



(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



1-0031082

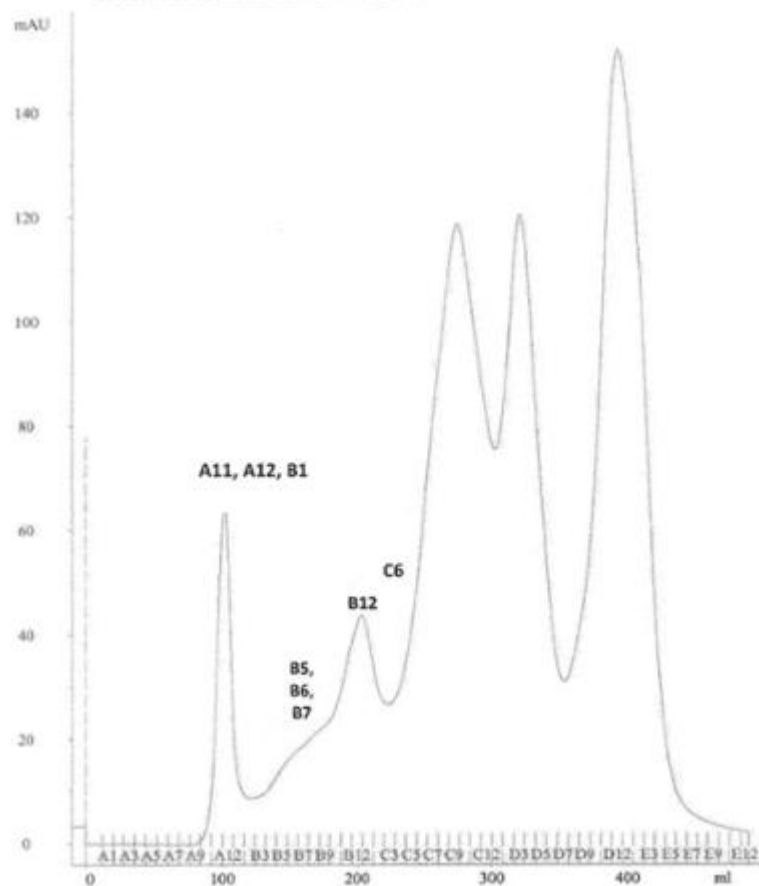
(51)⁸ A61K 39/00; G01N 33/68; G01N 33/50 (13) B

-
- (21) 1-2017-03567 (22) 04/03/2016
(86) PCT/US2016/021003 04/03/2016 (87) WO2016/141338 09/09/2016
(30) 62/128,744 05/03/2015 US
(45) 25/02/2022 407 (43) 25/12/2017 357A
(73) BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA, INC. (US)
3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, United States of America.
(72) IYER, Arun V. (IN); HERMANN, Joseph Ralph (US); ROOF, Michael B. (US);
VAUGHN, Eric Martin (US); SCHAEFFER, Merrill Lynn (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT XÁC ĐỊNH CÁ THỂ ĐÃ DÙNG CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA PROTEIN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC TẠO RA BẰNG HỆ BIỂU HIỆN BACULOVIRUT

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực dầu chuẩn tuân thủ và vacxin dầu chuẩn cho phép phân biệt giữa các cá thể bị nhiễm bệnh và cá thể đã được chủng ngừa bằng vacxin. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định xem một cá thể đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng được nuôi cấy hay chưa. Sáng chế cũng đề cập đến baculovirut tái tổ hợp, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut, và phương pháp sản xuất chế phẩm này.

011216 SEC S300HR sHPLC Run 1001-10_UV1_280nm
011216 SEC S300HR sHPLC Run 1001-10_Fractions
011216 SEC S300HR sHPLC Run 1001-10_Inject



Lĩnh vực kĩ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực dấu chuẩn tuân thủ và vaccin dấu chuẩn cho phép phân biệt giữa các cá thể bị nhiễm bệnh và cá thể đã được chủng ngừa bằng vaccin. Cụ thể, sáng chế đề cập đến dấu chuẩn tuân thủ dùng cho vaccin bao gồm kháng nguyên dưới đơn vị, và hệ thống phân biệt động vật đã nhiễm bệnh và động vật đã được chủng ngừa bằng vaccin (Differentiating Infected from Vaccinated Animals - DIVA) khiến cho có thể phân biệt các động vật đã nhiễm mầm bệnh và động vật được điều trị bằng kháng nguyên dưới đơn vị thu được từ mầm bệnh đó, trong đó kháng nguyên dưới đơn vị được biểu hiện trong các tế bào côn trùng nuôi cấy, tốt hơn là bằng baculovirut đã được xử lý di truyền.

Tình trạng kĩ thuật của sáng chế

Các baculovirut là các virut hình que lớn có ADN mạch kép mà nhiễm vào động vật không xương sống, cụ thể là côn trùng, nhưng không sao chép trong tế bào động vật có vú hoặc các tế bào động vật có xương sống khác. Đầu những năm 1940, các virut này lần đầu được sử dụng làm tác nhân sinh học diệt trừ loài gây hại trong lĩnh vực trồng trọt. Ngoài ra, sau khi bài báo đầu tiên được công bố mô tả về sự biểu hiện quá mức beta interferon người trong tế bào côn trùng (Smith et al. Mol Cell Biol. 3: 2156–2165 (1983)), các baculovirut được xử lý di truyền đã được sử dụng rộng rãi để sản xuất các protein tái tổ hợp phức tạp trong sản phẩm nuôi cấy tế bào côn trùng, bao gồm việc sản xuất kháng nguyên cho một số loại vaccin dưới đơn vị được chấp thuận cho người và trong thú y (van Oers et al. J Gen Virol. 96: 6-23 (2015)).

Chủng ngừa là công cụ chính để kiểm soát sức khỏe bầy đàn, cụ thể là trong cơ sở nuôi nhốt mật độ cao nơi mà nhiều động vật làm thức ăn được chăn nuôi. Khi dịch bệnh xảy ra ở các động vật mà được cho là đã được chủng ngừa, câu hỏi đặt ra là liệu vaccin không có khả năng bảo vệ các động vật này hay vaccin được phân phối theo đúng cách hay không, trong đó khả năng sau liên quan đến việc phân phối vaccin đúng cách được xem là tuân thủ vaccin.

Do đó, việc sử dụng các dấu chuẩn tuân thủ để xác định xem một động vật đã được chủng ngừa vaccin đúng hay chưa là mong muốn của các nhà sản xuất. WO 2009/058835 A1 mô tả, ví dụ, việc sử dụng xylanaza tinh chế mà được bổ sung làm dấu chuẩn tuân thủ vào vaccin cúm lợn. Liên quan đến các vaccin chứa kháng nguyên được biểu hiện bằng baculovirut, có thể sử dụng kháng nguyên baculovirut làm dấu chuẩn tuân thủ, tuy nhiên trong đó, các hệ thống hiện được sử dụng có hạn chế ở các động vật thử nghiệm dương tính và ở chỗ cần có lượng kháng nguyên lớn (Gerber *et al.* Res Vet Sci. 95:775-81 (2013); Lehnert. Top Agrar 5: S11-S14 (2011)).

Các vaccin được dùng trong các chương trình kiểm soát bệnh dịch do và nhiễm virut phải có hệ thống hữu hiệu để theo dõi sự có mặt sau đó của virut nhiễm vào trong quần thể. Tuy nhiên, việc chủng ngừa vaccin làm phức tạp hóa việc theo dõi trên quy mô lớn sự lây nhiễm lan truyền, ví dụ theo nhóm huyết thanh, vì cả cá thể được chủng ngừa bằng vaccin và cá thể bị phơi nhiễm để tạo ra kháng thể đặc hiệu virut. Sự tương tự về kháng nguyên giữa chủng đồng ruộng độc gây nhiễm của virut và vaccin virut thường gây khó khăn cho việc phân biệt giữa đối tượng bị nhiễm và đối tượng được chủng ngừa bằng vaccin vì việc chủng ngừa bằng vaccin dẫn đến sự có mặt và duy trì của kháng thể mà phân biệt được giữa cá thể bị nhiễm và cá thể được chủng ngừa bằng vaccin.

Các chiến lược chủng ngừa bằng vaccin DIVA (phân biệt động vật bị nhiễm và động vật được chủng ngừa bằng vaccin) ngày càng được quan tâm trên toàn thế giới. Chẳng hạn, những cuộc họp chung giữa WHO/FAO/OIE về chủng cúm gia cầm H5N1 HPAI đã khuyến nghị rằng mọi việc chủng ngừa bằng vaccin nên được thực hiện bằng DIVA, để sự lan tràn của bệnh nhiễm khuẩn có thể được theo dõi. Tuy nhiên, các phương pháp DIVA hiện có khó tăng quy mô và thường gặp vấn đề trong việc phân biệt việc chủng ngừa bằng vaccin với việc nhiễm các chủng virut đang lan truyền khác.

Các phương pháp hiện có để theo dõi bao gồm hướng đích vật lý các động vật được chủng ngừa bằng vaccin, sử dụng các động vật báo biến, và xét nghiệm virut. Tuy nhiên, các phương pháp hiện có này có một số hạn chế do các lý do về hậu cần và kinh tế.

Việc hướng đích vật lý các động vật được chủng ngừa bằng vaccin bao gồm việc nhận dạng riêng từng cá thể được chủng ngừa bằng vaccin bằng phương pháp vật lý như thẻ gắn vào tai, băng đeo chân hoặc thẻ gắn vào cánh, việc này tốn thời gian. Tương tự, việc sử dụng các động vật báo biến không được chủng ngừa bằng vaccin gặp khó khăn về hậu cần và kinh tế và cũng có nguy cơ nếu động vật báo biến bị nhiễm virus, ví dụ gia cầm bị nhiễm virus H5N1, nguy cơ lây lan sang người sẽ tăng. Xét nghiệm virus từng cá thể thông qua sàng lọc và phát hiện virus sống hoặc xét nghiệm theo dõi bằng RT-PCR là quy trình rất đắt tiền và nặng nề về cơ sở hạ tầng, phương pháp này không thể áp dụng đối với các vaccin dưới đơn vị, và chỉ cung cấp thông tin về tình trạng hiện tại của một cá thể, và không cho phép phân tích tiền sử nhiễm khuẩn và/hoặc chủng ngừa bằng vaccin của cá thể đó.

Qua xem xét các hạn chế này, việc sử dụng các vaccin dầu chuẩn cho phép phân biệt về mặt huyết thanh động vật được chủng ngừa bằng vaccin và động vật bị nhiễm khuẩn rất được ưu tiên, trong đó các vaccin dầu chuẩn như vậy có thể được bào chế dưới dạng vaccin dầu chuẩn âm tính hoặc dương tính.

Vaccin dầu chuẩn âm tính được bào chế bằng cách sử dụng phần kháng nguyên của mầm bệnh hoặc bằng cách lấy kháng nguyên ra khỏi mầm bệnh, kháng nguyên này gây ra kích thích kháng thể đặc hiệu ở động vật bị nhiễm. Các vaccin dầu chuẩn âm tính thường là vaccin dưới đơn vị hoặc vaccin sống giảm độc chứa chủng được xử lý di truyền thiếu kháng nguyên sinh miễn dịch. Ví dụ về vaccin dầu chuẩn âm tính là, ví dụ, việc sử dụng protein E2 của virus cúm lợn cổ điển (CSFV) được biểu hiện bằng baculovirus làm kháng nguyên dưới đơn vị để chủng ngừa chống lại bệnh cúm lợn cổ điển, trong đó việc phát hiện ra các kháng thể đặc hiệu cho các kháng nguyên khác của CSFV, ví dụ protein E^{RNS} hoặc protein NS3, trong huyết thanh của lợn được chủng ngừa bằng vaccin thể hiện sự nhiễm SCFV.

Vaccin dầu chuẩn dương tính chứa kháng nguyên bổ sung mà kích thích tạo ra kháng thể đặc hiệu trong cá thể được chủng ngừa bằng vaccin nhưng không bị nhiễm mầm bệnh. Ví dụ về phương pháp vaccin dầu chuẩn dương tính được mô tả trong WO 2007/053899 A1, trong đó virus cúm gia cầm H6N2 (A1) và độc tố tetanus, được sản xuất riêng rẽ, được kết hợp trong một lần tiêm để chủng ngừa cho chim, và sau đó các kháng thể đặc hiệu cho độc tố tetanus được phát hiện trong huyết thanh thu được từ

chim dưới dạng dấu chuẩn thể hiện rằng con chim này đã được chủng ngừa bằng vaccin.

Tuy nhiên, việc sản xuất riêng cả kháng nguyên vaccin và kháng nguyên dấu chuẩn tương đối đắt tiền và, hơn nữa, cần có bước phối trộn cần để kết hợp hai thành phần trong một lần chủng ngừa, trong đó việc này cũng có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của các thành phần vaccin/kháng nguyên.

Do đó, cần có hệ dấu chuẩn đơn giản để tạo ra theo cách không tốn kém các vaccin dấu chuẩn dương tính, cụ thể là các vaccin dưới đơn vị chứa kháng nguyên được biểu hiện bằng baculovirut.

Hơn nữa, cần có các dấu chuẩn tuân thủ hữu hiệu mà cũng dễ phát hiện việc chủng ngừa bằng vaccin với lượng thấp kháng nguyên dưới đơn vị được biểu hiện bằng baculovirut.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp xác định cá thể đã dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bởi hệ biểu hiện trong tế bào côn trùng được nuôi cấy, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học thu được từ cá thể đã nêu sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn thể hiện rằng cá thể này đã nhận được một hoặc nhiều kháng nguyên từ virut mà là virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu trong mẫu sinh học đã nêu chỉ ra rằng cá thể này đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch.

Sáng chế cũng đề cập đến baculovirut tái tổ hợp, trong đó baculovirut này chứa trình tự ADN mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

- a. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm:
 - i. SEQ ID NO: từ 1 đến 6; và/hoặc
 - ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; và/hoặc
- b. trong đó baculovirut đã nêu chứa trình tự ADN chứa hoặc bao gồm:

- i. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: từ 9 đến 14; và/hoặc
- ii. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16.

Sáng chế cũng đề cập đến vector, cụ thể là vector truyền, chứa trình tự ADN mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

- a. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: từ 1 đến 6; và/hoặc
- b. protein chứa hoặc bao gồm:
 - i. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; và/hoặc
- c. chứa trình tự ADN có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: từ 9 đến 14; và/hoặc trình tự ADN có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 hoặc SEQ ID NO:16.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bởi hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng được nuôi cấy, và một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 23, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a. đưa baculovirut tái tổ hợp mã hóa protein tái tổ hợp vào tế bào côn trùng, trong đó tế bào côn trùng này được nhiễm virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, nuôi cấy tế bào côn trùng để tạo ra baculovirut tái tổ hợp đã nêu và virus ARN; và
- b. thu hồi protein tái tổ hợp đã nêu và virus đã nêu, tốt hơn là trong dịch nổi.

Sáng chế cũng đề cập đến kit để xác định cá thể đã dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng được nuôi cấy, trong đó kit này chứa một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ được

cố định vào giá thể rắn, trong đó một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ cố định này có khả năng liên kết với một hoặc nhiều dấu chuẩn được chọn từ nhóm gồm:

- a. kháng thể đặc hiệu với một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng;
- b. một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng; và
- c. một hoặc nhiều phân tử axit nucleic đặc trưng cho virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa chất phản ứng bất giữ, trong đó chất phản ứng bất giữ chứa hoặc bao gồm các hạt virus và/hoặc hạt giống như virus của virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó chế phẩm hoặc chất phản ứng bất giữ này thu được bằng phương pháp bao gồm các bước

- i. thu dịch nổi từ sản phẩm nuôi cấy tế bào côn trùng được nhiễm virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó dịch nổi này chứa các hạt virus và/hoặc hạt giống như virus của virus ARN, và trong đó tế bào côn trùng được nhiễm virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng đã nêu tốt hơn là không được nhiễm baculovirus và/hoặc tốt hơn là không được chuyển nhiễm plasmit,
- ii) tách các mảnh vụn tế bào từ các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus qua bước tách bao gồm vi lọc qua ít nhất một bộ lọc, tốt hơn là hai bộ lọc, trong đó ít nhất một bộ lọc tốt hơn là có cỡ lỗ lớn hơn các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus này, cụ thể là có cỡ lỗ khoảng 0,1 μm đến khoảng 4 μm , tốt hơn là khoảng 0,2 μm đến khoảng 2 μm ,
- iii) và tùy ý đưa dịch lọc ở bước ii) mà chứa các hạt virus đã nêu và/hoặc hạt giống như virus vào sắc ký loại trừ theo kích thước, trong đó sự có mặt của protein trong chất giải hấp được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm hoặc 280 nm (A_{260} hoặc A_{280}), và trong đó tốt hơn là chất giải hấp thể hiện đỉnh A_{260} hoặc A_{280} đầu tiên được thu gom.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Các sản phẩm khuếch đại được cho chạy trên gel để kiểm tra kích thước.

Fig. 2: Đoạn cắt chèn vào và vector được cho chạy trên gel để kiểm tra sự duỗi thẳng của vector.

Fig. 3: Các dòng dương tính từ các giếng 2, 5, 7, 10, 11, và 12 được giải trình tự và các đoạn được sắp thẳng hàng với trình tự tham chiếu về cấu trúc để kiểm tra đột biến; tất cả các dòng đều khớp hoàn toàn.

Fig. 4: Thẩm tách Western để đánh giá mức biểu hiện cấu trúc gen G.

Fig. 5: Dịch nổi, các phân đoạn tế bào hòa tan và không hòa tan được dò để phát hiện protein; ở thời điểm này protein có mặt trong phần không tan.

Fig. 6: Kết quả của bước chạy sắc ký loại trừ theo kích thước bằng các điều kiện đẳng dòng trên AKTA. Việc giải hấp các protein từ cột được theo dõi bằng độ hấp thụ UV ở 280 nm.

Fig. 7: Kết quả PCR thời gian thực: Cột 1 là số giếng. Cột 2 thể hiện phần tử mang huỳnh quang 6-carboxyfluorescein (FAM) được liên kết với mẫu dò đặc hiệu được sử dụng. Cột 3 là các phân đoạn kháng nguyên SfRV thu được từ bước sắc ký loại trừ theo kích thước (các phân đoạn A11, A12, B1, B5, B12 và C6) hoặc các chuẩn với lượng axit nucleic đặc hiệu SfRV đã biết được sử dụng để tạo ra đường cong chuẩn (các giếng 7 -14). Giếng 15 là đối chứng âm (không có khuôn) và giếng 16 là đối chứng dương chứa kháng nguyên SfRV đậm đặc trước khi phân đoạn theo kích thước (SEC).

