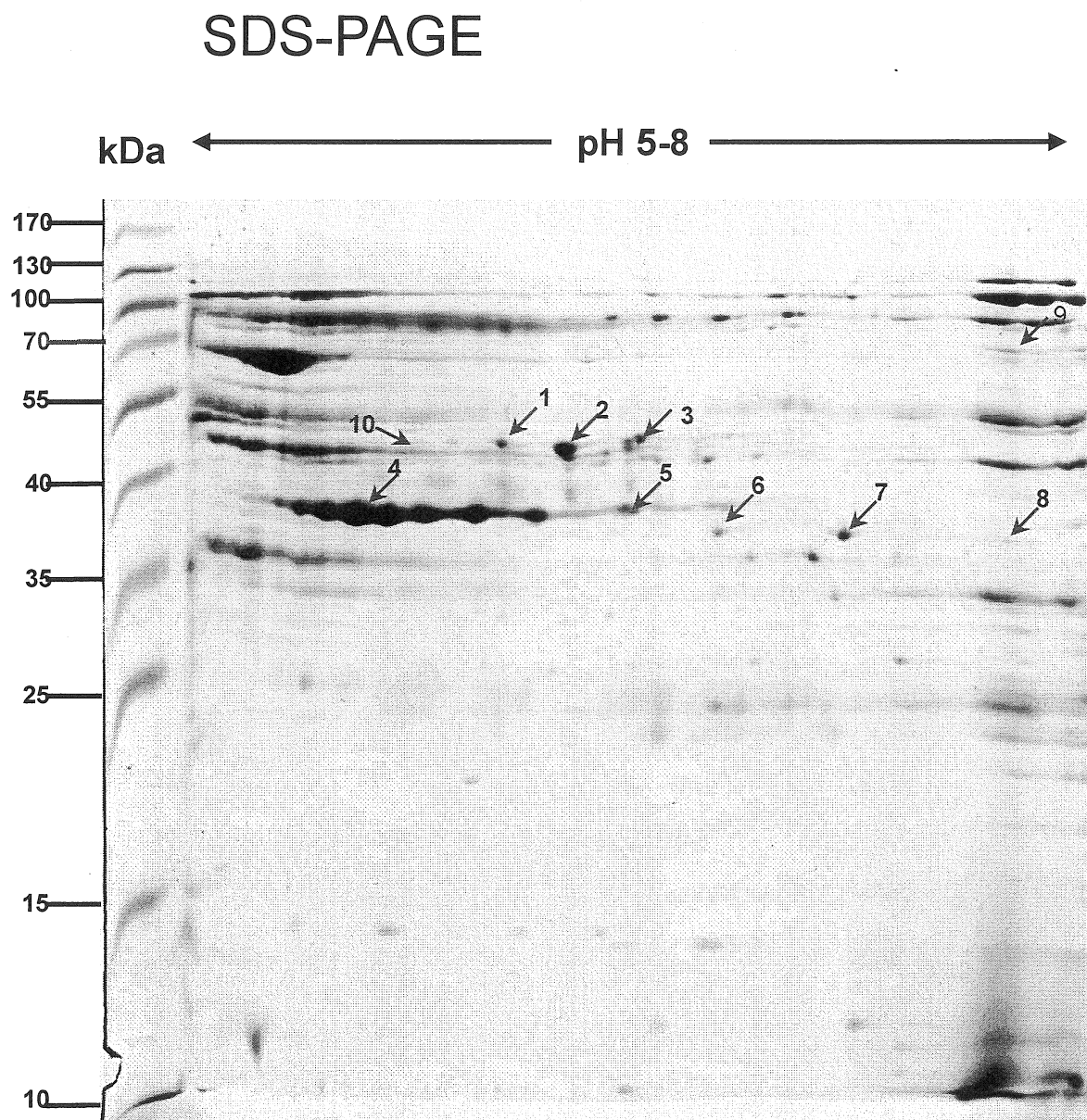


Fig. 2

Western blot

kDa ← pH 5-8 →

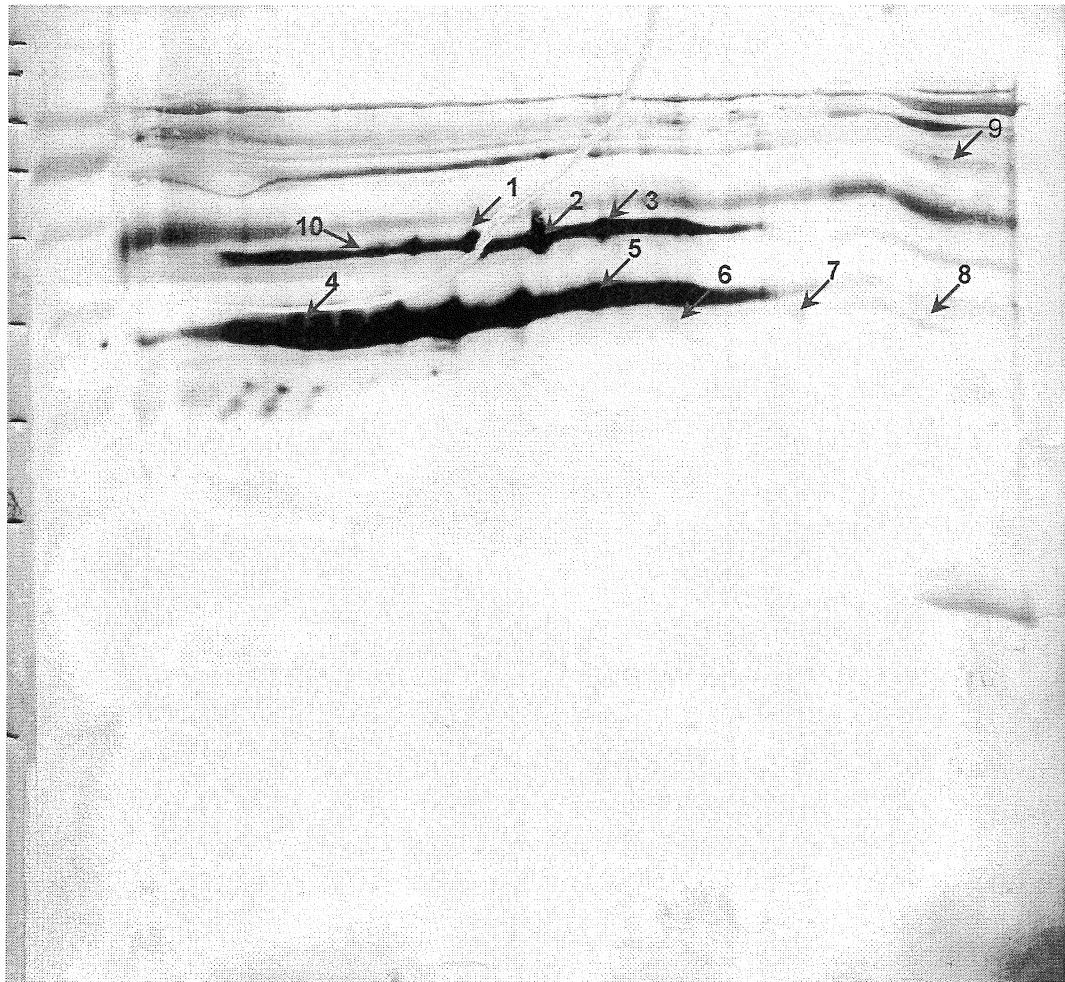


Fig. 3

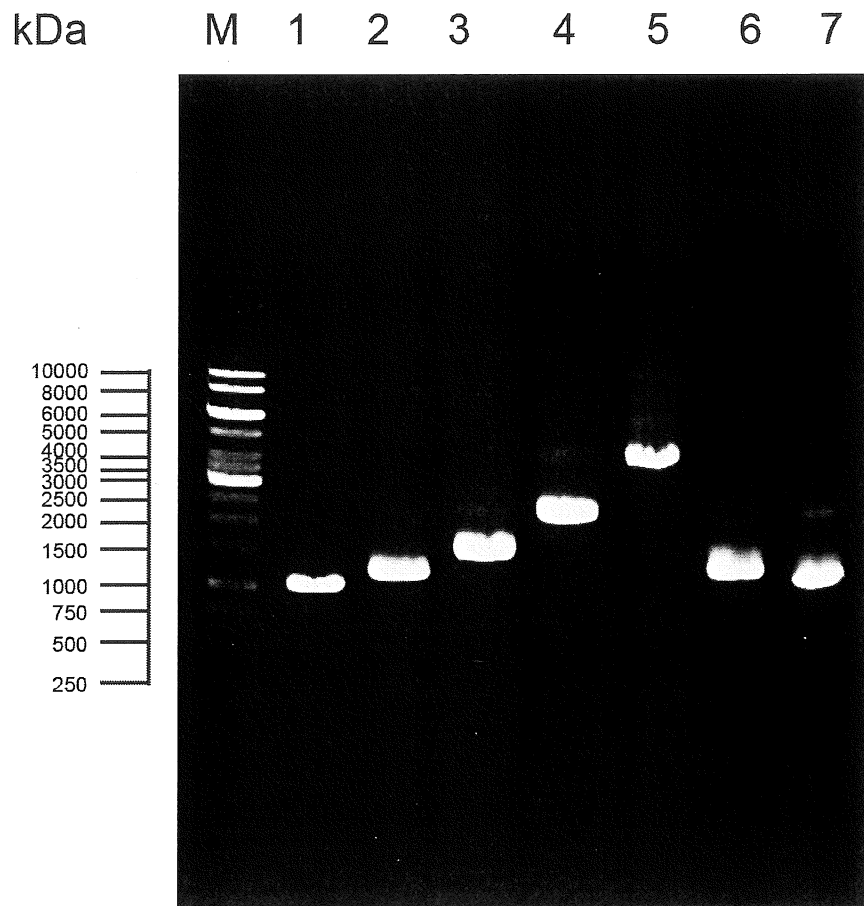


Fig. 4

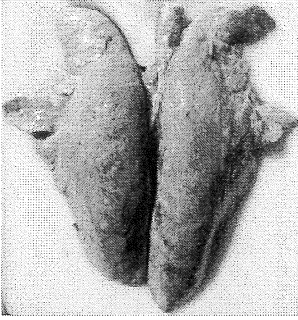
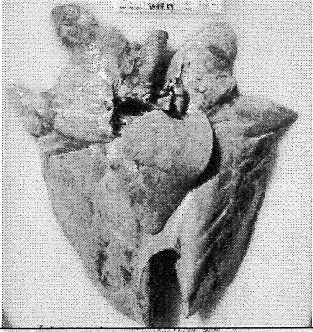
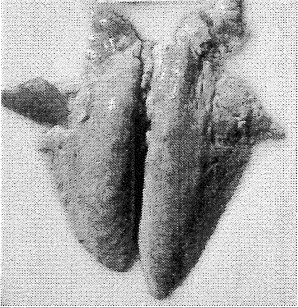
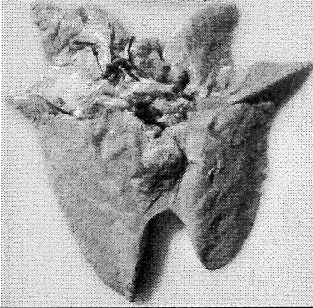
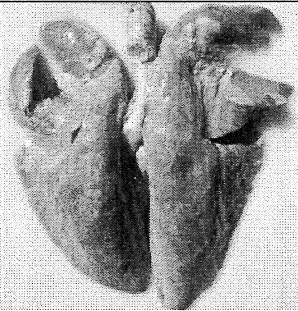
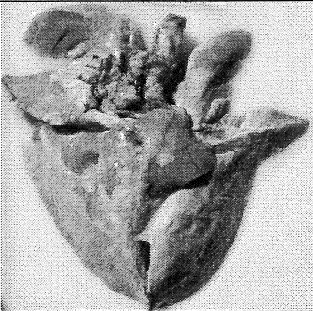
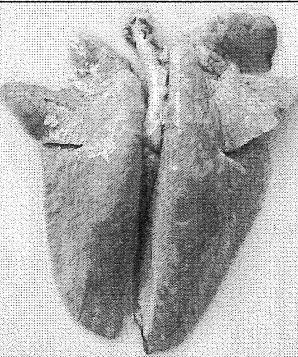
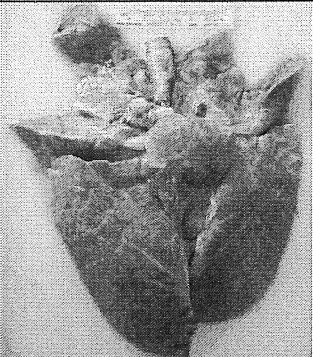
Kháng nguyên	Điểm	Phổi, phía lưng	Phổi, phía ngực
XylF+Mhp145	13		
PdhA+P78	15		
P132	26		
XylF	27		

Fig. 4 (tiếp)

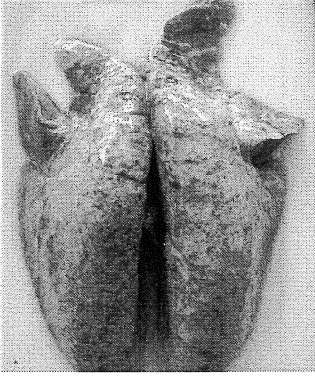
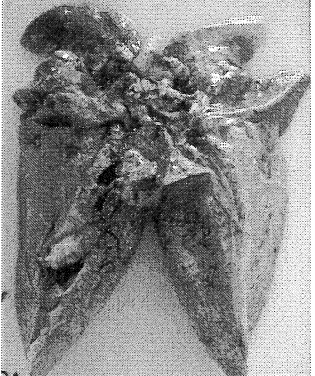
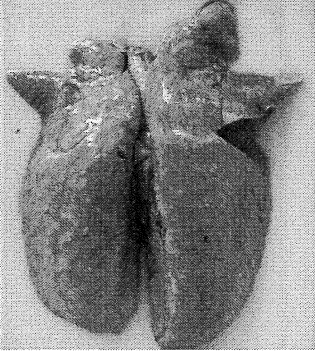
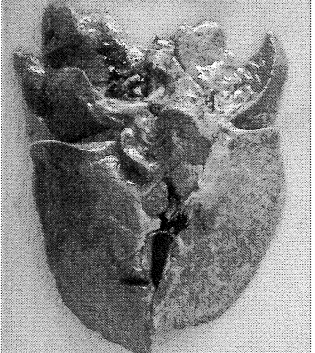
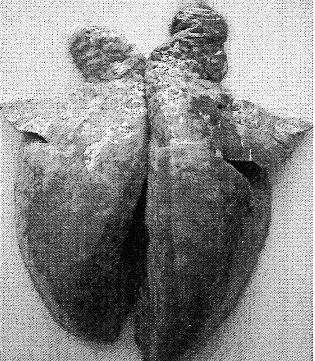
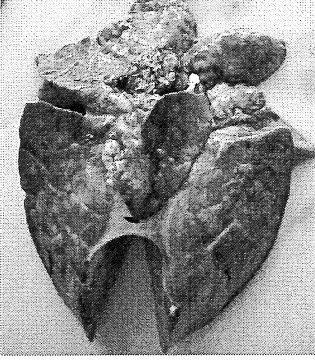
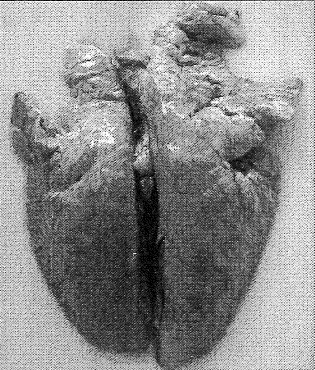
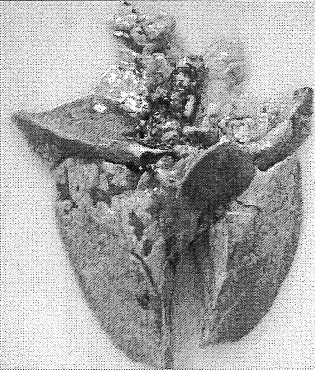
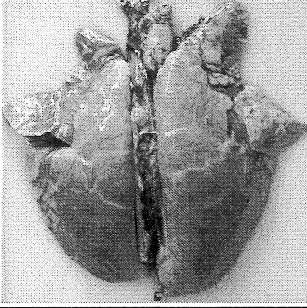
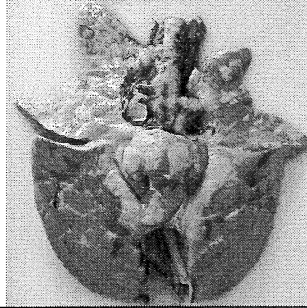
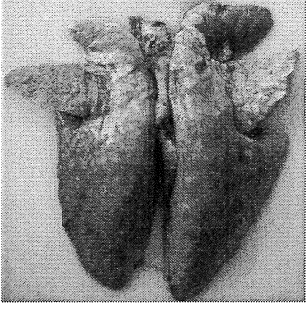
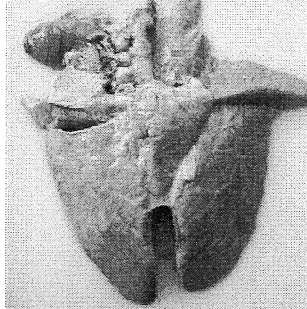
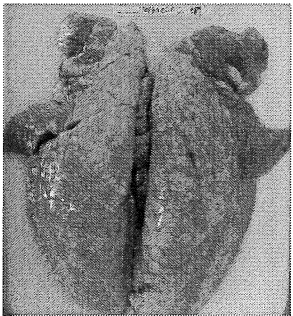
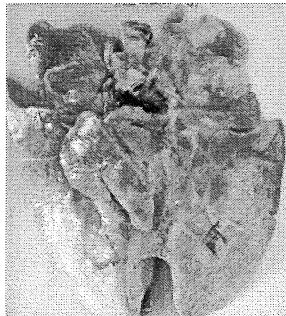
Kháng nguyên	Điểm	Phôi, phía lưng	Phôi, phía ngực
Mhp145	28		
P78	25		
PdhA	28		
EutD	24		

Fig. 4 (tiếp)

Kháng nguyên	Điểm	Phổi, phía lưng	Phổi, phía ngực
Mhp389	27		
<i>Vacxin PRIT-5</i> (đối chứng dương)	20		
Đối chứng không điều trị	43		

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE	
<120>	Chế phẩm ngăn ngừa bệnh gây ra bởi <i>Mycoplasma</i> Spp.	
