



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

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

(11)



1-0031611

(51)⁸

C07K 14/18; C12N 7/00; A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2017-02194

(22) 18/12/2015

(86) PCT/EP2015/080400 18/12/2015

(87) WO 2016/097245 23/06/2016

(30) 14199430.1 19/12/2014 EP

(45) 25/04/2022 409

(43) 27/11/2017 356A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, the Netherlands

(72) DE GROOF, Ad (NL); GUELEN, Lars (NL); SCHRIER, Carla, Christina (NL);
DEIJS, Martin (NL); VAN DER HOEK, Cornelia, Maria (NL).

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

(54) PESTIVIRUT Ở LỢN, PROTEIN CỦA VIRUT, GEN MÃ HÓA PROTEIN NÀY
VÀ VẮCXIN DỰA TRÊN VIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến pestivirut mới ở lợn, protein của virut và vắc xin dựa trên virut và protein của nó. Sáng chế còn đề cập đến đoạn ADN chứa gen của virut và vắc xin ADN dựa trên các gen của virut. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các kháng thể phản ứng với virut mới và các thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện virut hoặc các kháng thể kháng lại virut này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến pestivirus mới, protein của virus này và vắc xin dựa trên virus này và protein của nó. Sáng chế còn đề cập đến đoạn ADN chứa gen của virus và vắc xin ADN dựa trên gen của virus này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các kháng thể phản ứng với virus mới và các thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện virus hoặc kháng thể kháng lại virus này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong nhiều thập kỷ gần đây, người ta thấy được sự tăng mạnh về lượng tiêu thụ thịt lợn trên toàn thế giới. Kết quả dẫn đến sự tăng về số lượng cũng như quy mô của các trang trại, để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường. Như được biết trong ngành chăn nuôi nói chung, số lượng lớn động vật sống gần nhau có thể bị tấn công bởi các bệnh đã biết và các bệnh ít biết hoặc ít gặp hoặc thậm chí chưa biết ở trước thời điểm xuất hiện các trang trại thương mại quy mô lớn.

Một bệnh mà tác nhân gây bệnh của nó vẫn đang chờ xác định đã biết là tồn tại từ đầu thế kỷ 20, khi “lợn nhảy” được nhắc đến bởi Kinsley trong Veterinary Medicine 1922;17. Qua một khoảng thời gian gần một thế kỷ, một vài bài báo được công bố mô tả cùng các triệu chứng dưới các tên khác nhau, bao gồm “bệnh lợn lắc”, chứng run ở lợn, *Myoclonia Congenita* ⁽¹⁾ hoặc chứng run bẩm sinh (CT) ⁽²⁾. Bệnh này còn được đề cập đến là CT. Các triệu chứng của CT là các cơn rung ở đầu và chân của lợn con mới sinh với mức độ nghiêm trọng khác nhau nhưng không xuất hiện khi ngủ. Các cơn rung này có thể nặng lên bởi tình trạng bị kích động và bị lạnh. Chúng kéo dài trong vài tuần đến vài tháng nhưng giảm dần khi lợn lớn lên. Mặc dù việc tự rung không trực tiếp gây ra tử vong, nhưng các cơn rung lại có thể ngăn cản lợn con tìm thấy đầu vú để bú. Điều này sau đó có thể dẫn đến việc lợn bị chết đói. Bệnh này được lan rộng và xuất hiện lặp đi lặp lại ở các trang trại lợn trên khắp thế giới.

Một vài trường hợp được biết là gây ra CT, và các trường hợp này hiện nay được chia thành hai nhóm A và B. Nhóm A bao gồm các trường hợp với các tổn thương mô nhìn thấy được, trong khi các trường hợp nhóm B không thể hiện tổn

thương rõ ràng nào. Nhóm A được chia tiếp thành năm phân nhóm, dựa vào các nguyên nhân khác nhau của CT. Trường hợp CT nhóm A-I được biết là do virus sốt lợn cổ điển (Classical Swine Fever-CSF) gây ra. Nguyên nhân của CT nhóm A-III là do khiếm khuyết gen (liên kết giới tính) chỉ có ở giống Landrace, trong khi khiếm khuyết gen lặn (liên kết thể nhiễm sắc điển hình) ở giống Saddleback là nguyên nhân của nhóm A-IV. Trường hợp nhóm A-V là do sự nhiễm độc triclofon gây ra, sự nhiễm độc này thường có liên quan đến thức ăn được xử lý phospho hữu cơ^(3, 4).

Trường hợp nhóm A-II đã, và vẫn đang là, trường hợp gây khó xử nhất. Chúng được cho là có nguyên nhân từ tác nhân gây nhiễm chưa được biết đến.

Mặc dù trước đây CT nhóm A-II có liên quan đến sự nhiễm PCV⁽⁵⁾, nhưng hiện nay nhiều nghiên cứu khác nhau đã chứng minh điều ngược lại. Ví dụ, PCV không có trong mô noron của lợn mắc chứng CT⁽⁶⁾ và chỉ lượng nhỏ không đáng kể PCV được tìm thấy trong mô không thuộc noron⁽⁴⁾. Nhìn chung, không có bằng chứng thuyết phục nào cho đến nay về nguyên nhân của CT nhóm A-II. Tuy nhiên, có lý do phù hợp để tin rằng CT nhóm A-II do tác nhân gây nhiễm gây nên. Phần lớn các con lợn con bị chứng rung thuộc nhóm A-II được sinh từ các lứa của lợn nái tơ (nghĩa là lợn cái ở giai đoạn giữa thời điểm thụ tinh và lứa đầu tiên của chúng) mà gần đây được đưa vào môi trường mới. Đáng chú ý là, sau lứa đầu tiên đẻ ra các con lợn con bị chứng rung, các lứa sau của cùng một con lợn nái hiếm khi thể hiện các dấu hiệu của CT. Đây là dấu hiệu chỉ ra rằng một loại miễn dịch nhất định đã sinh ra ở lợn nái, bảo vệ chống lại tác nhân gây CT. Khoảng 40 năm trước đây, Patterson và cộng sự⁽⁵⁰⁾ đã thành công trong việc gây ra CT nhóm A-II ở các lợn con thông qua việc gây nhiễm bằng thử nghiệm cho lợn nái chữa bằng nhũ tương của tủy sống, não và lá lách của các con lợn bị tác động về mặt lâm sàng.

Nhưng như được chỉ ra ở trên, không tác nhân gây nhiễm gây bệnh nào đã từng được phân lập từ lợn con CT hay lợn nái chữa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất tác nhân gây nhiễm mới là tác nhân gây ra CT nhóm A-II, cũng như vắc xin nhằm chống lại bệnh này. Ngoài ra, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp để phát hiện và nhận diện tác nhân gây nhiễm liên quan đến bệnh này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Tổng quan dạng sơ đồ của các đoạn môi được thiết kế trong gen ARN polymeraza (NS5B) của CTAPV, và sản phẩm PCR.

Fig. 2: Các mẫu khuếch đại 400 lần được cố định formalin và nhuộm màu hematoxylin-eosin của các bất thường rõ rệt nhất trong não và mô tủy sống. (A) Mặt cắt của tiểu não thể hiện sự tạo không bào của các tế bào Purkinje (lớp các tế bào lớn giữa lớp hạt và chất trắng. Mũi tên màu trắng chỉ ra các ví dụ về sự tạo không bào ở một vài trong số các tế bào Purkinje. (B) Sự tạo không bào của chất trắng, chỉ ra sự mất myelin. Một số ví dụ về sự mất myelin của các axon trong tủy sống được chỉ ra bởi các mũi tên màu trắng. (C) Sự tích lũy các vi thể bào thần kinh đệm (được nhuộm màu tím sẫm) tạo thành bao thể của vi thể bào thần kinh đệm xung quanh neuron thoái hóa (thực bào thần kinh) trong não. Neuron này được chỉ ra bởi mũi tên màu trắng. (D) Sự tạo viền quanh mạch trong tủy sống ở ngực. Các bạch cầu hạt ưa eosin bao quanh mạch máu mà được chỉ ra bởi mũi tên màu trắng.