Fig. 8: ELISA; các đĩa ELISA được phủ bằng bốn kháng nguyên khác nhau bao gồm SfRV bán tinh chế (bảng A), các phân đoạn loại trừ theo kích thước A11 (bảng B), A12 (bảng C) và B1 (bảng D). Các đĩa này được dò bằng huyết thanh từ các động vật đối chứng âm (hình tam giác ngược) hoặc huyết thanh ngày 28 từ các động vật được cho dùng vaccin thử nghiệm chứa SfRV (hình tròn).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ rằng việc sử dụng các tế bào Sf+, bị nhiễm rhabdovirus, để tạo ra kháng nguyên được biểu hiện bằng baculovirus có thể tạo ra theo cách hiệu quả và không tốn kém các vaccin dấu chuẩn dương tính, và đánh dấu sự tuân thủ một cách dễ dàng và có hữu trong sản xuất, tạo ra một phương pháp nhạy cho thấy việc phân phối chính xác vaccin dưới đơn vị.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp xác định xem liệu một cá thể đã được cho dùng chế phẩm gây miễn dịch hay chưa, cụ thể là đã dùng vaccin chứa protein tái tổ hợp được sản xuất bằng hệ biểu hiện, tốt hơn là hệ biểu hiện baculovirut, trong tế bào côn trùng được nuôi cấy hay chưa, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: thu mẫu sinh học từ cá thể; và xác định trong mẫu sinh học này sự có mặt hay không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn thể hiện rằng cá thể này đã được nhận được một hoặc nhiều kháng nguyên từ virut, mà là virus ARN có khả năng nhiễm bào tế bào côn trùng, trong đó sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn này trong mẫu sinh học này chỉ ra rằng cá thể này đã được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong đó sự không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn này trong mẫu sinh học này chỉ ra rằng cá thể này chưa được dùng chế phẩm sinh miễn dịch.

Thuật ngữ “protein tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, cụ thể đề cập đến phân tử protein được biểu hiện từ phân tử ADN tái tổ hợp, như polypeptit được sản xuất bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Một ví dụ về công nghệ như vậy bao gồm trường hợp khi ADN mã hóa protein được biểu hiện được chèn vào vector biểu hiện thích hợp, tốt hơn là vector biểu hiện baculovirut, vector này được sử dụng để chuyển nhiễm, hoặc trong trường hợp vector biểu hiện baculovirut để gây nhiễm, tế bào chủ để sản sinh protein hoặc polypeptit được mã hóa bởi ADN này. Vì vậy, thuật ngữ “protein tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, cụ thể đề cập đến phân tử protein được biểu hiện từ phân tử ADN tái tổ hợp.

Theo một ví dụ cụ thể, protein tái tổ hợp được tạo ra bởi phương pháp bao gồm các bước sau: gen mã hóa protein này được tách dòng vào vector truyền baculovirut; vector truyền này được sử dụng để tạo ra baculovirut tái tổ hợp chứa gen đã nêu bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong các tế bào côn trùng; và sau đó protein này được biểu hiện trong tế bào côn trùng trong quá trình nhiễm baculovirut tái tổ hợp.

Theo một ví dụ khác, protein tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào côn trùng từ plasmit biểu hiện tái tổ hợp. Trong trường hợp ví dụ khác này, không cần đến baculovirut.

Cần hiểu thêm rằng thuật ngữ “protein tái tổ hợp bao gồm trình tự” cụ thể cũng liên quan đến sự cải biến hoặc những cải biến đồng phiên mã và/hoặc sau phiên mã của trình tự bị ảnh hưởng bởi tế bào mà ở đó polypeptit này được biểu hiện. Vì vậy,

thuật ngữ “protein tái tổ hợp bao gồm trình tự”, như được mô tả ở đây, cũng hướng đến trình tự có một hoặc nhiều cải biến được thực hiện bởi tế bào mà ở đó polypeptit này được biểu hiện, cụ thể là những cải biến về gốc axit amin được thực hiện trong quá trình sinh tổng hợp protein và/hoặc xử lý protein, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm glycosyl hóa, phosphoryl hóa và axetyl hóa.

Tốt hơn, nếu protein tái tổ hợp theo sáng chế được sản xuất hoặc có thể thu được nhờ hệ biểu hiện baculovirut, cụ thể là trong các tế bào côn trùng được nuôi cấy.

Thuật ngữ “hệ biểu hiện” như được sử dụng ở đây cụ thể bao gồm các phương tiện hoặc vectơ để biểu hiện gen trong tế bào chủ cũng như phương tiện hoặc vectơ làm cho gen tích hợp ổn định trong nhiễm sắc thể chủ.

Như được sử dụng ở đây “hệ biểu hiện baculovirut” cụ thể nghĩa là hệ để sản xuất protein mong muốn trong tế bào côn trùng bằng cách sử dụng vectơ baculovirut tái tổ hợp được thiết kế để biểu hiện protein này. Hệ biểu hiện baculovirut thường gồm tất cả các phần tử cần thiết để biểu hiện được protein tái tổ hợp trong các tế bào côn trùng, và thường gồm việc thiết kế vectơ baculovirut để biểu hiện protein mong muốn, đưa vectơ baculovirut đã thiết kế vào tế bào côn trùng, nuôi cấy tế bào côn trùng chứa vectơ baculovirut đã thiết kế trong môi trường sinh trưởng thích hợp sao cho protein mong muốn được biểu hiện, và thu hồi protein. Thông thường, việc thiết kế vectơ baculovirut bao gồm tạo xây dựng cấu trúc và tách các baculovirut tái tổ hợp trong đó trình tự mã hóa gen đã chọn được chèn vào sau đoạn khởi đầu dùng cho gen virut không thiết yếu, trong đó hầu hết các hệ biểu hiện baculovirut hiện dùng dựa trên trình tự của virut đa diện nhân *Autographa californica* (AcMNPV) ((Virology 202 (2), 586-605 (1994), NCBI Accession No.: NC_001623). Các hệ biểu hiện baculovirut đã được biết rõ trong lĩnh vực này và đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu “Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual” của David R. O'Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, nhà xuất bản Oxford Univ. Press (1994), “The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide” của Linda A. King, R. D. Possee, nhà xuất bản Chapman & Hall (1992). Một ví dụ minh họa không hạn chế về hệ baculovirut để sản xuất protein tái tổ hợp được mô tả chẳng hạn trong WO 2006/072065 A2.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất này, sáng chế đề xuất phương pháp xác định xem một cá thể đã được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo

ra bởi hệ biểu hiện trong tế bào côn trùng được nuôi cấy hay chưa, phương pháp này sau đây còn gọi là “phương pháp theo sáng chế”, trong đó phương pháp này cụ thể bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học thu được từ cá thể này sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn thể hiện rằng cá thể này đã nhận được một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus, mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu trong mẫu sinh học đã nêu chỉ ra rằng cá thể này đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch.

“Tế bào côn trùng” như được sử dụng ở đây nghĩa là tế bào hoặc sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được từ loài côn trùng. Theo sáng chế các tế bào côn trùng thu được từ loài *Spodoptera frugiperda* và *Trichoplusia ni* đặc biệt được quan tâm.

Như được sử dụng ở đây, “virus có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng” cụ thể được hiểu là các cấu trúc neo đậu của virus trên bề mặt virus mà có khả năng tương tác với tế bào côn trùng trong một phạm vi nhất định sao cho virus, hoặc ít nhất là hệ gen virus, có thể kết hợp vào tế bào côn trùng.

Cụ thể hơn, việc gây nhiễm tế bào côn trùng bao gồm sự gắn kết của virus vào tế bào chủ, sự xâm nhập của virus vào tế bào, sự tháo vỏ virion trong tương bào, sự sao chép và dịch mã của hệ gen virus, sự biểu hiện của các protein virus và sự lắp ghép và giả phóng các hạt virus gây nhiễm mới.

Tốt hơn, nếu chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế là vaccin dấu chuẩn, cụ thể là vaccin dấu chuẩn dương tính.

Thuật ngữ “vaccin dấu chuẩn” như được mô tả ở đây, cụ thể chỉ vaccin gây miễn dịch trong sinh vật được gây miễn dịch, khác với việc gây miễn dịch trong sinh vật mầm bệnh thực sự gây ra.

“Vaccin dấu chuẩn dương tính” cụ thể đề cập đến vaccin dấu chuẩn chứa kháng nguyên bổ sung mà kích thích sự sản sinh các kháng thể đặc hiệu trong cá thể được chủng ngừa bằng vaccin mà không phải trong các cá thể bị nhiễm mầm bệnh.

Thuật ngữ “dấu chuẩn” như được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế tốt hơn là tương đương với thuật ngữ “dấu chuẩn sinh học”, và cụ thể chỉ chất hoặc hợp chất đo được mà chỉ ra rằng cá thể đã được cho tiếp xúc với chế phẩm sinh miễn dịch, tốt hơn là tiếp xúc với vaccin dấu chuẩn dương tính hoặc, cụ thể hơn là tiếp xúc với kháng

nguyên bổ sung của vacxin dấu chuẩn dương tính mà kích thích sự sản sinh các kháng thể đặc hiệu được phát hiện ở đối tượng được chủng ngừa bằng vacxin nhưng không có trong đối tượng bị nhiễm mầm bệnh.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm sinh miễn dịch” cụ thể chỉ chế phẩm mà sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch ở cá thể mà đã được cho tiếp xúc với chế phẩm này. Đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm cảm ứng kháng thể và/hoặc cảm ứng đáp ứng tế bào T. Tùy thuộc vào chức năng dự định của chế phẩm, chế phẩm này có thể gồm một hoặc nhiều kháng nguyên. Tốt hơn, nếu chế phẩm sinh miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả là vacxin.

Thuật ngữ “vacxin” như được sử dụng ở đây, được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này và liên quan đến chế phẩm kích thích hoặc tăng cường sự miễn dịch của cá thể với bệnh cụ thể disease. Với mục đích này, vacxin chứa thành phần tương tự với mầm bệnh hoặc thành phần gây bệnh của mầm bệnh đó. Khi tiếp xúc với thành phần này, hệ miễn dịch của cá thể sẽ được kích hoạt để nhận dạng thành phần này là lạ và phá hủy nó. Sau đó, hệ miễn dịch sẽ ghi nhớ việc tiếp xúc với thành phần này, sao cho lần tiếp xúc tiếp theo với mầm bệnh đảm bảo sẽ nhận dạng và phá hủy dễ dàng và hiệu quả. Theo sáng chế, vacxin có thể ở dạng bào chế bất kỳ dùng cho các vacxin đã biết trong lĩnh vực này, như chẳng hạn các vacxin để tiêm trong bắp, vacxin niêm mạc hoặc vacxin để tiêm dưới da hoặc tiêm trong da cũng như vacxin để xông, ví dụ như dưới dạng sol khí. Các dạng bào chế vacxin như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực này và đã được mô tả, ví dụ trong tài liệu Neutra MR et al. 2006 Mucosal vaccines: the promise and the challenge 6(2): 148-58 hoặc F. P. Nijkamp, Michael J. Parnham 2011; Principles of Immunopharmacology ISBN-13: 978-3034601351.

Do đó, phương pháp theo sáng chế cụ thể là phương pháp xác định xem một cá thể đã được cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bởi hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng được nuôi cấy hay chưa, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học thu được từ cá thể sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn thể hiện rằng cá thể này đã nhận được một hoặc nhiều kháng nguyên từ virut mà là virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu trong mẫu sinh học đã nêu chỉ ra rằng cá thể này đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch.

Tốt hơn, nếu mẫu sinh học thu được từ cá thể ít nhất là 14 ngày và tốt nhất là từ 14 đến 35 ngày sau khi cá thể được chủng ngừa bằng vaccin hoặc, lần lượt, đã được cho là được chủng ngừa bằng vaccin.

Tốt hơn, nếu tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, là tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào từ dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, và tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm gồm tế bào Sf9 và tế bào Sf+. Các tế bào tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, lần lượt tốt hơn là tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào từ dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, và tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm gồm tế bào Sf9 và tế bào Sf+.

Một hoặc nhiều dấu chuẩn thể hiện rằng cá thể này đã nhận được một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, sau đây còn gọi là “một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế”, tốt hơn là một hoặc nhiều dấu chuẩn được chọn từ nhóm gồm: kháng thể đặc hiệu với một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng; một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và; một hoặc nhiều phân tử axit nucleic đặc trưng cho virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng.

Tốt nhất, nếu một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế là kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng.

Tốt hơn, nếu các kháng thể được mô tả trong bản mô tả là kháng thể đa dòng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu với” kháng nguyên xác định cụ thể chỉ các kháng thể, tốt hơn là kháng thể đa dòng, mà liên kết với kháng nguyên với ái lực hoặc K_a (tức là, hằng số kết hợp cân bằng của một tương tác liên kết cụ thể với đơn vị 1/M) là, chẳng hạn, lớn hơn hoặc bằng khoảng $10^5 M^{-1}$, $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ hoặc $10^{13} M^{-1}$. Theo cách khác, ái lực liên kết có thể được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_d) của tương tác liên kết cụ thể với đơn vị M (ví dụ, $10^{-5} M$ đến $10^{-13} M$). Ái lực liên kết của kháng thể có thể dễ dàng được xác định bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết rõ (xem, ví dụ, Scatchard *et al.* (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; U.S. Pat. No. 5,283,173; 5,468,614; BIACORE® analysis; hoặc các tài liệu tương đương).

Một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, sau đây còn gọi là “một hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế”, tốt hơn là protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Về thuật ngữ “ít nhất 90%”, như được đề cập đến trong ngữ cảnh của sáng chế, cần hiểu rằng thuật ngữ này tốt hơn là đề cập đến “ít nhất 91%”, tốt hơn nữa là “ít nhất 92%”, còn tốt hơn nữa là “ít nhất 93%” hoặc đặc biệt là “ít nhất 94%”.

Về thuật ngữ “ít nhất 95%” như được đề cập đến trong ngữ cảnh của sáng chế, cần hiểu rằng thuật ngữ này tốt hơn là đề cập đến “ít nhất 96%”, tốt hơn nữa là “ít nhất 97%”, còn tốt hơn nữa là “ít nhất 98%” hoặc đặc biệt là “ít nhất 99%”.

Thuật ngữ “có độ đồng nhất về trình tự 100%”, như được sử dụng ở đây, được hiểu là tương đương với thuật ngữ “đồng nhất”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng nguyên” cụ thể chỉ phân tử, gốc hoặc thực thể bất kỳ có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch bao gồm các đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc dịch thể.

Độ đồng nhất về trình tự tính theo phần trăm có ý nghĩa được thừa nhận trong lĩnh vực này và có một số phương pháp để xác định độ tương đồng giữa hai trình tự polypeptit hoặc polynucleotit. Xem, ví dụ, Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); và Gribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991). Các phương pháp để sắp thẳng hàng các polynucleotit hoặc polypeptit được hệ thống hóa trong các chương trình máy tính, bao gồm gói chương trình GCG (Devereux et al., *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)), và chương trình Bestfit

(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) mà sử dụng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith và Waterman (*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981)). Ví dụ, chương trình máy tính ALIGN sử dụng thuật toán FASTA có thể được sử dụng, bằng việc tìm kiếm khoảng trống afin với điểm phạt mở khoảng trống là -12 và điểm phạt mở rộng khoảng trống là -2. Với các mục đích của sáng chế, các trình tự nucleotit được sắp thẳng hàng bằng phương pháp Clustal W trong phần mềm MegAlign phiên bản 11.1.0 (59), 419 của hãng DNASTAR Inc. bằng cách sử dụng các thông số sắp thẳng hàng mặc định được thiết lập trong chương trình (điểm phạt khoảng trống =15,0, điểm phạt độ dài khoảng trống =6,66, trình tự phân kỳ muộn (%) = 30%, trọng số chuyển tiếp ADN =0,50 và ma trận trọng số DNA = IUB) và lần lượt các trình tự protein/axit amin được sắp thẳng hàng bằng phương pháp Clustal W trong phần mềm MegAlign phiên bản 11.1.0 (59), 419 của hãng DNASTAR Inc. bằng các thông số sắp thẳng hàng mặc định được thiết lập trong chương trình (ma trận trọng số protein Gonnet với điểm phạt khoảng trống =10,0, điểm phạt độ dài khoảng trống = 0,2, và trình tự phân kỳ muộn (%) = 30%).

Như được sử dụng ở đây, cần hiểu cụ thể rằng thuật ngữ “độ đồng nhất về trình tự với trình tự nêu trong SEQ ID NO:X” là tương đương với thuật ngữ “độ đồng nhất về trình tự với trình tự nêu trong SEQ ID NO:X trên chiều dài của SEQ ID NO: X” hoặc thuật ngữ “độ đồng nhất về trình tự với trình tự nêu trong SEQ ID NO:X trên toàn bộ chiều dài của SEQ ID NO: X”. Trong ngữ cảnh này, “X” là số nguyên bất kỳ được chọn từ 1 đến 24 sao cho “SEQ ID NO: X” là SEQ ID NO bất kỳ được đề cập trong bản mô tả.

Một hoặc nhiều phân tử axit nucleic đặc trưng cho virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, mà sau đây còn gọi là “một hoặc nhiều phân tử axit nucleic theo sáng chế”, tốt hơn là phân tử axit nucleic mã hóa: protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ

đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9; và/hoặc trình tự mà bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

Tốt hơn, nếu phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước: cho mẫu sinh học tiếp xúc với chất phản ứng bất giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó chất phản ứng bất giữ được cố định này có khả năng liên kết với một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế; và phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu liên kết với chất phản ứng bất giữ, trong đó sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu liên kết với chất phản ứng bất giữ là chỉ thị cho sự có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn trong mẫu sinh học đã nêu.

Thuật ngữ “chất phản ứng bất giữ”, như được sử dụng ở đây, cụ thể chỉ phân tử hoặc phức đa phân tử mà có thể liên kết với dấu chuẩn. Tốt hơn, nếu chất phản ứng bất giữ có khả năng liên kết với dấu chuẩn theo cách gần như đặc hiệu, tốt hơn là với ái lực hoặc $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ hoặc tốt hơn là $> 10^6 \text{ M}^{-1}$. Chất phản ứng bất giữ tùy ý có thể là phân tử sinh học có trong tự nhiên, tái tổ hợp, hoặc tổng hợp. Các protein và phối tử axit nucleic (aptame) rất thích hợp làm chất bất giữ. Toàn bộ virus hoặc mảnh virus hoặc peptit tổng hợp cũng có thể dùng làm các chất phản ứng bất giữ được ưu tiên, vì chúng có khả năng liên kết với các kháng thể.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ “được cố định” cụ thể nghĩa là chất phản ứng bất giữ có thể được gắn vào bề mặt (ví dụ, giá thể rắn) theo cách bất kỳ hoặc phương pháp bất kỳ; bao gồm, ví dụ, liên kết thuận nghịch hoặc không thuận nghịch, gắn kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị, và tương tự.

Chất phản ứng bất giữ được đề cập trong bản mô tả được cố định vào giá thể rắn và có khả năng liên kết với một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế, trong đó chất phản ứng bất giữ này sau đây còn gọi là “chất phản ứng bất giữ theo sáng chế”, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm: protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong trình tự bất kỳ nêu

trong SEQ ID NO: 1 đến 6; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt; oligonucleotit có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự đặc trưng của trình tự SEQ ID NO:9; và oligonucleotit có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự đặc trưng của trình tự SEQ ID NO:15.

Thuật ngữ “lai đặc hiệu” như được mô tả trong bản mô tả cụ thể đề cập đến việc lai trong các điều kiện nghiêm ngặt. Các điều kiện lai này có thể được thiết lập theo các quy trình thông thường, ví dụ, theo Sambrook, “Molecular Cloning, A Laboratory Handbook”, 2nd edition (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubel, “Current Protocols in Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); hoặc Higgins and Hames (eds) “Nucleic acid hybridization, a practical approach” IRL Press Oxford, Washington DC (1985). Ví dụ về các điều kiện lai đặc hiệu là lai ở 4×SSC và 0,1% SDS ở 65° C sau đó rửa trong 0,1×SSC, 0,1% SDS ở 65° C. Theo cách khác, các điều kiện lai nghiêm ngặt là, ví dụ, 50% formamit, 4×SSC ở 42° C.