<130>	GPI13TW0261	
<160>	100	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	1125	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	gen pdhA bị đột biến	
<400>	1	
	atggacaaat ttcgctatgt aaagcctggt caaattatgg caaaagatga agaaatgatt	60
	cgcttttcttg atattgatgg taatctttta tcttcaactg tttttggacc aatcgacgaa	120
	acaaatgata ttcgcttatac aaaacaggaa atcaaaaaag cttatgaatt tatggtttta	180
	tctcgccaac aagatacgta tatgacacaa ctacagcgac aaggtagaat gttgactttt	240
	gcccctaact ttggtgaaga agctcttcaa gtagcctcag ggatggcgct aacaaaagat	300
	gactggtttg tcccagcttt tcgttcaa atgcaacaatgt tataatcttg cgtgccaatg	360
	atcttgcaaa tgcaatattg gaatggtagc gaaaaaggta atgtaattcc cgaaaatgtt	420
	aatgtttttac ctattaacat tcccatcgga acgcagtttt cccatgctgc cggaattgct	480
	tatgcagcaa aactaacagg taaaaaaata gtttcaatga gttttattgg aaacggggga	540
	actgccgaag gcgagtttta cgaggcgcta aatattgcaa gtatttgga atgaccagtt	600
	gtttttttgcg taaataacaa tcaatgggca atttcaacc caaataaata tgaaaacggt	660
	gcctcaacaa ttgctgcaaa agcaatggca gccggaattc ctggaattcg tgtagacgga	720
	aatgaccttt tagcttctta tgaagtaatc aaggaagctg ttgattatgc tcgttctgga	780
	aacgggtcctg ttcttggtga gtttgtaact tggcgtcaag gtgttcatac ctcttctgat	840
	aatccacgaa tttatcgtag tgttgaagag gaaagagaac acgaaaaatg ggaaccaatg	900
	caccggattg aaaaatatat gtttgaccgc ggaattcttg attctgccga aaaacaaaaa	960

atttgggatg aagcgcttgc gattgtcaaa gaaacttatg aaaaatctct tgttgggctt 1020
 gagtcaacaa ttgatgaaat tttcgatcat acctacaagg ttttaccacc agaacttgaa 1080
 gaacaaaaac aagaagcgct tgaatttttt aaaggagtaa aataa 1125

