



(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)



1-0028493

(51)⁷ A61K 39/02; A61K 11/00

(13) B

(21) 1-2016-01401

(22) 21/11/2013

(86) PCT/CN2013/087599 21/11/2013

(87) WO2015/074213 A1 28/05/2015

(45) 25/06/2021 399

(43) 27/06/2016 339A

(73) AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

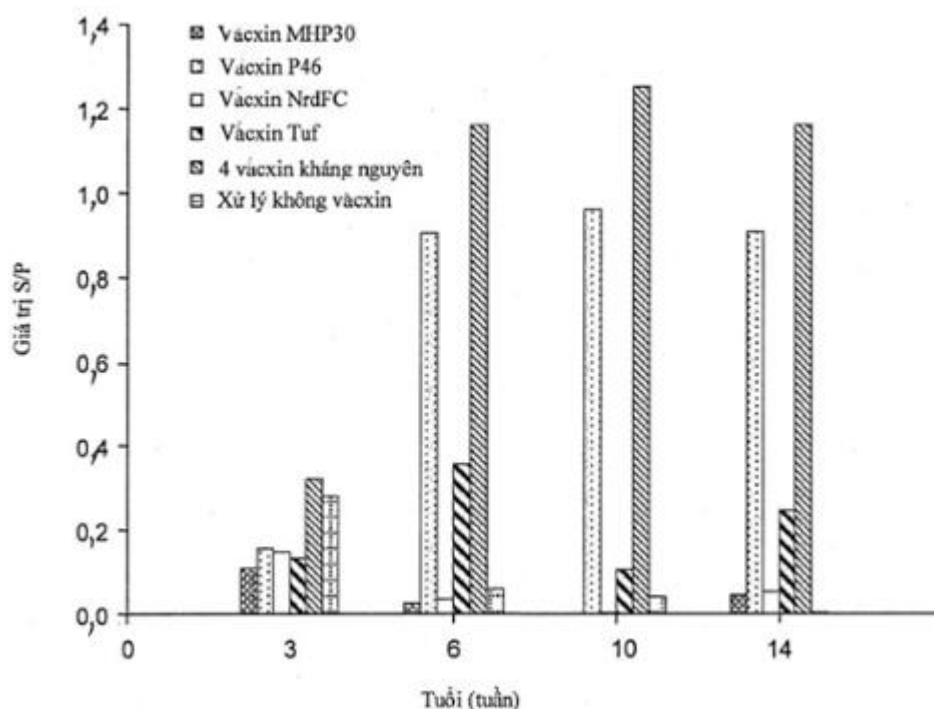
No. 1, Ln. 51 Dahu Road, Xiangshan Dist., Hsinchu City, Taiwan 300

(72) Jiunn-Horng LIN (TW); Jyh-Perng WANG (TW); Zeng-Weng CHEN (TW); Chien-Yu FANG (TW); Ming-Wei HSIEH (TW); Ping-Cheng YANG (TW).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ PHÒNG TRỪ NHIỄM MYCOPLASMA SPP., VECTƠ BIỂU HIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG NGUYÊN HÒA TAN

(57) Sáng chế đề cập đến dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp.. Chế phẩm này bao gồm hoạt chất thứ nhất chứa Tuf và tá dược được dùng. Chế phẩm này được chứng minh thực nghiệm có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch thích hợp để tránh cho lợn khỏi nhiễm *Mycoplasma* spp.. Chế phẩm này không chỉ an toàn hơn so với 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. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vectơ biểu hiện và phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp.. Ngoài ra sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện và phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan.

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 xấu 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 môi trường 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 vắc xin thông thường trong lĩnh vực này sử dụng vi khuẩn bất hoạt/chết làm hoạt chất của nó. Tuy nhiên, giá của vắc xin 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 vắc xin *Mycoplasma* spp., các nhà khoa học tiếp tục cố gắng phát triển các loại vắc xin khác, như: (1) vắc xin được làm yếu, (2) vắc xin vector, (3) vắc xin thể hệ hai, và (4) vắc xin ADN. Trong số chúng, vắc xin 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 vắc xin *M. hyopneumoniae*; tuy nhiên, không có báo cáo nào xác nhận protein thích hợp cho vắc xin *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 vắc xin *Mycoplasma* spp. và nhờ đó sản xuất vắc xin *Mycoplasma* spp. 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 vắc xin *Mycoplasma* spp. và nhờ đó tạo ra vắc xin thể hệ hai với hiệu suất tốt hơn; do đó, có nhiều lựa chọn hơn cho nhiệm vụ phòng chống.

Sáng chế đề xuất protein để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, hoặc sự kết hợp của chúng.

Sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., như đã được bộc lộ trong điểm 1 yêu cầu bảo hộ. Các phương án được ưu tiên khác được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc. Tốt hơn nữa, chất phụ gia được dụng đã nêu 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 hấp thụ, hoặc sự kết hợp của chúng.

Sáng chế còn mô tả chế phẩm để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm: hoạt chất, có ít nhất hai protein được chọn từ nhóm bao gồm P46, Tuf, MHP30, và NrdFC; và tá dược được dụng.

Hoạt chất đã nêu là P46, Tuf, MHP30, và NrdFC.

Hoạt chất đã nêu có ít nhất hai trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, và SEQ ID NO: 04.

Hoạt chất đã nêu có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, và SEQ ID NO: 04.

Hoạt chất đã nêu có nồng độ từ 20 đến 2000 µg/mL căn cứ vào tổng thể tích của chế phẩm này.

Tá được được dụng đã nêu là tá được Freund hoàn chỉnh, tá được Freund không hoàn chỉnh, gel nhôm, chất hoạt động bề mặt, tá được polyanion, peptit, chất nhũ tương dầu, hoặc sự kết hợp của chúng.

Tốt hơn nếu, chế phẩm được phát minh còn bao gồm chất phụ gia được dụng.

Tốt hơn nếu, chất phụ gia được dụng đã nêu 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 hấp thụ, hoặc sự kết hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện được xác định trong điểm 8 yêu cầu bảo hộ. Hơn nữa, sáng chế bộc lộ vector biểu hiện để sản xuất hoạt chất đã nêu trên; trong đó vector biểu hiện đã nêu bao gồm plasmit; trong đó plasmit đã nêu bao gồm: trình tự nucleotit chứa ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07, và SEQ ID NO: 08; gen mã hóa phần dung hợp, được chọn từ nhóm bao gồm MsyB của *E. coli*, YjgD của *E. coli*, GroS17 của *E. coli*, GroES của *Bacillus subtilis*, TrxA của *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO của *S. cerevisiae*, và Vgb của *Vitreoscilla* spp.; và yếu tố điều hòa.

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

Tốt hơn nếu, plasmit đã nêu là pET-MSY, pET-YjgD, pET-GroS17, pET-GroES, pET-TrxA, pET-SUMO, hoặc pET-Vgb cũng được bộc lộ trong phần mô tả.

Liên quan đến vector biểu hiện đã nêu, được đề xuất rằng, khi trình tự nucleotit đã nêu là ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, và SEQ ID NO: 08, gen đã nêu mã hóa phần dung hợp là MsyB của *E. coli*.

Liên quan đến vector biểu hiện đã nêu, được đề xuất rằng, khi trình tự nucleotit đã nêu là SEQ ID NO: 07, gen đã nêu mã hóa phần dung hợp được chọn từ nhóm bao gồm YjgD của *E. coli*, GroS17 của *E. coli*, GroES của *Bacillus subtilis*, TrxA của *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO của *S. cerevisiae*, và Vgb của *Vitreoscilla* spp.

Vector biểu hiện đã nêu được áp dụng để sử dụng cho hệ thống biểu hiện gen *E. coli*.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan được xác định trong điểm 11 yêu cầu bảo hộ. Hơn nữa, sáng chế bộc lộ phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan, bao gồm việc sử dụng vector biểu hiện đã nêu; trong đó kháng nguyên đã nêu là P46, Tuf, MHP30, hoặc NrdFC.

Tóm lại, sáng chế đề cập đến kháng nguyên, chế phẩm, và vector biểu hiện để sản xuất kháng nguyên đã nêu để phòng trừ khỏi nhiễm *Mycoplasma* spp.. Sáng chế không chỉ đề xuất phương án mới cho nhiệm vụ phòng ngừa, mà còn chứng minh rằng vắc xin thể hệ hai “cocktail” kết hợp ít nhất hai kháng nguyên (đó là, có ít nhất hai kháng nguyên làm hoạt chất) có khả năng tăng cường cảm ứng miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế hướng dẫn rằng một số phần dung hợp thích hợp đặc biệt cho việc biểu hiện kháng nguyên nêu trên trong hệ thống biểu hiện sao cho thuận tiện để tăng khả năng sản xuất trong việc sản xuất vắc xin cần thiết.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là kết quả điện di protein, thể hiện nhiều phần dung hợp có tác động khác nhau lên tính tan của MHP 30 được sản xuất. Đường M: thang chuẩn protein (Thang protein PageRuler™; Fermentas, USA); Đường 1: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-YjgD-MHP30), protein hòa tan; đường 2: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-SUMO-MHP30), protein hòa tan; đường 3: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-GroS17-MHP30), protein hòa tan; đường 4: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-GroES-MHP30), protein hòa tan; đường 5: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-MHP30), protein hòa tan; đường 6: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MsyB-MHP30), protein hòa tan; đường 7: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-Vgb-MHP30), protein hòa tan; đường 8: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-TrxA-MHP30), protein hòa tan.