Thuật ngữ “giá thể rắn”, như được đề cập trong bản mô tả, là chất không ở dạng lỏng, và bao gồm chip, lọ, và hạt (bao gồm các vi hạt và hạt) được tạo ra từ các vật liệu như polyme, kim loại (các hạt thuận từ, sắt từ), thủy tinh, và gốm; các chất gel như silic oxit, nhôm oxit, và gel polyme; các mao quản, mà có thể được tạo ra từ polyme, kim loại, thủy tinh và/hoặc gốm; zeolit và các chất xốp khác; các điện cực; các đĩa vi chuẩn độ; các dải rắn; và cuvet, ống hoặc các vật chứa mẫu trong phổ kế. Thành phần giá thể rắn của thử nghiệm khác với các bề mặt rắn mà thử nghiệm có thể tiếp xúc trong đó “giá thể rắn” chứa ít nhất một góc trên bề mặt của nó, góc này được dự định để tương tác với chất phản ứng bắt giữ, trực tiếp hoặc gián tiếp. Giá thể rắn có thể là thành phần tĩnh, như ống, dải, cuvet, hoặc đĩa vi chuẩn độ, hoặc có thể là các thành phần không tĩnh, như hạt và vi hạt. Các vi hạt cũng có thể được sử dụng làm giá thể rắn trong các thiết kế thử nghiệm đồng nhất. Nhiều vi hạt mà cho phép sự gắn kết cả không cộng hóa trị hoặc cộng hóa trị của các protein với các chất khác có thể được sử dụng. Các hạt như vậy bao gồm các hạt polyme như polystyren và poly(methylmetacrylat); các hạt vàng như các hạt nano vàng và keo vàng; và các hạt

gồm như silic oxit, thủy tinh, và các hạt oxit kim loại. Xem, ví dụ, Martin, C.R., et al., *Analytical Chemistry-News & Features* 70 (1998) 322A-327A, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

"Chip" là vật liệu rắn, không xốp, như lom loại, thủy tinh hoặc nhựa. Vật liệu này có thể tùy ý được bao, hoàn toàn hoặc ở những vùng nhất định. Trên bề mặt vật liệu có các mảng điểm bất kỳ, nhìn thấy hoặc nằm trong các phối trí. Trên mỗi điểm có thể cố định một polypeptit xác định, có hoặc không có cầu liên kết hoặc đệm với bề mặt vật liệu. Tất cả các tài liệu được đề cập trong bản mô tả, trên đây hoặc sau đây, đều được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, như được đề cập trong bản mô tả, sau đây còn gọi là "virut ARN theo sáng chế", tốt hơn là: virut (-)ssARN và tùy ý là virut thuộc họ *Rhabdoviridae*; và/hoặc virut chứa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc virut mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc virut mà hệ gen của nó chứa phân tử ARN có trình tự mà bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 và/hoặc; trình tự mà bổ sung ngược với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

Tất cả các trình tự nucleotit trong danh mục trình tự được thể hiện theo chiều 5' - 3'. Các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 9 và 15 mã hóa các cADN có tính phân cực

dương (mạch +). Thuật ngữ “bổ sung ngược chiều” nghĩa là trình tự này đối song song với trình tự tham chiếu.

Virut ARN theo sáng chế tốt hơn là có thể sao chép ít nhất hai hoặc tốt hơn nữa là ít nhất ba tuần trong dòng tế bào côn trùng.

Tốt hơn nếu, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế, trong đó các dấu chuẩn này là kháng thể đặc hiệu với protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc; kháng thể đặc hiệu với protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

cho mẫu sinh học tiếp xúc với chất phản ứng bắt giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó chất phản ứng bắt giữ được chọn từ nhóm gồm protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: 1 đến 6 hoặc trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8, virut tùy ý đã bất hoạt chứa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7, virut mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là

ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt, virus mà hệ gen của nó chứa phân tử ARN chứa trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 và/hoặc; trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt.

tách mẫu sinh học khỏi chất phản ứng bất giữ cố định;

cho phức chất phản ứng bất giữ cố định-kháng thể tiếp xúc với chất phát hiện mà liên kết với kháng thể của phức chất phản ứng-kháng thể; và

xác định mức kháng thể liên kết với chất phản ứng bất giữ bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện dùng cho chất phát hiện, và trong đó bước xác định (d) tốt hơn là bao gồm thêm bước so sánh với đường cong chuẩn để xác định mức kháng thể liên kết với chất phản ứng bất giữ.

Tốt hơn nếu, chất phát hiện mà liên kết với kháng thể của phức chất phản ứng-kháng thể là kháng thể phát hiện, tốt hơn nữa là kháng thể thứ cấp đã đánh dấu.

Chất phản ứng bất giữ, như được mô tả trong bản mô tả, tốt hơn là protein được biểu hiện bởi baculovirus, và protein được biểu hiện bởi baculovirus này tốt hơn là được biểu hiện bằng baculovirus theo sáng chế, mà được mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác của sáng chế, một hoặc nhiều dấu chuẩn theo sáng chế cũng có thể là một hoặc nhiều tế bào T đặc hiệu với virus ARN theo sáng chế và/hoặc một hoặc nhiều tế bào B đặc hiệu với virus ARN theo sáng chế và/hoặc một hoặc nhiều tế bào trình diện kháng nguyên mà trình diện một hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế. Sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều tế bào B và/hoặc một hoặc nhiều tế bào T và/hoặc một hoặc nhiều tế bào trình diện kháng nguyên tốt hơn là được xác định bằng cách phân tích tế bào theo dòng, và trong đó cụ thể là một hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế được đánh dấu huỳnh quang được sử dụng để đánh dấu một hoặc nhiều tế bào B và/hoặc một hoặc nhiều tế bào T này và/hoặc trong đó một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu với virus ARN virus theo sáng

chế được đánh dấu huỳnh quang được sử dụng để đánh dấu một hoặc nhiều tế bào trình diện kháng nguyên.

Protein tái tổ hợp được sản xuất bằng hệ biểu hiện trong các tế bào côn trùng được nuôi cấy, như được đề cập trong bản mô tả, sau đây còn gọi là “protein tái tổ hợp theo sáng chế”, tốt hơn là protein ORF2 của PCV2, và protein ORF2 của PCV2 này cụ thể là protein có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 91%, tốt hơn nữa là ít nhất 92%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 93% hoặc đặc biệt là ít nhất 94% hoặc ít nhất 95% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, protein tái tổ hợp theo sáng chế là hemagglutinin cúm, cụ thể là hemagglutinin cúm gia cầm, trong đó hemagglutinin cúm gia cầm này tốt hơn là protein H5 của virus H5N1, và trong đó protein H5 của virus H5N1 tốt hơn nữa là protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:24.

Tốt hơn, nếu phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học sự có mặt của một hoặc nhiều chất phân tích được chọn từ nhóm gồm: kháng thể đặc hiệu với protein tái tổ hợp theo sáng chế, polypeptit đặc trưng cho protein tái tổ hợp theo sáng chế, trình tự nucleotit đặc trưng cho trình tự ADN mã hóa protein tái tổ hợp theo sáng chế.

Trong ngữ cảnh của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch tốt hơn là chế phẩm sinh miễn dịch như được mô tả sau đây.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” như được sử dụng ở đây chỉ mẫu bất kỳ được thu từ cá thể (ví dụ từ lợn hoặc chim) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dịch thể chứa tế bào, máu ngoại vi, huyết tương hoặc huyết thanh, nước bọt, dịch treo mô đồng thể, chất hút từ phổi và các cơ quan khác, và dịch rửa và dịch thụt, và nguồn bất kỳ khác thu được từ đối tượng người hoặc động vật. Đối với động vật, chẳng hạn “mẫu sinh học” bao gồm máu, tế bào, phân, phân tiêu chảy, sữa, chất nhày, đờm dãi, mủ, nước bọt, tinh dịch, mồ hôi, nước mắt, nước tiểu, nước mắt, dịch nhãn cầu, chất tiết âm đạo, và chất nôn, nếu có ở động vật này.

Mẫu sinh học, như được đề cập trong bản mô tả, tốt hơn là được phân lập từ động vật có vú hoặc chim, tốt hơn là từ lợn hoặc gà (*Gallus gallus domesticus*), và/hoặc cụ

thể là được chọn từ nhóm gồm máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, và dịch từ miệng. Ở đây, thuật ngữ “huyết thanh” được hiểu là tương đương với “huyết thanh từ máu”.

Thuật ngữ “dịch từ miệng” như được sử dụng ở đây, cụ thể chỉ một hoặc nhiều dịch được phát hiện trong khoang miệng riêng rẽ hoặc kết hợp. Các dịch này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước bọt và dịch thấm niêm mạc. Cụ thể cần hiểu rằng các dịch từ miệng có thể chứa hỗn hợp các dịch từ một số nguồn (ví dụ, mang tai, dưới hàm dưới, dưới lưỡi, các tuyến phụ, niêm mạc lợi và niêm mạc má) và thuật ngữ “dịch từ miệng” bao gồm dịch từ mỗi nguồn này riêng rẽ, hoặc kết hợp. Thuật ngữ “nước bọt” chỉ hỗn hợp các dịch từ miệng như thường thấy trong miệng, cụ thể là sau khi nhai. Thuật ngữ “dịch thấm niêm mạc”, như được sử dụng ở đây, chỉ dịch thu được tạo ra bởi sự khuếch tán thụ động của các thành phần huyết thanh từ kẽ niêm mạc miệng vào khoang miệng. Dịch thấm niêm mạc thường là một thành phần của nước bọt.

Chất phản ứng bất giữ cố định, như được mô tả trong bản mô tả, tốt hơn là được phủ trên đĩa vi chuẩn độ, cụ thể là vào đĩa vi chuẩn độ có khả năng đọc được bằng đầu đọc ELISA.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất baculovirut tái tổ hợp, trong đó baculovirut này chứa trình tự ADN mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: 1 đến 6 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; và/hoặc trong đó baculovirut này chứa trình tự ADN chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: 9 đến 14 và/hoặc; trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16.

Sáng chế cũng đề xuất vector, cụ thể là vector truyền, chứa trình tự ADN mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: 1 đến 6 và/hoặc; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; và/hoặc chứa trình tự ADN có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: 9 đến 14 và/hoặc; trình tự ADN có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16.

Vector truyền trong ngữ cảnh của sáng chế tốt hơn là “vector truyền baculovirus”.

Thuật ngữ “vector truyền” đã được thừa nhận trong lĩnh vực này và chỉ phân tử axit nucleic đầu tiên mà axit nucleic thứ hai liên kết vào, và bao gồm ví dụ plasmit, cosmit hoặc thể thực khuẩn.

Theo các phương án nhất định, vector truyền có thể là “vector biểu hiện,” chỉ cấu trúc ADN sao chép được được sử dụng để biểu hiện ADN mã hóa protein mong muốn và bao gồm đơn vị dịch mã chứa tập hợp (i) các yếu tố di truyền có vai trò điều chỉnh sự biểu hiện gen, chẳng hạn, đoạn khởi đầu, đoạn chỉ huy, hoặc đoạn tăng cường, được liên kết theo cách vận hành được với (ii) trình tự ADN mã hóa protein mong muốn mà được phiên mã thành mRNA và dịch mã thành protein, và (iii) các trình tự khởi đầu và kết thúc phiên mã và dịch mã thích hợp. Việc lựa chọn đoạn khởi đầu và các yếu tố điều hòa khác thường thay đổi theo tế bào chủ được dự định. Nói chung, các vector biểu hiện được dùng trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng “plasmit,” chỉ các vòng ADN sợi kép, mà ở dạng vector của chúng không liên kết với nhiễm sắc thể. Sáng chế được dự định bao gồm các dạng vector biểu hiện khác có chức năng tương đương và mà sau khi mô tả ở đây trở thành đã biết trong lĩnh vực này.

Các vector truyền có thể chứa các yếu tố điều hòa để kiểm soát việc phiên mã hoặc dịch mã, mà có thể thường thu được từ gen động vật có vú, vi sinh vật, virus hoặc

côn trùng. Khả năng sao chép trong vật chủ, thường có được nhờ điểm khởi đầu sao chép, và gen chọn lọc để hỗ trợ việc nhận dạng thể biến nạp, có thể được kết hợp thêm vào.

Các vector truyền thu được từ virus, mà có thể gọi là “vector virus,” có thể được sử dụng theo các phương án nhất định của sáng chế. Một số ví dụ bao gồm baculovirus, retrovirus, adenovirus và các virus tương tự. Các vector virus, cụ thể là vector baculovirus, ví dụ, vector truyền baculovirus, được đặc biệt ưu tiên theo sáng chế. Như đối với các vector biểu hiện, các vector virus có thể bao gồm các yếu tố điều hòa.

Việc thiết kế vector truyền bất kỳ có thể phụ thuộc vào các yếu tố như việc lựa chọn tế bào chủ cần biến nạp và/hoặc loại protein mong muốn cần biểu hiện. Hơn nữa, số bản sao vector, khả năng kiểm soát số bản sao này và việc biểu hiện protein bất kỳ khác được mã hóa bởi vector, như các dấu chuẩn kháng sinh (ví dụ, ampicillin), cũng có thể được cân nhắc.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch, sau đây còn gọi là “chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế”, trong đó chế phẩm này chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirus trong tế bào côn trùng được nuôi cấy; và một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN theo sáng chế, trong đó virus này tốt hơn đã được bất hoạt; và trong đó protein tái tổ hợp đã nêu tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm protein ORF2 của PCV2 tốt hơn là chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 91%, tốt hơn nữa là ít nhất 92%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 93% hoặc đặc biệt là ít nhất 94% hoặc ít nhất 95% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23; và hemagglutinin cúm, cụ thể là hemagglutinin cúm gia cầm, tốt hơn là protein H5 của virus H5N1, tốt hơn nữa là protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:24; và protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ từ 1 đến 8.

Thuật ngữ “đã bất hoạt”, như được sử dụng ở đây, nghĩa là kháng nguyên không gây bệnh, khi được dùng cho vật chủ động vật có vú hoặc không sao chép trong tế bào chủ.

Đã biết các phương pháp vật lý và hóa học khác nhau để bất hoạt trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “đã bất hoạt” chỉ virus có độc tính hoặc không có độc tính đã được chiếu xạ (cực tím (UV), tia X, tia điện tử hoặc bức xạ gamma), gia nhiệt, hoặc xử lý hóa học để bất hoạt, tiêu diệt, trong khi vẫn giữ được tính sinh miễn dịch của nó. Theo một phương án, virus đã bất hoạt được bộc lộ trong bản mô tả được bất hoạt bằng cách xử lý bằng tác nhân bất hoạt. Các tác nhân bất hoạt thích hợp bao gồm beta-propiolacton, binary hoặc beta- hoặc axetyl-etylenimin, glutaraldehyt, ozon, và formalin (formaldehyt).

Để bất hoạt bằng formalin hay formaldehyt, formaldehyt thường được trộn với nước và rượu metylic để tạo ra formalin. Việc bổ sung rượu metylic ngăn chặn sự thoái hóa hoặc phản ứng chéo trong quá trình hoạt hóa.

Cụ thể hơn, thuật ngữ "đã bất hoạt" nghĩa là virus không còn khả năng sao chép in vivo hoặc in vitro. Ví dụ, thuật ngữ “đã bất hoạt” có thể chỉ virus mà đã được nhân lên in vitro, ví dụ và đã được bất hoạt bằng cách hóa học hoặc vật lý sao cho nó không còn khả năng sao chép.

Tốt hơn nếu virus theo sáng chế đã được bất hoạt là virus được bất hoạt bằng binary etylenimin (BEI).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, bao gồm các bước đưa baculovirus tái tổ hợp mã hóa protein tái tổ hợp đã nêu vào tế bào côn trùng, trong đó tế bào côn trùng này được nhiễm virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, nuôi cấy tế bào côn trùng nuôi dưỡng baculovirus tái tổ hợp và virus ARN đã nêu; và thu hồi protein tái tổ hợp và virus đã nêu, tốt hơn là dịch nổi; và tốt hơn là bao gồm thêm bước ban đầu là chèn trình tự ADN mã hóa protein tái tổ hợp vào vectơ truyền có khả năng đưa trình tự này vào hệ gen của baculovirus, nhờ đó tạo ra baculovirus tái tổ hợp.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kit, cụ thể là kit xét nghiệm, để xác định xem một cá thể đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirus được nuôi cấy trong tế bào côn trùng

hay chưa, trong đó kit này chứa một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ cố định này có khả năng liên kết với một hoặc nhiều dấu chuẩn được chọn từ nhóm gồm kháng thể đặc hiệu với một hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế; một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN theo sáng chế; và một hoặc nhiều phân tử axit nucleic theo sáng chế; và trong đó một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ tốt hơn được chọn từ nhóm gồm protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ: từ 1 đến 6; protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc đặc biệt là 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt, oligonucleotit có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự đặc trưng của trình tự SEQ ID NO:9; và oligonucleotit có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự đặc trưng của trình tự SEQ ID NO:15.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất đoạn môi hoặc cặp đoạn môi, lần lượt được chọn từ nhóm gồm các trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 90% hoặc tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ: từ 17 đến 22.

Theo một khía cạnh khác, chất phản ứng bất giữ theo sáng chế chứa hoặc bao gồm các hạt virus và/hoặc hạt giống như virus của virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng này tốt hơn là virus ARN theo sáng chế, và trong đó chất phản ứng bất giữ có thể thu được bằng phương pháp bao gồm các bước

- i) thu dịch nổi từ sản phẩm nuôi cấy tế bào côn trùng đã nhiễm virus ARN, tốt hơn là virus ARN theo sáng chế, trong đó dịch nổi này chứa các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus của virus ARN, và trong đó các tế bào côn trùng này tốt hơn là không bị nhiễm baculovirus và/hoặc tốt hơn là không được chuyển nhiễm plasmit,
- ii) tách các mảnh vụn tế bào từ các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus qua bước tách bao gồm vi lọc qua ít nhất một bộ lọc, tốt hơn là hai bộ lọc, trong đó

ít nhất một bộ lọc tốt hơn là có cỡ lỗ lớn hơn các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus này, cụ thể là có cỡ lỗ khoảng 0,1 μm đến khoảng 4 μm , tốt hơn là khoảng 0,2 μm đến khoảng 2 μm , và thu gom dịch lọc,

- iii) và tùy ý đưa dịch lọc ở bước ii) chứa các hạt virus và/hoặc các hạt giống như virus vào sắc ký loại trừ theo kích thước, trong đó tốt hơn nếu sự có mặt của protein trong chất giải hấp được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng của chất giải hấp ở 260 nm hoặc 280 nm (A_{260} hoặc A_{280}), và trong đó chất giải hấp này thể hiện đỉnh A_{260} hoặc A_{280} thứ nhất được thu gom.

Tương tự, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất phản ứng bất giữ đã nêu, trong đó chế phẩm này chứa thu được bằng phương pháp đã nêu.

Trong bước sắc ký loại trừ theo kích thước (size-exclusion chromatography - SEC) được mô tả trong bản mô tả, các phân tử được tách theo kích thước trong lớp đệm xếp bởi môi trường xốp trơ, đặc biệt là môi trường gel trơ, tốt hơn là composit của các polysacarit liên kết ngang, ví dụ, agarosa và dextran liên kết ngang ở dạng hạt cầu. Các phân tử lớn hơn lỗ lớn nhất trong các hạt gel đã trương nở không đi vào trong các hạt gel và do đó di chuyển qua tầng sắc ký nhanh nhất. Các phân tử nhỏ hơn, mà đi vào trong các hạt gel ở mức độ thay đổi thay đổi theo kích cỡ và hình dạng của chúng, bị chậm lại trên đường đi qua tầng này. Do đó, các phân tử thường được giải hấp theo trật tự cỡ phân tử giảm dần. Cột SEC chứa môi trường thích hợp để sắc ký loại trừ theo kích thước được mô tả trong bản mô tả tốt hơn là cột HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR (GE Healthcare Bio-Sciences).