<210> 2

<211> 1344

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen xylF bị đột biến

<400> 2

atgaaatgga ataaatttct tggcttaggc ttagtttttc cgctttcagc aatcgcgaca 60
 atctctgccg gatgttggga taaagaaaca actaaagaag aaaaatcagc cgataatcaa 120
 aataaacaaa tcaactgatgt ctcaaaaatt tcaggactag ttaatgagcg aaaatccgaa 180
 attatggccg caaaagctga tgcaaacaaa cattttgggc taaatatggc aattgtaacc 240
 gctgatggaa cggtaaatga taattcattt aaccaatcaa gttgggaggc aattcaacaa 300
 cttggcgctc ttactggagg tgagattact tcagtagata gttcaactgc tgaacttgaa 360
 ggaaaatata gctcacttgc taataccaac aaaaatgttt gggtactttc tggttttcaa 420
 cacggtgatg cgatcacaaa atgggttaaaa atccctgaaa ataagcaatt atttactgaa 480
 aaaaatatta tcatactcgg aattgactgg actgatactg aaaatgtaat tccaacaggt 540
 cgatatatta atttaaccta taaaactgaa gaagccggat ggcttgcagg atatgcgaat 600
 gcttcctttt tggcaaaaaa attocccaagt gatccaacta aaagatcagc aattgttatc 660
 ggtggtggga ttttcccagc tgtaactgat tttatcgctg gttatctagc cggaattaaa 720
 gcttggaatc taaaaaattc tgataaaaaa acaaagataa caactgataa aatcgaaata 780
 aatcttgggt ttgattttca aaatacttca acaaaagaaa gacttgaaca aattgcttca 840
 aaagataaac cttcaacact attagcagtc gctggaccac ttactgaaat tttctcggat 900
 ataatcgcaa accaaaaatga tcgttatctc attggtgttg acaccgacca atcacttggt 960
 tatacaaaaa ctaaaaataa atttttcacc tcaattttga aaaatttagg ttactccggt 1020
 ttcagtgttc ttagtgatgt atataccaaa aatcaaaatt caagaaattt agccggcttt 1080

gaatttggtta aaaaaagtgc aaccgtttat cttggaatta aagacaagtt tgtcgatatt 1140
gctgatactt ctttagaagg aaatgataaa aaactcgcaa ctgaagccat ttctgaagct 1200
aaaaaagaat ttgaagaaaa aactaagaca actcctgccg aagaagttcg taaaacttta 1260
gaaattccgg aaatgactga taaacaacct gataaacaac aggaaagctt agacaaacta 1320
attaccgata ttaataaaaa ttaa 1344

<210> 3

<211> 954

<212> ADN

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 3

atgacatacc aagaatatct tcaagcaaga cttgagcaac aaaatgagac aaaaagttta 60
cgctcagttc taattattga tgggtgctgat ccgcgagcaa ttgccgcggc aaaactttta 120
aaggaaaaaa atttagtaaa accggtttta ctagttgatg aagaaattcc aaatcttgac 180
gttgatcaac atatagttaa ttttcaagaa aaaatggaat ttattaagga atttcttaaa 240
ttccgcaagg gaaaagaaac tcctgagtca gccgaaattc aatttcaatc aaatgctttt 300
tatggaacaa tgctactaag aaagaaaaaa gtagatgcag ttgtcggggg tcttaattac 360
ccaacagccg aaattttacg agcagctttt aaaataatcg ggccaaaacc aaatataaaa 420
acaatttcat cagtaatgat tatgcataaa gatcaggaaa aatattttatt tagtgatatt 480
tcagtaaata ttgctccaaa tgagaatcaa cttgttgata ttgctaaaaa tgcccttgat 540
tttgctattc agttaggttt tgatccaaaa ccagcttttc tttccttttc aacaaaagga 600
tcagcaaaat caccgcagtc agaattagtg gctaaagcga cgcaaattgt taatgcaaca 660
tcccccaattg aagcttatgg tgaaattcag cttgatgccg cccttgatat tgaagttcgc 720
cgccaaaaat atgaagtaaa tgtaggtaaa aacgccaaata ttttaatttt cccgaatctt 780
gatgcaggaa atattggcta taaaattgcc caaagattgg gaaatttttg ggcaattggc 840
ccaataatta ccggaattaa tgccccaatt aatgatttat cccggggatc aacaactcaa 900
gatgtcttta ataccgtgct aattagcgct ctacaagttg aagaaggtaa atag 954

<210> 4

<211> 1122
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen mhp145 bị đột biến

<400> 4
 atagcttcaa ggtcgaatac aactgccaaa gttgccccag ttgctgttgt tttctcaaca 60
 agaaataatc cttttttcca aaatgttgaa aaagggattg aaacagcggc aaaagaatta 120
 ggagttgact atgaagtcta tgactctgaa aatgactcgg ataaagaagc aagaaatatt 180
 tcaaataatta ttgcaaaaca acaaaaagtt gtaattttta acgatgttaa tgaagattca 240
 ggaatctcag ctgttaaaaa attaaatcaa gctggaattc cggttaattgc cactgatcat 300
 ttactaaatt cgccaaaagc cttagaagca aaaattaaag ttgaagccaa tattgcttct 360
 gataataaac aagcaggagt aattcttgcc cagtttatgg cccaaaaaat cggacttcct 420
 caagattcac ttacttattc agtctatgga attcccggaa ctgaatcagg ggaatcccga 480
 gctcaagggt ttattgaaac agttaaaaat ctaaataatc aagcaataaa atacaacctt 540
 ttttcttatg gaaaatacgg aaaagaaaat gcaaattgaa aaacttacat cggaagacaa 600
 gctgatgata atcgcgatct agcaaatcaa agagttgcaa atgatgcaac gcaagtattc 660
 caagatgctc aaaaaaggcc acttttggtt tttgggacta atgatgaagc tgccttaggt 720
 tcaatttctg cccttgaaag tgcccagatt ccattaggag gtggagataa attccttcca 780
 ggttcaggaa aagtttatat taccggagt gattatacaa atgatgctca aaaagcggta 840
 ttaaataata aattatcagc aactgttgaa caagatactg atcttttagg aagactttct 900
 ttaataattg cagaaaaaat tcttaaagat caatggaaaa caagtaaata ttctgatttt 960
 tattcacaat ttcttcagct tgataaagac aaaaatcctg atgatcaagt tgagcaagga 1020
 tattatttta aagtaggaac aaaacttttc tggaaggac cagatggaaa aggtgaaaaa 1080
 cttcaagccg atgaaaatgg gatactccaa aaggtaaatt aa 1122

<210> 5
 <211> 2076
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen P78 bị đột biến

<400> 5

ttatcctata aatttaggcg ttttttccta accagcgcac ttagttttgc tcccttggt	60
ttagttgcaa gttgtgttaa taattcccga tttgattcaa atgaggataa taaattagtt	120
tttggtcata ctttttcac ttcaggaaaa gaggcaaaag cacttgagaa aattattgaa	180
gtctggaata aaactgcaac taatcaaaaa gattttatca aaatggaagc acaatatttc	240
cagaatggct ataatggatc agcggcttca attacaaact ttttacagac aaaagatcgg	300
ataaaaactgc caaatattgt cacaaattat ccttcacttc tggcaatagt taataaatat	360
tcaatgactt ttccgcttgt taaagatttt agttctaatac aagaaccaca agatgaaaat	420
gaaaaagcaa taaaaaagtt cctaaaagag caaggaattt ctgatttcct tgagattaat	480
aaagaagttc ctttccttga tacaaaggga gtttataccc ttccatttgg aaaatcaact	540
gaagttctta caattaataa agttttgttt ggttggtatga ttaataaagc acttgctgat	600
ccaaaaaagc cagcaaaaat taaagaagaa gataaacctt attttgccga atttcaaaaa	660
ttaggcaagg aaaaaactgg tgatattaaa gaaattgaaa gaatctggaa aaaatatgtc	720
tccgatgatc aaggacttgc aggctatgaa tttcgccgat ccgatcttga aaattttact	780
gacctacaga aattatcatc acgaattctt cgttcttttc cagaggccct ttcaggaggc	840
tccactgatt cggcaaaatc agtttttagga attgataatc aagcaacgct agtttttgct	900
cttgccagat cagtttcaga aggtaatcga tcccaggaag ttactgttct tgataggcaa	960
aagaatttaa ttgattatat atcttttata gataaacctg attcaattag atataaaaaat	1020
ttagaaaaaa tttttaattt attaagccaa gggataaaag atcgctcaat ttattataca	1080
tctgcagggg agtataattc aacttttttc cggaatcatc agcaggtttt ctcaattggg	1140
tcaacttcag gctatttcca taattttgtc aaaccaacag cgacaaatta tcaaactgga	1200
tttaagaaaa atgatggtct taagtcagtt tatagcgtta gctatcccaa atttagcgca	1260
attgtatcac ttgaagatct caaggatata accaaagatc tagaaataac agcaaccgat	1320
ggtagctcta aattaaaaat tgatgctaaa tttttaggaa aactcaaaga atatgcacag	1380
caaatccag ttaaaaaagt gttttatttt actgatcgat cagaaaaacc ttcaggatc	1440