Fig. 3: Cây phát sinh loài của CTAPV 1 và pestivirus đã được nhận diện trước kia khác có trình tự nucleotit được lưu giữ trong ngân hàng gen (số hiệu lưu giữ được chỉ ra trên Fig này). Trình tự axit amin của polyprotein được sử dụng cho phương pháp lân cận gần nhất. Thanh ở góc bên trái là số trung bình đoạn thể/vị trí nucleotit.

Fig. 4: Sự phân tích phát sinh loài của biến thể CTAPV. Trình tự axit amin được sử dụng cho phương pháp lân cận gần nhất. Thanh ở góc bên trái là số trung bình đoạn thể/vị trí nucleotit. Sự phân tích dựa vào 5000 nucleotit đầu tiên của bộ gen. CTAPV typ 7 không được bao gồm. CTAPV 5 giống với CTAPV 8.

Fig. 5: Sự so sánh trình tự axit amin của vùng E^{rms}-E1-E2 của CTAPV 1 và 1B. Trình tự protein E2 là chữ in nghiêng. Protein E^{rms} được gạch chân bằng đường kẻ đậm, trình tự protein E1 được gạch chân bằng đường kẻ mảnh.

Fig. 6: Sự so sánh trình tự axit amin của vùng E^{rms}-E1-E2 của CTAPV 1B và 8. Trình tự protein E2 là chữ in nghiêng. Protein E^{rms} được gạch chân bằng đường kẻ đậm, trình tự protein E1 được gạch chân bằng đường kẻ mảnh.

Fig. 7: Các kháng thể được tạo ra ở thỏ nhận diện đặc hiệu protein E2 của CTAPV được biểu hiện trong hệ biểu hiện baculovirus/SF9. Các vạch đánh dấu (bằng

chuẩn) tương ứng (từ dưới lên) với 5, 10, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 và 250 kDa.

Fig. 8: Chỉ dẫn vị trí vùng mã hóa protein E^{ms} (gạch chân đậm), vùng mã hóa protein E1 (gạch chân mảnh) và vùng mã hóa protein E2 (in nghiêng). Trình tự bắt đầu ở nt 1259 của bộ gen tham chiếu.

Fig. 9: Dữ liệu RT-qPCR của mẫu dòng chuẩn và mẫu đối chứng âm. Fig. 9A thể hiện đồ thị với các giá trị Ct với các chu kỳ được vẽ đồ thị theo RFU, Fig. 9B thể hiện đường cong chuẩn; các giá trị Ct được vẽ đồ thị theo nồng độ biến đổi log của các dung dịch pha loãng theo bậc mười lần (log) của axit nucleic đích và Fig. 9C thể hiện đường cong nóng chảy thu được theo thời gian thực (Real Time).

Mô tả chi tiết sáng chế

Để phát hiện và phân lập cuối cùng tác nhân gây ra CT nhóm A-II, huyết thanh và trong nhiều trường hợp là vật liệu sinh học khác của lợn con mắc CT nhóm A-II thu được từ tháng 9/2012 đến đầu năm 2014, trên 8 trang trại khác nhau ở Hà Lan. 8 trang trại này có tiền sử các con lợn con mắc CT (thường ở một trong số bốn lứa, lợn con được thấy là mắc CT trong thời điểm đỉnh của bệnh dịch ở một trang trại cụ thể).

Trang trại lợn ở Hà Lan được chẩn đoán là có đợt bùng phát chứng run bẩm sinh typ A-II vào đầu năm 2012. Chủ yếu là các con lợn con sinh ra từ lợn nái tợ, là các con lợn đẻ lứa đầu tiên, bị ảnh hưởng nhưng cả những con lợn nái với lứa đẻ sau đôi khi cũng bị ảnh hưởng. Việc chẩn đoán dựa trên các quan sát lâm sàng và sau đó là loại trừ chứng run bẩm sinh typ A-I, A-III, A-IV và A-V là nguyên nhân gây bệnh có thể có. Các con lợn con bị ảnh hưởng về mặt lâm sàng cho thấy cơn run ở các mức độ khác nhau, do sự co cơ quá mức trong quá trình vận động. Các triệu chứng này giảm bớt khi ngủ. Hiện tượng mất lợn con là tác dụng thứ cấp gây ra bởi việc mất khả năng tự ăn của các con vật bị ảnh hưởng, đặc biệt là trong tuần đầu tiên sau khi sinh. Về mặt mô học, não và tủy sống được đặc trưng bởi sự giảm myelin hóa. (Tuy nhiên, các bất thường ở mô không phải lúc nào cũng nhìn thấy ở các con lợn con bị ảnh hưởng. Trong tài liệu, mức độ giảm myelin hóa cũng được mô tả là có sự biến đổi). Như được mô tả thêm dưới đây, không phải tất cả các con lợn bị ảnh hưởng đều sống sót. Ở những con lợn sống sót, cơn run giảm bớt và cuối cùng biến mất khi các con lợn này lớn lên. Trong 20 tuần đầu của năm 2012, tổng cộng 48 lứa đẻ mắc triệu chứng của chứng run bẩm sinh được sinh ra từ lợn nái tợ, trong số tổng số 231 lứa đẻ từ lợn nái

tơ. Điều này tương đương với 21% trong tổng số lứa sinh ra từ lợn nái tơ. Tại thời điểm đỉnh điểm của đợt nhiễm bệnh, 8 tuần sau đợt bùng phát đầu tiên, 85% lứa đẻ từ lợn nái tơ cho thấy các con lợn con mắc chứng run bầm sinh typ A-II. Phần trăm mất lợn con (chết lợn con) đến khi cai sữa là 26% ở các lứa bị ảnh hưởng, so với 11% ở các lứa không bị ảnh hưởng. Ở các lứa bị ảnh hưởng, 60% số lợn con chết là do chứng run bầm sinh. Tổng số lợn con sinh ra ở mỗi lứa không bị ảnh hưởng. Chứng run bầm sinh tác động lên cả lợn con đực và lợn con cái mới sinh, và tỷ lệ phổ biến trong lứa này thay đổi trong khoảng <10% - 100%.

Các vấn đề về sự bùng phát chứng run bầm sinh vẫn tiếp tục ở trang trại này từ năm 2012, và các con lợn con bị ảnh hưởng vào năm 2013 và 2014 (xem phần dưới đây). Tuy nhiên, tỷ lệ mắc đã giảm.

Các mẫu huyết tương được lấy vào tháng 3/2012 (6 mẫu, tất cả các con lợn con có triệu chứng CT trong đó các nguyên nhân không phải do A-II có thể được loại trừ) và tháng 4/2012 (5 mẫu, tất cả các con lợn con có triệu chứng CT trong đó các nguyên nhân không phải do A-II có thể được loại trừ). Virut mới, tạm gọi là “Michael” (M) được phát hiện ở 11/11 mẫu.

Nhiều mẫu huyết tương hơn được lấy từ cùng một trang trại vào tháng 7/2012. Tổng cộng 16 mẫu huyết thanh từ lợn con sinh ra từ 2 lợn nái và 1 lợn nái tơ được phân tích. Không con nào trong số các con lợn con này thể hiện chứng run bầm sinh. Michael 1 được tìm thấy trong 1/16 mẫu.