Cần hiểu cụ thể rằng chất giải hấp thể hiện đỉnh A_{260} hoặc A_{280} đầu tiên là phân đoạn dịch lọc ở bước ii) chứa các cấu trúc protein lớn nhất có trong dịch lọc ở bước ii). Do đó, chất giải hấp thể hiện đỉnh A_{260} hoặc A_{280} đầu tiên là chất giải hấp, hoặc phần của nó, chứa phần lớn các hạt virus và/hoặc hạt giống như virus có trong dịch lọc ở bước ii).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế. Các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1:**Gây nhiễm tế bào Sf bằng rhabdovirus, sản xuất rhabdovirus bán tinh chế, và tách dòng và biểu hiện kháng nguyên rhabdovirus**

Để khẳng định sự gây nhiễm tế bào SF+ và Sf9 bởi rhabdovirus, sau đây còn gọi là SFRV hoặc SFRV (rhabdovirus tế bào Sf), các đoạn môi được thiết kế để khuếch đại các gen SFRV G và N với mục đích chèn các vị trí giới hạn 5' và 3' đặc biệt. Ngoài ra, đoạn môi đầu 3' được thiết kế để bổ sung vị trí phân cắt proteaza của virut khảm thuốc lá (tobacco etch virus - TEV) sau đó là đuôi 6X histidin. Việc này được thực hiện để có thể tinh chế protein được biểu hiện trên cột nicken bằng đuôi His và sau đó cắt bỏ đuôi His bằng proteaza TEV để tạo ra protein G hoặc N tự nhiên.

Các trình tự đoạn môi được sử dụng cho cấu trúc gen G (chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1) là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18, trình tự axit nucleic của cấu trúc gen G được đưa ra trong SEQ ID NO:12, và trình tự axit amin của cấu trúc gen G là trình tự SEQ ID NO:4.

Trình tự các đoạn môi được sử dụng cho cấu trúc gen N (chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:7) là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21 và 22, trình tự axit nucleic của cấu trúc gen N được đưa ra trong SEQ ID NO:16, và trình tự axit amin của cấu trúc gen N là trình tự SEQ ID NO:8.

Hơn nữa, các vùng xuyên màng và nội bào của glycoprotein SFRV G được dự đoán bằng phần mềm TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) được mô tả trong K. Hofmann & W. Stoffel (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166, TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) sử dụng mô hình Markov ẩn được mô tả trong Möller S1, Croning MD, Apweiler R., Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions, Bioinformatics (2001) 17 (7): 646-653 và SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>). Dựa trên các kết quả từ TMpred và TMHMM, trình tự SFRV G được kết thúc ở axit amin 550 và vị trí phân cắt TEV, đuôi 6X His và các vị trí Pst I được bổ sung vào. Các trình tự đoạn môi dùng được cho các cấu trúc gen G (chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:2) là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và 19, trình tự axit nucleic của cấu trúc gen G được đưa ra trong SEQ ID NO:13, và trình tự axit amin của cấu trúc gen G là trình tự SEQ ID NO:5.

Hơn nữa, trình tự tín hiệu tiết melittin của ong mật được dung hợp vào trình tự SFRV G cắt cụt (Chouljenko *et al.* J Virol, 84:8596–8606 (2010); Tessier *et al.* Gene. 98:177-83 (1991)), trong đó trình tự melittin được bổ sung vào SFRV G có độ dài đầy đủ với vị trí phân cắt TEV và 6X His bằng cách thay thế đầu tận cùng N của nó. Các trình tự đoạn môi dùng được cho các cấu trúc gen G (chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:3) là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 và 18, trình tự axit nucleic của cấu trúc gen G được đưa ra trong SEQ ID NO:14, và trình tự axit amin của cấu trúc gen G là trình tự SEQ ID NO:6.

Toàn bộ trình tự hệ gen của SFRV theo MA *et al.* (J Virol. 88: 6576-6585 (2014)) được lưu trữ trong GenBank (số truy cập KF947078) được sử dụng làm cơ sở để thiết kế đoạn môi. Tương tự, đối với vị trí phân cắt TEV, trình tự ENLYFQG được sử dụng dựa trên các thông tin đã công bố.

SFRV được tinh chế từ môi trường đã qua sử dụng cho sự sinh trưởng Sf9 (các tế bào bám dính) và Sf+ (các tế bào lơ lửng): Môi trường đã qua sử dụng được thu gom từ SFRV đã gây nhiễm và tùy ý các tế bào Sf9 và Sf+ đã nhân giống và lọc qua bộ lọc 0,2 micromet để loại bỏ mảnh vụn tế bào. Sau đó, dịch lọc được tải trên đệm sacaroza trong dung dịch đệm NaCl-Tris HCl-EDTA (NTE) độ pH=7,4 và siêu ly tâm ở 32000 vòng/phút ở 4°C trong 3 giờ. Dịch nổi được cẩn thận hút ra và phần kết viên được loại nước và tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm NTE. Hàm lượng protein được xác định trên thiết bị nanodrop và các protein được đánh số mẻ và làm lạnh đông ở $\leq -70^{\circ}\text{C}$ đến khi sử dụng tiếp. Chế phẩm kháng nguyên này chứa virus đã bán tinh chế để phủ lên đĩa ELISA, như được mô tả dưới đây.

Môi trường SF9 đã qua sử dụng được dùng làm nguồn chiết ARN virus SFRV. Kit chiết ARN virus QIAamp (Qiagen) được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Để khuếch đại các gen G và N, kit One-Step Superscript III được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gradien RT-PCR được dùng theo các điều kiện sau: 1 chu kỳ ở 60°C trong 30 phút (bước RT) tiếp theo là một chu kỳ ở 94°C trong 2 phút. Sau đó là 40 chu kỳ ở 94°C trong 15 giây, gradien ủ ở 75°C-50°C trong 60 giây, tiếp theo là kéo dài ở 68°C trong 2 phút. Cuối cùng phản ứng được tạo chu kỳ đơn ở 68°C trong 5 phút và giữ không đổi ở 4°C.

Các sản phẩm khuếch đại được cho chạy trên gel để kiểm tra kích thước. Các băng gel có kích thước mong đợi được cắt khỏi gel và tinh chế bằng kit chiết gel Qiaquick theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Fig. 1).

Trong phần sau đây, chỉ mô tả các việc tiếp theo sử dụng gen G (chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1).

Gen G được khuếch đại (băng phía trên trong Fig. 1) với kích thước mong đợi ~1,6Kb được cắt ra và chiết gel, như đã mô tả trên đây. Sau đó gen này được cắt bằng enzym giới hạn Eco RI và Pst I. Sản phẩm cắt là đoạn chèn. Tương tự, plasmid vector truyền baculovirus pVL1393 (Pharmlingen) được cắt bằng các enzym giới hạn Eco RI và Pst I để tạo ra vector. Đoạn chèn và vector đã cắt được chạy trên gel (xem Fig. 2) để kiểm tra sự tuyến tính của vector. Các băng được cắt ra và gel được chiết và vector được khử phosphoryl hóa. Tách dòng đoạn chèn (cấu trúc SFRV-G được cắt bằng Eco RI-PstI) vào vector (pVL1393 được cắt bằng Eco RI-PstI, khử phosphoryl hóa) và lai ghép bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn.

Sản phẩm lai ghép được sử dụng để biến nạp vào tế bào E. coli (các tế bào khả biến hóa học hiệu lực DH5 α One Shot Max của hãng Invitrogen) và các tế bào được đưa vào đĩa trên thạch agar LB với ampicilin. Các khuẩn lạc được nhặt vào ngày hôm sau và sàng lọc để chọn plasmid bằng phương pháp PCR khuẩn lạc và đánh số dòng vô tính.

Các điều kiện phản ứng cho PCR khuẩn lạc là như sau: một chu kỳ ở 98°C trong 3 phút tiếp theo là 34 chu kỳ biến tính ở 98°C trong 30 giây, ủ ở 58°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. Sau bước này là bước kéo dài lần cuối ở 72°C trong 10 phút và cuối cùng giữ ở 4°C.

Các sản phẩm PCR được chạy trên gel agarosa để nhận dạng các dòng vô tính chứa plasmid (xem Fig. 3).

Sau đó, các dòng dương tính được nuôi trong môi trường lỏng LB-ampicilin và plasmid được tinh chế từ giống nuôi cấy bằng kit tinh chế plasmid Qiaprep miniprep (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vector truyền được tạo ra từ đó chứa cấu trúc gen SFRV G và được chia thành các phần phân ước, đánh số mề.

Để tạo ra baculovirut tái tổ hợp biểu hiện cấu trúc gen SFRV G, plasmit truyền được đồng chuyển nhiễm với khung ADN flashBAC ULTRAbaculovirut đã tuyến tính hóa (Genway biotech) vào các tế bào Sf9 bằng cách sử dụng các chất phản ứng chuyển nhiễm ESCORT (SAFC). Sau một tuần, dịch nổi từ mẻ chuyển nhiễm (p0) được ủ với tế bào Sf9 mới để khuếch đại baculovirut tế bào chủ bất kỳ mà có thể đã được tạo ra.

Phần tế bào kết viên từ mẻ chuyển nhiễm được thu gom và chạy trên gel SDS và chuyển sang màng nitrocellulose để thẩm tách Western. Protein được dò bằng kháng thể kháng His (Invitrogen). Cỡ protein được dự đoán là ~71,5KDa. Gel thể hiện (**Fig. 4**) hai băng gần nhau ở dấu chuẩn 62KDa và trên đó đối với cả năm dòng vô tính được thử nghiệm (2, 5, 7, 10 và 11) nhưng không có băng nào ở hàng tế bào đối chứng (cc).

Các dòng vô tính 2 và 5 chứa virut tái tổ hợp được cấy chuyển tiếp và nuôi trong các bình lắc để sản xuất khối lượng lớn protein trong giống nuôi cấy Sf+ dạng huyền phù. Dịch nổi, các phân đoạn tế bào hòa tan và không hòa tan được dò tìm protein. Ở thời điểm này, protein chỉ có trong phần không tan (Fig. 5). Kết quả là, các đoạn cắt cụt đầu tận cùng C của các glycoprotein SFRV G được tạo ra ở bước tiếp theo để sử dụng trong thử nghiệm ELISA.

Ví dụ 2:

Phát triển bằng ELISA

Thử nghiệm ELISA được thiết kế để đánh giá sự có mặt của đáp ứng kháng thể chống lại SFRV ở các động vật được chủng ngừa bằng vacxin PCV2 hoặc các vacxin dưới đơn vị khác chứa baculovirut được biểu hiện trong các tế bào Sf nhiễm SFRV. Một cách vắn tắt, các đĩa ELISA được phủ kháng nguyên SFRV bán tinh chế 250ng/giếng (như đã mô tả trên đây) từ dịch nổi tế bào Sf9 hoặc Sf+.

- Việc phủ này được thực hiện bằng cách pha loãng kháng nguyên trong đệm carbonat-bicarbonat độ pH=9,0 để tạo ra nồng độ cuối là 250ng/giếng. Việc phủ được tiến hành ở 4°C qua đêm.
- Các đĩa được rửa vào ngày hôm sau bằng PBS-Tween (PBST) và phong bế bằng 10% sữa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.
- Sau đó, các đĩa được dò bằng huyết thanh pha loãng 1:100 (trong đệm phong bế) từ các động vật được chủng ngừa bằng kháng nguyên dưới đơn vị PCV2,

baculovirut được biểu hiện trong các tế bào Sf nhiễm SFRV, hoặc đối chứng không được chủng ngừa bằng vacxin (xem mục dữ liệu).

- Các đĩa được ủ ở 37°C trong 1 giờ và sau đó rửa 5X lần bằng PBST để loại bỏ các kháng thể không liên kết.
- Sau đó các đĩa được dò bằng kháng thể thứ cấp (thể liên hợp IgG H+L của dê kháng lợn-HRP – Bethyl laboratories) đã pha loãng 1:10.000, ủ ở 37°C trong 1 giờ và sau đó rửa 5X lần bằng PBST để loại bỏ các kháng thể không liên kết.
- Cuối cùng, cơ chất SureBlue TMB (KPL) được bổ sung vào và các đĩa được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ngừng phản ứng bằng dung dịch ngừng phản ứng TMB (KPL).
- Sau đó các đĩa được đọc ở 450nm.

Thiết lập đĩa ELISA là như sau:

- Dòng a, các giếng 1-10 được phủ bằng SFRV thu được từ Sf9
- Dòng b, các giếng 1-10 được phủ bằng SFRV thu được từ Sf+
- Huyết thanh lợn được đánh giá theo bộ đôi và các động vật được chủng ngừa bằng kháng nguyên dưới đơn vị PCV2 (A, B) được in đậm. Các đĩa này cần thể hiện kết quả dương tính nếu các động vật đã tiếp xúc với SFRV qua chủng ngừa bằng vacxin và tạo ra kháng thể kháng SFRV.
- Các đối chứng âm được in nghiêng (C và D)
- Các cột 9 và 10 là đối chứng dung dịch đệm (khoogn chứa kháng thể sơ cấp)

Kết quả ELISA được thể hiện trong **bảng 1**.

Bảng 1:

	A		B		C		D			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dòng A	0,774	0,626	0,217	0,215	<i>0,058</i>	<i>0,098</i>	<i>0,095</i>	<i>0,091</i>	0,044	0,039
Dòng B	1,857	0,909	1,556	1,028	<i>0,993</i>	<i>0,554</i>	<i>0,104</i>	<i>0,103</i>	0,041	0,033

Bảng 1 thể hiện dữ liệu đánh giá kháng nguyên SfRV thu được từ các tế bào Sf9 (dòng A) và tế bào Sf+ (dòng B). Bốn mẫu huyết thanh được đánh giá theo bộ đôi. Các cột A và B chứa huyết thanh ngày 28 từ các động vật được chủng ngừa bằng vacxin thử nghiệm trong khi các cột C và D chứa huyết thanh từ các động vật đối chứng âm. Kết quả thể hiện rằng cả tế bào Sf9 và Sf+ chứa SfRV và có thể sử dụng làm kháng nguyên virus. Hơn nữa, khả năng nhận biết cụ thể kháng nguyên ở các động vật được chủng ngừa bằng vacxin mà không phải là các động vật đối chứng cho thấy sự hữu dụng của SfRV dưới dạng dấu chuẩn tuân thủ cổ hữu.

Giải thích dữ liệu:

- Dựa trên kết quả ELISA, các động vật được chủng ngừa bằng kháng nguyên dưới đơn vị PCV2 (nhóm A và B) thể hiện đáp ứng tốt chống lại SFRV bán tinh chế.
- Các động vật đối chứng âm (nhóm C và D) không thể hiện phản ứng với SFRV bán tinh chế.
- Kết quả này thể hiện tính hữu dụng của SFRV để đánh dấu tuân thủ cổ hữu và để dùng cho phương pháp DIVA.

Ví dụ 3:

ELISA sử dụng kháng nguyên SFRV (trong đó kháng nguyên này là protein chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số: từ 1 đến 6, hoặc trong đó kháng nguyên này là virus tinh chế hoặc bán tinh chế theo sáng chế) được mô tả trên đây

Quy mô: Mẫu huyết thanh thử nghiệm (hoặc dịch từ miệng) để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng kháng nguyên SFRV

Vật liệu và phương pháp

A. Thiết bị

- Máy rửa ELISA
- Đầu đọc ELISA
- WFI để nuôi cấy tế bào, USP (Gibco, catalog# A12873-02)

- Viên đệm carbonat-bicarbonat (độ pH=9,6) (Sigma, catalog# C3041-100CAP)
- Đĩa miễn dịch 96 giếng (đĩa đáy tròn hoặc đáy phẳng, Nunc Maxisorb)
- Pipet 12 kênh, các pipet nhiều loại trong khoảng từ 1 μ L đến 1 mL.
- Đầu pipet
- Máy ủ 37°C
- Tủ lạnh 4°C
- Thiết bị xoáy
- Tấm đáy đĩa (Thermo, catalog# AB-0752)
- Dịch phong bế S-block 2mL (Phenix catalog# M-1810S, hoặc tương đương)
- Nguồn cung chất phản ứng
- Dụng cụ tính giờ

B. Các chất phản ứng

1. Đệm phủ: Đệm carbonat-cicarbonat

- 100 mL WFI
- 1 viên nang chứa đệm carbonat-bicarbonat
- Mở viên nang, pha bột vào WFI, trộn đến khi hòa tan
- Lọc khử trùng dung dịch bằng cách sử dụng bộ lọc 0,2 μ m
- Bảo quản ở 4°C
- Hạn sử dụng: 1 tuần
- Cần cho mỗi thử nghiệm (4 đĩa): 50mL

2. 10X PBS:

- 1 gói PBS đặc, Fisher BP665-1
- thêm lượng GenPur H₂O (hoặc tương đương) đủ đến 1L
- bảo quản ở nhiệt độ trong phòng

- Hạn sử dụng: 1 năm
3. Dung dịch đệm rửa: 0,05% Tween 20 trong PBS Dulbeccos.
- 0,5 mL Tween 20, Fisher BP337, hoặc tương đương
 - 100 mL 10X D-PBS, độ pH = 7,2-7,4
 - thêm lượng GenPur H₂O (hoặc tương đương) đủ đến 1L
 - Độ pH đến 7,2 ± 0,1
 - bảo quản ở nhiệt độ trong phòng
 - Hạn sử dụng: 6 tháng
 - Cần cho mỗi thử nghiệm (4 đĩa): 2 L
4. PBST:
- 500mL 1X PBS độ pH 7,4 (Gibco, catalog# 10010-023)
 - 0,3 mL tween 20, Fisher BP337, hoặc tương đương
 - Bảo quản ở nhiệt độ trong phòng
 - Hạn sử dụng: 6 tháng
 - Cần cho mỗi thử nghiệm (4 đĩa): 100mL
5. Dung dịch phong bế: 10% sữa khô không béo trong dung dịch PBST.
- 20 g chất phong bế cấp độ thẩm tách, Bio-Rad 170-6404, hoặc tương đương
 - 200 mL PBST
 - Bảo quản ở 4°C
 - Hạn sử dụng: 0 ngày
 - Cần cho mỗi thử nghiệm (4 đĩa): 200mL
6. Kháng nguyên SFRV:
- Dịch nuôi cấy nổi tế bào SF hoặc SF+ không gây nhiễm được lọc qua bộ lọc 0,2 micromet (Thermo cat 456-0020). Trong ngữ cảnh này, “dịch nuôi cấy nổi tế bào SF hoặc SF+ không gây nhiễm” nghĩa là dịch nổi của tế bào SF

hoặc SF+ trong môi trường nuôi cấy, trong đó các tế bào này không được gây nhiễm baculovirus, nhưng được gây nhiễm SFRV.