ttcgaaaaag attatattgt tttaggcaaa tacaaaaatg ataaaaatga agaattttaat 1500
 ggccttgtaa ttccaactta tacagaactc tataaaaaatt ctggatcaaa tgcccttaat 1560
 gatgatgaac ttgcacttga agccccaccg cataaattcg atgcaaatag taaaatcacc 1620
 cccattgtcg cccaaggtcc tgatctaatt tttattcatt caactgaaaa agaagataaa 1680
 gccgcaaaag cttttgttaa atggcttttg acagaaaaaa tagtctttga ggaaaatagt 1740
 caggaaaaaa tgactccgct tgagtatttt gccagagcaa cctcatattt attgccaata 1800
 aatcaacgc ttgataaaac ccatttttagt ccaaaaaata gatctcagaa attcatactt 1860
 gaccaattta gtaaatttct taatgctgat tcaaaaggaa aatattcgct tgtctatgat 1920
 aatgccgatg caaatgcttc atccttccgt gaatcactag attcttcagt tgcccagatg 1980
 caatcattaa aagccagcga tggaaaacta cgtagtttta aagagttttt agaaaaacta 2040
 gagggaaatt taggtcctgc ttttaaataa aaataa 2076

<210> 6

<211> 3549

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen P132 bị đột biến

<400> 6

attggactaa caatttttga gaaatcattt agttcccaag tttcaggagg ggtcgataag 60
 aacaaagttg tggatttaaa atcagattca gatcaaactt tctcagaaga agattttata 120
 agagcagttg agaatcttaa actttttgat aaatataaac atctaacagc aagaatggca 180
 ttaggacttg ctagggaagc agctaatagcc tttaactttt tagatactta tgactacacc 240
 ccaattacaa aacattcatt taagatttct ttggatatatt ccatgcctt tgcggctaata 300
 aaagaagtaa aagcggtagt ggtagtgca tattcccaaa aatatcaagt tacctattca 360
 agactaactt ctctaaaagg ttggaaagaa gaagatgatt ttggcgatga tattatagat 420
 tatcaaatta atcaagagct ttcaggtcta tcactttctt ccttagcccc tgaaagcgcg 480
 catcttttag cctcagaaat ggcttttcgg cttgataatg actttcaagt tgcataataa 540
 aaaacaggat caagagccga ggcttttcgt caggccttga taaagaatta tcttggttat 600

aacttagtta accgccaagg tttgcccact atgctccaaa agggttatgt gctagcccc	660
aaaacaattg aaaataaaaa tgcaagcgaa gaaaaattag taaatataaa tgaaaatgac	720
cgtgcaaggg ttaataaaact acaaaaagta gaaaatctag cctttaaaaa cttaagtgat	780
ccaaatggaa cgctttctat tacttttgaa ctctgggacc caaatggtaa attagtatcc	840
gaatacgatt ttaaaaattaa gggaatcaaa aaacttgatt ttgatcttaa aaaacaagag	900
gaaaaagtac ttcaaaaagt aactgaattt gttgagatta aaccttatgt tcaattaggt	960
ttaatccgtg ataatttatac attgtctgaa attatctata aaaatgataa taatccggag	1020
tatcttagga aaatattagc taaactaaaa gaacacaata acaacaaaag ggtggataat	1080
aatacatcca ctactaaatt tcaagaagag gatcttaaaa acgaaccaa ttctaattgga	1140
tcagaacaag attctttcga gaaagcaaag gaaaatttcc ttagtttttt tgatctaagg	1200
tcgagactaa ttcctattcc cgatcttcct ttatattatc ttaaagttaa ttcaattaat	1260
tttgatagaa atattgaaga aaatgaaaaa gaaaaattat taaaaaatga acaagtagta	1320
ctcaaagtag attttagtct taaaaaagtt gttagcgata ttagagctcc ttacctagtt	1380
tctagtcagg ttagatcaaa ttatcccccg gttttaaaaag cttcgctagc aaaaataggt	1440
aaggggtcaa attcaaaaagt tgccttttta gatcttgga atttatcttc aagatttaaa	1500
gttcaacttg attatagtgc aaaacaaaga gaaataatta atactttatt aaaggaaaat	1560
ccagaaagag aaaaagaatt acaagctaaa attgaaagta agacgttttag tccaatagat	1620
cttaacaatg atgatctatt agcaatcgaa tttcaatatg aggataacc tgaaggagat	1680
tggataactt tagggagaat ggaaaagtta gtcaaagagg ttatccaata taaaaagaa	1740
ggtaaaacct tcttagatga tgaagtcgcg aaaacacttt attattttaga tttccatcat	1800
ctacctcaa gtaaaaaaga cctcgaagaa tataaagaaa aacacaaaaa caagtttatc	1860
agcgaaataa aacctgctac accagcaagt caagcaaaaa caagtcaagc aaaaaatgaa	1920
aaagaagtaa aacctgaatc agcccaagca gaagcttcat cttcaaattc taatgattct	1980
agtagtaaaa ccacttcttc ttcaagtatg gcgggtacaa cccaaaataa atctacagaa	2040
actccaaatt caagttcaaa ttcaacacca acaagttcag caacaacttc agcaacaact	2100
tcaacaacaa gttcaaattc aagttcaaca acaagttcaa caacaacaac aacttcaaca	2160

caagcagcaa caacttcagc ctcttcggct aaagtaaaaa caactaaatt ccaagaacaa 2220
 gtaaaagaac aagaacaaaa acaagaaaaa gcaaaagaaa ctaaccaatt attagatact 2280
 aaaagaaata aagaagactc agggcttgga ttaattcttt gggatttcct agtaaattca 2340
 aaatataaaa ctctaccagg aactacctgg gatttccatg ttgaaccaga taatttcaat 2400
 gatcgtctaa aaataacagc gattctaaaa gaaaatacat ccagggcaaa gtcaaacca 2460
 gatagtaaaa acctaacttc cctatcacga aaccttataa taaaaggggt tatggctaatt 2520
 aaatacattg actacttagt ccaagaagat ccagtacttc ttgtagatta tacaagaaga 2580
 aaccagatta aaaccgaaag agaaggacaa ctaatttgga gccagttagc tccccctcaa 2640
 atggcatctc ctgaatctag tcccgaaaag gctaagctcg agatcaccca ggaaggactc 2700
 cgtgttaaaa aaggtggcac taagataaaa gagacaagaa aaagcacaac cagcaatgct 2760
 aaaagcaata ctaactccaa accaaataaa aagttagtcc tactaaaagg gtctataaaa 2820
 aaccgggaa caaaaaagga atggattctt gtaggatctg ggaataaggc caccaaaaac 2880
 ggaagctcca gcaacaactc caatacgcaa atatggataa cccgtctagg aacatctggt 2940
 ggttcattaa aaaccgaagg tgagacagtc cttggaattt cgaataataa tccaagggt 3000
 gaagttctct ggactactat taaatccaaa ctcgaaaacg aaaataactc agataacaat 3060
 caaatccaat actccccag tacgcatagt ttaacaacca attctcgatc aaatacccaa 3120
 caatcagggc gaaatcaaat taaaattaca aacacgcaaa ggaaaacaac aacttcgcca 3180
 agccaaaatc taagtcaaaa tcctgatctc aaccaaattg atgtaagact tggctacta 3240
 gtacaagaca aaaaacttca cctttggtgg attgctaatt atagctctga tgagcctgag 3300
 catataacaa ttgatttcgc tgaagggaca aaatttaatt atgatgattt aaattatgtc 3360
 ggagggcttt taaaaaatac tacaataat aacaatatgc aaaccaaga cgatgaagggt 3420
 gatggatata ttgccctaaa aggattaggt atctatgaat ttctgatga tgaaagtatt 3480
 gatcaaccgc ctactgttga aaaggcagag agattatata aacactttat ggggctattt 3540
 agggaataa 3549

<210> 7
 <211> 1053
 <212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen mhp389 bị đột biến

<400> 7

```

atggacaaat tttcacgaac tgttctcggg gatattcacc catcggaatt aggtgttggt      60
gactgtcatg atcatttaat taaaaattat ggaccaaag ctcacgaaca tccggatttt      120
gtaatgttat caaatgaggc tgcaattgct gaatcacttg aatatgcttc ccggggtgga      180
aaaacaatag tgacaatgga ccccccaaat gttggtcggg atgtctatcg aatgttaaag      240
attgccaaag ctcttgaagg aaaagtgcac attattatgg caactggatt tcataaagcg      300
gctttctatg ataaaggcgc atcatggcct gcgcttgac caacagatga aattgtaaaa      360
atggttgttg ctgaaattac acagggaatg gatgaatata attattcagg tcctgtgggt      420
agacgttcaa aagccaaagc aggaattatc aaagccggaa ctggatatgg agcaattgat      480
cgacttgaat taaaatcact tgaggttgca gcaagagcct caattgaaac cggggcaccg      540
attttggttc atacccaatt aggaacaatg gcctatgaag cggcaaaata tttaattgat      600
tttggtgcaa atccacggaa aattcagatc tcacatctta ataaaaacc tgataaatat      660
tattatgcaa aaataattaa agaacttggg gtatctttat gttttgatgg tcctgatcgg      720
gttaagtatt ttcttgatac aactcttgct gaaaatatta aatatcttgt cgatttagga      780
ctagaaaaac atattacctt atcacttgat gccggtcgtg ttttatatca gcgaaattat      840
ggaaaactta aaggtaaagt gacttttgga ctaacctatt tattcgatcg gtttattccg      900
cttttagaac aagttggaat tagcaaggaa acaattaata atattcttgt taataatcca      960
gctgaaattc ttgcctttga tcagccaaga aaatttgatc catcaattct tccagattat     1020
attattgaat taaaaaaatc ctttaaaatc tag                                1053