Fig. 2 là kết quả điện di protein, thể hiện nhiều phần dung hợp có tác động khác nhau lên tính tan của P46, NrdFC, và Tuf được sản xuất. Đường M: thang chuẩn protein (Thang protein PageRuler™; Fermentas, USA); đường 1: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-P46M), protein hòa tan; đường 2: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-P46M), protein không hòa tan; đường 3: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-NrdFC), protein hòa tan; đường 4: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-NrdFC), protein không hòa tan; đường 5: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-Tuf), protein hòa tan; đường 6: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-D-Tuf), protein không hòa tan; đường 7: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-P46M), protein hòa

tan; đường 8: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-P46M), protein không hòa tan; đường 9: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-NrdFC), protein hòa tan; đường 10: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-NrdFC), protein không hòa tan; đường 11: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-Tuf), protein hòa tan; đường 12: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-Tuf), protein không hòa tan.

Fig. 3 là kết quả điện di protein, thể hiện sự tinh sạch của protein tái tổ hợp MHP30, P46, NrdFC, và Tuf. đường M: thang chuẩn protein (PageRuler™ pretained protein ladder; Fermentas, USA); đường 1: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-YjgD-MHP30), protein hòa tan; đường 2: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-P46M), protein hòa tan; đường 3: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-NrdFC), protein hòa tan; đường 4: *E. coli* BL21 (DE3) (pET-MysB-Tuf), protein hòa tan; đường 5: protein dung hợp MHP30 được tinh sạch; đường 6: protein dung hợp P46 được tinh sạch; đường 7: protein dung hợp NrdFC được tinh sạch; đường 8: protein dung hợp Tuf được tinh sạch.

Fig. 4 thể hiện kết quả phân tích Western Blot, thể hiện kháng huyết thanh chuột được xác định sự dung giải tế bào tổng số của *M. hyopneumoniae*.

Fig. 5 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA, thể hiện kết quả thử nghiệm thử thách miễn dịch được tiến hành theo phương án 7 của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng nguyên, chế phẩm, và vector biểu hiện để sản xuất kháng nguyên đã nêu phòng trừ khỏi nhiễm *Mycoplasma* spp.. Cụ thể là, sáng chế chứng minh hiệu quả kháng nguyên của P46 và Tuf để sản xuất chế phẩm để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp.. Ngoài ra, sáng chế cũng chứng minh vắc xin “cocktail” thể hệ hai kết hợp ít nhất hai trong số P46, Tuf, MHP30, và NrdFC làm hoạt chất có khả năng tăng cường cảm ứng miễn dịch.

Theo cách khác, sáng chế bộc lộ các phần dung hợp, mà đặc biệt thích hợp để sản xuất P46, Tuf, MHP30, và NrdFC với tính tan cao (tức là, tính tan trong nước). Thông qua việc sử dụng phần dung hợp nêu trên, thời gian và chi phí cần cho sản xuất vắc xin có thể được giảm tương đối.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm: hoạt chất thứ nhất, bao gồm protein P46, Tuf, hoặc

sự kết hợp của chúng; và tá dược được dụng. Theo phương án khác, chế phẩm này còn có thể bao gồm hoạt chất thứ hai. Hoạt chất thứ hai đã nêu bao gồm protein MHP30, NrdFC, hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm: hoạt chất, có ít nhất hai protein được chọn từ nhóm bao gồm P46, Tuf, MHP30, và NrdFC; và tá dược được dụng.

Theo phương án khác của sáng chế, P46 tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện là SEQ ID NO: 01; Tuf tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện là SEQ ID NO: 02; MHP30 tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện là SEQ ID NO: 03; NrdFC tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện là SEQ ID NO: 04. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể hiểu rằng miễn là thể xác định kháng nguyên được tạo ra bằng cách gấp peptit của trình tự axit amin nêu trên không bị can thiệp, hoạt chất đã nêu có thể là protein dung hợp với ít nhất hai trình tự đã nêu.

Thông thường, việc kết hợp hai hoặc nhiều kháng nguyên trong một vắc xin duy nhất luôn không thuận tiện cho cảm ứng miễn dịch của vắc xin. Trên thực tế, việc kết hợp hai kháng nguyên vào một vắc xin duy nhất có thể gây ra tình huống không mong muốn mà cảm ứng miễn dịch của hai hoặc nhiều kháng nguyên xung đột với nhau và do đó bị giảm. Bên cạnh đó, về khía cạnh chi phí, thậm chí nếu không xung đột với nhau, nếu cảm ứng miễn dịch của hai hoặc nhiều kháng nguyên không thể hiện hiệu quả hiệp đồng, sẽ là vô giá trị để kết hợp hai hoặc nhiều kháng nguyên trong một vắc xin duy nhất. Các nghiên cứu của sáng chế chứng minh rằng P46, Tuf, MHP30, và NrdFC thể hiện cảm ứng miễn dịch tốt hơn trong khi được sử dụng kết hợp. Do đó, theo phương án khác, hoạt chất đã nêu của chế phẩm này bao gồm hai hoặc nhiều protein bất kỳ đã nêu; đó là, vắc xin cocktail của sáng chế.

Nồng độ của hoạt chất đã nêu trong chế phẩm này là 20 đến 2000 $\mu\text{g/mL}$ căn cứ vào tổng thể tích của chế phẩm này. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, một hoạt chất trong chế phẩm này có nồng độ 20 đến 500 $\mu\text{g/mL}$ căn cứ vào tổng thể tích của chế phẩm này. Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm chứa ít nhất một protein đã nêu làm hoạt chất; trong đó nồng độ tổng số của hoạt chất là 20 đến 1000 $\mu\text{g/mL}$, 20 đến 1500 $\mu\text{g/mL}$ hoặc 20 đến 2000 $\mu\text{g/mL}$ căn cứ vào tổng thể tích của chế phẩm này.

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

Khía cạnh khác của sáng chế là đề cập đến vector biểu hiện. Đặc biệt là, vector biểu hiện đã nêu được sử dụng cho hệ biểu hiện *E. coli*. Theo cách khác, vector biểu hiện đã nêu có khả năng dịch mã thành peptit có trình tự axit amin của protein mong muốn, và peptit có thể gấp lại tạo ra hoạt chất mong muốn dùng cho chế phẩm. Tuy nhiên, căn cứ vào bản chất của sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể tham khảo phần mô tả của sáng chế và tạo sự cải biến theo đó để phù hợp với hệ biểu hiện khác trong khi vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, tạo sự biến đổi về trình tự để tương ứng với việc sử dụng mã bộ ba khác).

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein để phòng trừ khỏi nhiễm *Mycoplasma* spp. bằng cách sử dụng vector biểu hiện đã nêu. Protein được sản xuất bằng vector biểu hiện thông thường trong lĩnh vực này có nhược điểm là không tan; do đó cần xử lý và giải quyết sản phẩm được tinh sạch bằng ure và guanidin hydroclorua. Tuy nhiên, việc xử lý này không chỉ tăng chi phí sản xuất mà còn gây ra sự biến tính protein làm cho đôi khi việc gấp lại cần để thu hồi lại chức năng kháng nguyên của chúng. Trong khi đó khả năng về quy trình gấp lại có thể hỏng, hiệu quả sinh kháng nguyên của các protein này có thể giảm. Về khía cạnh thiếu sót của việc sản xuất thông thường đã nêu trên, phương pháp hiện tại có sức mạnh trong việc khớp phần dung hợp mà đặc biệt thích hợp để tạo ra tính tan tuyệt vời cho protein nêu trên để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp.. Do đó, có thể tiết kiệm chi phí sản xuất, quy trình sản xuất có thể đơn giản hóa, và tính hiệu lực của protein được sản xuất của các hoạt chất của vắc xin có thể được tăng cường.

Theo phương án khác của sáng chế, vector biểu hiện đã nêu bao gồm plasmid. Plasmid đã nêu bao gồm: trình tự nucleotit, gen mã hóa phần dung hợp và yếu tố điều hòa. Trình tự nucleotit đã nêu bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07, và SEQ ID NO: 08, mà lần lượt tương ứng với P46, Tuf, MHP30, và NrdFC.

Theo phương án khác, miễn là sự điều khiển của hệ thống biểu hiện gen không bị cản trở và việc sản xuất trình tự nucleotit đã nêu và việc gấp trình tự axit amin liên tiếp của nó không bị cản trở, plasmit đã nêu có thể bao gồm hai hoặc nhiều trình tự nucleotit đã nêu.

Gen đã nêu mã hóa phần dung hợp được chọn từ nhóm bao gồm MsyB của *E. coli*, YjgD của *E. coli*, GroS17 của *E. coli*, GroES của *Bacillus subtilis*, TrxA của *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO của *S. cerevisiae*, và Vgb của *Vitreoscilla* spp.

Yếu tố điều hòa đã nêu để chỉ thành phần cần cho sự khởi đầu phiên mã và dịch mã trong hệ biểu hiện. Yếu tố điều hòa đã nêu sẽ ít nhất bao gồm vùng khởi động, và vị trí gắn kết ribosom. Tốt hơn nữa, yếu tố điều hòa đã nêu có thể còn bao gồm: gen điều khiển, trình tự gen tăng cường, hoặc kết hợp chúng.