Đợt bùng phát bệnh mới được chẩn đoán vào tháng 1/2013. Bốn con lợn con mới sinh trước khi nhận sữa non được lấy để mổ khám xác, tất cả đều biểu hiện triệu chứng của CT trong đó nguyên nhân không phải do A-II có thể được loại trừ. Virut mới có tên là Michael 1A bởi vì, mặc dù nó có nguồn gốc từ cùng một trang trại, nhưng một thời gian khá dài đã qua từ đợt bùng phát bệnh đầu tiên đến khi xuất hiện các vấn đề lâm sàng mới. Virut mới Michael 1A được phát hiện ở 4/4 lợn con.

Một lần nữa đợt bùng phát bệnh mới được chẩn đoán vào tháng 3/2013. Ba lợn con mới sinh chưa nhận sữa non được lấy để mổ khám xác, tất cả đều biểu hiện các triệu chứng của CT trong đó nguyên nhân không phải do A-II có thể được loại trừ. Virut mới này có tên là Michael 1B (M 1B). Virut mới Michael 1B được phát hiện ở 3/3 mẫu. Não và tủy sống cho thấy các dấu hiệu về sự mất myelin (xem Fig. 2).

Đợt bùng phát bệnh mới được chẩn đoán vào tháng 1/2014. Bốn lợn con mới sinh chưa nhận sữa non được lấy, tất cả đều biểu hiện các triệu chứng của CT trong đó nguyên nhân không phải do A-II có thể được loại trừ. Virut mới này có tên là Michael 1C (M 1C). Virut mới Michael 1C được phát hiện ở 4/4 mẫu. Việc mổ khám xác ở 3 lợn con khác được thực hiện vào tháng 2/2014, một lần nữa cả 3 lợn con này đều biểu hiện CT nhóm A-II, và Michael được phát hiện ở 3/3 mẫu.

Thực hiện mổ khám xác trên các con lợn con từ các đợt bùng phát vào tháng 1/2013, 3/2013 và 2/2014. Não và tủy sống cho thấy dấu hiệu mất myelin.

Tổng cộng 7 mẫu huyết thanh lấy từ lợn con mới sinh chưa nhận sữa non từ trang trại không có tiền sử về chứng run bầm sinh typ A-II được sử dụng làm đối chứng âm để chạy PCR và mổ khám xác. Tất cả các mẫu huyết tương đều âm tính với virut Michael, và không quan sát thấy có bất thường về bệnh học nào ở các con lợn con.

Phân tích ngang bằng của các đợt bùng phát CT nhóm A-II được thực hiện trên 7 trang trại khác ở Hà Lan.

Các mẫu lứa lợn con mắc CT được phân tích và virut mới được phát hiện thấy ở 100% các con lợn con CT từ đó vật liệu chưa nhận sữa non được lấy (vật liệu được lấy trước lần đầu tiên tiêu hóa sữa non hoặc sữa mẹ).

Virut mới theo sáng chế chưa được phân loại chính thức, nhưng ở thời điểm đó virut này được đề cập đến rõ nhất là “pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II”. Virut này sau đây cũng sẽ được gọi là CTAPV.

Trình tự bộ gen của virut được phân tích và cho thấy rằng virut mới bất ngờ mang một vài, mặc dù mức độ tương đối thấp, sự tương đồng với họ Flaviviridae, cụ thể hơn là với chi Pestivirus trong họ này. Các thành viên đã biết của chi Pestivirus là virut sốt lợn cổ điển, virut tiêu chảy ở bò và virut gây bệnh biên giới (Border).

Hạt virut trưởng thành của *Pestivirus* có đường kính khoảng 50nm, hình cầu và có vỏ, và chúng chứa ARN sợi đơn dương dài khoảng 12 kilobazơ (kb).

Trình tự ADN nguyên chiều dài của đại diện virut mới này được nêu trong SEQ ID NO: 19.

Tổ chức gen của virut mới gần với tổ chức gen của pestivirus đã biết (xem Fig.

1). Bộ gen pestivirus mã hóa polyprotein đơn NH₂-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH mà được xử lý đồng thời và sau khi dịch mã thành cả protein mang cấu trúc (protein “lõi” (C), và protein E^{ms}, E1 và E2) và protein không mang cấu trúc (NS). Phần đầu tận amin của polyprotein được cắt bởi các proteaza của tế bào chủ và các sản phẩm phân cắt của nó, lõi và protein vỏ (E^{ms}, E1 và E2) được tin là các thành phần cấu tạo chính của các hạt pestivirus (hạt virus trưởng thành).

Protein cấu trúc E^{ms}, còn được biết là E0 hoặc gp44/48, là protein vỏ có tính chất đặc trưng là có hoạt tính ARNaza (12). Nó được tiết ra từ các tế bào ở lượng tương đối lớn (13). Tuy nhiên, một lượng thậm chí lớn hơn vẫn còn liên kết với màng (14). Một trong những vai trò của E^{ms} có vẻ như là can thiệp vào hệ miễn dịch chủ bằng cách ức chế đáp ứng interferon sử dụng hoạt tính ARNaza của nó (15). Vai trò như vậy trong độc lực được hỗ trợ thêm bởi thực tế là các chủng virus thiếu mất E^{ms} sẽ bị làm giảm độc lực (16). E1 và E2 lần lượt được biết đến trước đó là gp33 và gp55 (và trước kia còn gây lúng túng là E1), là hai glycoprotein vỏ khác. Protein cấu trúc E2 tạo thành các homodime (dime cùng loại) và heterodime (dime khác loại) với E1 (17, 18). Đặc biệt là, các heterodime của protein E1 và E2 là quan trọng đối với các pestivirus để đi vào vật chủ của chúng, trong khi đó E^{ms} dường như là không cần thiết cho sự đi vào của virus (19, 20). Các kháng thể trung hòa nhằm đích chủ yếu là E^{ms} và E2, và nhằm đích E1 với mức độ ít hơn (17, 21).

Gen mã hóa protein vỏ E^{ms} gồm 216 axit amin được tìm thấy ở vị trí 1258-1899 của SEQ ID NO: 19 và gen mã hóa protein vỏ E2 gồm 211 axit amin được tìm thấy ở vị trí 2479-3111 của SEQ ID NO: 19. Gen mã hóa protein vỏ E1 gồm 193 axit amin được tìm thấy ở vị trí 1900-2478 của SEQ ID NO: 19.

Ví dụ về trình tự ADN của gen mã hóa protein vỏ E^{ms} được nêu trong SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin của protein E^{ms}.

Ví dụ về trình tự ADN của gen mã hóa protein vỏ E2 được nêu trong SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 4 là trình tự axit amin của protein E2.

Ví dụ về trình tự ADN của gen mã hóa protein vỏ E1 được nêu trong SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 6 là trình tự axit amin của protein E1.

Trình tự đầy đủ của virus mới được sử dụng để tạo ra cây phát sinh loài dựa trên

phương pháp xác suất tối đa (Maximum Likelihood), mô hình hiệu chỉnh Poisson và phân tích bootstrap (500 bản sao).

Các cây này được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình MEGA, phiên bản 5, sử dụng các thiết lập chuẩn. (MEGA5: phân tích di truyền tiến hóa phân tử sử dụng phương pháp xác suất tối đa, phương pháp khoảng cách tiến triển (Evolutionary Distance), và phương pháp tiết kiệm tối đa (maximum parsimony). Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei and Sudhir Kumar. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731–2739. 2011 doi:10.1093/molbev/msr121 Advance Access publication May 4, 2011).

Cây phát sinh loài dựa trên toàn bộ trình tự của pestivirus mới được biểu diễn trên Fig. 3. Phần trăm hỗ trợ bootstrap được chỉ ra ở các nốt. Thanh khoảng cách chỉ ra số các thay thế nucleotit ở mỗi vị trí.