```

<210> 8

<211> 374

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 8

```

Met Asp Lys Phe Arg Tyr Val Lys Pro Gly Gln Ile Met Ala Lys Asp
1              5              10              15

```

Glu Glu Met Ile Arg Phe Leu Asp Ile Asp Gly Asn Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Thr Val Phe Gly Pro Ile Asp Glu Thr Asn Asp Ile Arg Leu Ser Lys
35 40 45

Gln Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Glu Phe Met Val Leu Ser Arg Gln Gln
50 55 60

Asp Thr Tyr Met Thr Gln Leu Gln Arg Gln Gly Arg Met Leu Thr Phe
65 70 75 80

Ala Pro Asn Phe Gly Glu Glu Ala Leu Gln Val Ala Ser Gly Met Ala
85 90 95

Leu Thr Lys Asp Asp Trp Phe Val Pro Ala Phe Arg Ser Asn Ala Thr
100 105 110

Met Leu Tyr Leu Gly Val Pro Met Ile Leu Gln Met Gln Tyr Trp Asn
115 120 125

Gly Ser Glu Lys Gly Asn Val Ile Pro Glu Asn Val Asn Val Leu Pro
130 135 140

Ile Asn Ile Pro Ile Gly Thr Gln Phe Ser His Ala Ala Gly Ile Ala
145 150 155 160

Tyr Ala Ala Lys Leu Thr Gly Lys Lys Ile Val Ser Met Ser Phe Ile
165 170 175

Gly Asn Gly Gly Thr Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Glu Ala Leu Asn Ile
180 185 190

Ala Ser Ile Trp Lys Trp Pro Val Val Phe Cys Val Asn Asn Asn Gln
195 200 205

Trp Ala Ile Ser Thr Pro Asn Lys Tyr Glu Asn Gly Ala Ser Thr Ile
210 215 220

Ala Ala Lys Ala Met Ala Ala Gly Ile Pro Gly Ile Arg Val Asp Gly
225 230 235 240

Asn Asp Leu Leu Ala Ser Tyr Glu Val Ile Lys Glu Ala Val Asp Tyr
245 250 255

Ala Arg Ser Gly Asn Gly Pro Val Leu Val Glu Phe Val Thr Trp Arg
260 265 270

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

Glu Glu Glu Arg Glu His Glu Lys Trp Glu Pro Met His Arg Ile Glu
290 295 300

Lys Tyr Met Phe Asp Arg Gly Ile Leu Asp Ser Ala Glu Lys Gln Lys
305 310 315 320

Ile Trp Asp Glu Ala Leu Ala Ile Val Lys Glu Thr Tyr Glu Lys Ser
325 330 335

Leu Val Gly Leu Glu Ser Thr Ile Asp Glu Ile Phe Asp His Thr Tyr
340 345 350

Lys Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu Glu Gln Lys Gln Glu Ala Leu Glu
355 360 365

Phe Phe Lys Gly Val Lys
370

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 9

Met Lys Trp Asn Lys Phe Leu Gly Leu Gly Leu Val Phe Pro Leu Ser
1 5 10 15

Ala Ile Ala Thr Ile Ser Ala Gly Cys Trp Asp Lys Glu Thr Thr Lys
 20 25 30

Glu Glu Lys Ser Ala Asp Asn Gln Asn Lys Gln Ile Thr Asp Val Ser
 35 40 45

Lys Ile Ser Gly Leu Val Asn Glu Arg Lys Ser Glu Ile Met Ala Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Ala Asn Lys His Phe Gly Leu Asn Met Ala Ile Val Thr
 65 70 75 80

Ala Asp Gly Thr Val Asn Asp Asn Ser Phe Asn Gln Ser Ser Trp Glu
 85 90 95

Ala Ile Gln Gln Leu Gly Ala Leu Thr Gly Gly Glu Ile Thr Ser Val
 100 105 110

Asp Ser Ser Thr Ala Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser Ser Leu Ala Asn
 115 120 125

Thr Asn Lys Asn Val Trp Val Leu Ser Gly Phe Gln His Gly Asp Ala
 130 135 140

Ile Thr Lys Trp Leu Lys Ile Pro Glu Asn Lys Gln Leu Phe Thr Glu
 145 150 155 160

Lys Asn Ile Ile Ile Leu Gly Ile Asp Trp Thr Asp Thr Glu Asn Val
 165 170 175

Ile Pro Thr Gly Arg Tyr Ile Asn Leu Thr Tyr Lys Thr Glu Glu Ala
 180 185 190

Gly Trp Leu Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ser Phe Leu Ala Lys Lys Phe
 195 200 205

Pro Ser Asp Pro Thr Lys Arg Ser Ala Ile Val Ile Gly Gly Gly Ile
 210 215 220

Phe Pro Ala Val Thr Asp Phe Ile Ala Gly Tyr Leu Ala Gly Ile Lys
225 230 235 240

Ala Trp Asn Leu Lys Asn Ser Asp Lys Lys Thr Lys Ile Thr Thr Asp
245 250 255

Lys Ile Glu Ile Asn Leu Gly Phe Asp Phe Gln Asn Thr Ser Thr Lys
260 265 270

Glu Arg Leu Glu Gln Ile Ala Ser Lys Asp Lys Pro Ser Thr Leu Leu
275 280 285

Ala Val Ala Gly Pro Leu Thr Glu Ile Phe Ser Asp Ile Ile Ala Asn
290 295 300

Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp Gln Ser Leu Val
305 310 315 320

Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe Phe Thr Ser Ile Leu Lys Asn Leu
325 330 335

Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu Ser Asp Leu Tyr Thr Lys Lys Ser
340 345 350

Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe Glu Phe Gly Lys Lys Ser Ala Thr
355 360 365

Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Lys Phe Val Asp Ile Ala Asp Thr Ser
370 375 380

Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu Ala Thr Glu Ala Ile Ser Glu Ala
385 390 395 400

Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr Lys Thr Thr Pro Ala Glu Glu Val
405 410 415

Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu Met Thr Asp Lys Gln Pro Asp Lys
420 425 430

Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu Ile Thr Asp Ile Asn Lys Asn
 435 440 445

<210> 10
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 10

Met Thr Tyr Gln Glu Tyr Leu Gln Ala Arg Leu Glu Gln Gln Asn Glu
 1 5 10 15

Thr Lys Ser Leu Arg Ser Val Leu Ile Ile Asp Gly Ala Asp Pro Arg
 20 25 30

Ala Ile Ala Ala Ala Lys Leu Leu Lys Glu Lys Asn Leu Val Lys Pro
 35 40 45

Val Leu Leu Val Asp Glu Glu Ile Pro Asn Leu Asp Val Asp Gln His
 50 55 60

Ile Val Asn Phe Gln Glu Lys Met Glu Phe Ile Lys Glu Phe Leu Lys
 65 70 75 80

Phe Arg Lys Gly Lys Glu Thr Pro Glu Ser Ala Glu Ile Gln Phe Gln
 85 90 95

Ser Asn Ala Phe Tyr Gly Thr Met Leu Leu Arg Lys Lys Lys Val Asp
 100 105 110

Ala Val Val Gly Gly Leu Asn Tyr Pro Thr Ala Glu Ile Leu Arg Ala
 115 120 125

Ala Phe Lys Ile Ile Gly Pro Lys Pro Asn Ile Lys Thr Ile Ser Ser
 130 135 140

Val Met Ile Met His Lys Asp Gln Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Asp Ile
 145 150 155 160

Ser Val Asn Ile Ala Pro Asn Glu Asn Gln Leu Val Asp Ile Ala Lys
 165 170 175

Asn Ala Leu Asp Phe Ala Ile Gln Leu Gly Phe Asp Pro Lys Pro Ala
 180 185 190

Phe Leu Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ser Ala Lys Ser Pro Gln Ser Glu
 195 200 205

Leu Val Ala Lys Ala Thr Gln Met Phe Asn Ala Thr Ser Pro Ile Glu
 210 215 220

Ala Tyr Gly Glu Ile Gln Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ile Glu Val Arg
 225 230 235 240

Arg Gln Lys Tyr Glu Val Asn Val Gly Lys Asn Ala Asn Ile Leu Ile
 245 250 255

Phe Pro Asn Leu Asp Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Ile Ala Gln Arg
 260 265 270

Leu Gly Asn Phe Gly Ala Ile Gly Pro Ile Ile Thr Gly Ile Asn Ala
 275 280 285

Pro Ile Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ser Thr Thr Gln Asp Val Phe Asn
 290 295 300

Thr Val Leu Ile Ser Ala Leu Gln Val Glu Gly Lys
 305 310 315

<210> 11

<211> 373

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 11

Ile Ala Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ala Lys Val Ala Pro Val Ala Val
 1 5 10 15

Val Phe Ser Thr Arg Asn Asn Pro Phe Phe Gln Asn Val Glu Lys Gly
 20 25 30

Ile Glu Thr Ala Ala Lys Glu Leu Gly Val Asp Tyr Glu Val Tyr Asp
 35 40 45

Ser Glu Asn Asp Ser Asp Lys Glu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ile Ile
 50 55 60

Ala Lys Gln Gln Lys Val Val Ile Phe Asn Asp Val Asn Glu Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Ile Ser Ala Val Lys Lys Leu Asn Gln Ala Gly Ile Pro Val Ile
 85 90 95