Các ví dụ sau nêu lại các thử nghiệm và thí nghiệm của sáng chế để giải thích thêm về đặc điểm và ưu điểm của sáng chế. Sẽ lưu ý rằng các ví dụ sau là minh họa và sẽ không được sử dụng để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chủng và nuôi cấy chúng.

Các nghiên cứu hiện tại xác định có bảy loại *Mycoplasma* spp. được phân lập từ lợn: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma suis*, và *Mycoplasma bovis* (Gourlay et al., 1978; Blank et al., 1996; Assuncao et al., 2005). Trong số chúng, *Mycoplasma hyopneumoniae* là yếu tố gây bệnh chính gây ra *Mycoplasma pneumoniae* ở lợn. Tỷ lệ nhiễm là nằm trong khoảng giữa 25% đến 93%. Do đó, nghiên cứu hiện tại sử dụng *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mycoplasma hyopneumoniae*, PRIT-5) làm nguồn gen kháng nguyên. Ngoài ra, nghiên cứu hiện tại đã sử dụng *Escherichia coli* JM109 làm vật chủ để tách dòng gen và *Escherichia coli* BL21 (DE3) làm vật chủ để biểu hiện protein.

M. hyopneumoniae được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường Friis (Friis et al., 1975). Chủng *Escherichia coli* (*E. coli*) được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường LB (Luria-Bertani). Lượng thích hợp kháng sinh và/hoặc 1,5% thạch để sản xuất môi trường rắn được tùy ý bổ sung vào phù hợp với điều kiện thí nghiệm.

Ví dụ 2: Tách dòng gen kháng nguyên *M. hyopneumoniae*

Đoạn môi đặc hiệu được thiết kế cho các gen kháng nguyên khác nhau (Bảng 1). Hệ gen của *M. hyopneumoniae* được sử dụng làm khuôn và sự khuếch đại được tiến hành bằng cách sử dụng các môi nêu trên. Chi tiết về sự khuếch đại gen và tách dòng được mô tả trong các đoạn sau:

Bảng 1: Môi thiết lập để khuếch đại gen mong muốn.

Gen mong muốn	Trình tự môi (5' đến 3')
MHP30	MHP30F (SEQ ID NO 09): GATATAGGATCCGCAAAATTAGACGATAATCTTCAGTATTCA MHP30R (SEQ ID NO 10): CAATATGTCGACTTAATTTTACCTTGTTTTTAATGATTTCGTC
P46	P46F (SEQ ID NO 11): GATATAGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATTCTTG P46R (SEQ ID NO 12): CAATATGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC
NrdFC	NrdCF (SEQ ID NO 13): GATATAGGATCCGATCTATTATATAAACTAATTGAATTAGAAAAAGATTATC NrdCR (SEQ ID NO 14): CAATATGTCGACTTAAAACTCCCAATCTTCATCTTCG
Tuf	TufF (SEQ ID NO 15): GATATAGGATCCATGGCAGTTGTAAAACGACAGGAAAA TufR (SEQ ID NO 16): CAATATGTCGACTTATTTAATAATTTTCGGTAACTGTTCCGGCA

*GGATCC: vị trí cắt *Bam*HI; GTCGAC: vị trí cắt *Sal*I

1. Tách chiết hệ gen *M. hyopneumoniae*.

Tách chiết hệ gen *M. hyopneumoniae* được tiến hành bằng cách sử dụng kit tinh sạch ADN (Tissue & Cell Genomic DNA kit tinh sạch ADN hệ gen ở mô và tế bào ; GeneMark, Đài Loan). Trước tiên, 4,5 mL nước canh thịt được ly tâm (5.870×g, 5 phút) trong ống để loại bỏ huyền phù và thu viên. Sau đó, 20 µL proteinaza K (10 mg/mL) và 200 µL chất phản ứng tách chiết được bổ sung vào để phản ứng ở 56 độ C trong 3 giờ. Hạt và chất phản ứng nêu trên được trộn lên xuống hoặc lắc ống mỗi 5 phút trong suốt giai đoạn đó để đảm bảo rằng chúng được trộn đều.

Sau khi phản ứng với chất phản ứng tách chiết, dung dịch trở nên trong suốt khi hạt được tan rã hoàn toàn. Sau đó bổ sung 200 µL chất phản ứng gắn kết vào để phản ứng ở 70 độ C trong 10 phút. Sau đó, bổ sung 200 µL ethanol tuyệt đối vào ống và trộn. Tất cả thành phần bên trong ống được đưa vào cột ly tâm nhẹ và sau đó cột ly tâm nhẹ được đặt vào ống thu. Sau khi tâm (17.970×g) trong 2 phút, loại bỏ dịch rửa giải và bổ sung 700 µL dung dịch rửa vào cột ly tâm. Sau khi ly tâm thêm (17.970×g) trong 2 phút, loại bỏ dịch rửa giải và quy trình nêu trên được lặp lại. Cuối cùng, ống được đặt

vào ly tâm (17.970×g) trong 5 phút để loại bỏ etanol còn lại. Sau đó, cột ly tâm được đặt vào ống vô trùng và bổ sung lượng thích hợp nước vô trùng vào để rửa giải ADN.

Nồng độ ADN hệ gen *M. hyopneumoniae* được tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng Kit phân tích độ nhạy cao dsADN Quant-iT™ (Invitrogen, Madison, USA) và Máy đo huỳnh quang Qubit (Invitrogen, Madison, USA). Hoạt động là: trộn chất phản ứng Quant-iT và đệm Quant-iT với tỷ lệ 1:200 để thu được dung dịch làm việc. Trộn 190 µL dung dịch làm việc và 10 µL mẫu chuẩn và đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút. Sau đó, đường cong chuẩn được mô tả. Sau đó, trộn 2 µL mẫu và 198 µL dung dịch làm việc, đặt trong 2 phút và dò bằng máy đo huỳnh quang Qubit Fluorometer để xác định nồng độ hệ gen ADN. Công thức tính nồng độ (ng/µL) là: giá trị đo ×100.

2. Khuếch đại gen mong muốn bằng phản ứng chuỗi (polymerase chain reaction - PCR)

ADN hệ gen *M. hyopneumoniae* được sử dụng làm khuôn và mỗi được thiết kế cho gen P46, gen Tuf, gen MHP30, và gen NrdFC được lần lượt sử dụng cho phản ứng PCR. Mỗi mỗi được sử dụng và điều kiện phản ứng PCR được thể hiện trong bảng 2 sau (trình tự của mỗi được liệt kê trong bảng 1 trên). 50 µL hỗn hợp PCR chứa đệm PCR B 1× GDP-HiFi, 200 µM hỗn hợp dATP, dTTP, dGTP, và dCTP, 1 µM mỗi khuếch đại, 200 ng ADN hệ gen *M. hyopneumoniae* và 1 U GDP-HiFi ADN polymeraza. Sau phản ứng PCR, tiến hành điện di trên gel để xác nhận sự tồn tại của mảnh ADN được khuếch đại với kích thước mong muốn.

Bảng 2: Điều kiện PCR và bộ mỗi

Gen mong muốn	Bộ mỗi	Điều kiện
MHP30	MHP30F MHP30R	98 độ C trong 5 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 30 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ).
P46	P46F P46R	98 độ C trong 5 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 45 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ).
NrdFC	NrdCF NrdCR	98 độ C trong 5 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 30 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ).
Tuf	TufF TufR	98 độ C trong 5 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 45 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ).

3. Thu thập sản phẩm PCR và tách dòng nó.

Thu thập sản phẩm PCR được sản xuất bằng cách sử dụng kit hệ làm sạch PCR-M™ (GeneMark, Taiwan; thí nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn sử dụng và không nhắc lại ở đây). Sau đó, dòng được tạo ra bằng cách sử dụng kit tách dòng PCT CloneJET. Các thí nghiệm tách dòng được tiến hành theo hướng dẫn sử dụng, mà được mô tả ngắn gọn như sau. Thứ nhất, sản phẩm PCR thu được được trộn với chất phản ứng và ADN ligaza của kit để tiến hành phản ứng nối ở 22 độ C trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp nối được biến nạp vào chủng *E. coli* ECOSTM 9-5 (Yeastern, Taiwan). Điều kiện biến nạp được chỉ đến trong hướng dẫn. Vi khuẩn đã biến nạp được chuyển vào 1 mL môi trường thu hồi SOC và được nuôi cấy ở 37 độ C lắc ở 250 rpm. Lượng thích hợp nước canh thịt được trải trên khay môi trường LB rắn với ampicilin (100 µg/mL) và khay được nuôi cấy ở 37 độ C trong 16 giờ. Sau đó, PCR tách dòng được tiến hành để sàng lọc chủng, tiếp tục biến nạp chúng. PCR tách dòng được tiến hành như các bước sau. Thứ nhất, ống chứa hỗn hợp PCR 50 µL 2×Taq PCR MasterMix (Genomics, Taiwan), 0,5 µL mỗi xuôi để khuếch đại gen mong muốn, 0,5 µL mỗi ngược để khuếch đại gen mong muốn, và 49 µL nước vô trùng được chuẩn bị. Sau khi trộn, hỗn hợp PCR được phân phối vào các ống PCR riêng (10 µL/ống). Các dòng trên các khay nêu trên được nhặt ngẫu nhiên vào các ống PCR tương ứng cho các phản ứng PCR. Các điều kiện của phản ứng PCR là: 95 độ C trong 5 phút (một chu kỳ); 95 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 72 độ C trong X phút (25 chu kỳ); 72 độ C trong 7 phút (một chu kỳ); trong đó “X” phụ thuộc vào thời gian kéo dài cần cho ADN polymeraza và được thiết lập theo kích thước của mảnh được khuếch đại. Tốc độ kéo dài của Taq ADN polymeraza là 1 kb/phút; Do đó, nếu mảnh được khuếch đại có kích thước khoảng 1 kb, “X” sẽ được thiết lập là 1 phút. Sau phản ứng, tiến hành điện di gel để xác định kết quả PCR. Đối với chủng biến nạp được xác nhận là chèn ADN vào thành công trong plasmit tái tổ hợp, plasmit được chiết ra để giải trình tự ADN. Các plasmit có gen MHP30, gen P46, gen NrdFC, và gen Tuf lần lượt được đặt tên là pJET-MHP30, pJET-P46, pJET-NrdFC, và pJET-Tuf.