Thấy rõ từ Fig. 3 rằng trong khi các pestivirus, virus gây bệnh Border, pestivirus của tuần lộc, virus sốt lợn cổ điển, virus tiêu chảy ở bò, pestivirus của hươu cao cổ và virus Bungowannah có quan hệ tương đối gần, virus mới theo sáng chế có quan hệ xa hơn với mỗi trong số các virus này.

Trên Fig. 4, cây phát sinh loài được biểu diễn trong đó 10 dạng phân lập (thể phân lập) khác nhau của virus theo sáng chế được so sánh.

Có thể thấy rằng các dạng phân lập M1, M1A, M1B và M1C (SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22), được phân lập ở cùng một trang trại, nhưng qua ba năm, có quan hệ với nhau gần gũi nhất. Các dạng phân lập từ các trang trại khác cho thấy sự thay đổi lớn hơn ở mức nào đó. M2, M4 và M9 (SEQ ID NO: 23, 25, 29) có quan hệ với nhau gần hơn so với nhóm M1. Điều này cũng đúng với cả M3, M6 và M8 (SEQ ID NO: 24, 26, 28). M7 (SEQ ID NO: 27) không được bao gồm. Điều này chỉ ra rằng có các thay đổi gen nhỏ giữa các dạng phân lập. Điều này được mong đợi đối với các virus ARN, và quan sát này là phù hợp với những gì thấy được đối với các pestivirus khác.

SEQ ID NO: 1, 3 và 5 lần lượt thể hiện ví dụ điển hình của trình tự nucleotit của gen mã hóa E^{rms}, E2 và E1 của virus theo sáng chế.

SEQ ID NO: 2, 4 và 6 lần lượt thể hiện ví dụ điển hình của trình tự axit amin của protein E^{rms}, E2 và E1 của virus theo sáng chế.

Sẽ hiểu rằng với các protein này, các thay đổi tự nhiên có thể tồn tại giữa các đại diện riêng của virus liên quan đến chứng run bẩm sinh nhóm A-II. Các thay đổi gen dẫn đến có những thay đổi nhỏ ở, ví dụ, trình tự axit amin E^{ms}, E2 và E1. Trước hết, có cái gọi là “sự dao động ở bazơ thứ hai và thứ ba” giải thích rằng các thay đổi nucleotit có thể xảy ra mà vẫn không làm thay đổi trình tự axit amin chúng mã hóa: ví dụ bộ ba TTA, TTG, TCA, TCT, TCG và TCC tất cả đều mã hóa leucine. Ngoài ra, các thay đổi nhỏ giữa các đại diện của pestivirus lợn mới theo sáng chế có thể gặp trong trình tự axit amin. Các thay đổi này có thể được phản ánh bởi (các) khác biệt axit amin ở toàn bộ trình tự hoặc bởi các đoạn mất, thay thế, cài xen, đảo hoặc thêm (các) axit amin trong trình tự này. Các thay thế axit amin mà về cơ bản không làm thay đổi hoạt tính sinh học và miễn dịch, được mô tả, ví dụ, bởi Neurath và cộng sự trong "The Proteins" Academic Press New York (1979). Các thay thế axit amin giữa các axit amin liên quan hoặc các thay thế mà xảy ra thường xuyên trong tiến trình là, không kể những cái khác, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (xem Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Các đoạn thế axit amin khác bao gồm Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val và Ala/Glu. Dựa vào thông tin này, Lipman và Pearson đã phát triển phương pháp so sánh protein nhanh và nhạy (Science 227, 1435-1441, 1985) và xác định độ tương đồng về chức năng giữa các protein tương đồng. Các đoạn thế axit amin này của các phương án được lấy làm ví dụ theo sáng chế, cũng như các thay đổi có đoạn mất và/hoặc đoạn cài xen là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Điều này giải thích vì sao E^{ms}, E2 và E1, khi được phân lập từ các đại diện khác nhau của pestivirus ở lợn theo sáng chế, có thể có mức tương đồng tương đối thấp hơn 100%, trong khi vẫn đại diện cho E^{ms}, E2 và E1 của pestivirus mới theo sáng chế.

Điều này được phản ánh rõ, ví dụ, trong cây phát sinh loài đối với gen N^{pro} pestivirus trong Becher, P. *et al.*⁽⁴⁹⁾, trong đó được thấy là các pestivirus có liên quan với nhau chặt chẽ lại có trình tự nucleotit toàn bộ bộ gen khác nhau đáng kể cũng như trình tự nucleotit của gen N^{pro} khác nhau đáng kể.

Do đó, phương án thứ nhất của sáng chế đề cập đến virus được phân lập là thành viên của các pestivirus, trong đó virus này khác biệt ở chỗ

- a) virus này là tác nhân gây chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn và
- b) virus này có bộ gen virus chứa gen mã hóa protein vỏ E^{ms}, gen mã hóa protein vỏ E2 và gen mã hóa protein vỏ E1, trong đó trình tự nucleotit của gen E^{ms} có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và/hoặc trình tự nucleotit của gen E2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và/hoặc trình tự nucleotit của gen E1 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Cho mục đích của sáng chế, độ đồng nhất trình tự được hiểu là phần trăm độ đồng nhất giữa, ví dụ, trình tự của SEQ ID NO: 1 và vùng tương ứng mã hóa E^{ms} của pestivirus mà độ đồng nhất trình tự của nó được xác định.

Chương trình thích hợp để xác định độ đồng nhất trình tự là chương trình blast nucleotit (blastn) của công cụ tra cứu sắp thẳng cục bộ cơ sở của NCBI (NCBI's Basic Local Alignment Search Tool), sử dụng phương án “sắp thẳng hai hoặc nhiều trình tự” và các thiết lập chuẩn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Cho mục đích của sáng chế, được phân lập nghĩa là: tách ra khỏi mô mà virus kết hợp với nó trong tự nhiên. Ví dụ về virus được phân lập là virus có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Dạng được ưu tiên của phương án này đề cập đến virus như vậy có gen E^{ms} có độ đồng nhất trình tự ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của E^{ms} được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Dạng ưu tiên khác của phương án này đề cập đến virus có gen E2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của gen E2 được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Dạng được ưu tiên khác nữa của phương án này đề cập đến virus có E1 gen có độ đồng nhất trình tự ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của gen E1 được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Dạng được ưu tiên hơn của phương án này đề cập đến virus được phân lập là

thành viên của các pestivirus, virus này khác biệt ở chỗ

a) virus này là tác nhân gây chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn và

b) virus này có bộ gen virus chứa gen mã hóa protein vỏ E^{ms}, gen mã hóa protein vỏ E2 và gen mã hóa protein vỏ E1, trong đó trình tự nucleotit của gen E^{ms} có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen E2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và trình tự nucleotit của gen E1 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo cách khác, cách xác định đặc điểm virus theo sáng chế phụ thuộc vào thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi đặc hiệu với trình tự gen NS5B hoặc trình tự 5'UTR của virus theo sáng chế.

Tổng quan về các đoạn mồi khác nhau và kích thước của các sản phẩm PCR được tạo ra sử dụng các đoạn mồi này được trình bày trong bảng a và b.

Bốn bộ đoạn mồi khác nhau có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 7-8, SEQ ID NO: 9-10, SEQ ID NO: 11-12 và SEQ ID NO: 13-14 được chọn lọc về tính đặc hiệu của chúng đối với vùng NS5B của virus.

Các thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi thứ nhất (SEQ ID NO: 7-8), bộ đoạn mồi thứ hai (SEQ ID NO: 9-10), và kết hợp các đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược phản ứng đặc hiệu với gen NS5B của virus, sử dụng hai cặp đoạn mồi sau đây F1-R1, F2-R2, F1-R2 và F2-R1, theo thứ tự.