Ala Thr Asp His Leu Leu Asn Ser Pro Lys Ala Leu Glu Ala Lys Ile
 100 105 110

Lys Val Glu Ala Asn Ile Ala Ser Asp Asn Lys Gln Ala Gly Val Ile
 115 120 125

Leu Ala Gln Phe Met Ala Gln Lys Ile Gly Leu Pro Gln Asp Ser Leu
 130 135 140

Thr Tyr Ser Val Tyr Gly Ile Pro Gly Thr Glu Ser Gly Glu Ser Arg
 145 150 155 160

Ala Gln Gly Phe Ile Glu Thr Val Lys Asn Leu Asn Asn Gln Ala Ile
 165 170 175

Lys Tyr Asn Leu Phe Ser Tyr Gly Lys Tyr Gly Lys Glu Asn Ala Asn
 180 185 190

Gly Lys Thr Tyr Ile Gly Arg Gln Ala Asp Asp Asn Arg Asp Leu Ala
 195 200 205

Asn Gln Arg Val Ala Asn Asp Ala Thr Gln Val Phe Gln Asp Ala Gln
 210 215 220

Lys Arg Pro Leu Leu Val Phe Gly Thr Asn Asp Glu Ala Ala Leu Gly
 225 230 235 240

Ser Ile Ser Ala Leu Glu Ser Ala Gln Ile Pro Leu Gly Gly Gly Asp
 245 250 255

Lys Phe Leu Pro Gly Ser Gly Lys Val Tyr Ile Thr Gly Val Asp Tyr
 260 265 270

Thr Asn Asp Ala Gln Lys Ala Val Leu Asn Asn Lys Leu Ser Ala Thr
 275 280 285

Val Glu Gln Asp Thr Asp Leu Leu Gly Arg Leu Ser Leu Ile Ile Ala
 290 295 300

Glu Lys Ile Leu Lys Asp Gln Trp Lys Thr Ser Lys Tyr Ser Asp Phe
 305 310 315 320

Tyr Ser Gln Phe Pro Gln Leu Asp Lys Asp Lys Asn Pro Asp Asp Gln
 325 330 335

Val Glu Gln Gly Tyr Tyr Phe Lys Val Gly Thr Lys Leu Phe Trp Lys
 340 345 350

Gly Pro Asp Gly Lys Gly Glu Lys Leu Gln Ala Asp Glu Asn Gly Ile
 355 360 365

Leu Gln Lys Val Asn
 370

<210> 12
 <211> 691
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 12

Leu Ser Tyr Lys Phe Arg Arg Phe Phe Leu Thr Ser Ala Leu Ser Phe
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Leu Val Ala Ser Cys Val Asn Asn Ser Arg Phe Asp
 20 25 30

Ser Asn Glu Asp Asn Lys Leu Val Phe Gly His Thr Phe Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Lys Glu Ala Lys Ala Leu Glu Lys Ile Ile Glu Val Trp Asn Lys
50 55 60

Thr Ala Thr Asn Gln Lys Asp Phe Ile Lys Met Glu Ala Gln Tyr Phe
65 70 75 80

Gln Asn Gly Tyr Asn Gly Ser Ala Ala Ser Ile Thr Asn Phe Leu Gln
85 90 95

Thr Lys Asp Arg Ile Lys Leu Pro Asn Ile Val Thr Asn Tyr Pro Ser
100 105 110

Leu Leu Ala Ile Val Asn Lys Tyr Ser Met Thr Phe Pro Leu Val Lys
115 120 125

Asp Phe Ser Ser Asn Gln Glu Pro Gln Asp Glu Asn Glu Lys Ala Ile
130 135 140

Lys Lys Phe Leu Lys Glu Gln Gly Ile Ser Asp Phe Leu Glu Ile Asn
145 150 155 160

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

Gly Lys Ser Thr Glu Val Leu Thr Ile Asn Lys Val Leu Phe Gly Trp
180 185 190

Met Ile Asn Lys Ala Leu Ala Asp Pro Lys Lys Pro Ala Lys Ile Lys
195 200 205

Glu Glu Asp Lys Pro Tyr Phe Ala Glu Phe Gln Lys Leu Gly Lys Glu
210 215 220

Lys Thr Gly Asp Ile Lys Glu Ile Glu Arg Ile Trp Lys Lys Tyr Val
225 230 235 240

Ser Asp Asp Gln Gly Leu Ala Gly Tyr Glu Phe Arg Arg Ser Asp Leu
245 250 255

Glu Asn Phe Thr Asp Leu Gln Lys Leu Ser Ser Arg Ile Leu Arg Ser
260 265 270

Phe Pro Glu Ala Leu Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ser Ala Lys Ser Val
275 280 285

Leu Gly Ile Asp Asn Gln Ala Thr Leu Val Phe Ala Leu Ala Arg Ser
290 295 300

Val	Ser	Glu	Gly	Asn	Arg	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Leu	Asp	Arg	Gln
305					310					315					320

Lys Asn Leu Ile Asp Tyr Ile Ser Phe Ile Asp Lys Pro Asp Ser Ile
325 330 335

Arg Tyr Lys Asn Leu Glu Lys Ile Phe Asn Leu Leu Ser Gln Gly Ile
340 345 350

Lys Asp Arg Ser Ile Tyr Tyr Thr Ser Ala Gly Glu Tyr Asn Ser Thr
355 360 365

Phe Phe Arg Asn His Gln Gln Val Phe Ser Ile Gly Ser Thr Ser Gly
370 375 380

Tyr Phe His Asn Phe Val Lys Pro Thr Ala Thr Asn Tyr Gln Ile Gly
385 390 395 400

Phe Lys Lys Asn Asp Gly Leu Lys Ser Val Tyr Ser Val Ser Tyr Pro
405 410 415

Lys Phe Ser Ala Ile Val Ser Leu Glu Asp Leu Lys Asp Ile Thr Lys
420 425 430

Asp Leu Glu Ile Thr Ala Thr Asp Gly Ser Ser Lys Leu Lys Ile Asp
435 440 445

Ala Lys Phe Leu Gly Lys Leu Lys Glu Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Val
 450 455 460

Lys Lys Val Phe Tyr Phe Thr Asp Arg Ser Glu Lys Pro Ser Gly Ile
 465 470 475 480

Phe Glu Lys Asp Tyr Ile Val Leu Gly Lys Tyr Lys Asn Asp Lys Asn
 485 490 495

Glu Glu Phe Asn Gly Leu Val Ile Pro Thr Tyr Thr Glu Leu Tyr Lys
 500 505 510

Asn Ser Gly Ser Asn Ala Leu Asn Asp Asp Glu Leu Ala Leu Glu Ala
 515 520 525

Pro Pro His Lys Phe Asp Ala Asn Ser Lys Ile Thr Pro Ile Val Ala
 530 535 540

Gln Gly Pro Asp Leu Ile Phe Ile His Ser Thr Glu Lys Glu Asp Lys
 545 550 555 560

Ala Ala Lys Ala Phe Val Lys Trp Leu Leu Thr Glu Lys Ile Val Phe
 565 570 575

Glu Glu Asn Ser Gln Glu Lys Met Thr Pro Leu Glu Tyr Phe Ala Arg
 580 585 590

Ala Thr Ser Tyr Leu Leu Pro Ile Lys Ser Thr Leu Asp Lys Thr His
 595 600 605

Phe Ser Pro Lys Asn Arg Ser Gln Lys Phe Ile Leu Asp Gln Phe Ser
 610 615 620

Lys Phe Leu Asn Ala Asp Ser Lys Gly Lys Tyr Ser Leu Val Tyr Asp
 625 630 635 640

Asn Ala Asp Ala Asn Ala Ser Ser Phe Arg Glu Ser Leu Asp Ser Ser
 645 650 655

Val Ala Gln Met Gln Ser Leu Lys Ala Ser Asp Gly Lys Leu Arg Ser
 660 665 670

Phe Lys Glu Phe Leu Glu Lys Leu Glu Gly Asn Leu Gly Pro Ala Phe
 675 680 685

Lys Ser Lys
 690

<210> 13

<211> 1182

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 13

Ile Gly Leu Thr Ile Phe Glu Lys Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Val Asp Lys Asn Lys Val Val Asp Leu Lys Ser Asp Ser Asp Gln
 20 25 30

Ile Phe Ser Glu Glu Asp Phe Ile Arg Ala Val Glu Asn Leu Lys Leu
 35 40 45

Phe Asp Lys Tyr Lys His Leu Thr Ala Arg Met Ala Leu Gly Leu Ala
 50 55 60

Arg Glu Ala Ala Asn Ala Phe Asn Phe Leu Asp Thr Tyr Asp Tyr Thr
 65 70 75 80

Pro Ile Thr Lys His Ser Phe Lys Ile Ser Leu Asp Ile Ser Asp Ala
 85 90 95

Phe Ala Ala Asn Lys Glu Val Lys Ala Val Val Val Ser Ala Tyr Ser
 100 105 110

Gln Lys Tyr Gln Val Thr Tyr Ser Arg Leu Thr Ser Leu Lys Gly Trp
 115 120 125

Lys Glu Glu Asp Asp Phe Gly Asp Asp Ile Ile Asp Tyr Gln Ile Asn
 130 135 140

Gln Glu Leu Ser Gly Leu Ser Leu Ser Ser Leu Ala Pro Glu Ser Ala
 145 150 155 160

His Leu Leu Ala Ser Glu Met Ala Phe Arg Leu Asp Asn Asp Phe Gln
 165 170 175

Val Ala Tyr Lys Lys Thr Gly Ser Arg Ala Glu Ala Phe Arg Gln Ala
 180 185 190

Leu Ile Lys Asn Tyr Leu Gly Tyr Asn Leu Val Asn Arg Gln Gly Leu
 195 200 205

Pro Thr Met Leu Gln Lys Gly Tyr Val Leu Ala Pro Lys Thr Ile Glu
 210 215 220

Asn Lys Asn Ala Ser Glu Glu Lys Leu Val Asn Ile Asn Glu Asn Asp
 225 230 235 240

Arg Ala Arg Val Asn Lys Leu Gln Lys Val Glu Asn Leu Ala Phe Lys
 245 250 255

Asn Leu Ser Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ser Ile Thr Phe Glu Leu Trp
 260 265 270