Kết quả giải trình tự ADN thể hiện rằng P46 được tách dòng trong sáng chế có trình tự amin và trình tự nucleotit lần lượt là SEQ ID NO 01 và SEQ ID NO 05. Tuf có trình tự amin và trình tự nucleotit lần lượt là SEQ ID NO 02 và SEQ ID NO 06. MHP30 có trình tự amin và trình tự nucleotit lần lượt là SEQ ID NO 03 và SEQ ID

NO 07. NrdFC có trình tự amin và trình tự nucleotit lần lượt là SEQ ID NO 04 và SEQ ID NO 08.

Ví dụ 3: Đột biến điểm và tách dòng gen P46.

P46 có ba mã bộ ba TGA. Mã bộ ba TGA được dịch mã thành tryptophan trong *Mycoplasma* spp. nhưng là mã dừng trong *E. coli*. Để ngăn lỗi trong sử dụng hệ biểu hiện *E. coli* để sản xuất protein tổng số mong muốn, đột biến điểm phải được tạo ra ở ma bộ ba TGA của gen P46 để thay thế chúng thành TGG, mà được dịch mã bằng *E. coli* là tryptophan.

Nguyên tắc thiết kế mỗi đột biến dùng cho đột biến điểm là điểm đột biến sẽ được đặt ở vùng trung tâm của mỗi và Tm của mỗi sẽ cao hơn 78 độ C. Tm của mỗi có thể được tính bằng công thức do Invitrogen đề xuất: $Tm = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N$ - %ghép đôi không tương đồng. “%GC” viết tắt là tỷ lệ phần trăm của G và C của mỗi liên quan; “N” viết tắt là chiều dài của mỗi liên quan; “%ghép đôi không tương đồng” viết tắt là phần trăm của bazơ bị đột biến của mỗi liên quan. Mỗi được sử dụng cho đột biến điểm của gen P46 được liệt kê trong bảng 3 sau đây, bao gồm P46F/P46M2, P46M1/P46M4, P46M3/P46M6 và P46M5/P46R.

Bảng 3: Mỗi được sử dụng cho đột biến điểm của gen P46

Gen mong muốn	Trình tự của mỗi (5' đến 3')
P46F	SEQ ID NO 11: GATATAGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATTCTTG
P46M2	SEQ ID NO 17: CTCTTTGGGCACTAATCCATCGAGGATTATCCGG
P46M1	SEQ ID NO 18: CCGGATAATCCTCGATGGATTAGTGCCCAAAGAG
P46M4	SEQ ID NO 19: ATTAGCTTGCTGAGTGAGCCAGTTATTTGTGCATCC
P46M3	SEQ ID NO 20: GGATGCACAAAATAACTGGCTCACTCAGCAAGCTAAT
P46M6	SEQ ID NO 21: CGGCAGTTCATAATTCCATCCTGGGACATAAAC
P46M5	SEQ ID NO 22: GTTTATGTCCCAGGATGGAATTATGGAAGTCCG
P46R	SEQ ID NO 12: CAATATGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC

50 μ L hỗn hợp PCR chứa đệm PCR B $1\times$ GDP-HiFi, 200 μ M hỗn hợp dATP, dTTP, dGTP, và dCTP, 1 μ M mỗi khuếch đại, 100 ng pJET-P46 và 1 U GDP-HiFi ADN polymeraza. Điều kiện phản ứng PCR là: 98 độ C trong 2 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 45 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ). Sau phản ứng PCR, tiến hành điện di gel để xác nhận sự tồn tại của mảnh ADN được khuếch đại có kích thước mong muốn.

Sản phẩm PCR được thu lại bằng cách sử dụng kit tách chiết gel Gel-M™ và thí nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn sử dụng. Sau đó bốn sản phẩm PCR thu được được sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen bằng cặp mồi P46F/P46R. Điều kiện phản ứng PCR là: 98 độ C trong 2 phút (một chu kỳ); 94 độ C trong 30 giây, 55 độ C trong 30 giây, 68 độ C trong 45 giây (35 chu kỳ); 68 độ C trong 5 phút (một chu kỳ). Sau đó, toàn bộ chiều dài của gen P46 được tạo đột biến điểm có thể thu được. Sản phẩm PCR được thu lại bằng cách sử dụng kit làm sạch PCR-M™ (GeneMark, Taiwan) và việc tách dòng gen đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng kit tách dòng PCR CloneJET. Đối với chủng biến nạp được xác nhận, bằng PCR tách dòng, chèn thành công ADN vào plasmit tái tổ hợp của chúng, plasmit được tách chiết để giải trình tự ADN. Plasmit có gen đột biến P46 được đặt tên là pJET-P46M.

Ví dụ 4: Thiết lập vector biểu hiện kháng nguyên *M. hyopneumoniae*.

Plasmit có các phân dung hợp được sử dụng làm khung để thiết lập vector biểu hiện kháng nguyên *M. hyopneumoniae*. Gen dung hợp được sử dụng là MsyB của *E. coli*, YjgD của *E. coli*, peptit từng phần của GroS chứa 17 axit amin (GroS17) của *E. coli*, GroES của *Bacillus subtilis*, TrxA của *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO của *S. cerevisiae*, protein D của thực khuẩn thể vi khuẩn phiX174, và Vgb của *Vitreoscilla* spp. Việc thiết lập được thực hiện như sau:

1. Thiết lập vector biểu hiện MHP30.

Cắt pJET-MHP30 bằng *Bam*HI và *Sal*I và gắn mảnh ADN thu được vào plasmit biểu hiện dung hợp được cắt trước bằng các enzym giới hạn giống nhau. Sản phẩm gắn được biến nạp vào *E. coli* ECOS 9-5. Chủng biến nạp được sàng lọc bằng tách dòng PCR và xác định nếu có mảnh ADN với kích thước mong muốn bằng cách sử dụng điện di ADN. Đối với các chủng biến nạp này được xác nhận chèn thành công ADN trong plasmit tái tổ hợp của chúng, plasmit được tách chiết để giải trình tự ADN.

Plasmid có trình tự ADN đúng được đặt tên tương ứng là pET-MSY-MHP30, pET-YjgD-MHP30, pET-GroS17-MHP30, pET-GroES-MHP30, pET-TrxA-MHP30, pET-SUMO-MHP30, pET-D-MHP30, và pET-Vgb-MHP30.

2. Thiết lập vector biểu hiện P46.

Cắt pJET-P46M bằng *Bam*HI và *Sal*I và thí nghiệm sau đó được tiến hành bằng cách tham khảo các bước thiết lập vector biểu hiện MHP30. Plasmid có trình tự ADN đúng được đặt tên tương ứng là pET-D-P46M, và pET-MSY-P46M.

3. Thiết lập vector biểu hiện NrdFC.

Cắt pJET-NrdFC bằng *Bam*HI và *Sal*I và thí nghiệm sau đó được tiến hành bằng cách tham khảo các bước thiết lập vector biểu hiện MHP30. Plasmid có trình tự ADN đúng được đặt tên tương ứng là pET-D-NrdFC, và pET-MSY-NrdFC.

4. Thiết lập vector biểu hiện Tuf.

Cắt pJET-Tuf bằng *Bam*HI và *Sal*I và thí nghiệm sau đó được tiến hành bằng cách tham khảo các bước thiết lập vector biểu hiện MHP30. Plasmid có trình tự ADN đúng được đặt tên tương ứng là pET-D-Tuf, và pET-MSY-Tuf.

Ví dụ 5: Biểu hiện kháng nguyên *M. hyopneumoniae* tái tổ hợp và tinh sạch nó.

Biểu hiện kháng nguyên mong muốn

Vector biểu hiện kháng nguyên được biến nạp vào *E.coli* BL21 (DE3). Một dòng duy nhất được nhặt ra và cấy truyền vào môi trường LB chứa kanamycin với nồng độ cuối cùng là 30 µg/mL và nuôi cấy dưới điều kiện 37 độ C và 180 rpm qua đêm. Sau đó nước canh thịt được cấy truyền vào môi trường LB tươi (chứa kanamycin với nồng độ cuối cùng là 30 µg/mL) với tỷ lệ 1:100 và điều kiện nuôi cấy là 37 độ C và 180 rpm đến giá trị OD₆₀₀ của chúng đạt khoảng 0,6 ~ 0,8. Bổ sung 0,1 mM IPTG vào để cảm ứng sự biểu hiện protein mong muốn trong 4 giờ. Sau đó, đặt nước canh thịt vào để ly tâm (10,000×g, 10 phút, 4 độ C) và thu hạt. Sau đó, phần hòa tan và không hòa tan của nó được tách ra bằng cách sử dụng kit chiết protein vi khuẩn Easy-Lyse (Epicentre, USA). Sau đó, tiến hành điện di protein để quan sát kháng nguyên tái tổ hợp được sản xuất.