- Hơn nữa, trong ngữ cảnh về các tế bào được mô tả trong bản mô tả, thuật ngữ “SF” tương đương với thuật ngữ “Sf”, thuật ngữ “SF+” tương đương với thuật ngữ “Sf+”, và thuật ngữ “SF9” tương đương với thuật ngữ “Sf9”.
 - Dịch lọc được tải trên đệm 30% sacaroza và ly tâm ở 28.000-34.000 vòng/phút ở 4°C trong 2-4 giờ
 - Sau khi ly tâm, dịch nổi được cẩn thận hút ra và phần kết viên được tạo huyền phù lại trong đệm NaCl-Tris-EDTA độ pH=7,4
 - Đây là kháng nguyên bán tinh chế.
 - Nồng độ protein được đánh giá bằng phương pháp phân tích quang phổ và protein được chia thành các phần phân ước và làm lạnh đông ở -70°C đến khi sử dụng
7. 2° kháng thể: Kháng thể IgG dê kháng lợn h+I HRP liên hợp. Bethyl Labs Cat. No. A100-105P, bảo quản ở 4°C $\pm$ 3,0°C.
8. Cơ chất: Cơ chất peroxidaza SureBlue TMB 1-Component Microwell. Kirkgaard and Perry Laboratories Cat No. 52-00-01 hoặc tương đương. Cơ chất được bảo quản ở 4°C $\pm$ 3,0°C, ủ sơ bộ ở 25°C $\pm$ 2,0°C, và sử dụng ở 25°C $\pm$ 3,0°C.
9. Dung dịch ngừng phản ứng: Dung dịch ngừng phản ứng TMB. Kirkgaard and Perry Laboratories Cat No. 50-85-04 hoặc tương đương. Bảo quản ở nhiệt độ trong phòng.

C. Quy trình

1. Chuẩn bị dung dịch đệm phủ theo công thức được liệt kê trong mục B1 trên đây.
2. Pha loãng kháng nguyên SFRV trong đệm phủ đến 250ng/giếng. Trộn kháng nguyên bằng cách lộn ngược 10 lần. Phủ bằng 250ng/100 μ l (tức là 2,5 μ g/ml = 250ng/giếng).
3. Bổ sung 100 μ L kháng nguyên SFRV đã pha loãng vào tất cả các giếng,

4. Đậy (các) đĩa thử nghiệm bằng tấm đậy đĩa và ủ qua đêm ở 4°C , đặt xuống đáy tủ lạnh để giảm thiểu xáo trộn.

Ngày hôm sau

5. Chỉ chuẩn bị đủ dung dịch phong bế cho thử nghiệm hiện thời. Khuyến nghị là 200mL dung dịch phong bế cho 4 đĩa. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến khi cần.
 6. Rửa (các) đĩa thử nghiệm 5 lần bằng dung dịch đệm rửa bằng máy rửa đĩa ultrawash plus microtiter plate, hoặc tương đương.
 7. Bổ sung 100 μL dung dịch đệm phong bế vào tất cả các giếng của (các) đĩa thử nghiệm. Đậy (các) đĩa thử nghiệm này và ủ trong 1,0 giờ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
 8. Trong quá trình ủ phong bế, pha loãng các mẫu huyết thanh thử nghiệm 1:100 trong dung dịch phong bế trong s-block. Đối với các dịch từ miệng, pha loãng mẫu 1:2 trong dung dịch phong bế. . Mỗi mẫu được thử nghiệm riêng. Pha loãng các đối chứng dương và âm theo cùng cách. .
 9. Rửa (các) đĩa 1X lần. Sau lần rửa cuối vỗ nhẹ các đĩa lên khăn giấy.
 10. Bổ sung 100 μL mỗi giếng mẫu thử nghiệm đã pha loãng trước vào (các) tương ứng. Trách chạm đầu pipet vào giếng. Thay các đầu pipet giữa mỗi mẫu thử nghiệm.
- Đậy (các) đĩa thử nghiệm này và ủ trong 1,0 giờ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ đối với các mẫu huyết thanh. Đối với các mẫu dịch từ miệng ủ trong 16,0 giờ ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
11. Ngay trước khi rửa (các) đĩa thử nghiệm, lấy lọ kháng thể thứ cấp khỏi tủ lạnh và pha loãng đến 1:10.000 trong dung dịch phong bế. Khuyến nghị chuẩn bị các dịch pha loãng hàng loạt để đạt được độ pha loãng 1:10.000 (4 dịch pha loãng). Trộn kháng thể đã pha loãng bằng cách lộn ngược 10 lần.
 12. Rửa (các) đĩa thử nghiệm 5 lần.
 13. Bổ sung 100 μL kháng thể phát hiện đã pha loãng vào tất cả các giếng của (các) đĩa thử nghiệm. Đậy (các) đĩa thử nghiệm này và ủ trong 1,0 giờ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

14. Ngay lập tức lấy cơ chất peroxidaza SureBlue TMB 1-Component Microwell ra khỏi tủ lạnh ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) và chuyển một thể tích thích hợp vào dụng cụ chứa màu nâu, hoặc mờ đục, High Density Polyethylene (HDPE), và ủ trong 1 giờ $\pm$ 15 phút ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (bench top).
15. Rửa (các) đĩa thử nghiệm 5 lần. Sau lần rửa cuối vỗ nhẹ các đĩa lên khăn giấy. Khuyến nghị bật máy đọc đĩa trong khi rửa (các) đĩa.
16. Bổ sung 100 μL cơ chất vào tất cả các giếng của (các) đĩa thử nghiệm.
17. Ủ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút.
18. Ngừng phản ứng bằng cách bổ sung 100 μL dung dịch ngừng phản ứng vào tất cả các giếng
19. Đo độ hấp thụ ở 450nm.

D. Tiêu chuẩn chấp nhận / Kết quả

- Đối chứng dương: huyết thanh (hoặc dịch từ miệng) từ lợn được gây miễn dịch bằng glycoprotein SFRV/SRFV G
- Huyết thanh lợn tự nhiên (hoặc các dịch từ miệng) hoặc huyết thanh lợn (hoặc các dịch từ miệng) của lợn không được chủng ngừa bằng vacxin thể hiện là không phản ứng với kháng nguyên SFRV hoặc phản ứng không đáng kể

Ví dụ 4:

Sản xuất rhabdovirus bán tinh chế, sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC), PCR thời gian thực, soi kính hiển vi triện tử các phân đoạn SEC, và ELISA

Sản xuất rhabdovirus bán tinh chế:

Trước khi tải lên cột, rhabdovirus bán tinh chế được tạo ra trong đó dịch nổi nuôi cấy tế bào (40 mL) của tế bào côn trùng Sf+ nhiễm SfRV được cô đặc từ 5 L xuống còn 800 mL bằng cách lọc sợi rỗng được lọc qua bộ lọc xi lanh 1,2 μm . Dịch lọc thu được là “rhabdovirus bán tinh chế” theo ví dụ này.

Sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC):

Phép sắc ký loại trừ theo kích thước được chạy bằng cách sử dụng các điều kiện đăng dòng trên thiết bị AKTA Explorer với cột HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR (GE

Healthcare Bio-Sciences) ở tốc độ dòng 1 mL/phút. Cột này được cân bằng bằng 1,5 thể tích cột đệm (1X nước muối đệm bằng phosphat, độ pH = 7,4, Gibco) sau đó bơm mẫu đã lọc (khoảng 5% thể tích cột) rhabdovirus bán tinh chế được sản xuất theo mục (i). Việc tách được thực hiện ở tốc độ dòng 1,0 mL/phút bằng 1,5 thể tích cột đệm, và các phân đoạn (8 mL) được thu gom từ thời điểm bơm qua toàn bộ bước tách. Việc giải hấp các protein từ cột được theo dõi bằng độ hấp thụ UV ở 280 nm (Fig. 6)

Các phân đoạn được phân tích bằng 4-12% SDS-PAGE (Thermo Fisher) sau khi cô đặc các phân đoạn đỉnh bằng cách kết tủa TCA/axeton. Một cách vắn tắt, 1 mL mỗi phân đoạn được kết tủa bằng TCA (200 μ L) trong 1 giờ trên nước đá. Các mẫu được ly tâm trong 2 phút ở 20.000 xg, và dịch nổi được lấy ra. Các phân đoạn được rửa bằng 500 μ L axeton lạnh băng và trộn bằng cách xoay tiếp theo là ly tâm trong 2 phút ở 20.000 xg. Các bước ly tâm và axeton được lặp lại trong tổng số ba lần rửa bằng axeton. Phần kết viên được làm khô trong 20 phút, tạo huyền phù lại trong 20 μ L đệm tải gel, và tải lên gel. Các gel được nhuộm trong 1 giờ bằng thuốc nhuộm protein Imperial (Thermo Fisher) và làm mất màu trong ít nhất 3 giờ trong nước khử ion. Sau khi phân tích gel, nồng độ protein của các phân đoạn được xác định bằng thử nghiệm BCA (Thermo Fisher) bằng cách sử dụng albumin huyết thanh bò làm chuẩn.

PCR thời gian thực

Sự có mặt của ARN SfRV trong rhabdovirus bán tinh chế (dịch lọc) ở bước (i) và trong các phân đoạn thu gom được bằng SEC ở bước (ii) được phát hiện/định lượng bằng cách sử dụng các phương pháp và trình tự sau cho PCR thời gian thực:

Các đoạn môi/các mẫu dò/đối chứng G-block:

Tên	Trình tự	Vị trí trong hệ gen*
Rhab_qPCR-F	SEQ ID NO:25	5584-5603
Rhab_qPCR-R	SEQ ID NO:26	5654-5672 (RC)
Rhab_qPCR-PR (FAM)	SEQ ID NO:27	5624-5646 (RC)
Rhab_gBlock	SEQ ID NO:28	5565-5690

* Vị trí trong hệ gen dựa trên chủng tham chiếu GenBank: KF947078. Tất cả các trình tự hướng đích đến vùng mã hóa glycoprotein SfRV

Các điều kiện chu kỳ:

1 chu kỳ ở 50°C trong 10 phút

1 chu kỳ ở 95°C trong 3 phút

40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây.

57°C trong 15 giây **Thu thập dữ liệu (FAM)

Mô tả vắn tắt các bước được thực hiện:

Việc khuếch đại được tiến hành bằng cách sử dụng kit BioRad iTaq Universal Probes One-Step (Cat # 172-5141) theo quy trình được đề xuất bởi nhà sản xuất. Các đoạn mồi được bổ sung vào đến nồng độ cuối là 0,4 μ M trong 25 μ l phản ứng trong khi mẫu dò được bổ sung vào đến nồng độ cuối là 0,16 μ M. Ở mỗi lần chạy, đường cong chuẩn bao gồm trình tự G-block (IDT) mạch kép tổng hợp tương ứng với sản phẩm khuếch đại dự kiến. Phản ứng diễn ra bằng hệ thống phát hiện PCR thời gian thực CFX96 (BioRad) trong các điều kiện sau: phiên mã ngược ban đầu ở 50°C trong 10 phút, sau đó biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 15 giây và ủ và kéo dài ở 57°C trong 15 giây với dữ liệu thu thập theo kênh FAM. Dữ liệu quang học được phân tích sử dụng phần mềm quản lý CFX (phiên 2.1, BioRad). Các lần chạy được cho là hợp lệ dựa trên: tính thống nhất của đường cong chuẩn, giá trị r bình phương vượt quá 0,99 và độ hữu hiệu theo tính toán nằm trong khoảng 80-120%. Đối với mỗi một lần xác định, các đường về ngưỡng được tính toán một cách tự động sử dụng thiết lập hồi quy cho phương thức xác định ngưỡng chu kỳ (Ct). Phép trừ tại mốc cơ sở được thực hiện một cách tự động sử dụng phương thức trừ tại mốc cơ sở.

Các kết quả PCR thời gian thực được thể hiện trên Fig.7.

Trên Fig. 7:

Cột 1 là số giếng. Cột 2 thể hiện phần tử mang huỳnh quang 6-carboxyfluorescein (FAM) được liên kết với mẫu dò đặc hiệu được sử dụng trong phương pháp PCR thời gian thực. Cột 3 là các phân đoạn kháng nguyên SfRV thu được từ bước sắc ký loại trừ theo kích thước (các phân đoạn A11, A12, B1, B5, B12 và C6) hoặc các chuẩn với lượng axit nucleic đặc hiệu SfRV đã biết được sử dụng để tạo ra đường cong chuẩn (các giếng 7 -14). Giếng 15 là đối chứng âm (không có

khuôn) và giếng 16 là đối chứng dương chứa kháng nguyên SfRV đậm đặc trước khi phân đoạn theo kích thước (SEC).

Chu kỳ định lượng (Cq) là chu kỳ mà ở đó huỳnh quang được phát hiện. Giá trị Cq thấp hơn cho thấy số bản sao cao hơn của đích đặc hiệu trong mẫu. Dữ liệu này được thể hiện trên cột 4. Số bản sao hệ gen ngoại suy được thể hiện trên cột 5 để định lượng trình tự (SQ) và thể hiện số bản sao hệ gen trong một mL.

Dữ liệu thể hiện rằng nguyên liệu ban đầu có 6 log bản sao hệ gen đặc hiệu SfRV/mL (giếng 16), các phân đoạn tương tự A11 và A12 có 6 log bản sao hệ gen/mL. Hai phân đoạn này cùng với phân đoạn đuôi B1 cần chứa chủ yếu là các hạt virus/virion SfRV và các hạt giống như virus (VLP). Các phân đoạn khác B5, B12 và C6 cần chứa các hạt virus dưới đơn vị trong SEC và do đó, chứa lượng ARN virus thấp hơn, nếu có.

Kính hiển vi điện tử:

Các phân đoạn được thu gom bằng SEC ở bước (ii) được nhuộm bằng axit phospho vonfram 2,5% (PTA) trong 3 phút (nhuộm âm tính) để phân tích bằng kính hiển vi điện tử. Trong các phân đoạn A11 và A12 (xem Fig. 6) các hạt kích thước ~30-35 nm được quan sát, các hạt này được xem là hạt virus SfRV.

ELISA:

Phương pháp ELISA được thực hiện như mô tả trong ví dụ 2, trong đó nguyên liệu và phương pháp được mô tả trong ví dụ 3 được sử dụng, khác biệt ở chỗ thay vì “kháng nguyên SFRV” (theo điểm B. 6 của ví dụ 3), rhabdovirus bán tinh chế (dịch lọc) ở bước (i) và các phân đoạn A11, A12, và B1 được thu gom bằng SEC ở bước (ii) được sử dụng, mỗi thành phần này được pha loãng trong đệm phủ đến nồng độ 250 ng trong 100 μ l, và sau đó 100 μ l mỗi kháng nguyên này được phủ lên giếng.

Các mẫu huyết thanh thử nghiệm, huyết thanh từ động vật được gây miễn dịch bằng vaccin thử nghiệm được sử dụng, vaccin này chứa protein tái tổ hợp được sản xuất bằng hệ biểu hiện baculovirus trong tế bào côn trùng nhiễm SfRV được nuôi cấy. Huyết thanh thu được từ máu lấy từ các động vật 28 ngày sau khi sử dụng vaccin thử nghiệm.

Huyết thanh của động vật tương ứng không được gây miễn dịch được dùng làm đối chứng âm.

Kết quả ELISA được thể hiện trên Fig.8.

Các đĩa ELISA được phủ bằng bốn kháng nguyên khác nhau bao gồm SfRV bán tinh chế (nhóm A), các phân đoạn sắc ký loại trừ theo kích thước A11 (nhóm B), A12 (nhóm C) và B1 (nhóm D). Các đĩa này được dò bằng huyết thanh từ các động vật đối chứng âm (hình tam giác ngược) hoặc huyết thanh ngày 28 từ các động vật được cho dùng vaccin thử nghiệm chứa SfRV (hình tròn).

Kết quả thể hiện rằng huyết thanh từ động vật được chủng ngừa bằng vaccin phản ứng với kháng nguyên được phủ lên trong khi huyết thanh đối chứng âm chỉ phản ứng ở mức tối thiểu. Hơn nữa, các động vật được chủng ngừa bằng vaccin phản ứng mạnh với các giếng phủ bằng các phân đoạn A11, A12 và B1 (nhóm B, C và D) với bằng chứng là giá trị OD tăng và phản ứng với các phân đoạn này kết cụm chặt hơn so với SfRV bán tinh chế (nhóm A). Điều này cho thấy khả năng nhận biết mạnh hơn và đáp ứng đặc hiệu hơn với kháng nguyên đã phủ lên (các phân đoạn A11, A12 và B1).

Trong danh mục trình tự:

SEQ ID NO:1 tương ứng với trình tự protein G của SFRV,

SEQ ID NO:2 tương ứng với trình tự protein G của SFRV cắt cụt,

SEQ ID NO:3 tương ứng với trình tự protein G của SFRV cắt cụt với trình tự melittin ở đầu tận cùng N,

SEQ ID NO:4 tương ứng với SEQ ID NO:1 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His),

SEQ ID NO:5 tương ứng với SEQ ID NO:2 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His),

SEQ ID NO:6 tương ứng với SEQ ID NO:3 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His),

SEQ ID NO:7 tương ứng với trình tự protein N của SFRV,

SEQ ID NO:8 tương ứng với SEQ ID NO:7 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His),

SEQ ID NO:9 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:1,

SEQ ID NO:10 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:2,

SEQ ID NO:11 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:3,

SEQ ID NO:12 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:13 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:5,
SEQ ID NO:14 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:6,
SEQ ID NO:15 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:7,
SEQ ID NO:16 tương ứng với trình tự mã hóa SEQ ID NO:8,
SEQ ID NO:17 tương ứng với đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13,
SEQ ID NO:18 tương ứng với đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:14,
SEQ ID NO:19 tương ứng với đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:13,
SEQ ID NO:20 tương ứng với đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:14,
SEQ ID NO:21 tương ứng với đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:16,
SEQ ID NO:22 tương ứng với đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:16,
SEQ ID NO:23 tương ứng với trình tự protein ORF2 của PCV2,
SEQ ID NO:24 tương ứng với trình tự protein hemagglutinin H5 (virus cúm).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xác định cá thể đã dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut trong các tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) nuôi cấy hoặc các tế bào nuôi cấy thuộc dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học thu được từ cá thể đã nêu về sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể đặc hiệu cho một hoặc nhiều kháng nguyên từ virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào thuộc dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, trong đó virut ARN này là virut thuộc họ *Rhabdoviridae*, và trong đó sự có mặt của các kháng thể đã nêu trong mẫu sinh học đã nêu chỉ ra rằng cá thể đã nêu đã được dùng chế phẩm sinh miễn dịch.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên từ virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
 - a. cho mẫu sinh học tiếp xúc với chất phản ứng bắt giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó chất phản ứng bắt giữ được cố định này có khả năng liên kết với các kháng thể đã nêu; và
 - b. xác định sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể đã nêu được liên kết với chất phản ứng bắt giữ, trong đó sự có mặt của các kháng thể đã nêu được liên kết với chất phản ứng bắt giữ là chỉ thị cho sự có mặt của các kháng thể đã nêu trong mẫu sinh học đã nêu.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất phản ứng bắt giữ đã nêu được chọn từ nhóm gồm:
 - a. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6;
 - b. virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó virut ARN này là virut thuộc họ *Rhabdoviridae*, và trong đó virut này tùy ý đã được bất hoạt và/hoặc trong đó virut này tùy ý là virut toàn phần được bán tinh chế.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là virus chứa:

- i. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc
- ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc
- iii. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là virus mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc
- iv. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc
- v. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là virus mà hệ gen của nó chứa phân tử ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9;
- vi. và/hoặc trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phương pháp này bao gồm bước:

xác định trong mẫu sinh học đã nêu sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều dấu chuẩn đã nêu, trong đó các dấu chuẩn này là các kháng thể đặc hiệu cho protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a. cho mẫu sinh học tiếp xúc với chất phản ứng bất giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó chất phản ứng bất giữ được chọn từ nhóm gồm:

- i. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 6,

ii. virus tùy ý được bất hoạt chứa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

iii. virus mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và/hoặc protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt,

iv. virus mà hệ gen của nó chứa phân tử ARN chứa trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 và/hoặc trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, trong đó virus này tùy ý đã được bất hoạt; và/hoặc

v. peptit tổng hợp có trình tự được chọn từ các trình tự gồm 5 đến 11 gốc axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO:1; và

b. tách mẫu sinh học khỏi chất phản ứng bất giữ được cố định;

c. cho phức chất phản ứng bất giữ cố định-kháng thể tiếp xúc với tác nhân phát hiện mà liên kết với kháng thể trong phức chất phản ứng-kháng thể; và

d. xác định mức kháng thể được liên kết với chất phản ứng bất giữ bằng cách sử dụng phương tiện phát hiện dùng cho tác nhân phát hiện.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó bước xác định (d) còn bao gồm việc so sánh với đường cong chuẩn để xác định mức kháng thể được liên kết với chất phản ứng bất giữ, và/hoặc

trong đó tác nhân phát hiện mà liên kết với kháng thể của phức chất phản ứng-kháng thể là kháng thể phát hiện được, tốt hơn là kháng thể thứ cấp được đánh dấu.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 7, trong đó chất phản ứng bất giữ là protein được biểu hiện bằng baculovirus, và trong đó protein được biểu hiện bằng baculovirus này tốt hơn là được biểu hiện bởi baculovirus tái tổ hợp, trong đó baculovirus chứa trình tự ADN mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 đến 6;

và/hoặc

trong đó baculovirut chứa trình tự ADN chứa hoặc bao gồm:

trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 9 đến 14.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xác định trong mẫu sinh học đã nêu sự có mặt của một hoặc nhiều chất phân tích được chọn từ nhóm gồm các kháng thể đặc hiệu cho protein tái tổ hợp đã nêu, polypeptit đặc hiệu cho protein tái tổ hợp đã nêu, trình tự nucleotit đặc hiệu cho trình tự ADN mã hóa protein tái tổ hợp đã nêu.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó protein tái tổ hợp được chọn từ nhóm gồm protein PCV2 ORF2, trong đó protein PCV2 ORF2 tốt hơn là protein có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23, và hemagglutinin cúm, tốt hơn là hemagglutinin cúm gia cầm, đặc biệt là protein H5 của virus H5N1, trong đó hemagglutinin cúm gia cầm hoặc protein H5 của virus H5N1 tốt hơn là protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:24.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là:

- chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng nuôi cấy, và một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, hoặc
- chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirut trong tế bào côn trùng nuôi cấy, và một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus mà là virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng này đã được bất hoạt,

và/hoặc trong đó protein tái tổ hợp được chọn từ nhóm gồm:

a. protein PCV2 ORF2 tốt hơn chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23,

b. hemagglutinin cúm, tốt hơn là hemagglutinin cúm gia cầm, đặc biệt là protein H5 của virus H5N1, trong đó hemagglutinin cúm gia cầm hoặc protein H5 của virus H5N1 tốt hơn là protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:24; và

c. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 đến 8,

và/hoặc virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là virus chứa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng và hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

c. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa:

i. phân tử ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9; và/hoặc

ii. trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15;

và/hoặc

trong đó mẫu sinh học được phân lập từ động vật có vú hoặc chim, tốt hơn từ lợn hoặc gà, và/hoặc

trong đó mẫu sinh học được chọn từ nhóm gồm máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, và dịch từ miệng, và/hoặc

trong đó chất phản ứng bất giữ cố định được phủ lên vi đĩa.

12. Kit xác định cá thể đã dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein tái tổ hợp được tạo ra bằng hệ biểu hiện baculovirus trong tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) nuôi cấy hoặc tế bào từ dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, trong đó kit này chứa một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ được cố định vào giá thể rắn, trong đó một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ cố định có khả năng liên kết với các kháng thể đặc hiệu cho một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào thuộc dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, trong đó virus ARN là virus thuộc họ *Rhabdoviridae*, và trong đó một hoặc nhiều chất phản ứng bất giữ được chọn từ nhóm gồm:

- a. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 đến 6;
- b. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào thuộc dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda*, trong đó virus ARN là virus thuộc họ *Rhabdoviridae*, và trong đó virus này đã được bất hoạt.

13. Kit theo điểm 12, trong đó virus ARN chứa hoặc bao gồm:

a. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng chứa protein chứa hoặc bao gồm:

- i. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc
- ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

b. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

- i. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc
- ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

c. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa:

- i. phân tử ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9; và/hoặc
- ii. trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

14. Kit theo điểm 12 hoặc 13, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên từ virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng là protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào thuộc dòng tế bào thu được từ *Spodoptera Frugiperda* được chọn từ nhóm gồm tế bào Sf9 và tế bào Sf+.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 11 hoặc 15, trong đó chất phản ứng bất giữ chứa hoặc bao gồm hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus của virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó chế phẩm đã nêu hoặc chất phản ứng bất giữ đã nêu có thể thu được bằng phương pháp bao gồm các bước:

- i) thu nhận dịch nổi từ sản phẩm nuôi cấy tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó dịch nổi này chứa hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus của virus ARN, và trong đó tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng tốt hơn là không được gây nhiễm bằng baculovirus và/hoặc tốt hơn là không được chuyển nhiễm bằng plasmit,
- ii) tách mảnh vụn tế bào từ hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus đã nêu bằng bước tách bao gồm vi lọc qua ít nhất một bộ lọc, tốt hơn là hai bộ lọc, trong đó ít nhất một bộ lọc tốt hơn là có cỡ lỗ lớn hơn so với hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus đã nêu, cụ thể là có cỡ lỗ khoảng từ 0,1 μm đến khoảng 4 μm , tốt hơn là từ khoảng 0,2 μm đến khoảng 2 μm ,
- iii) và tùy ý sắc ký loại trừ theo kích thước dịch lọc của bước ii) chứa hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus đã nêu, trong đó sự có mặt của protein trong chất rửa giải được xác định bằng cách xác định độ hấp thụ ánh sáng ở 260 nm hoặc 280 nm (A_{260} hoặc A_{280}), và trong đó tốt hơn là chất rửa giải thể hiện đỉnh đầu tiên ở A_{260} hoặc A_{280} được thu thập.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó virus ARN chứa hoặc bao gồm:

a. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng chứa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

b. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

c. virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa:

i. phân tử ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9; và/hoặc

ii. trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

18. Kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14, trong đó tế bào *Spodoptera Frugiperda* (Sf) hoặc tế bào từ dòng tế bào thu được từ tế bào *Spodoptera Frugiperda* được chọn từ nhóm gồm tế bào Sf9 và tế bào Sf+.

19. Kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14 hoặc 18, trong đó chất phản ứng bất giữ chứa hoặc bao gồm hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus của virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, và trong đó chế phẩm đã nêu hoặc chất phản ứng bất giữ đã nêu có thể thu được bằng phương pháp bao gồm các bước:

i) thu nhận dịch nổi từ sản phẩm nuôi cấy tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng, trong đó dịch nổi này chứa hạt virus và/hoặc hạt tương tự virus của virus ARN, và trong đó tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng virus ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng

tốt hơn là không được gây nhiễm bằng baculovirut và/hoặc tốt hơn là không được gây nhiễm bằng plasmit,

ii) tách các mảnh vụn tế bào từ các hạt virut và/hoặc hạt tương tự virut đã nêu bằng bước tách bao gồm vi lọc qua ít nhất một bộ lọc, tốt hơn là hai bộ lọc, trong đó ít nhất một bộ lọc này tốt hơn là có cỡ lỗ lớn hơn so với hạt virut và/hoặc hạt tương tự virut đã nêu, cụ thể là có cỡ lỗ từ khoảng 0,1 μm đến khoảng 4 μm , tốt hơn là từ khoảng 0,2 μm đến khoảng 2 μm ,

iii) và tùy ý sắc ký loại trừ theo kích thước dịch lọc của bước ii) chứa hạt virut và/hoặc hạt tương tự virut, trong đó sự có mặt của protein trong chất rửa giải được xác định bằng cách xác định độ hấp thụ ánh sáng ở 260 nm hoặc 280 nm (A_{260} hoặc A_{280}), và trong đó tốt hơn là chất rửa giải thể hiện đỉnh đầu tiên ở A_{260} hoặc A_{280} được thu gom.

20. Kit theo điểm 19, trong đó virut ARN chứa hoặc bao gồm:

a. virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng chứa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

b. virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein chứa hoặc bao gồm:

i. trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc

ii. protein chứa hoặc bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7; và/hoặc

c. virut ARN có khả năng gây nhiễm tế bào côn trùng mà hệ gen của nó chứa:

i. phân tử ARN có trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:9; và/hoặc

ii. trình tự bổ sung ngược chiều với trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 70% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

<120> PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT XÁC ĐỊNH CÁ THỂ ĐÃ DÙNG CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA PROTEIN TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC TẠO RA BẰNG HỆ BIỂU HIỆN BACULOVIRUT

<130> P10-0168

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 610

<212> PRT

<213> SFRV

<400> 1

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr
20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr
35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys
50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu
85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn
100 105 110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu
130 135 140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr

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

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile
405 410 415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile
420 425 430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu
435 440 445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile
450 455 460

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly
465 470 475 480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr
485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys
500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln
515 520 525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val
530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr
545 550 555 560

Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg
565 570 575

His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu
580 585 590

Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp
595 600 605

Gly Val
610

<210> 2
<211> 550
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự của protein SFRV G đã cắt cụt

<400> 2

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr
20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr
35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys
50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu
85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn
100 105 110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu
130 135 140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr
145 150 155 160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys
165 170 175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg
180 185 190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg
195 200 205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys
210 215 220

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe
225 230 235 240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu
245 250 255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile
260 265 270

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala
275 280 285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu
290 295 300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn
305 310 315 320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln
325 330 335

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln
340 345 350

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe
355 360 365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln
370 375 380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr
385 390 395 400

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile
405 410 415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile
420 425 430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu
435 440 445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile
450 455 460

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly
465 470 475 480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr
485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys
500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln
515 520 525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val
530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu
545 550

<210> 3
<211> 618
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự của protein của SFRV cắt cụt với trình tự melittin ở đầu tận cùng N

<400> 3

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu
20 25 30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro
35 40 45

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr
50 55 60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp
65 70 75 80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser
85 90 95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr

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

Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile
 355 360 365
 Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys
 370 375 380
 Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala
 385 390 395 400
 Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly
 405 410 415
 Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr
 420 425 430
 Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys
 435 440 445
 Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr
 450 455 460
 Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly
 485 490 495
 Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr Met Asp His Leu Glu Val Val Gln
 500 505 510
 Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu
 515 520 525
 Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr
 530 535 540
 Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile
 545 550 555 560
 His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile
 565 570 575
 Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala
 580 585 590

Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe
595 600 605

Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp Gly Val
610 615

<210> 4

<211> 623

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SEQ ID NO:1 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His)

<400> 4

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr
20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr
35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys
50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu
85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn
100 105 110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu
130 135 140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr
145 150 155 160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys
165 170 175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg
 180 185 190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg
 195 200 205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys
 210 215 220

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu
 245 250 255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile
 260 265 270

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala
 275 280 285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu
 290 295 300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn
 305 310 315 320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln
 325 330 335

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln
 340 345 350

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe
 355 360 365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln
 370 375 380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr
 385 390 395 400

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile
 405 410 415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile
420 425 430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu
435 440 445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile
450 455 460

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly
465 470 475 480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr
485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys
500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln
515 520 525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val
530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr
545 550 555 560

Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg
565 570 575

His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu
580 585 590

Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp
595 600 605

Gly Val Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His
610 615 620

<210> 5

<211> 563

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SEQ ID NO:2 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His)

<400> 5

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg
 1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr
 20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr
 35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys
 50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu
 85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn
 100 105 110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu
 130 135 140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr
 145 150 155 160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys
 165 170 175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg
 180 185 190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg
 195 200 205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys
 210 215 220

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu
245 250 255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile
260 265 270

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala
275 280 285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu
290 295 300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn
305 310 315 320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln
325 330 335

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln
340 345 350

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe
355 360 365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln
370 375 380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr
385 390 395 400

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile
405 410 415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile
420 425 430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu
435 440 445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile
450 455 460

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly
465 470 475 480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr
 485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys
 500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln
 515 520 525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val
 530 535 540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His
 545 550 555 560

His His His

<210> 6

<211> 631

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SEQ ID NO:3 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His)

<400> 6

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu
 20 25 30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro
 35 40 45

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr
 50 55 60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp
 65 70 75 80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser
 85 90 95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr
 100 105 110

Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys
 115 120 125

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

Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly
 165 170 175

Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro
 180 185 190

Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp
 195 200 205

Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly
 210 215 220

Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val
 225 230 235 240

Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu
 245 250 255

Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser
 260 265 270

Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu
 275 280 285

Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro
 290 295 300

Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro
 305 310 315 320

Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser
 325 330 335

Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu
 340 345 350

Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile
 355 360 365
 Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys
 370 375 380
 Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala
 385 390 395 400
 Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly
 405 410 415
 Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr
 420 425 430
 Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys
 435 440 445
 Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr
 450 455 460
 Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly
 485 490 495
 Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr Met Asp His Leu Glu Val Val Gln
 500 505 510
 Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu
 515 520 525
 Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr
 530 535 540
 Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile
 545 550 555 560
 His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile
 565 570 575
 Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala
 580 585 590
 Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe

595

600

605

Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp Gly Val Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 610 615 620

Gly His His His His His His
 625 630

<210> 7
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> SFRV

<400> 7

Met Thr Gln Gly Thr Met Lys Pro Val Trp Glu Glu Leu Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Phe Gln Gly Thr Val Asp Ile Pro Gly Arg Ser Leu Lys
 20 25 30

Pro Glu Lys Thr Asp Trp Ser Val Asp Thr Cys Arg Glu Ile Ser Leu
 35 40 45

Asn Leu Lys Leu Pro Gly Glu Ile Trp Gln Leu Ala His Gln Glu Thr
 50 55 60

Ile Phe Asn Arg Phe Leu Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Val Pro Asn
 65 70 75 80

Thr His Thr Ala Thr Glu Ile Val Leu Ser Met Ala Ser Leu Ile Phe
 85 90 95

Lys Asp Lys Ala Lys Ala Pro Ile Asp Leu Ile Trp Asp Asp Ser Phe
 100 105 110

Gln Ala Ser Pro Ser Glu Glu Cys Gly Phe Ser Val Val Gly Glu Thr
 115 120 125

Pro Leu Val Ile Gly Gln His Pro Asp Asp Asp Asp Tyr Thr Leu Arg
 130 135 140

Glu Asp Glu Glu Ser Ala Ala Met Asn Glu Glu Glu Lys Ile Gln Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Asp Thr Pro Val Asp Leu Lys Asp
 165 170 175

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

Lys Asn Glu Lys Ala Leu His Val Glu Asp Asp Ile Asn Ala Leu Thr
 195 200 205

Gln Ile Thr Lys Gln Phe Leu Phe Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Leu Gln
 210 215 220

Lys Phe Val Ala Lys Ala Thr Thr Ile Phe Ile Asp Asn Asn Ala Thr
 225 230 235 240

Asn Gly Phe Thr Arg Leu His Leu His Ala Ile Arg Val Met Asn Phe
 245 250 255

Ile Ala Leu Thr Met Leu Arg Lys Val Thr Lys Ser Asn Ala Gln Met
 260 265 270

Ile Asn Ala Phe Leu Lys Glu Gln Tyr Lys Arg Asn Ile Ala Ser Leu
 275 280 285

Ile Pro Gly Ala Leu Ser Ser Asp Phe Ala Pro Pro Ser Lys Ser Cys
 290 295 300

Ile Asp Lys Leu Thr Ala Ile Ser Lys Asn Asp Pro Ala Val Ser Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Ala Lys Val Val Met Leu Asn Met Glu Glu Glu Arg Arg Asn
 325 330 335

Pro Ser Leu Val Ala Cys Leu Gly Ala Ser Leu Leu Thr His Thr Thr
 340 345 350

Trp Asn Gly Met Gly Ile Leu His Val Ile Phe Glu Val Cys Leu Phe
 355 360 365

His Gln Ile Ser Trp Lys Arg Leu Val Thr Glu Ser Leu Thr Ser Leu
 370 375 380

Thr Lys Met Ser Trp Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Ile Lys Tyr Gln
 385 390 395 400

Ala Lys Gly Asn Pro Asp Pro Thr Val Ala Trp Ala Arg Ile Ile Asp
 405 410 415

Asp Ser Tyr Phe Met Arg Leu Thr Ile Val Asn His Pro Thr Leu Ala
420 425 430

Ala Leu Leu Val Glu Ser Leu Ile Arg Ser Gln Lys Asp Asp Gly Ile
435 440 445

Leu Asn Ala Asn Trp Ala Ile Gln His Arg Asp Thr Ile Asn Tyr Tyr
450 455 460

Arg Asp Ala Ala Lys Leu Leu Thr Asp Lys Leu Thr Gly Gln Thr Ala
465 470 475 480

Thr Val Gln Ala Leu Thr Asn Glu Ala Ala Asp Leu Val Arg Thr Met
485 490 495

Asn Ala Gly Pro Ser Arg Tyr His Pro Arg Pro Ser Thr Leu Ile Pro
500 505 510

Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu
515 520

<210> 8

<211> 534

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SEQ ID NO:7 với các cải biến (bao gồm đuôi 6x His)

<400> 8

Met Thr Gln Gly Thr Met Lys Pro Val Trp Glu Glu Leu Gly Thr Gly
1 5 10 15

Glu Thr Glu Phe Gln Gly Thr Val Asp Ile Pro Gly Arg Ser Leu Lys
20 25 30

Pro Glu Lys Thr Asp Trp Ser Val Asp Thr Cys Arg Glu Ile Ser Leu
35 40 45

Asn Leu Lys Leu Pro Gly Glu Ile Trp Gln Leu Ala His Gln Glu Thr
50 55 60

Ile Phe Asn Arg Phe Leu Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Val Pro Asn
65 70 75 80

Thr His Thr Ala Thr Glu Ile Val Leu Ser Met Ala Ser Leu Ile Phe
85 90 95

Lys Asp Lys Ala Lys Ala Pro Ile Asp Leu Ile Trp Asp Asp Ser Phe
 100 105 110

Gln Ala Ser Pro Ser Glu Glu Cys Gly Phe Ser Val Val Gly Glu Thr
 115 120 125

Pro Leu Val Ile Gly Gln His Pro Asp Asp Asp Asp Tyr Thr Leu Arg
 130 135 140

Glu Asp Glu Glu Ser Ala Ala Met Asn Glu Glu Glu Lys Ile Gln Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Asp Thr Pro Val Asp Leu Lys Asp
 165 170 175

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

Lys Asn Glu Lys Ala Leu His Val Glu Asp Asp Ile Asn Ala Leu Thr
 195 200 205

Gln Ile Thr Lys Gln Phe Leu Phe Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Leu Gln
 210 215 220

Lys Phe Val Ala Lys Ala Thr Thr Ile Phe Ile Asp Asn Asn Ala Thr
 225 230 235 240

Asn Gly Phe Thr Arg Leu His Leu His Ala Ile Arg Val Met Asn Phe
 245 250 255

Ile Ala Leu Thr Met Leu Arg Lys Val Thr Lys Ser Asn Ala Gln Met
 260 265 270

Ile Asn Ala Phe Leu Lys Glu Gln Tyr Lys Arg Asn Ile Ala Ser Leu
 275 280 285

Ile Pro Gly Ala Leu Ser Ser Asp Phe Ala Pro Pro Ser Lys Ser Cys
 290 295 300

Ile Asp Lys Leu Thr Ala Ile Ser Lys Asn Asp Pro Ala Val Ser Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Ala Lys Val Val Met Leu Asn Met Glu Glu Glu Arg Arg Asn
 325 330 335