Asp Pro Asn Gly Lys Leu Val Ser Glu Tyr Asp Phe Lys Ile Lys Gly
 275 280 285

Ile Lys Lys Leu Asp Phe Asp Leu Lys Lys Gln Glu Glu Lys Val Leu
 290 295 300

Gln Lys Val Thr Glu Phe Val Glu Ile Lys Pro Tyr Val Gln Leu Gly
 305 310 315 320

Leu Ile Arg Asp Asn Leu Ser Leu Ser Glu Ile Ile Tyr Lys Asn Asp
 325 330 335

Asn Asn Pro Glu Tyr Leu Arg Lys Ile Leu Ala Lys Leu Lys Glu His
340 345 350

Asn Asn Asn Lys Arg Val Asp Asn Asn Thr Ser Thr Thr Lys Phe Gln
355 360 365

Glu Glu Asp Leu Lys Asn Glu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Glu Gln Asp
370 375 380

Ser Phe Glu Lys Ala Lys Glu Asn Phe Leu Ser Phe Phe Asp Leu Arg
385 390 395 400

Ser Arg Leu Ile Pro Ile Pro Asp Leu Pro Leu Tyr Tyr Leu Lys Val
405 410 415

Asn Ser Ile Asn Phe Asp Arg Asn Ile Glu Glu Asn Glu Lys Glu Lys
420 425 430

Leu Leu Lys Asn Glu Gln Val Val Leu Lys Val Asp Phe Ser Leu Lys
435 440 445

Lys Val Val Ser Asp Ile Arg Ala Pro Tyr Leu Val Ser Ser Gln Val
450 455 460

Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Val Leu Lys Ala Ser Leu Ala Lys Ile Gly
465 470 475 480

Lys Gly Ser Asn Ser Lys Val Val Leu Leu Asp Leu Gly Asn Leu Ser
485 490 495

Ser Arg Phe Lys Val Gln Leu Asp Tyr Ser Ala Lys Gln Arg Glu Ile
500 505 510

Ile Asn Thr Leu Leu Lys Glu Asn Pro Glu Arg Glu Lys Glu Leu Gln
515 520 525

Ala Lys Ile Glu Ser Lys Thr Phe Ser Pro Ile Asp Leu Asn Asn Asp
530 535 540

Asp Leu Leu Ala Ile Glu Phe Gln Tyr Glu Asp Asn Pro Glu Gly Asp
545 550 555 560

Trp Ile Thr Leu Gly Arg Met Glu Lys Leu Val Lys Glu Val Ile Gln
565 570 575

Tyr Lys Lys Glu Gly Lys Thr Phe Leu Asp Asp Glu Val Ala Lys Thr
580 585 590

Leu Tyr Tyr Leu Asp Phe His His Leu Pro Gln Ser Lys Lys Asp Leu
595 600 605

Glu Glu Tyr Lys Glu Lys His Lys Asn Lys Phe Ile Ser Glu Ile Lys
610 615 620

Pro Ala Thr Pro Ala Ser Gln Ala Lys Thr Ser Gln Ala Lys Asn Glu
625 630 635 640

Lys Glu Val Lys Pro Glu Ser Ala Gln Ala Glu Ala Ser Ser Ser Asn
645 650 655

Ser Asn Asp Ser Ser Ser Lys Thr Thr Ser Ser Ser Ser Met Ala Gly
660 665 670

Thr Thr Gln Asn Lys Ser Thr Glu Thr Pro Asn Ser Ser Ser Asn Ser
675 680 685

Thr Pro Thr Ser Ser Ala Thr Thr Ser Ala Thr Thr Ser Thr Thr Ser
690 695 700

Ser Asn Ser Ser Ser Thr Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr
705 710 715 720

Gln Ala Ala Thr Thr Ser Ala Ser Ser Ala Lys Val Lys Thr Thr Lys
725 730 735

Phe Gln Glu Gln Val Lys Glu Gln Glu Gln Lys Gln Glu Lys Ala Lys
740 745 750

Glu Thr Asn Gln Leu Leu Asp Thr Lys Arg Asn Lys Glu Asp Ser Gly
755 760 765

Leu Gly Leu Ile Leu Trp Asp Phe Leu Val Asn Ser Lys Tyr Lys Thr
770 775 780

Leu Pro Gly Thr Thr Trp Asp Phe His Val Glu Pro Asp Asn Phe Asn
785 790 795 800

Asp Arg Leu Lys Ile Thr Ala Ile Leu Lys Glu Asn Thr Ser Gln Ala
805 810 815

Lys Ser Asn Pro Asp Ser Lys Asn Leu Thr Ser Leu Ser Arg Asn Leu
820 825 830

Ile Ile Lys Gly Val Met Ala Asn Lys Tyr Ile Asp Tyr Leu Val Gln
835 840 845

Glu Asp Pro Val Leu Leu Val Asp Tyr Thr Arg Arg Asn Gln Ile Lys
850 855 860

Thr Glu Arg Glu Gly Gln Leu Ile Trp Ser Gln Leu Ala Ser Pro Gln
865 870 875 880

Met Ala Ser Pro Glu Ser Ser Pro Glu Lys Ala Lys Leu Glu Ile Thr
885 890 895

Glu Glu Gly Leu Arg Val Lys Lys Gly Gly Thr Lys Ile Lys Glu Thr
900 905 910

Arg Lys Ser Thr Thr Ser Asn Ala Lys Ser Asn Thr Asn Ser Lys Pro
915 920 925

Asn Lys Lys Leu Val Leu Leu Lys Gly Ser Ile Lys Asn Pro Gly Thr
930 935 940

Lys Lys Glu Trp Ile Leu Val Gly Ser Gly Asn Lys Ala Thr Lys Asn
945 950 955 960

Gly Ser Ser Ser Asn Asn Ser Asn Thr Gln Ile Trp Ile Thr Arg Leu
 965 970 975

Gly Thr Ser Val Gly Ser Leu Lys Thr Glu Gly Glu Thr Val Leu Gly
 980 985 990

Ile Ser Asn Asn Asn Ser Gln Gly Glu Val Leu Trp Thr Thr Ile Lys
 995 1000 1005

Ser Lys Leu Glu Asn Glu Asn Asn Ser Asp Asn Asn Gln Ile Gln
 1010 1015 1020

Tyr Ser Pro Ser Thr His Ser Leu Thr Thr Asn Ser Arg Ser Asn
 1025 1030 1035

Thr Gln Gln Ser Gly Arg Asn Gln Ile Lys Ile Thr Asn Thr Gln
 1040 1045 1050

Arg Lys Thr Thr Thr Ser Pro Ser Gln Asn Leu Ser Gln Asn Pro
 1055 1060 1065

Asp Leu Asn Gln Ile Asp Val Arg Leu Gly Leu Leu Val Gln Asp
 1070 1075 1080

Lys Lys Leu His Leu Trp Trp Ile Ala Asn Asp Ser Ser Asp Glu
 1085 1090 1095

Pro Glu His Ile Thr Ile Asp Phe Ala Glu Gly Thr Lys Phe Asn
 1100 1105 1110

Tyr Asp Asp Leu Asn Tyr Val Gly Gly Leu Leu Lys Asn Thr Thr
 1115 1120 1125

Asn Asn Asn Asn Met Gln Thr Gln Asp Asp Glu Gly Asp Gly Tyr
 1130 1135 1140

Leu Ala Leu Lys Gly Leu Gly Ile Tyr Glu Phe Pro Asp Asp Glu
 1145 1150 1155

Ser Ile Asp Gln Pro Ala Thr Val Glu Lys Ala Glu Arg Leu Tyr
 1160 1165 1170

Lys His Phe Met Gly Leu Phe Arg Glu
 1175 1180

<210> 14
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 14

Met Asp Lys Phe Ser Arg Thr Val Leu Gly Asp Ile His Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Gly Val Val Asp Cys His Asp His Leu Ile Lys Asn Tyr Gly Pro
 20 25 30

Lys Ala His Glu His Pro Asp Phe Val Met Leu Ser Asn Glu Ala Ala
 35 40 45

Ile Ala Glu Ser Leu Glu Tyr Ala Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ile Val
 50 55 60

Thr Met Asp Pro Pro Asn Val Gly Arg Asp Val Tyr Arg Met Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ala Lys Ala Leu Glu Gly Lys Val His Ile Ile Met Ala Thr Gly
 85 90 95

Phe His Lys Ala Ala Phe Tyr Asp Lys Gly Ala Ser Trp Leu Ala Leu
 100 105 110

Ala Pro Thr Asp Glu Ile Val Lys Met Val Val Ala Glu Ile Thr Gln
 115 120 125

Gly Met Asp Glu Tyr Asn Tyr Ser Gly Pro Val Val Arg Arg Ser Lys
 130 135 140

Ala Lys Ala Gly Ile Ile Lys Ala Gly Thr Gly Tyr Gly Ala Ile Asp

145		150		155		160									
Arg	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Val	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Ile	Glu
				165					170					175	
Thr	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Val	His	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Met	Ala	Tyr
			180					185					190		
Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu	Ile	Asp	Phe	Gly	Ala	Asn	Pro	Arg	Lys	Ile
		195					200					205			
Gln	Ile	Ser	His	Leu	Asn	Lys	Asn	Pro	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Lys
	210					215					220				
Ile	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Ser	Leu	Cys	Phe	Asp	Gly	Pro	Asp	Arg
225					230					235					240
Val	Lys	Tyr	Phe	Pro	Asp	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Asn	Ile	Lys	Tyr	Leu
				245					250					255	
Val	Asp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	His	Ile	Thr	Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	Gly
			260					265					270		
Arg	Val	Leu	Tyr	Gln	Arg	Asn	Tyr	Gly	Lys	Leu	Lys	Gly	Lys	Trp	Thr
		275					280					285			
Phe	Gly	Leu	Thr	Tyr	Leu	Phe	Asp	Arg	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Glu	Gln
	290					295					300				
Val	Gly	Ile	Ser	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Asn	Pro
305					310					315					320
Ala	Glu	Ile	Leu	Ala	Phe	Asp	Gln	Pro	Arg	Lys	Phe	Asp	Pro	Ser	Ile
				325					330					335	
Leu	Pro	Asp	Tyr	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Ile		
			340					345					350		