Fig. 1 và 2 lần lượt thể hiện tính tan khác nhau của MHP30 khi sử dụng các phần dung hợp khác nhau khi biểu hiện; và tính tan khác nhau của P46, NrdFC, và Tuf khi sử dụng các phần dung hợp khác nhau trong biểu hiện. Kết quả chỉ ra rằng việc sử dụng YjgD, SUMO, GroS17, GroES, Vgb, hoặc TrxA làm phần dung hợp có thể tăng tính tan của MHP30. Theo cách khác, việc sử dụng MsyB làm phần dung hợp có thể làm cho tính tan của P46, NrdFC, và Tuf tuyệt vời.

Tinh sạch kháng nguyên mong muốn

Dựa vào thực tế là đuôi N' Hig của protein tái tổ hợp có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị kết hợp với ion niken hoặc ion coban, sắc ký ái lực cố định bằng kim loại (immobilized-metal affinity chromatography - IMAC) được sử dụng để tinh sạch protein. Quy trình tinh sạch protein được tham khảo tới QIA expressist™ (xuất bản lần bốn, Qiagen). Các viên cặn được tạo huyền phù trong đệm dung giải (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, độ pH 8,0) và phá vỡ bằng máy khuấy. Sau đó, tiến hành ly tâm và thu dịch huyền phù. Đưa dịch huyền phù thu được vào cột nhựa (1mL Ni-NTA) tại đó kháng nguyên tái tổ hợp sẽ được gắn lên. Sau đó, bổ sung 15 mL đệm rửa (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, độ pH 8,0) vào để rửa bên trong cột để loại bỏ liên kết không đặc hiệu của protein. Cuối cùng, đưa vào 20 mL đệm rửa giải (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, độ pH 8,0) để rửa giải kháng nguyên trên nhựa. Đệm rửa giải chứa imidazol nồng độ cao để cạnh tranh vị trí liên kết trên nhựa với protein tái tổ hợp sao cho protein tái tổ hợp có thể được rửa khỏi nhựa. Kết quả tinh sạch được quan sát bằng điện di protein. Theo Fig. 3, thể hiện rõ ràng rằng đuôi His được gắn trên đầu N' của kháng nguyên tái tổ hợp thuận lợi cho việc tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp bằng IMAC.

Ví dụ 6: Thử nghiệm kháng huyết thanh chuột.

Ví dụ này sử dụng chuột cái BALB/c năm tuần (National Laboratory Animal Center). Chuột được duy trì trong phòng động vật tiêu chuẩn với máy điều hòa không khí và cung cấp thức ăn và nước sạch. Thử thách miễn dịch được tiến hành sau khi chuột được nuôi 7 ngày. Kháng nguyên tái tổ hợp đã tinh sạch trong ví dụ trên được trộn với tá dược dưới dạng hỗn hợp (tá dược Freund hoàn chỉnh hoặc tá dược Freund không hoàn chỉnh) thông qua bộ ba chạc và tiêm dưới da vào chuột. Phép tiêm đầu tiên là chế phẩm tá dược Freund hoàn chỉnh. Sau 7 ngày từ lần tiêm đầu tiên, chuột

được tiêm chế phẩm tá được Freund không hoàn chỉnh hai lần trong 7 ngày cách đều nhau. Sau 7 ngày từ lần tiêm thứ hai, thu máu từ ổ mắt của chuột.

Đặt mẫu máu thu được ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và đặt ở 4 độ C qua đêm để máu đông lại. Sau đó, ly tâm mẫu (5.000×g) trong 30 phút để thu được kháng huyết thanh, mà chứa kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên tái tổ hợp.

Sau đó sử dụng kháng huyết thanh thu được để chống lại sự dung giải tế bào tổng số của *M. hyopneumoniae*. Quy trình thí nghiệm là: tạo huyền phù *M. hyopneumoniae* PRIT-5 trong đệm SET (50 mM glucoza, 25 mM-HCl, 10 mM EDTA, độ pH 8,0) và bổ sung đệm mẫu 5× (312,5 mM Tris-HCl (độ pH 6,8), 50% glyxerol, 10% SDS, 0,05% bromphenol xanh); nung nóng mẫu ở 100 độ C trong 5 phút sau khi mẫu được trộn đều với đệm trên. Sau đó, tiến hành điện di protein. Sau đó gel điện di protein, được ngâm trong đệm chuyển (25 mM Tris baza, 192 mM glyxin, 10% (v/v) metanol, pH 8,3). Rửa màng PVDF có kích thước thích hợp bằng metanol trong vài giây, rửa bằng nước khử ion, và sau đó ngâm vào đệm chuyển. Sau đó, cả gel và màng PVDF được ngâm trong đệm chuyển trong 15 phút, giấy lọc, gel, màng PVDF và giấy lọc khác được lần lượt đặt trong khay chuyển bán khô Trans-Blot SD để chuyển dưới nguồn điện thích hợp. Sau khi thực hiện chuyển, màng PVDF được ngâm trong 20 mL đệm phong tỏa (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5% sữa tách bơ, độ pH7,4) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và 10 µL kháng nguyên tái tổ hợp được bổ sung vào (pha loãng 2000 lần). Sau khi lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, loại bỏ đệm phong tỏa, và màng được rửa bằng 20 mL đệm TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, độ pH7,4) ba lần (5 phút mỗi lần). Sau đó, bổ sung 20 mL đệm phong tỏa và 4 µL IgG (H+L) để kháng chuột liên hợp phosphatasa kiềm vào và lắc hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, màng PVDF được rửa bằng đệm TBST ba lần và bổ sung chất phản ứng NBT/BCIP vào để phát hiện.

Kết quả thể hiện rằng hỗn hợp kháng nguyên tái tổ hợp và tá được thích hợp tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên ở chuột. Điều này để nói rằng, protein hiện tại có khả năng là chất kháng nguyên (Fig. 4).

Ví dụ 7: Kiểm tra miễn dịch ở lợn và các thử nghiệm thử thách.

1. Sản xuất vắc xin.

Một hoặc nhiều kháng nguyên tái tổ hợp được tinh sạch của các ví dụ trên được trộn với tá dược để thu được vắc xin thể hệ hai mong muốn hoặc vắc xin hỗn hợp. Liều của từng vắc xin được sản xuất là 2 mL, mà chứa 200 µg mỗi loại protein được bổ sung.

2. Kiểm tra miễn dịch ở lợn.

Vắc xin thể hệ hai hoặc vắc xin hỗn hợp nêu trên được sử dụng để kiểm tra miễn dịch lợn. Lợn SPF hai tuần được mua từ trại lợn SPF thể hệ hai của Viện công nghệ động vật Đài Loan (Animal Technology Institute Taiwan). Tất cả lợn được duy trì và cho ăn như trong trại lợn SPF.

Vắc xin (2 mL) được tiêm bắp cho lợn khi chúng đạt 21 ngày tuổi và máu của chúng được thu vào ngày tuổi thứ 21, 42, 70, và 98 để phân tách huyết thanh. Kit thử nghiệm kháng thể *Mycoplasma* spp. (IDEXX) được sử dụng để phân tích kháng thể huyết thanh thu được. Hoạt động như sau. Trước tiên, 10 µL huyết thanh được trộn với 390 µL mẫu chất pha loãng nhẹ nhàng để thu được hỗn hợp. Bổ sung 100 µL hỗn hợp vào các giếng của khay 96 giếng, mà có sẵn kháng nguyên *Mycoplasma* spp. bên trong. Bên cạnh đó, còn bổ sung 100 µL huyết thanh dương tính và huyết thanh âm tính vào các giếng khác nhau của khay làm đối chứng. Khay được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau đó, loại bỏ chất lỏng trong khay và bổ sung 350 µL đệm rửa vào ba lần để rửa. Sau đó, bổ sung 350 µL peroxidaza của cải ngựa được gắn kháng thể kháng lợn vào khay và đặt khay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau đó, chất lỏng trong khay được loại bỏ, và 350 µL đệm rửa được bổ sung ba lần để rửa. Bổ sung 100 µL dung dịch chất nền TMB vào khay và đặt khay ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau đó, bổ sung 100 µL đệm dừng để kết thúc phản ứng tạo màu. Cuối cùng, đánh giá sự hấp thụ của mỗi khay ở bước sóng 650 nm bằng máy đọc ELISA để tính giá trị S/P. Giá trị S/P = (sự hấp thụ ở OD₆₅₀ của nhóm thử nghiệm – sự hấp thụ OD₆₅₀ của nhóm đối chứng âm) / (sự hấp thụ OD₆₅₀ của nhóm đối chứng dương – sự hấp thụ OD₆₅₀ của nhóm đối chứng âm). Giá trị S/P cao hơn thì nhiều kháng thể chống lại protein *M. hyopneumoniae*. Kết quả thử nghiệm thể hiện rằng kháng nguyên có khả năng gây ra phản ứng miễn dịch; trong đó vắc xin P46 và vắc xin hỗn hợp (chứa bốn kháng nguyên trong một vắc xin: P46, Tuf, MHP30, và NrdFC) thể hiện hiệu quả cảm ứng tốt nhất và đáp ứng miễn dịch gây ra có thể được duy trì đến 14-tuần tuổi (Fig. 5).