Các bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 11-12 (PAN-FW và PAN-REV) và SEQ ID NO: 13-14 (PANdeg-FW và PANdeg-REV) cũng phản ứng đặc hiệu với NS5B. Bộ đoạn mồi suy biến SEQ ID NO: 13-14 được thiết kế để tăng cơ hội tìm thấy các biến thể CTAPV có trình tự ARN thay đổi ít.

Thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi (SEQ ID NO: 15-16) phản ứng đặc hiệu với 5' UTR của virus và sử dụng hai đoạn mồi F3-R3.

Thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi (SEQ ID NO: 17-18) cũng phản ứng đặc hiệu với 5' UTR của virus và sử dụng hai đoạn mồi F4-R4.

Các thử nghiệm, được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, là

thử nghiệm PCR chuẩn trên ADN hỗ trợ. (Dĩ nhiên là, vì virus có bộ gen ARN, ARN virus trước tiên được phiên mã thành ADN hỗ trợ trong phản ứng phiên mã ngược. ADN hỗ trợ được sử dụng cho các phản ứng PCR).

Bảng a

Tên đoạn mồi	Tên ngắn	Trình tự đoạn mồi	Vị trí trong SEQ ID NO: 19
CTAPV-PAN2-F2	F2	CGGATACAGAAATACTAC	10204-10221
CTAPV-PAN2-R2	R2	CCGAATGCAGCTARCAGAGG	10519-10538
CTAPV-PAN2-F1	F1	GCCATGATGGAGGAAGTG	10261-10278
CTAPV-PAN2-R1	R1	GGGCAGRTTTGTGGATTTCAG	10397-10416
CTAPV-PAN-FW	PAN-FW	GAAACAGCCATGCCAAAAAATGA G	9889-9912
CTAPV-PAN-REV	PAN-RV	AGTGGGTTCCAGGGGTAGATCAG	10762-10784
CTAPV-PANdeg-FW	PANdeg-FW	GAAACAGCCATGCCMAARAATGA G	9889-9912
CTAPV-PANdeg-REV	PANdeg-RV	AGTGGGTTCCAGGRGTAGATYAG	10762-10784
CTAPV-PAN2-F3	F3	GAGTACGGGGCAGACGTCAC	161-180
CTAPV-PAN2-R3	R3	CATCCGCCGGCACTCTATCAAGCA G	318-342
CTAPV-PAN2-F4	F4	ATGCATAATGCTTTGATTGG	2-18
CTAPV-PAN2-R4	R4	GTGACGTCTGCCCCGTACTC	161-180

Bảng b

Tổ hợp đoạn mồi	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Đích
F1-R1	60,2	156	NS5B
F1-R2	60,2	277	NS5B
F2-R1	50,9	213	NS5B
F2-R2	50,9	335	NS5B
PAN-FW-PAN-RV	58,0	896	NS5B
PANdeg-FW-PANdeg-RV	58,0	896	NS5B
F3-R3	50,0	182	5'-UTR

F4-R4

50,0

182

5'-UTR

Nếu virus được đặc trưng bởi việc sử dụng bộ đoạn mô tả trên, có thể nói như sau: nếu việc phân tích sản phẩm PCR của, ví dụ, bộ đoạn mô tả F1-R1 cho biết sản phẩm PCR chứa khoảng 156 cặp bazơ hoặc nếu việc phân tích sản phẩm PCR của, ví dụ, bộ đoạn mô tả F2-R2 cho biết sản phẩm PCR chứa khoảng 335 cặp bazơ, điều này chứng minh rõ ràng rằng virus phân tích thuộc virus theo sáng chế.

Đơn thuần là ví dụ: sản phẩm PCR chứa khoảng 156 cặp bazơ là sản phẩm PCR có chiều dài từ $156 + 10$ đến $156 - 10$ cặp bazơ. Sản phẩm PCR chứa khoảng 335 cặp bazơ là sản phẩm PCR có chiều dài từ $335 + 10$ đến $335 - 10$ cặp bazơ.

Do đó, dạng khác của phương án này của sáng chế đề cập đến virus được phân lập là thành viên của Pestivirus, khác biệt ở chỗ:

- a) virus này là tác nhân gây ra chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn và
- b) ADN bổ trợ được phiên mã ngược từ bộ gen ARN của virus phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 156 ± 10 cặp bazơ và/hoặc phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 9 và 10 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 335 ± 10 cặp bazơ và/hoặc phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 ± 10 cặp bazơ và/hoặc phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 ± 10 cặp bazơ và/hoặc phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 ± 10 cặp bazơ và/hoặc phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 ± 10 cặp bazơ.

Dạng được ưu tiên của phương án này đề cập đến virus theo sáng chế trong đó ADN bổ trợ được phiên mã ngược từ bộ gen ARN của virus phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 156 ± 10 cặp bazơ và phản ứng bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 9 và 10 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 335 ± 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 ± 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn mô tả được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 ± 10

10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 +/- 10 cặp bazơ.

Dạng ưu tiên hơn của phương án này đề cập đến virus theo sáng chế trong đó virus này có bộ gen virus chứa gen mã hóa E^{ms}, gen mã hóa E2 và gen mã hóa E1, trong đó trình tự nucleotit của gen E^{ms} có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen E2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và trình tự nucleotit của gen E2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 5 và trong đó ADN bổ trợ của bộ gen virus phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 156 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và 10 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 335 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 896 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18 trong phản ứng PCR để tạo ra sản phẩm PCR gồm 182 +/- 10 cặp bazơ.

Virus theo sáng chế có thể ở dạng sống, dạng giảm độc lực hoặc dạng bất hoạt.

Như chỉ ra ở trên, trình tự ADN của gen mã hóa E^{ms}, protein E2 và E1 của virus sau đây sẽ được mô tả. Việc nhận diện các gen này là rất hữu ích, vì chúng có thể được sử dụng làm cơ sở cho vắc xin ADN, để sử dụng trong việc bào chế vắc xin cấu trúc dưới phân tử trên cơ sở các protein này hoặc cho các mục đích chẩn đoán, như được giải thích khái quát dưới đây.

Do vậy, phương án khác của sáng chế đề cập đến gen mã hóa protein E^{ms} được đặc trưng bởi trình tự nucleotit của gen đó có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E^{ms} được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Dạng được ưu tiên của phương án này đề cập đến gen có độ đồng nhất trình tự

ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của gen E^{ms} được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến gen mã hóa protein E2 được đặc trưng bởi trình tự nucleotit của gen có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E2 được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến gen có độ đồng nhất trình tự ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của gen E2 được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến gen mã hóa protein E1 được đặc trưng bởi trình tự nucleotit của gen có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E1 được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến gen như vậy có độ đồng nhất trình tự ít nhất 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí 100%, theo thứ tự ưu tiên, với trình tự nucleotit của gen E1 được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến protein E^{ms} được đặc trưng bởi protein E^{ms} được mã hóa bởi gen E^{ms} theo sáng chế.

Các protein E^{ms} của virus theo sáng chế rất phù hợp vì chúng thích hợp để sử dụng trong vắc xin, cụ thể hơn là trong vắc xin cấu trúc dưới phân tử, chúng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể và chúng làm cho các thử nghiệm chẩn đoán khả thi, như được giải thích dưới đây.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến E^{ms} có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến protein E2, được đặc trưng bởi protein E2 được mã hóa bởi gen E2 theo sáng chế.

E2 như vậy của virus theo sáng chế rất phù hợp vì chúng thích hợp để sử dụng trong vắc xin, cụ thể hơn là trong vắc xin cấu trúc dưới phân tử, chúng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể và chúng làm cho các thử nghiệm chẩn đoán khả thi, như

được giải thích dưới đây.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến protein E2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến protein E1, được đặc trưng bởi protein E1 được mã hóa bởi gen E1 theo sáng chế.