Pro Ser Leu Val Ala Cys Leu Gly Ala Ser Leu Leu Thr His Thr Thr
 340 345 350

Trp Asn Gly Met Gly Ile Leu His Val Ile Phe Glu Val Cys Leu Phe
 355 360 365

His Gln Ile Ser Trp Lys Arg Leu Val Thr Glu Ser Leu Thr Ser Leu
 370 375 380

Thr Lys Met Ser Trp Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Ile Lys Tyr Gln
 385 390 395 400

Ala Lys Gly Asn Pro Asp Pro Thr Val Ala Trp Ala Arg Ile Ile Asp
 405 410 415

Asp Ser Tyr Phe Met Arg Leu Thr Ile Val Asn His Pro Thr Leu Ala
 420 425 430

Ala Leu Leu Val Glu Ser Leu Ile Arg Ser Gln Lys Asp Asp Gly Ile
 435 440 445

Leu Asn Ala Asn Trp Ala Ile Gln His Arg Asp Thr Ile Asn Tyr Tyr
 450 455 460

Arg Asp Ala Ala Lys Leu Leu Thr Asp Lys Leu Thr Gly Gln Thr Ala
 465 470 475 480

Thr Val Gln Ala Leu Thr Asn Glu Ala Ala Asp Leu Val Arg Thr Met
 485 490 495

Asn Ala Gly Pro Ser Arg Tyr His Pro Arg Pro Ser Thr Leu Ile Pro
 500 505 510

Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 515 520 525

His His His His His His
 530

<210> 9
 <211> 1830
 <212> ADN
 <213> SFRV

<400> 9
 atggttttct taagttttatc aacgatcata tttatcctaa gcttcggggc tgtaacctgc
 60

tccaatcctc tctcctatcc taatggcatt ttgactaaca actctactca caatcatccc
 120
 ctatcggact tttatatattt ttatgagaac agttccctta cctatactca attccctgtg
 180
 gccccagact gctctagtat tctagatact agagatgagc agtatcccac cactgttact
 240
 ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagtggggac tccttttatg gcaagagaga
 300
 attgacacca cttgctcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa
 360
 tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg
 420
 agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtcccttaca acttgagata ttattgttac
 480
 tgggtgcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc
 540
 ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac
 600
 aacttggtggg gagatcagat gaggtatcta gttattcgaa gatttggggg agaatctagc
 660
 tgccctctta agatatatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc
 720
 atcttagtgt cccttccctc cttgaatttg cagttctctg tatcacttga atccactgag
 780
 acgaaatgct catttgagga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc
 840
 ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat
 900
 ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac
 960
 caatttataa attatcactc atccccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc
 1020
 cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatatgagca gaatttcac
 1080
 atccgacaga tcaataagaa ttttgatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt
 1140
 tctaagtggc agaatctcag tccaccaat cttgctatga aaattgccca ttatgtcacc
 1200
 ggctctatcc actctatagg tgggtttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa
 1260

aaatccatta ctaagggtcaa tctgggtgttt cccattgtta ttgttcatgg aatgtataag
1320

tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtgggtt tgggcagaac ccgtcacagg gatccttatto
1380

aagtctccta ttccgactca tttctcacta agttcctctt ggctacctgg ggtaaagtgt
1440

tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg
1500

gaggttgtag aacaggttga agcaaagatg gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg
1560

tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa
1620

tcaaatacag taaatccttg gattgggctt ttgatacatg gtggagtgtc catagctact
1680

ggaatattag tagcactttt gatccctca atcttaaaat tgttcagaca tataattgag
1740

aaaggggagg catcgttaga ggagaggttg catctgaggg aaacctcaag aaaagaattt
1800

gtcaagggtta gggggaaacc atgggggtgtc
1830

<210> 10

<211> 1650

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:2

<400> 10

atggttttct taagtttatc aacgatcata tttatcctaa gcctccgggc tgtaacctgc
60

tccaatcctc tctcctatcc taatggcatt ttgactaaca actctactca caatcatccc
120

ctatcgggact tttatatattt ttatgagaac agttccctta cctatactca attcctgtg
180

gccccagact gctctagtag tctagatact agagatgagc agtatccac cactgttact
240

ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagtggggac tccttttatg gcaagagaga
300

attgacacca cttgctcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgatatctaaa
360

tcctcagtag ctctaaagga tatcccatcg ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg
420

agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtcccttaca acttgagata ttattgttac
 480
 tgggtgcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc
 540
 ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac
 600
 aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta gttattcgaa gatttggggg agaacttagc
 660
 tgccctctta agatatatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc
 720
 atcttagtgt ccttccctc cttgaatttg cagttctctg tatcactga atccactgag
 780
 acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc
 840
 ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac cctcagcat
 900
 ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac
 960
 caatttataa attatcactc atccccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagtgc
 1020
 cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatatgagca gaatttcac
 1080
 atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt
 1140
 tctaagtggc agaatctcag tccacccaat cttgctatga aaattgcccc ttatgtcacc
 1200
 ggctctatcc actctatagg tgggtgttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa
 1260
 aaatccatta ctaagggtcaa tctgggtgtt cccattgtta ttgttcattg aatgtataag
 1320
 tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtgggt tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc
 1380
 aagtctccta ttccgactca tttctcacta agttcctctt ggctacctgg ggtaaatggt
 1440
 tttctattg tccctctgac aggtcaaatt cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg
 1500
 gaggttgtag aacaggttga agcaaagatg gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg
 1560
 tttgatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa
 1620

tcaaatacag taaatccttg gattgggctt
1650

<210> 11
<211> 1854
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:3

<400> 11
atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tatacatttc ttacatctat
60
gccaatcctc tctcctatcc taatggcaat cctctctcct atcctaattg cattttgact
120
aacaactcta ctcaaatca tcccctatcg gacttttata ttttttatga gaacagttcc
180
cttacctata ctcaattccc tgtggcccca gactgctcta gtattctaga tactagagat
240
gagcagtatc ccaccactgt tactttgtgg aaggttgatc aagaatctca agctgagtgg
300
ggactccttt tatggcaaga gagaattgac accacttgct cctggaactt ctggggcaat
360
tacaaaggat ccattgtatc taaatcctca gtacctctaa aggatatccc atcgggtagt
420
gcccggaatg gatattgggc tttagcaat gatgaagttc aagagattga tcatgtccct
480
tacaacttga gatattattg ttactgggtg agaaatgaat atcctgggag cttttatatg
540
agatatgtaa agaaagttcg gatcataaga aatcctgatg ggtctataaa gactcctaga
600
ggatcctggg ttcatgagtt ggacaacttg tggggagatc agatgaggta tctagttatt
660
cgaagatttg ggggagaatc tagctgccct ctttaagatat atgatgtgag agcaggggtt
720
ctgtcaaaat ctcggtcaaa cttcatctta gtgtcccttc cctccttgaa tttgcagttc
780
tctgtatcac ttgaatccac tgagacgaaa tgctcatttg gagataagac atatgatatt
840
gtgcagagca tgggaggcta tctcctctcc atcgacatag gtaatgcgaa ctggcgaggc
900
ccttgggatc ctaccctca gcatccgggt cgtgaaagaa gatcaattat ggagtttccg
960

gatcaaacat ctttcagata taaccaatTT ataaattatc actcatcccc aagacacaag
1020

agacatgatc aagaatttga gttccctctc agtctaaaat ccagttatga ttatgctcaa
1080

tttagatatg agcagaatTT catcatccga cagatcaata agaattttgg attattacag
1140

aagagcattt gtgatattca gttttctaag tggcagaatc tcagtccacc caatcttgct
1200

atgaaaattg cccattatgt caccggctct atccactcta taggtgggtg tcatcatgga
1260

tcttattcaa ttcaaagaac ggaaaaatcc attactaagg tcaatctggt gtttcccatt
1320

gttattgttc atggaatgta taagtgccaa agggaaccat ccaaggaggt ggtttgggca
1380

gaaccctgca cagggatctt attcaagtct cctattccga ctcatTTctc actaagttcc
1440

tcttggctac ctggggtaaa tggttcttct attgtccctc tgacaggtca aattcttctc
1500

cctgaaatca caatggatca cttggagggt gtacaacagg ttgaagcaaa gatgggtcaaa
1560

agtatgtaca cgaatgtaga gttgtttgga tcaacagagg aatttcaaag ataccaaact
1620

cagggaaatta cctctgatga acaatcaaat acagtaaatc cttggattgg gcttttgata
1680

catggtggag tgtccatagc tactggaata ttagtagcac ttttgatccc ctcaatctta
1740

aaattgttca gacatataat tgagaaaggg gaggcacgt tagaggagag gttgcatctg
1800

agggaaacct caagaaaaga atttgtcaag gttaggggga aacctgggg tgtc
1854

<210> 12

<211> 1884

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:4

<400> 12

gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct ccgggctgta
60

acctgctcca atcctctctc ctatcctaatt ggcattttga ctaacaactc tactcacaat
120

catccccctat cggacttttta ttttttttat gagaacagtt cccttaccta tactcaattc
180
cctgtggccc cagactgctc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccact
240
gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa
300
gagagaattg acaccacttg ctcttggaaac ttctggggca attacaaagg atccattgta
360
tctaaatcct cagtacctct aaaggatatc ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg
420
gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat
480
tgttactggg gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt
540
cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag
600
ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa
660
tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcgggtca
720
aacttcatct tagtgtccct tccctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc
780
actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catggggaggc
840
tatctcctct ccatcgacat aggtaatgag aactggcgag gcccttgagg tccctaccct
900
cagcatccgg gtcgtgaaag aagatcaatt atggagtttc cggatcaaac atctttcaga
960
tataaccaat ttataaatta tcaatcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt
1020
gagttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat
1080
ttcatcatcc gacagatcaa taagaatttt ggattattac agaagagcat ttgtgatatt
1140
cagttttcta agtggcagaa tctcagtcca cccaatcttg ctatgaaaat tgcccattat
1200
gtcaccggct ctatccactc tataggtggg gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga
1260
acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgtttccca ttgttattgt tcatggaatg
1320

tataagtgcc aaaggaacc atccaaggag gtggtttggg cagaaccgt cacagggatc
1380

ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tctaagtt cctcttggct acctggggta
1440

aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattcttc tccctgaaat cacaatggat
1500

cacttgagg ttgtacaaca ggttgaagca aagatgggtca aaagtatgta cacgaatgta
1560

gagttgtttg gatcaacaga ggaatttcaa agataccaaa ctgaggaat tacctctgat
1620

gaacaatcaa atacagtaaa tccttggatt gggcttttga tacatgggtg agtgtccata
1680

gctactggaa tattagtagc acttttgatc ccctcaatct taaaattgtt cagacatata
1740

attgagaaag gggaggcatc gttagaggag aggttgcac tgagggaac ctcaagaaaa
1800

gaatttgtca aggttagggg gaaaccatgg ggtgtcgaaa acctgtattt tcagggccac
1860

catcaccatc accattaact gcag
1884

<210> 13
<211> 1704
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:5

<400> 13
gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct ccgggctgta
60

acctgtcca atcctctctc ctatcctaatt ggcattttga ctaacaactc tactcacaat
120

catcccctat cggactttta tattttttat gagaacagtt cccttaocta tactcaattc
180

cctgtggccc cagactgctc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccact
240

gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa
300

gagagaattg acaccacttg ctcttggaaac ttctggggca attacaaagg atccattgta
360

tctaaatcct cagtacctct aaaggatatc ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg
420

gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat
 480
 tgttactggg gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt
 540
 cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag
 600
 ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa
 660
 tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcgggtca
 720
 aacttcatct tagtgtccct tccctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc
 780
 actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggaggg
 840
 tatctcctct ccatcgacat aggtaatgcg aactggcgag gcccttggga tccctaccct
 900
 cagcatccgg gtcgtgaaag aagatcaatt atggagtttc cggatcaaac atctttcaga
 960
 tataaccaat ttataaatta tcaatcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt
 1020
 gagttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat
 1080
 ttcacatcc gacagatcaa taagaatttt ggattattac agaagagcat ttgtgatatt
 1140
 cagttttcta agtggcagaa tctcagtcca ccaatcttg ctatgaaaat tgcccattat
 1200
 gtcaccggct ctatccactc tatagggtggg gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga
 1260
 acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgtttccca ttgttattgt tcatggaatg
 1320
 tataagtgcc aaagggaacc atccaaggag gtgggttggg cagaaccctg cacagggatc
 1380
 ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tactaagtt cctcttgggt acctggggta
 1440
 aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattcttc tccctgaaat cacaatggat
 1500
 cacttgagg ttgtacaaca ggttgaagca aagatgggtca aaagtatgta cacgaatgta
 1560
 gagttgtttg gatcaacaga ggaatttcaa agataccaaa ctgaggaat tacctctgat
 1620

gaacaatcaa atacagtaaa tccttggatt gggcttgaaa acctgtatTT tcagggccac
1680

catcaccatc accattaact gcag
1704

<210> 14
<211> 1908
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:6

<400> 14
gaattcatga aattcttagt caacgttgcc cttgttttta tggctgtata catttcttac
60

atctatgcc aatcctctctc ctatcctaatt ggcaatcctc tctcctatcc taatggcatt
120

ttgactaaca actctactca caatcatccc ctatcggact tttatatTTT ttatgagaac
180

agttccctta cctataactca attccctgtg gccccagact gctctagtat tctagataact
240

agagatgagc agtatccac cactgttact ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct
300

gagtggggac tccttttatg gcaagagaga attgacacca cttgctcctg gaacttctgg
360

ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg
420

ggtagtgcc ggaatggata ttgggctttg agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat
480

gtcccttaca acttgagata ttattgttac tgggtgcagaa atgaatatcc tgggagcttt
540

tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact
600

cctagaggat cctgggttca tgagttggac aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta
660

gttattcgaa gatttggggg agaatctagc tgccctctta agatatatga tgtgagagca
720

ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc atcttagtgt cccttcctc cttgaatttg
780

cagttctctg tatcacttga atccactgag acgaaatgct catttggaga taagacatat
840

gatattgtgc agagcatggg aggcatactc ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg
900

cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag
960

tttccggatc aaacatcttt cagatataac caatttataa attatcactc atccccaaga
1020

cacaagagac atgatcaaga atttgagttc cctctcagtc taaaatccag ttatgattat
1080

gctcaattta gatatgagca gaatttcac atccgacaga tcaataagaa ttttggatta
1140

ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt tctaagtggc agaattctcag tccaccaat
1200

cttgctatga aaattgccca ttatgtcacc ggctctatcc actctatagg tgggtgtcat
1260

catggatctt attcaattca aagaacggaa aaatccatta ctaagggtcaa tctgggtgtt
1320

cccattgtta ttgttcattg aatgtataag tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtggtt
1380

tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc aagtctccta ttccgactca tttctcacta
1440

agttcctctt ggctacctgg ggtaaattgg tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt
1500

cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg gaggttgtag aacagggtga agcaaagatg
1560

gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac
1620

caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa tcaaatacag taaatccttg gattgggctt
1680

ttgatacatg gtggagtgtc catagctact ggaatattag tagcactttt gatccctca
1740

atcttaaaat tgttcagaca tataattgag aaaggggagg catcgttaga ggagaggttg
1800

catctgaggg aaacctcaag aaaagaattt gtcaagggtta gggggaaacc atgggggtgc
1860

gaaaacctgt attttcaggg ccaccatcac catcaccatt aactgcag
1908

<210> 15
<211> 1563
<212> ADN
<213> SFRV

<400> 15
atgacacagg gaaccatgaa gccagtatgg gaagaattgg ggacaggaga aacagagttc
60

caagggaccg tggacattcc agggagatct ctcaagccag aaaaaacaga ttggagtgtt
120

gatacatgtc gggagatcag tttaaactctg aagttacctg gtgaaatatg gcaactggcc
180

catcaagaaa ccattcttcaa cagattttctt acatttttacg ctactgggta tgttccaaat
240

acacacacag ccacagaaat tgtactctcc atggcatcac taatcttcaa ggacaaggcc
300

aaagcaccta ttgatttgat ttgggatgac tcattttcaag ctagtccctc tgaggagtgt
360

gggttctccg ttgttggaga aactccattg gttatcggac aacacccgga tgatgatgac
420

tacacattga gagaagatga agaatcagcc gctatgaatg aggaagaaaa aatacaagca
480

gctctaaaaa ctttgggaat tcaagatact ccagtagacc tgaaggatgc atctggaatt
540

gtctttgaga caaaggagga cagagaacaa aggatcaaga atgagaaagc tctacatgta
600

gaggatgata tcaacgctct aactcagatt acaaaacaat tcttgtttga gtattccaca
660

ggctccctac agaaatttgt tgcaaaggct actactattt tcatagataa taatgctact
720

aacggcttca cccgtttgca tctccatgcc atcagagtca tgaacttcat tgctctaaca
780

atgcttagaa aggtaaccaa gtcaaagcc cagatgatca atgcctttct gaaggagcaa
840

tacaagagaa atattgcctc cctaattccc ggcgccctct cctctgattt tgctcctccc
900

agtaagagct gcattgataa actgacagct atttctaaga atgaccggc agtcagttca
960

ttctttgcaa aggttgtgat gctcaacatg gaggaggaac ggagaaaccc ttctctgggt
1020

gcttgtcttg gggcttccct tctcaccac accacttga atggaatggg gattttacat
1080

gttatttttg aagtttgtct attccatcag attagctgga agaggttggt cacagagtcc
1140

ctgacctcac taacaaagat gtcatggggg gaagtcagtc aattcctcat caagtatcaa
1200

gcaaagggaa atcctgaccc aacggttgcc tgggccagaa tcattgatga ttcttacttt
1260

atgagattaa ccatagtaaa tcatcccaca cttgctgcat tattagtga atccctcata
1320

agatctcaga aagatgatgg aatcctgaat gccaaactggg ccatccaaca cagggacacc
1380

atcaattatt atagggacgc tgccaagctt ctactgata agctcacagg acagactgct
1440

acagtccaag cccttaccaa tgaagccgct gatctagtta gaacaatgaa tgcaggaccc
1500

tctagatacc acccaaggcc tagtaccctt atcccatgg tagatctaaa cccggaagac
1560

tta
1563

<210> 16
<211> 1617
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự mã hóa SEQ ID NO:8