3. Thử nghiệm thử thách ở lợn.

Vắc xin Bayovac® MH-PRIT-5 được sản xuất bằng cách sử dụng *M. hyopneumoniae* PRIT-5 được sử dụng trong thí nghiệm làm đối chứng để đánh giá hiệu quả miễn dịch của vắc xin thể hệ hai hiện tại và vắc xin hỗn hợp. Lợn SPF bốn tuần tuổi được mua từ trại lợn SPF thể hệ hai của Viện công nghệ động vật Đài Loan (Animal Technology Institute Taiwan). Tất cả lợn được duy trì và cho ăn bằng nhau trong trại lợn SPF.

Nước canh thịt *M. hyopneumoniae* được sử dụng cho thử nghiệm thử thách được sản xuất bằng cách: mô phổi lợn (khoảng 3×3 cm²) được nhiễm *M. hyopneumoniae* thu được và được nghiền trong 20 mL môi trường Friis. Sau khi ly tâm (148.8×g) trong 10 phút, dịch huyền phù được chuyển đến ống sạch để ly tâm (7,870×g) trong 40 phút. Sau đó, loại bỏ huyền phù và tái tạo huyền phù kết tủa bằng 6 mL môi trường Friis để thu được dịch huyền phù. Sau đó, dịch huyền phù được lọc theo thứ tự bằng màng lọc 5 µm và 0,45 µm thu được nước canh thịt vi khuẩn thử thách cho thí nghiệm này.

Vắc xin (2 mL) được tiêm bắp vào lợn khi đạt 35-ngày tuổi. Phép tiêm khác được tạo ra ở 49-ngày tuổi theo cách giống nhau. Ở ngày tuổi 63, lợn đã gây miễn dịch được gây mê và thử thách bằng cách áp dụng nước canh vi khuẩn thử thách (5 mL) thông qua khí quản. Sau 28 ngày từ ngày được thử thách, lợn được rạch và thu phổi của nó để đánh giá hiệu quả miễn dịch. Việc đánh giá hiệu quả miễn dịch được tạo ra theo tiêu chuẩn sau: bất kỳ một thùy trên giữa và thùy trên của bên bất kỳ của phổi quan sát được đặc điểm bệnh học được đánh giá điểm là 10 điểm; bất kỳ thùy trên giữa và thùy cơ hoành của bên bất kỳ của phổi quan sát được đặc điểm của bệnh được đánh giá điểm là 5 điểm. Điểm đầy đủ là 55 điểm. Ghi nhận quan sát được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: Đánh giá thương tổn phổi trong thử nghiệm thử thách

Kháng nguyên	Điểm thương tổn phổi
MHP30	27
P46	25
NrdFC	26

Tuf	23
MHP30+NrdFC+P46+Tuf	17
vắc xin PRIT-5 (đối chứng dương)	23
Không có vắc xin được sử dụng (đối chứng âm)	30

Theo dữ liệu thể hiện trong 4, rõ ràng rằng vắc xin thể hệ hai của sáng chế có khả năng tạo ra hiệu quả miễn dịch tương đồng với vắc xin thông thường (Bayovac® MH-PRIT-5). Ngoài ra, vắc xin hỗn hợp (chứa bốn kháng nguyên trong một vắc xin: P46, Tuf, MHP30, và NrdFC) thể hiện hiệu quả miễn dịch tốt hơn đáng kể so với vắc xin thông thường. Tóm lại, protein của sáng chế thực sự phù hợp để áp dụng làm hoạt chất của vắc xin và các protein này thể hiện hiệu quả hiệp đồng trong khi được sử dụng kết hợp trong vắc xin hỗn hợp.

Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể đã hiểu là có sự biến đổi bất kỳ có thể căn cứ vào mô tả sáng chế này mà không lệch khỏi phạm vi của sáng chế. Do đó, các ví dụ trên sẽ không được sử dụng để giới hạn sáng chế mà mong muốn bao gồm cả các biến đổi thuộc phạm vi của sáng chế theo các yêu cầu bảo hộ được viện dẫn sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., bao gồm:
hoạt chất thứ nhất, chứa Tuf có trình tự là SEQ ID No: 02; và
tá dược được dụng.
2. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp. theo điểm 1, còn bao gồm hoạt chất thứ hai, bao gồm protein P46, MHP30, NrdFC, hoặc sự kết hợp của chúng;
trong đó P46 đã nêu có trình tự là SEQ ID NO: 01; MHP30 đã nêu có trình tự là SEQ ID NO: 03; NrdFC đã nêu có trình tự là SEQ ID NO: 04.
3. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp. theo điểm 2, trong đó hoạt chất thứ nhất đã nêu và/hoặc hoạt chất thứ hai đã nêu độc lập về nồng độ là từ 20 đến 2000 µg/mL căn cứ vào tổng thể tích của chế phẩm đã nêu.
4. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp. theo điểm 1, trong đó tá dược được dụng đã nêu 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 tương dầu, hoặc sự kết hợp của chúng.
5. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp. theo điểm 1, còn bao gồm chất phụ gia được dụng.
6. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp. theo điểm 5, trong đó chất phụ gia được dụng đã nêu 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 hấp thụ, hoặc sự kết hợp của chúng.
7. Chế phẩm dùng để phòng trừ nhiễm *Mycoplasma* spp., theo điểm 2, trong đó chế phẩm đã nêu là P46, Tuf, MHP30, và NrdFC.
8. Vector biểu hiện bao gồm plasmit; trong đó plasmit đã nêu bao gồm:
trình tự nucleotit chứa SEQ ID NO: 06;
gen mã hóa phần dung hợp, trong đó phần dung hợp đã nêu là MsyB của *E. coli*;
và
yếu tố điều hòa.
9. Vector biểu hiện theo điểm 8, trong đó yếu tố điều hòa đã nêu bao gồm vùng khởi động và vị trí gắn kết ribosom.

10. Vector biểu hiện theo điểm 8, trong đó plasmit đã nêu là pET-MSY-Tuf.
11. Vector biểu hiện theo điểm 8, là hệ thống biểu hiện gen *E. coli*.
12. Phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan, bao gồm việc sử dụng vector biểu hiện đã nêu theo điểm 18; trong đó kháng nguyên đã nêu là Tuf.