Protein E1 như vậy của virus theo sáng chế rất phù hợp vì chúng thích hợp để sử dụng trong vắc xin, cụ thể hơn là trong các giả hạt và vắc xin chứa các giả hạt này, như được giải thích dưới đây.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến protein E1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6.

Một trong số các ưu điểm của sáng chế là lần đầu tiên có thể theo sát quá trình nhiễm virus và phân tích sự có mặt hoặc không có mặt virus mới ở nhiều cơ quan khác nhau và dịch thể của lợn bị nghi ngờ nhiễm virus mới theo sáng chế.

Được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế rằng nhiều mô và cơ quan từ lợn mắc chứng run bầm sinh nhóm A-II hiện nay có thể được kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt và số lượng virus mới.

Phát hiện ra rằng huyết thanh, huyết tương, PBL, tim, ruột non và ruột già, não, tủy sống vùng ngực, tủy sống vùng thắt lưng, gan, hạch bạch huyết ở bẹn, phổi, túi mật, bàng quang, thận, amidan và lá lách được phân lập từ lợn mắc chứng run bầm sinh nhóm A-II chứa virus mới.

Điều này giúp hiểu rõ hơn sự phát triển của bệnh.

Ưu điểm khác của sáng chế là giờ đây có thể gây nhiễm virus mới cho lợn khỏe mạnh và xét nghiệm con đường gây nhiễm virus. Cho mục đích này, cách vật liệu cơ quan từ các con vật mắc chứng run bầm sinh nhóm A-II được phân lập và tinh sạch được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Vật liệu này sau đó được tiêm vào lợn con sau cai sữa khỏe mạnh để nghiên cứu sự sao chép của virus in vivo theo các phương pháp được áp dụng bởi Patterson (10-20% (w/v) thể đồng nhất được tiêm qua nhiều con đường sử dụng khác nhau, miệng, mũi, trong cơ, dưới da).

Ưu điểm khác nữa của sáng chế là có thể gây nhiễm virus mới cho lợn nái to

đang chữa nhằm chỉ ra rằng virus này có khả năng gây ra chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn con của các con lợn nái tơ này. Kết quả của các thử nghiệm này được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Ngoài ra, vật liệu này được sử dụng làm vật liệu thử thách trong thử nghiệm tiêm vắc xin/thử thách như được mô tả dưới đây.

Cũng là một trong số các ưu điểm của sáng chế là, do pestivirus mới ở lợn hiện nay đã được phân lập, virus này và/hoặc các cấu trúc dưới phân tử bảo vệ của virus có thể được sử dụng làm vật liệu khởi đầu cho mục đích tiêm vắc xin.

Đơn thuần làm ví dụ: phần ví dụ thực hiện sáng chế mô tả việc bào chế vắc xin chứa protein E2 được biểu hiện bởi baculo, việc sử dụng vắc xin toàn bộ tế bào và vắc xin E2 tinh sạch và sau đó thử thách với vật liệu thử thách có độc tố nêu trên.

Do đó, phương án khác của sáng chế đề cập đến vắc xin kháng lại CT nhóm A-II ở lợn, trong đó vắc xin này chứa lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của virus theo sáng chế và chất mang được dụng.

Việc kháng lại trong trường hợp này cần được hiểu theo nghĩa rộng: kháng lại CT nhóm A-II ở lợn được xem là bao gồm việc chủng ngừa để ngăn ngừa các dấu hiệu của bệnh cũng như chủng ngừa để giảm bớt các dấu hiệu của bệnh như được nêu ở trên.

Ví dụ về chất mang được dụng thích hợp để sử dụng trong vắc xin theo sáng chế là nước vô trùng, nước muối, đệm chứa nước như PBS và chất tương tự. Ngoài ra, vắc xin theo sáng chế có thể bao gồm các phụ gia khác như chất bổ trợ, chất làm ổn định, chất chống oxy hóa và các chất khác, như được mô tả dưới đây.

Vắc xin theo sáng chế có thể, ví dụ, bao gồm virus theo sáng chế ở dạng sống bị giảm độc lực hoặc dạng bất hoạt.

Vắc xin virus sống bị giảm độc lực, nghĩa là vắc xin chứa virus theo sáng chế ở dạng sống bị giảm độc lực, có lợi thế hơn vắc xin bất hoạt mà chúng có thể mô phỏng tốt nhất con đường gây nhiễm tự nhiên. Ngoài ra, khả năng sao chép của chúng cho phép chủng ngừa với lượng virus thấp; số lượng của chúng sẽ tự động tăng lên cho đến khi nó đạt đến mức độ khởi động hệ miễn dịch. Từ thời điểm này trở đi, hệ miễn dịch sẽ được khởi động và cuối cùng sẽ loại bỏ virus.

Virut sống bị làm giảm độc lực là virut có mức độc lực giảm so với virut được phân lập từ thực địa. Virut có mức độc lực giảm được xem virut đem lại tác dụng bảo vệ kháng lại CT nhóm A-II hoặc ít nhất là loại bỏ các triệu chứng của CT, so với triệu chứng của CT do pestivirus kiểu đại theo sáng chế gây ra.

Do đó, một dạng được ưu tiên của phương án này theo sáng chế đề cập đến vắc xin chứa virut theo sáng chế trong đó virut này ở dạng sống bị làm giảm độc lực.

Virut giảm độc lực có thể thu được theo nhiều cách khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng có thể, ví dụ thu được bằng cách phát triển virut theo sáng chế khi có mặt tác nhân gây đột biến, sau đó lựa chọn virut thể hiện sự giảm mức độ đời con cháu và/hoặc tốc độ sao chép. Nhiều tác nhân gây đột biến như vậy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp thường được sử dụng khác là cấy truyền in vitro trên dòng tế bào dễ bị mắc. Sau đó, các virut thích nghi với dòng tế bào được sử dụng để cấy truyền, sao cho chúng bị làm giảm độc lực khi chuyển sang vật chủ tự nhiên một lần nữa dưới dạng vắc xin.

Cách khác để thu được virut giảm độc lực là cho các virut phát triển ở các nhiệt độ lệch khỏi nhiệt độ môi trường sống tự nhiên. Phương pháp lựa chọn thể đột biến nhạy với nhiệt độ (T-mutant) đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp này bao gồm bước cho virut phát triển, thường trong điều kiện có mặt tác nhân gây đột biến, sau đó phát triển ở cả nhiệt độ dưới tối ưu và nhiệt độ tối ưu, chuẩn độ virut thể hệ sau trên các lớp tế bào và lựa chọn bằng mắt thường các vết tan phát triển chậm ở nhiệt độ tối ưu. Các vết tan nhỏ này bao gồm các virut sống bị làm giảm độc lực phát triển chậm và do đó là virut mong muốn.

Cách khác để thu được pestivirus sống bị làm giảm độc lực theo sáng chế đề cập đến cải biến bộ gen của pestivirus có chủ ý. Phương pháp này có ưu điểm so với các kỹ thuật làm giảm độc lực cổ điển như nêu trên, là đã biết bản chất của việc làm giảm độc lực. Đối với pestivirus, nhiều chủng virut sống bị làm giảm độc lực của, ví dụ, các pestivirus tiêu chảy ở bò và virut sốt lợn cổ điển đã được mô tả từ đó, ví dụ gen E2, gen E^{ms} hoặc gen N^{pro} hoặc là được làm mất hoặc là được cải biến.

Ví dụ về pestivirus sống bị làm giảm độc lực, cụ thể hơn là pestivirus ở lợn là

virut sốt lợn cổ điển (CSFV), có đoạn mất N^{pro} được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số US7572455 và trong Mayer, D. et al⁽¹⁹⁾.