<400> 16
ggatccatga cacaggggaac catgaagcca gtatgggaag aattggggac aggagaaaca
60

gagttccaag ggaccgtgga cattccaggg agatctctca agccagaaaa aacagattgg
120

agtgttgata catgtcggga gatcagttta aatctgaagt tacctgggtga aatatggcaa
180

ctggcccatc aagaaaccat cttcaacaga tttcttacat tttacgctac tgggtatggt
240

ccaataacac acacagccac agaaattgta ctctccatgg catcactaat cttcaaggac
300

aaggccaaag cacctattga tttgatttgg gatgactcat ttcaagctag tccctctgag
360

gagtgtgggt tctccgttgt tggagaaact ccattgggtta tcggacaaca cccggatgat
420

gatgactaca cattgagaga agatgaagaa tcagccgcta tgaatgagga agaaaaata
480

caagcagctc taaaaacttt gggaattcaa gatactccag tagacctgaa ggatgcatct
540

ggaattgtct ttgagacaaa ggaggacaga gaacaaagga tcaagaatga gaaagctcta
600

catgtagagg atgatatcaa cgctctaact cagattacaa aacaattctt gtttgagtat
660

tccacaggct ccctacagaa atttgttgca aaggctacta ctattttcat agataataat
720

gctactaacg gcttcacccg tttgcatctc catgccatca gagtcatgaa cttcattgct
780

ctaacaatgc ttagaaaggt aaccaagtca aatgccaga tgatcaatgc ctttctgaag
840

gagcaatata agagaaatat tgctcccta atccccggcg ccctctctc tgattttgct
900

cctcccagta agagctgcat tgataaactg acagctatct ctaagaatga cccggcagtc
960

agttcattct ttgcaaaggt tgtgatgctc aacatggagg aggaacggag aaacccttct
1020

ctggttgctt gtcttggggc ttcccttctc acccacacca cttggaatgg aatggggatt
1080

ttacatgtta tttttgaagt ttgtctattc catcagatta gctggaagag gttggtcaca
1140

gagtcctga cctcactaac aaagatgtca tgggggtgaag tcagtcaatt cctcatcaag
1200

tatcaagcaa agggaaatcc tgacccaacg gttgcctggg ccagaatcat tgatgattct
1260

tactttatga gattaaccat agtaaactcat cccacacttg ctgcattatt agtggaatcc
1320

ctcataagat ctcagaaaga tgatggaatc ctgaatgcca actggggccat ccaacacagg
1380

gacaccatca attattatag ggacgctgcc aagctttctca ctgataagct cacaggacag
1440

actgctacag tocaagccct taccaatgaa gccgctgatc tagttagaac aatgaatgca
1500

ggaccctcta gataccaccc aaggcctagt acccttatcc ccatggtaga tctaaacccg
1560

gaagacttag aaaacctgta ttttcagggc caccatcacc atcaccatta actgcag
1617

<210> 17

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:13

<400> 17

aaaaaagaat tcatgggttt ctttaag

26

<210> 18
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:14

<400> 18
 tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttcgacaccc
 60

catggt
 66

<210> 19
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:13

<400> 19
 ttttttctgc agttaatggt gatggtgatg gtggccctga aaatacaggt tttcaagccc
 60

aatccaag
 68

<210> 20
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:14

<400> 20
 tatatagaat tcatgaaatt cttagtcaac gttgcccttg tttttatggt cgtatacatt
 60

tcttacatct atgccaatcc tctctcctat cctaattggc
 99

<210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi xuôi để tạo ra SEQ ID NO:16

<400> 21
 aaaaaaggat ccatgacaca gg
 22

<210> 22
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi ngược để tạo ra SEQ ID NO:16

<400> 22
 tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggcctgaa aatacaggtt ttctaagtct
 60

tccggg
 66

<210> 23
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus lợn

<400> 23

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

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

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr

145					150					155					160
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro
				165					170					175	
Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn
			180					185					190		
Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Lys	Tyr	Asp
		195					200					205			
Gln	Asp	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe
	210					215					220				
Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Glu	Pro							
225					230										
<210>	24														
<211>	552														
<212>	PRT														
<213>	virut cúm gia cầm														
<400>	24														
Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val
1				5					10					15	
Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile
			20					25					30		
Leu	Glu	Lys	Thr	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Asp	Gly	Val	Lys
		35					40					45			
Pro	Leu	Ile	Leu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				
Pro	Met	Cys	Asp	Glu	Phe	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val
65					70					75					80
Glu	Lys	Ala	Asn	Pro	Ala	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asn	Phe	Asn
				85					90					95	
Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn	His	Phe	Glu
			100					105					110		
Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Asn	Ser	Trp	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Ser
		115					120					125			

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe
 130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly
 210 215 220

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 325 330 335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 340 345 350

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 355 360 365

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 370 375 380

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 385 390 395 400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 405 410 415

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 420 425 430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 435 440 445

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 450 455 460

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 465 470 475 480

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 485 490 495

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 500 505 510

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 515 520 525

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 530 535 540

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 545 550

<210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 25
 ctattgtccc tctgacag
 18

<210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 26
 gaccatcttt gcttcaacc
 19

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 27
 caacctccaa gtgatccatt gtg
 23

<210> 28
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 28
 cctggggtaa atgggtcttc tattgtccct ctgacaggtc aaattcttct ccctgaaatc
 60

acaatggatc acttggaggt tgtacaacag gttgaagcaa agatgggtcaa aagtatgtac
 120

acgaat
 126

FIG. 1

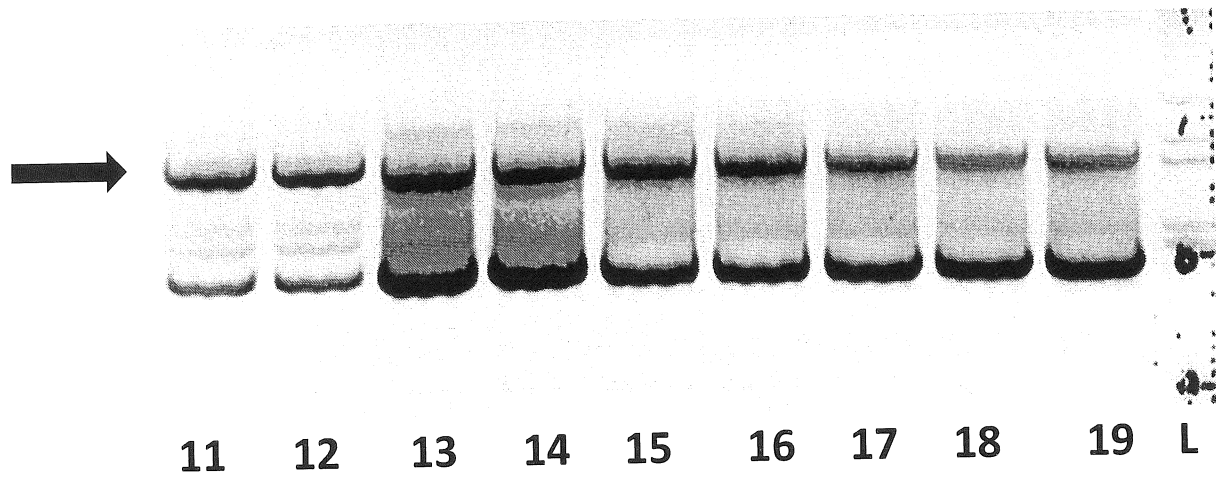


FIG. 2

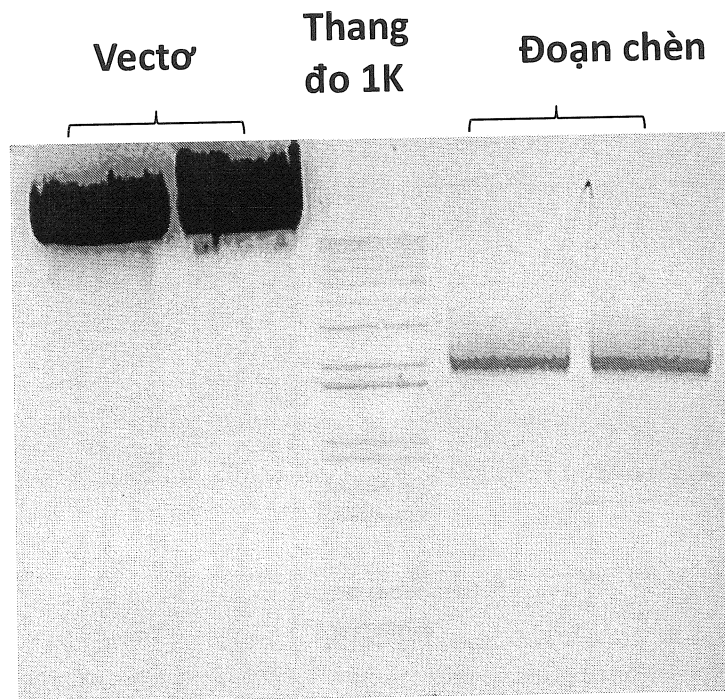


FIG. 3

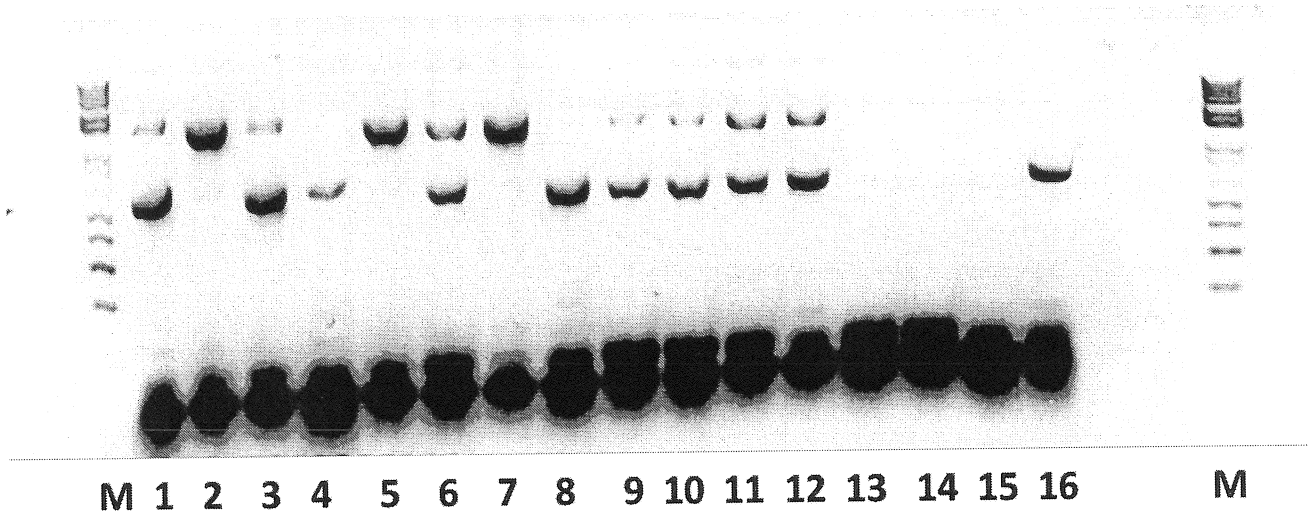


FIG. 4

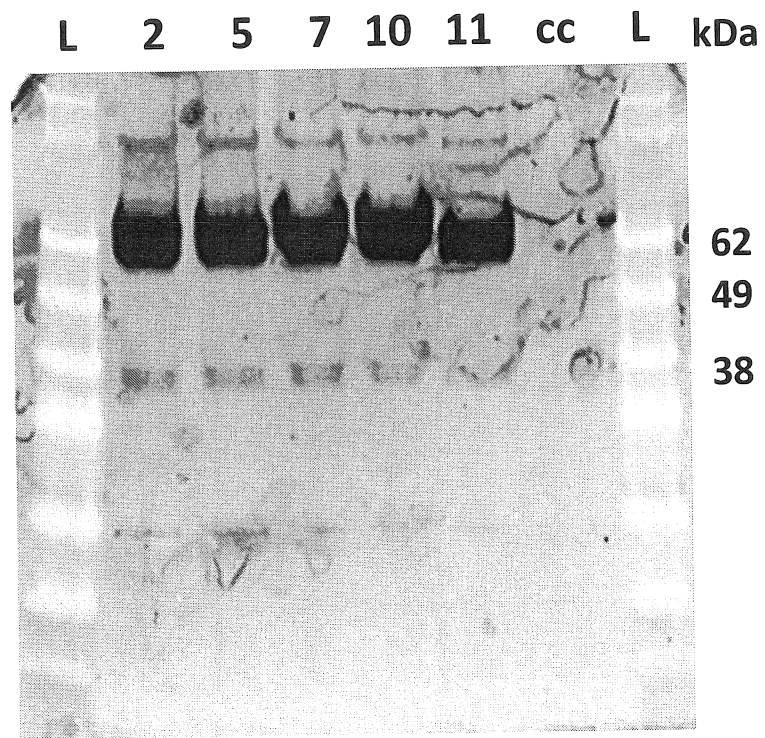


FIG. 5

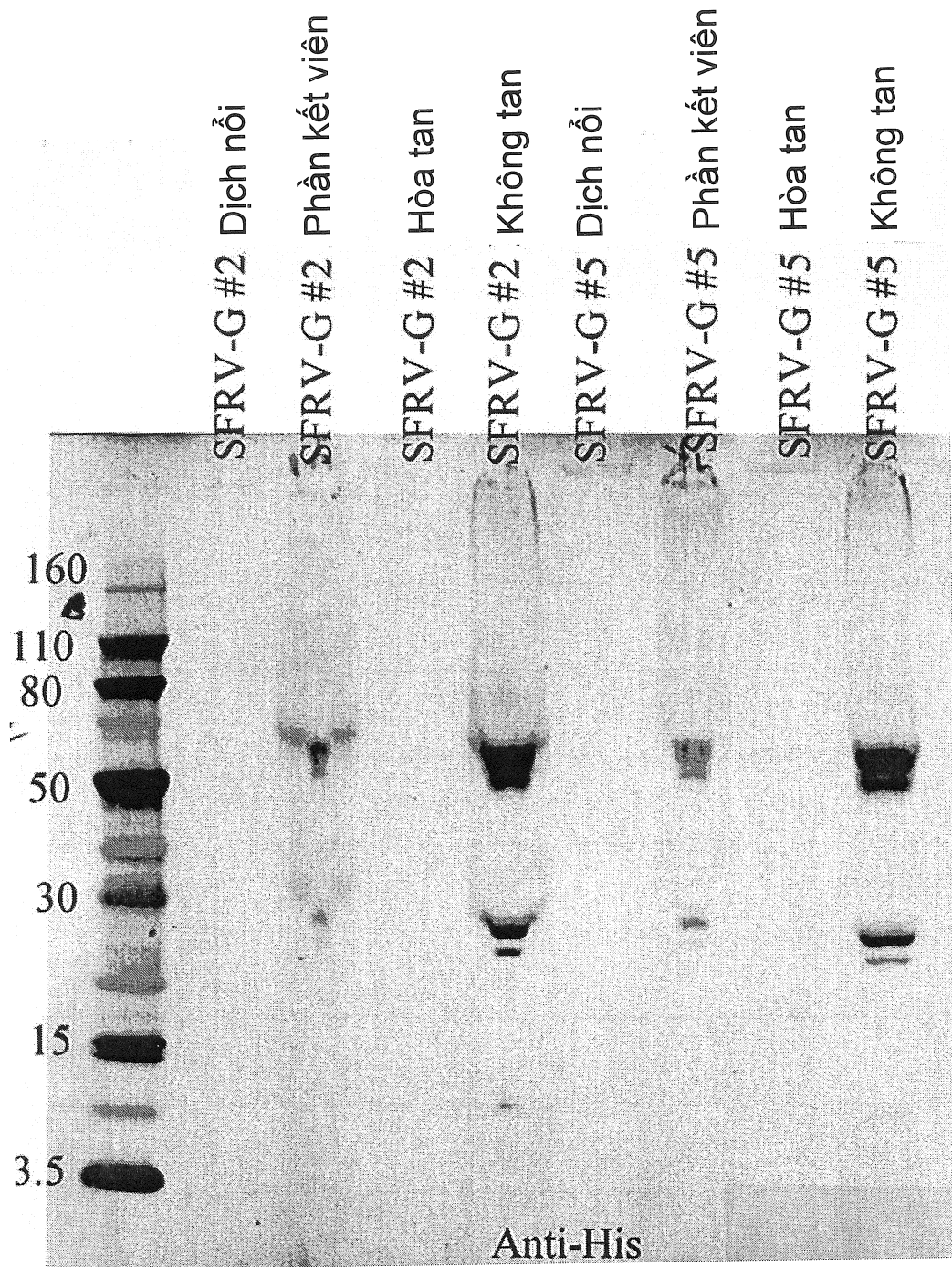


FIG. 6

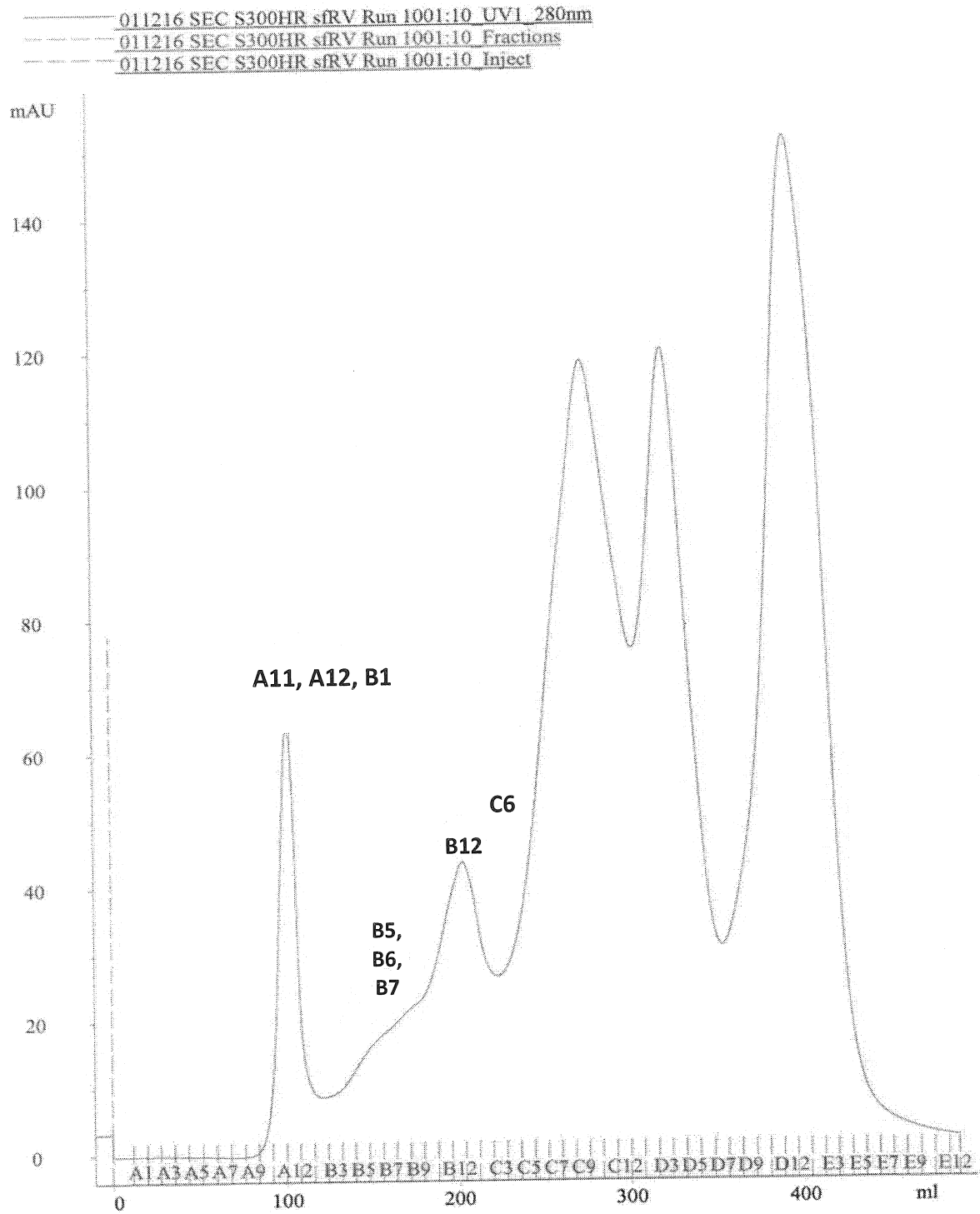


FIG. 7