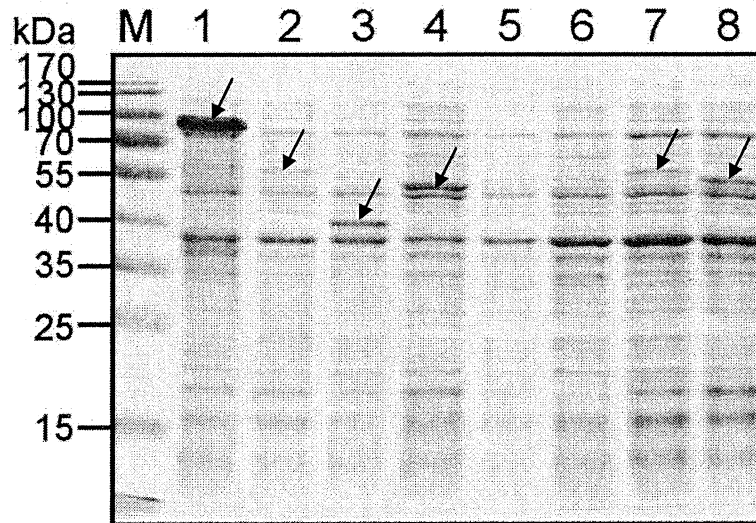


Fig. 1

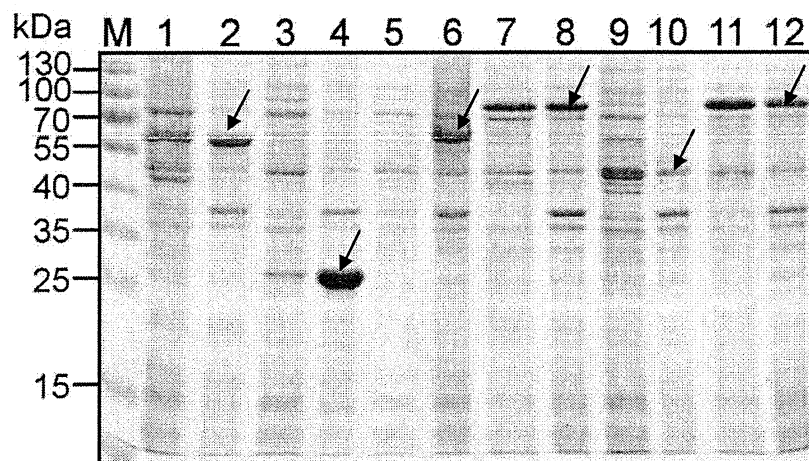


Fig. 2

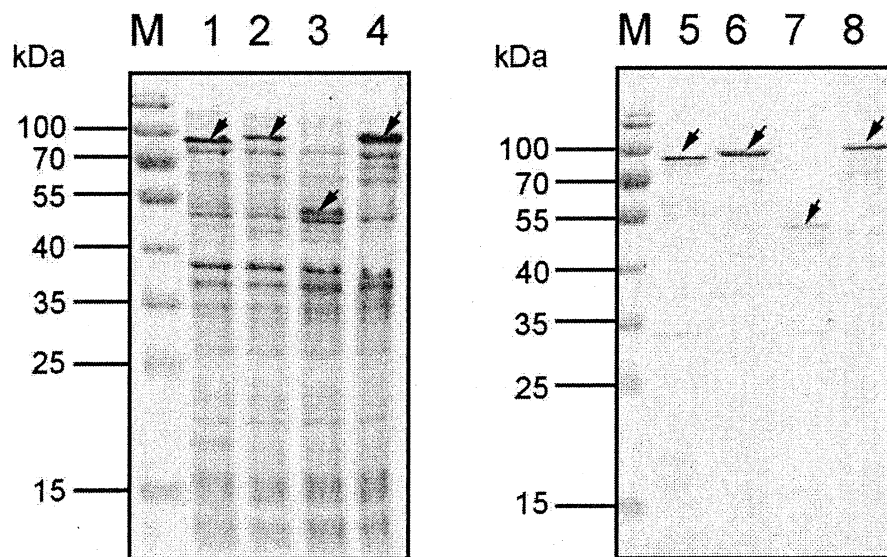


Fig. 3

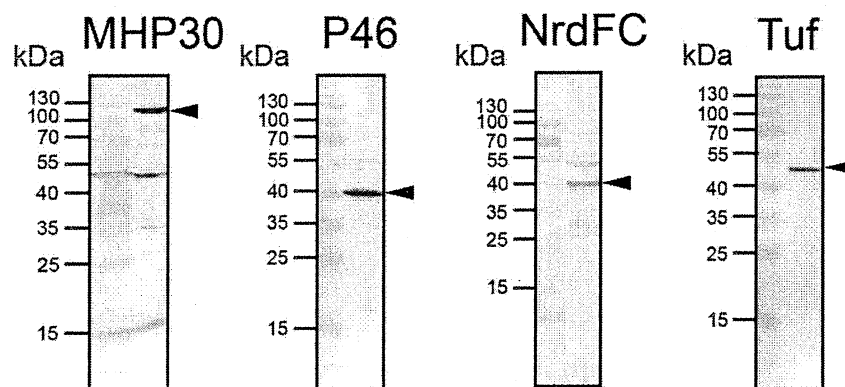


Fig. 4

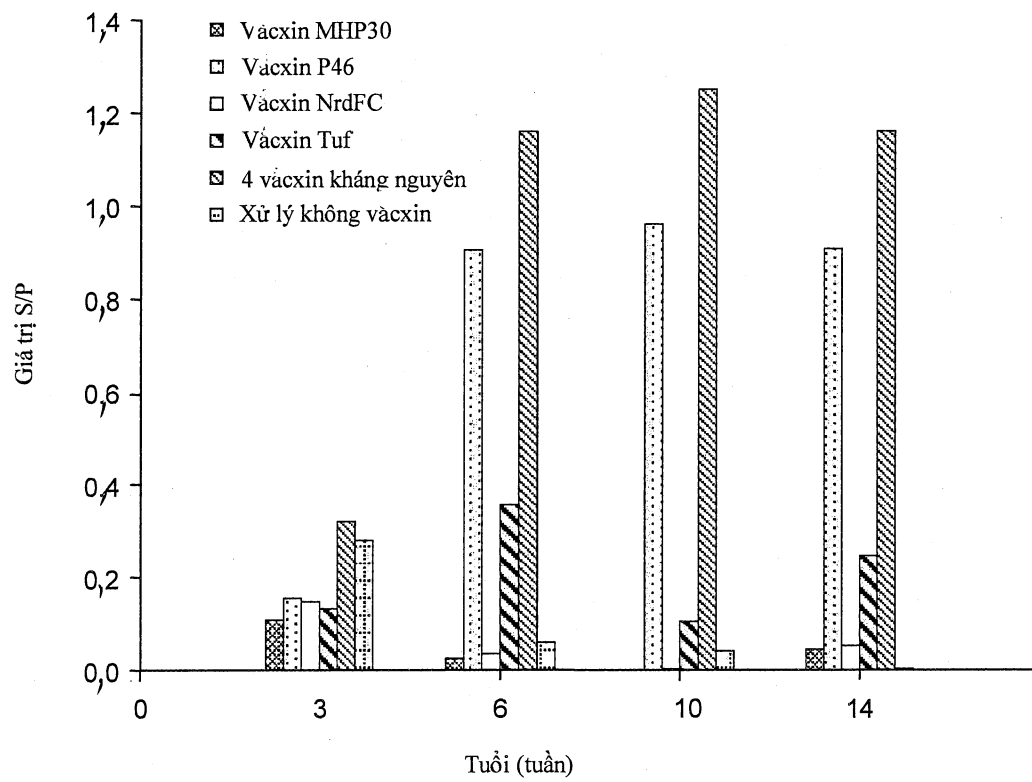


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Agricultural technology research institute

<120> Chế phẩm để phòng trừ nhiễm Mycoplasma spp., vectơ biểu hiện và phương pháp sản xuất kháng nguyên hòa tan

<130> GPI13TW3599

<160> 22

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 1

Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr
1 5 10 15

Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly
20 25 30

Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr
35 40 45

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

Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Arg Asp Ile Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp
85 90 95

Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro
100 105 110

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala
115 120 125

Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg
130 135 140

Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn
145 150 155 160

Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu
165 170 175

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr
180 185 190

Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
195 200 205

Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met

210 215 220
 Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ile Asp
 225 230 235 240
 Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
 245 250 255
 Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
 260 265 270
 Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
 275 280 285
 Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
 290 295 300
 Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
 305 310 315 320
 Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
 325 330 335
 Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
 340 345 350
 Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
 355 360 365
 Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
 370 375 380
 Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Asp Lys Asn Ile Asn
 385 390 395 400
 Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
 405 410 415

Pro Asp Ala

<210> 2
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 2

Met Ala Val Val Lys Thr Thr Gly Lys Lys Asp Phe Asp Arg Ser Lys
 1 5 10 15
 Glu His Ile Asn Ile Gly Thr Ile Gly His Val Asp His Gly Lys Thr
 20 25 30
 Thr Leu Thr Ala Ala Ile Ser Thr Val Leu Ala Lys Arg Gly Leu Ala
 35 40 45
 Glu Ala Lys Asp Tyr Ala Ser Ile Asp Ala Ala Pro Glu Glu Lys Ala
 50 55 60
 Arg Gly Ile Thr Ile Asn Thr Ala His Ile Glu Tyr Ser Thr Asp Lys

65						70						75						80
Arg	His	Tyr	Ala	His	Val	Asp	Cys	Pro	Gly	His	Ala	Asp	Tyr	Ile	Lys			
				85					90					95				
Asn	Met	Ile	Thr	Gly	Ala	Ala	Gln	Met	Asp	Gly	Ala	Ile	Leu	Val	Val			
			100					105					110					
Ala	Ala	Thr	Asp	Gly	Pro	Met	Pro	Gln	Thr	Arg	Glu	His	Ile	Leu	Leu			
		115					120					125						
Ser	Lys	Gln	Val	Gly	Val	Pro	Lys	Met	Val	Val	Phe	Leu	Asn	Lys	Ile			
	130					135					140							
Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	Met	Val	Asp	Leu	Val	Glu	Val	Glu			
145					150					155					160			
Ile	Arg	Glu	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Asn	Thr	Pro			
				165					170					175				
Ile	Ile	Arg	Gly	Ser	Ala	Arg	Gly	Ala	Leu	Glu	Gly	Lys	Pro	Glu	Trp			
			180					185					190					
Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Glu	Leu	Met	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asp			
		195					200					205						
Ser	Pro	Val	Arg	Glu	Met	Asp	Lys	Pro	Phe	Leu	Met	Ala	Val	Glu	Asp			
	210					215					220							
Val	Phe	Thr	Ile	Thr	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Ala	Thr	Gly	Lys	Val	Glu			
225					230					235					240			
Arg	Gly	Gln	Val	Lys	Leu	Asn	Glu	Glu	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Tyr	Arg			
				245					250					255				
Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Thr	Val	Ile	Thr	Gly	Ile	Glu	Met	Phe	Asn	Lys			
			260					265					270					
Asn	Leu	Gln	Thr	Ala	Met	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Arg			
		275					280					285						
Gly	Val	Asp	Arg	Lys	Asp	Ile	Glu	Arg	Gly	Gln	Val	Ile	Ala	Lys	Pro			
	290					295					300							
Lys	Thr	Ile	Ile	Pro	His	Thr	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ala	Leu			
305					310					315					320			
Lys	Lys	Glu	Glu	Gly	Gly	Arg	His	Thr	Pro	Phe	Phe	Lys	Asn	Tyr	Lys			
				325					330					335				
Pro	Gln	Phe	Tyr	Phe	Arg	Thr	Thr	Asp	Val	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Phe			
			340					345					350					
Glu	Pro	Gly	Arg	Glu	Met	Val	Ile	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Asp	Leu	Thr			
		355					360					365						
Val	Glu	Leu	Ile	Ala	Pro	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	Thr	Lys	Phe	Ser			
	370					375					380							
Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Glu	Ile			
385					390					395					400			