Ví dụ về pestivirus sống bị làm giảm độc lực, cụ thể hơn là virut sốt lợn cổ điển, có cả cải biến E^{rms} và mất N^{pro} được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số US7572455.

Ví dụ về pestivirus sống bị làm giảm độc lực, cụ thể hơn là virut sốt lợn cổ điển, có cải biến ở gen E2 được mô tả, ví dụ, bởi Risatti, G.R. et al.⁽²²⁾ và bởi Risatti, G.R. et al.⁽²³⁾.

Việc bị nhiễm pestivirus nhìn chung là vấn đề gặp phải ở nhiều nước nơi mà lợn, động vật nhai lại hoặc cừu được chăn nuôi. Hiện nay, các phương pháp khác nhau để giải quyết tình trạng nhiễm pestivirus nhìn chung được áp dụng ở nhiều nước khác nhau ở đó các pestivirus gây ra thiệt hại về mặt kinh tế. Một số nước sử dụng phương pháp tiêu hủy toàn bộ để loại bỏ virut, trong khi đó các nước khác ưu tiên phương pháp chủng ngừa hơn. Thực tế là các phương pháp này được sử dụng song song, tuy nhiên lại gây ra các vấn đề. Đơn thuần là ví dụ: ví dụ, pestivirus ở lợn lan truyền ở các con lợn trang trại nhưng cũng lan truyền ở các động vật hoang dã như lợn lòi đực hoang dã, và do đó các con vật này tạo ra nguồn từ đó virut có thể tràn sang các con vật nuôi trong nhà. Các con vật đã chủng ngừa vắc xin cổ điển không dễ để phân biệt với gia súc bị nhiễm ở thực địa, bởi vì trong cả hai trường hợp, các kháng thể chống lại virut đều sẽ có mặt. Do đó, chưa biết là các con vật dương tính với kháng thể pestivirus là dương tính với kháng thể do sự nhiễm (trong trường hợp đó chúng có thể mang virut) hay do sự chủng ngừa. Kết quả là, các con vật này sẽ không được phép vận chuyển sang các nước đã chọn phương pháp tiêu hủy toàn bộ đối với pestivirus đó.

Do pestivirus mới gây CT nhóm A-II hiện nay đã được nhận diện, virut này có thể áp dụng trong tương lai cho pestivirus mới này.

Vấn đề này có thể được giải quyết thông qua việc sử dụng cái gọi là vắc xin chỉ thị hoặc vắc xin DIVA (DIVA = Differentiating Infected from Vaccinated Animals – bị nhiễm phân biệt từ các con vật đã được chủng ngừa). Vắc xin như vậy thiếu một hoặc nhiều protein virut sinh miễn dịch hoặc ít nhất một trong số các epitop sinh miễn dịch, kết quả là các con vật được chủng ngừa vắc xin chỉ thị sẽ không sinh ra các kháng thể kháng lại tất cả các protein/epitop virut sinh miễn dịch. Các khác biệt ở bảng màu kháng thể giữa động vật được chủng ngừa và động vật bị nhiễm có thể được chứng

minh bằng các thử nghiệm chẩn đoán được thiết kế cho mục đích này. Do đó, thử nghiệm này cho phép phân biệt động vật đã được chủng ngừa với các động vật bị nhiễm.

Vì các gen mã hóa protein E^{ms}, Npro, E1 và E2 của pestivirus mới theo sáng chế hiện nay đã biết, các kỹ thuật vắc xin chỉ thị đã biết như được mô tả cho, ví dụ pestivirus ở lợn CSFV hiện nay có thể áp dụng lên virus mới. Ví dụ về vắc xin CSFV sống bị làm giảm độc lực cũng thích hợp làm vắc xin chỉ thị được mô tả, ví dụ bởi Van Gennip, H.G.P. et al⁽⁷⁾., Reimann, I. et al⁽⁸⁾., Beer, M. et al⁽⁹⁾., Wehrle, F. et al⁽¹⁰⁾, bởi Dong, X.N. và Chen, Y.H.⁽¹¹⁾., và bởi de Smit, A. J. et al.⁽²⁴⁾. Trong hầu hết các trường hợp, virus được báo cáo trong đó gen E2 hoặc E^{ms} được trao đổi với gen tương ứng của chủng virus khác loại hoặc pestivirus khác.

Tuy nhiên, nhược điểm có thể có của việc sử dụng virus sống bị làm giảm độc lực có thể là ở chỗ vốn có lượng độc lực nhất định ở lại. Đây không phải là nhược điểm thực sự miễn là mức độc lực chấp nhận được, nghĩa là miễn vắc xin này ít nhất ngăn không để lợn bị chết. Dĩ nhiên, độc lực còn lại của vắc xin sống bị làm giảm độc lực càng thấp, ảnh hưởng của việc chủng ngừa đến sự tăng cân trong/sau khi chủng ngừa càng ít.

Phương án khác để sử dụng virus sống bị làm giảm độc lực là sử dụng virus không truyền nhiễm. Ở các virus này, gen cơ bản bị mất, và được bổ sung *in trans* vào dòng tế bào được sử dụng để phát triển virus. Do đó, virus đời sau là virus mà, mặc dù có khả năng gây nhiễm tế bào chủ, nhưng không thể sao chép trong tế bào chủ đó. Virus không truyền nhiễm này mô phỏng sát sự nhiễm tự nhiên và đồng thời virus không thể lan truyền. Vắc xin chứa virus không truyền nhiễm như vậy rất an toàn và ngoài ra nó rất thích hợp để làm vắc xin chỉ thị. Vắc xin này được mô tả trong, ví dụ pestivirus ở lợn CSFV, ví dụ, bởi Widjojoatmodjo, M.N. et al.⁽²⁵⁾, và bởi Van Gennip, H.G. et al.⁽²⁶⁾.

Vắc xin bất hoạt, ngược lại với vắc xin sống bị làm giảm độc lực, vốn an toàn, do không để lại độc lực còn lại. Dù thực tế là chúng thường chứa liều virus cao hơn ở mức nào đó so với vắc xin sống bị làm giảm độc lực, chúng có thể, ví dụ là dạng được ưu tiên của vắc xin ở lợn đang mắc bệnh khác. Lợn được giữ ở các điều kiện dưới tối ưu, như dinh dưỡng không đủ hoặc nuôi nhốt dưới tối ưu cũng sẽ có lợi khi dùng vắc xin

bất hoạt.

Do đó, dạng được ưu tiên khác của phương án này đề cập đến vắc xin chứa virus theo sáng chế trong đó virus này ở dạng bị bất hoạt.

Vắc xin bất hoạt toàn virus này có thể được tạo ra cho pestivirus mới ở lợn theo sáng chế. Như trường hợp đối với vắc xin pestivirus ở lợn đã biết, việc sản xuất vắc xin này về cơ bản bao gồm bước cho pestivirus mới ở lợn phát triển trên các tế bào lợn dễ mắc, thu hoạch virus, bất hoạt virus và trộn virus bất hoạt với chất mang được dụng.

Cách chuẩn để làm bất hoạt là xử lý kiểu cổ điển bằng formaldehyt. Các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để làm bất hoạt là bức xạ UV, bức xạ gama, xử lý bằng etylen-imin hai thành phần, thimerosal và phương pháp tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết cách áp dụng các phương pháp này. Tốt hơn là, virus được làm bất hoạt bằng β -propiolacton, glutaraldehyt, etylen-imin hoặc formaldehyt. Dĩ nhiên, các cách làm bất hoạt virus khác cũng được bao gồm trong sáng chế.

Như được chỉ ra ở trên, virus theo sáng chế có thể được phát triển trong môi trường nuôi cấy tế bào trên các tế bào hoặc dòng tế bào ở lợn dễ bị mắc.

Do đó, phương án khác của sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào chứa pestivirus theo sáng chế. Ví dụ về dòng tế bào này là SK6.