<210> 15

<211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 15
 gatataggat ccatggacaa atttcgctat gtaaagcctg 40

 <210> 16
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 16
 caatatgtcg acttatttta ctccctttaaa aaattcaagc gcttc 45

 <210> 17
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 17
 gatataggat ccatgaatgg aataaatttc ttggcttagg cttagttttt c 51

 <210> 18
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 18
 caatatgtcg acttaatttt tattaatatc ggtaattagt ttgtctaagc 50

 <210> 19
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 19

gatataggat ccatgacata ccaagaatat cttcaagcaa g

41

<210> 20

<211> 42

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 20

caatatgtcg acctatttac cttcttcaac ttgtagagcg ct

42

<210> 21

<211> 38

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 21

gatataggat ccatagcttc aaggtcgaat acaactgc

38

<210> 22

<211> 42

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 22

caatatgtcg acttaattta ccttttggag tatcccattt tc

42

<210> 23

<211> 40

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 23

gatataggat ccttatccta taaatttagg cgttttttcc

40

<210> 24
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 24
 caatatgtcg acttatttttg atttaaaagc aggacctaaa t

41

<210> 25
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 25
 gatataggat ccattggact aacaattttt gagaaatcat ttag

44

<210> 26
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 26
 caatatgtcg acttatttcct aaatagcccc ataaagtg

38

<210> 27
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 27
 gatataggat ccatggacaa attttcacga actgttct

38

<210> 28

<211> 51
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 28
 caatatgtcg acctagattt taaaggattt ttttaattca ataataataat c

51

<210> 29
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 29
 gatataggat ccatggacaa atttcgctat gtaaagcctg

40

<210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 30
 gctaacaaaa gatgactggg ttgtcccagc ttttcg

36

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 31
 cgaaaagctg ggacaaacca gtcatttttt gtttagc

36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 32

cttgcaaattg caatattgga atggttagcga aaaagg

36

<210> 33

<211> 36

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 33

ccttttttcgc taccattcca atattgcatt tgcaag

36

<210> 34

<211> 58

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 34

cgaggcgcta aatattgcaa gtattttggaa atggccagtt gtttttttcgc taaataac

58

<210> 35

<211> 58

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 35

gttatttacg caaaaaacaa ctggccattt ccaaatactt gcaatattta ggcctcg

58

<210> 36

<211> 52

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 36

gttttttgcg taaataacaa tcaatgggca atttcaaccc caaataaata tg 52

<210> 37
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 37
 catatttatt tgggggttgaa attgcccatt gattggttatt tacgcaaaaa ac 52

<210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 38
 gttgagtttg taacttggcg tcaaggtggt catacc 36

<210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 39
 ggtatgaaca ccttgacgcc aagttacaaa ctcaac 36

<210> 40
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 40
 gagaacacga aaaatgggaa ccaatgcacc gg 32

<210> 41

<211> 32
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 41
 ccggtgcatt ggttcccatt tttcgtgttc tc

32

<210> 42
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 42
 ccgaaaaaca aaaaatttgg gatgaagcgc ttgcgattg

39

<210> 43
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 43
 caatcgcaag cgcttcatcc caaatttttt gtttttcgg

39

<210> 44
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 44
 caatatgtcg acttatattta ctcctttaaa aaattcaagc gcttc

45

<210> 45
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

 <400> 45
 gatataggat ccatgaaatg gaataaattt cttggcttag gcttagtttt tc 52

 <210> 46
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 46
 catttaacca atcaagttgg gaggcaattc aacaacttgg 40

 <210> 47
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 47
 ccaagttggt gaattgcctc ccaacttgat tgggttaaag 40

 <210> 48
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 48
 ctaataccaa caaaaatggt tgggtacttt ctggttttca acacg 45

 <210> 49
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mỗi

 <400> 49

cgtgttgaaa accagaaagt acccaaacat ttttgttggt attag 45

<210> 50
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 50
 cggatgatgac atcacaaaat ggttaaaaat ccctgaaaat aagc 44

<210> 51
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 51
 gcttatttttc agggattttt aaccattttg tgatcgcatc accg 44

<210> 52
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 52
 ttatcactac cggaattgac tggactgata ctgaaaatgt aattc 45

<210> 53
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 53
 gaattacatt ttcagtatca gtccagtcaa ttccgagtat gataa 45

<210> 54

<211> 29
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 54
 gaagaagccg gatggcttgc aggatatgc

29

<210> 55
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 55
 gcatatcctg caagccatcc ggcttcttc

29

<210> 56
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 56
 ggttatctag ccggaattaa agcttggaat ctaaaaaatt ctgataaaaa aac

53

<210> 57
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 57
 gtttttttat cagaattttt tagattccaa gctttaattc cggctagata acc

53

<210> 58
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 58

caatatgtcg acttaatttt tattaatatc ggtaattagt ttgtctaagc

50

<210> 59

<211> 40

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 59

gatataggat ccttataccta taaatttagg cgttttttcc

40

<210> 60

<211> 52

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 60

caattaataa agttttgttt ggttgatga ttaataaagc acttgctgat cc

52

<210> 61

<211> 52

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 61

ggatcagcaa gtgctttatt aatcatccaa ccaaacaaaa ctttattaat tg

52

<210> 62

<211> 53

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 62

gatattaaag aaattgaaag aatctggaaa aaatatgtct ccgatgatca agg 53

<210> 63
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 63
 ccttgatcat cggagacata ttttttccag attctttcaa tttctttaat atc 53

<210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 64
 gccctttcag gaggctccac tgattcggca 30

<210> 65
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 65
 tgccgaatca gtggagcctc ctgaaagggc 30

<210> 66
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 66
 gccgcaaaag cttttgttaa atggcttttg acagaaaaaa tagtct 46

<210> 67

<211> 46
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 67
 agactatttt ttctgtcaaa agccatttaa caaaagcttt tgcggc

46

<210> 68
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 68
 caatatgtcg acttattttg atttaaaagc aggacctaaa t

41

<210> 69
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 69
 gatataggat ccattggact aacaattttt gagaaatcat ttag

44

<210> 70
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 70
 ctaacttctc taaaagggttg gaaagaagaa gatgattttg

40

<210> 71
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 71

caaaatcatc ttcttctttc caacctttta gagaagttag

40

<210> 72

<211> 47

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 72

ctttctatta cttttgaact ctgggaccca aatggtaaatt tagtatc

47

<210> 73

<211> 47

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 73

gataactaatt taccatttgg gtcccagagt tcaaaagtaa tagaaag

47

<210> 74

<211> 30

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 74

ccctgaagga gattggataa ctttagggag

30

<210> 75

<211> 30

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 75

ctccctaaag ttatccaatc tccttcaggg

30

<210> 76

<211> 34

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 76

ctaccaggaa ctacctggga tttccatgtt gaac

34

<210> 77

<211> 34

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 77

gttcaacatg gaaatcccag gtagttcctg gtag

34

<210> 78

<211> 30

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 78

ggacaactaa tttggagcca gttagcttcc

30

<210> 79

<211> 30

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 79

ggaagctaac tggctccaaa ttagttgtcc

30

<210> 80

<211> 35
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 80
 ggaacaaaaa aggaatggat tcttgtagga tctgg

35

<210> 81
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 81
 ccagatccta caagaatcca ttcctttttt gttcc

35

<210> 82
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 82
 ccaatacgca aatatggata acccgtctag gaac

34

<210> 83
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 83
 gttcctagac gggttatcca tatttgcgta ttgg

34

<210> 84
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 84

ccaaggggaa gttctctgga ctactattaa atccaaac

38

<210> 85

<211> 38

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 85

gtttggattt aatagtagtc cagagaactt ccccttgg

38

<210> 86

<211> 37

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 86

caaaaaactt cacctttggt ggattgctaa tgatagc

37

<210> 87

<211> 37

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 87

gctatcatta gcaatccacc aaaggtgaag ttttttg

37

<210> 88

<211> 38

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 88

caatatgtcg acttattcct aaatagcccc ataaagtg

38

<210> 89

<211> 38

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 89

gatataggat ccatagcttc aaggtcgaat acaactgc

38

<210> 90

<211> 68

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 90

aataattgca gaaaaaattc tttaaagatca atggaaaaca agtaaattatt ctgattttta

60

ttcacaaat

68

<210> 91

<211> 68

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 91

attgtgaata aaaatcagaa tattttacttg ttttccattg atctttaaga attttttctg

60

caattatt

68

<210> 92

<211> 42

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 92

caatatgtcg acttaattta ccttttggag tatcccatTT tc

42

<210> 93
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 93
 gatataggat ccatggacaa attttcacga actgttct

38

<210> 94
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 94
 caatagtgc aatggacccc ccaaattgtg gtcg

34

<210> 95
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 95
 cgaccaacat ttgggggggc cattgtcact attg

34

<210> 96
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 96
 gataaaggcg catcatggct tgcgcttgca ccaac

35

<210> 97

<211> 35
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 97
 gttggtgcaa gcgcaagcca tgatgcgctt ttatc

35

<210> 98
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 98
 ggaaaactta aaggtaaagtg gacttttgga ctaacctatt t

41

<210> 99
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 99
 aaatagggtta gtccaaaagt ccattttacct ttaagttttc c

41

<210> 100
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 100
 caatatgtcg acctagattt taaaggattt ttttaattca ataataat c

51