Ile Lys

<210> 3
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 3

Ala	Lys	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Gln	Tyr	Ser	Phe	Glu	Ala	Ile	Lys	Lys	1	5	10	15
Gly	Glu	Thr	Thr	Lys	Glu	Gly	Lys	Arg	Glu	Glu	Val	Asp	Lys	Lys	Val	20	25	30	
Lys	Glu	Leu	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Gly	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	35	40	45	
Ala	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	50	55	60	
Lys	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	65	70	75	80
Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	85	90	95	
Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	100	105	110	
Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Thr	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Lys	115	120	125	
Pro	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Met	Ala	Phe	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Tyr	130	135	140	
Thr	Asp	Glu	Asn	Lys	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Val	Phe	145	150	155	160
Leu	Glu	Leu	Val	His	Gln	Ser	Glu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Lys	Ile	Ile	Lys	165	170	175	
Glu	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Gln	Tyr	Gln	Phe	Gln	Glu	Val	180	185	190	
Lys	Val	Ala	Ser	Asp	Gln	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	His	Pro	Met	Met	Thr	195	200	205	
Glu	Gly	Ser	Ser	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	Gln	210	215	220	
Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	225	230	235	240
Ala	Pro	Ser	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Asn	Gln	Gln	Ser	245	250	255	
Pro	Thr	Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Tyr	Leu	Pro	Asp	Leu	Gly	Lys	Lys	Ile	260	265	270	

Asp Glu Ile Ile Lys Lys Gln Gly Lys Asn
 275 280

<210> 4
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 4

Asp Leu Leu Tyr Lys Leu Ile Glu Leu Glu Lys Asp Tyr Leu Tyr Asp
 1 5 10 15

Leu Tyr Ser Glu Val Gly Leu Ala Glu Ser Ala Ile Lys Phe Ser Ile
 20 25 30

Tyr Asn Ala Gly Lys Phe Leu Gln Asn Leu Gly Tyr Asp Ser Pro Phe
 35 40 45

Ser Lys Glu Glu Thr Glu Ile Glu Pro Glu Ile Phe Ser Gln Leu Ser
 50 55 60

Ala Arg Ala Asp Glu Asn His Asp Phe Phe Ser Gly Asn Gly Ser Ser
 65 70 75 80

Tyr Val Met Ala Leu Ala Glu Glu Thr Glu Asp Glu Asp Trp Glu Phe
 85 90 95

<210> 5
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 5

```

atgaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt      60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttca      120
gattctaaac cacaagccga gactctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata      180
gcactaaccg atccggataa tcctcgatga attagtcccc aaagagatat tatttcttat      240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaaa accaggatgc acaaaataac      300
tgactcactc agcaagctaa ttttaagtcca gcgcctaaaag gatttattat tgcccctgaa      360
aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattggt      420
gcctatgatc gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat      480
gaaaaagttg gtgaattaca aggtctttca cttgctgctg gtctattagg aaaggaagat      540
ggtgcttttg attcaattga tcaaataaat gaatatctaa aatcacatat gcccgaagag      600
acaatttctt tttatacaat cgcggttcc caagatgata ataactccca atatttttat      660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgcaaaataa aataattgat      720
ttatctcctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt      780

```

caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtaa taaaatcaaa	840
gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg	900
gccgaacaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta	960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatatg	1020
acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta	1080
attgcaaaga aaaataaagc atctagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaagcta	1140
ccaaatattt catttaaata tgataatcaa acatataaag tacaagataa aaatattaat	1200
acaatttttag taagtccagt aattgttaca aaagctaatz ttgataatcc tgatgcctaa	1260
<210> 6	
<211> 1209	
<212> ADN	
<213> Mycoplasma hyopneumoniae	
<400> 6	
atggcagttg ttaaaacgac aggaaaaaaa gactttgatc gttccaaaga acatattaat	60
attggaacaa ttggtcatgt tgaccatgga aaaacaacac taacagcagc aatttcaact	120
gttttggtgcaa aaagaggact cgcgagggca aaggattatg cctcaattga tgcagctcct	180
gaagaaaaag cacgaggaat tacaattaat accgcccata ttgaatatag cactgacaaa	240
cggcactatg cccatgttga ttgccaggt catgccgatt atataaaaaa tatgatcacc	300
ggagcggccc aaatggatgg agcaatttta gtggttgag caaccgatgg cccaatgcct	360
caaactcgtg aacacatttt attatcaaaa caagttggtg tccccaaaat ggttgttttc	420
cttaataaaa ttgacttact tgaaggcgaa gaagaaatgg ttgatttagt tgaggtcgaa	480
attcggaac ttctttcttc ttatgatttt gatggcgata atactccaat tattcgggga	540
tctgctcgtg gggcccttga aggaaaacct gaatgggagg caaaagtact tgaattgatg	600
gacgcagttg attcttatat tgactcacct gttcgggaaa tggataaacc ctttttgatg	660
gccgttgagg atgtttttac aattacagga cgtggaaccg tagcaacggg aaaagttgaa	720
agaggtcaag ttaactaaa cgaagaagt gaaattgtgg gttatcgca agaacctaaa	780
aagaccgtaa tcaccggaat tgaaatgttt aataaaaatc ttcaaactgc gatggctggg	840
gataatgccg gtgttctcct acgtggagta gatcgaaaag atatcgaacg tggtcaggtt	900
attgcaaac caaaaacaat tataccgcat acaaaattta aagctgcaat ttatgccctt	960
aaaaaagaag aaggcggaag gcatacacca tttttcaaaa attataaacc acaattttat	1020
tttcgaacta ccgatgtaac aggcggaatc gagtttgaac caggtcgca gatggtaatt	1080
ccgggggata atgttgatct taccgttgaa ttaattgcc caattgccgt tgagcagga	1140
accaaattct cgatccgaga aggtggtaga accgtgggtg ccggaacagt taccgaaatt	1200

attaaataa	1209
<210> 7	
<211> 849	
<212> ADN	
<213> Mycoplasma hyopneumoniae	
<400> 7	
gcaaaattag acgataatct tcagtattca tttgaagcta tcaaaaaagg ggaaactaca	60
aaagaaggta aaagagaaga agtagataaa aaagttaagg aattagataa taaaataaaa	120
ggtatattgc ctgagcccc agcggctaaa ccagaagcag caaaaccagt agcggctaaa	180
ccagaagcag caaaaccagt agcggctaaa cctgaagcag caaaaccagt agcggctaaa	240
cctgaagcag caaaaccagt tgcggctaaa cctgaagcag caaaaccagt tgcggctaaa	300
cctgaagcag caaaaccagt tgcagctaaa cctgaagcag caaaaccagt tgctactaat	360
actggctttt cacttacaaa taaacaaaa gaagactatt tcccaatggc ttttagttat	420
aaattagaat atactgacga aaataaatta agcccaaaaa caccggaaat taatgtattt	480
ttagaactag ttcaccaaag cgagtatgaa gaacaaaaaa taataaagga actagacaaa	540
actgttttaa atcttcaata tcaattccag gaagtcaagg tagctagtga tcaatatcag	600
aaacttagcc acccaatgat gaccgagga tcttcaaatac aaggtaaaaa agcagagggg	660
gctcctaacc aagggaaaaa agcagagggg gctcctaacc aagggaaaaa agcagagggc	720
gctcctagtc aagggaaaaa agccgaagga acttctaacc acaaagccc aactaccgaa	780
ttaactaatt accttcctga cttaggtaaa aaaattgacg aaatcattaa aaaacaaggt	840
aaaaattaa	849
<210> 8	
<211> 291	
<212> ADN	
<213> Mycoplasma hyopneumoniae	
<400> 8	
gatctattat ataaactaat tgaattagaa aaagattatc tctatgattt atattctgaa	60
gttggacttg ctgaatcagc aataaaattt agcatttata atgccgggaa attcttgcaa	120
aatctaggat atgattcacc tttttcaaaa gaggaaccg aaattgaacc tgaaattttt	180
agtcaattat cggctcgagc tgatgaaaat catgactttt tttcaggaaa tggctcttct	240
tatgtaatgg cgcttgctga agaaaccgaa gatgaagatt gggagtttta a	291
<210> 9	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	

<223> ĐOẠN MỖI

<400> 9
gatataggat ccgcaaaatt agacgataat cttcagtatt ca 42

<210> 10
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 10
caatatgtcg acttaatttt taccttgttt tttaatgatt tcgtc 45

<210> 11
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 11
gatataggat ccatgaaaaa aatgcttaga aaaaaattct tg 42

<210> 12
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 12
caatatgtcg acttaggcat caggattatc aacattagc 39

<210> 13
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 13
gatataggat ccgatctatt atataaacta attgaattag aaaaagatta tc 52

<210> 14
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 14
caatatgtcg acttaaaaact cccaatcttc atcttcg 37

<210> 15

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

 <400> 15
 gatataggat ccatggcagt tgttaaaacg acaggaaaa 39

 <210> 16
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

 <400> 16
 caatatgtcg acttatttaa taatttcggt aactgttccg gca 43

 <210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

 <400> 17
 ctctttgggc actaatccat cgaggattat ccgg 34

 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

 <400> 18
 ccggataatc ctcgatggat tagtgcccaa agag 34

 <210> 19
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

 <400> 19
 attagcttgc tgagtgagcc agttattttg tgcattcc 37

 <210> 20
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ĐOẠN MỖI

<400> 20
ggatgcacaa aataactggc tcactcagca agctaatt

37

<210> 21
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 21
cggcagttcc ataattccat cctgggacat aaac

34

<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ĐOẠN MỖI

<400> 22
gtttatgtcc caggatggaa ttatggaact gccg

34