Mặc dù các pestivirus ở lợn bị bất hoạt toàn bộ theo sáng chế và các pestivirus ở lợn không truyền nhiễm theo sáng chế cung cấp cơ sở tốt cho vắc xin bất hoạt, việc tạo ra chúng có thể tốn kém, phụ thuộc vào, ví dụ, loại tế bào chủ sử dụng, cơ chất và môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng.

Trong trường hợp cụ thể của pestivirus, phương án thay thế được chú ý để sử dụng virus bị bất hoạt toàn bộ hoặc virus pestivirus ở lợn không truyền nhiễm theo sáng chế là sử dụng các cấu trúc dưới phân tử pestivirus ở lợn, đặc biệt là protein E^{ms} và E2.

Sự biểu hiện các cấu trúc dưới phân tử này, đặc biệt là protein E^{ms} và E2 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả khái quát đối với pestivirus ở lợn CSFV cả ở hệ biểu hiện baculovirus và ở các tế bào của động vật có vú, bởi Hulst, M.M. et al.⁽²⁷⁾, Bouma, A. et al.⁽²⁸⁾, Van Rijn, P.A. et al.⁽²⁹⁾, Moorman, R.J.M. et al.⁽³⁰⁾, Donofrio, G. et al.,⁽³¹⁾, Lutticken D. et al.⁽³²⁾, và Floegel-Niesmann et al.⁽³³⁾.

Sự biểu hiện mức độ cao của E^{ms} và E2 trong hệ biểu hiện baculovirut được mô tả, ví dụ trong EP1049788.

Hơn nữa, hệ biểu hiện baculovirut và vector biểu hiện baculovirut nhìn chung được mô tả khái quát trong sách, như bởi O'Reilly et al. ⁽³⁴⁾ và Murhammer ⁽³⁵⁾.

Hệ biểu hiện dựa trên baculovirut cũng được bán trên thị trường, ví dụ từ Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008, Mỹ.

Phương án thay thế khác cho hệ biểu hiện dựa trên baculovirut là hệ biểu hiện dựa vào nấm men. Hệ biểu hiện nấm men được mô tả, ví dụ bởi Gellissen et al. ⁽³⁶⁾.

Donofrio, G. et al., ⁽³¹⁾ mô tả sự biểu hiện của E2 BVDV trong dòng tế bào của động vật có vú.

Hệ biểu hiện sử dụng ngay, ví dụ, có bán trên thị trường từ Research Corp. Technologies, 5210 East Williams Circle, Suite 240, Tucson, AZ 85711-4410 USA. Hệ biểu hiện tế bào nấm men và côn trùng cũng, ví dụ, có bán trên thị trường từ Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, Mỹ.

Sự biểu hiện của protein E^{ms} và E2 ở hệ biểu hiện dựa trên tế bào động vật có vú như được mô tả bởi Donofrio, G. et al ⁽³¹⁾ mặc dù rất thích hợp, nhưng rất có khả năng đắt hơn khi sử dụng so với hệ biểu hiện dựa trên baculovirut.

Do đó, dạng khác của phương án này đề cập đến vắc xin kháng lại CT nhóm A-II ở lợn, được đặc trưng bởi việc vắc xin này chứa lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của protein E^{ms} và/hoặc E2 và/hoặc E1 theo sáng chế và chất mang được dụng.

Tốt hơn nữa là, các cấu trúc dưới phân tử này ở dạng được gọi là các giả hạt pestivirut.

Các giả hạt này là các hạt giống virus cơ bản chứa protein E^{ms}, E1 và E2.

Tuy nhiên, chúng khác với virus kiểu đại ở chỗ chúng không chứa toàn bộ bộ gen pestivirut và do đó chúng không có khả năng sao chép trong vật chủ. Do đó, các giả hạt pestivirut không phải bị bất hoạt trước khi sử dụng trong vắc xin, và do đó chúng có ưu điểm khác là chúng về bản chất là an toàn.

Các giả hạt pestivirut có thể thu được bằng cách biểu hiện protein E^{ms}, E1 và E2 trong hệ biểu hiện thích hợp. Ví dụ về các giả hạt pestivirut và cách tạo ra các giả hạt

được mô tả, ví dụ, trong EP1454981 và EP1170367.

Do đó, phương án khác nữa đề cập đến các giả hạt được đặc trưng ở chỗ chúng chứa protein E^{rms} theo sáng chế, protein E2 theo sáng chế và protein E1 theo sáng chế.

Lượng các giả hạt trong vắc xin và con đường sử dụng có thể tương đương với các yếu tố này của toàn bộ các hạt virus bị bất hoạt, vì theo tính sinh miễn dịch và độ tương đồng vỏ capsit chúng có thể tương đương với các hạt toàn bộ virus bị bất hoạt.

Thông thường, lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100µg các giả hạt pestivirus mới ở lợn sẽ rất phù hợp ở dạng liều vắc xin. Từ quan điểm chi phí, lượng các giả hạt được ưu tiên sẽ nằm trong khoảng 1-50 µg, được ưu tiên hơn là nằm trong khoảng 1-25 µg.

Vắc xin theo sáng chế, cụ thể hơn là vắc xin trên cơ sở toàn bộ virus bị bất hoạt, các cấu trúc dưới phân tử như protein E^{rms} và E2 hoặc các giả hạt, tốt hơn nếu chứa tá dược. Tá dược thông thường, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là, ví dụ tá dược Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, vitamin E, polyme khối phi ion, dipeptit muramyl, Quill A^(R), dầu khoáng ví dụ Bayol^(R) hoặc Markol^(R), dầu thực vật, và Carbopol^(R) (homopolyme), hoặc Diluvac^(R) Forte. Vắc xin cũng có thể chứa thành phần gọi là "chất dẫn thuốc". Chất dẫn thuốc là hợp chất polypeptit gắn kết vào đó, không cần được liên kết cộng hóa trị với nó. Hợp chất chất dẫn thuốc thường được sử dụng là, ví dụ, nhôm hydroxit, -phosphat hoặc -oxit, silica, cao lanh, và bentonit.

Về nguyên tắc, có thể đủ khi chỉ sử dụng vắc xin theo sáng chế một lần. Tuy nhiên, đặc biệt là trong trường hợp vắc xin bất hoạt, vắc xin toàn virus, vắc xin cấu trúc dưới phân tử hoặc vắc xin giả hạt, tốt hơn nếu còn có chủng ngừa tăng cường thứ nhất và có thể là thứ hai. Liều tăng cường thứ nhất thường sẽ được thực hiện ít nhất hai tuần sau lần chủng ngừa đầu tiên. Thời điểm rất thích hợp cho việc chủng ngừa tăng cường là trong khoảng 3 đến 16 tuần sau lần chủng ngừa đầu tiên. Liều tăng cường thứ hai, nếu cần, thường sẽ được thực hiện trong khoảng 4 đến 50 tuần sau liều tăng cường thứ nhất.

Phương án thay thế cho phương án toàn virus bị bất hoạt, các cấu trúc dưới phân tử như protein E^{rms}, E2 và E1 hoặc các giả hạt là sử dụng các virus vector tái tổ hợp sống có lợn làm vật chủ của chúng, làm chất mang gen E^{rms}, E2 hoặc E1 của pestivirus

mới ở lợn.

Trong số các virus vector tái tổ hợp thích hợp có lợn làm vật chủ, một số virus vector đặc biệt thích hợp làm chất mang: virus giả dại pseudorabies (PRV), Adenovirus ở lợn (PAV), virus gây bệnh đậu lợn (Swine Pox virus - SPV) và virus sốt lợn cổ điển (CSFV). Ngoài ra, virus gây bệnh đậu mùa đã được mô tả là virus vector thích hợp.

Việc sử dụng virus vector tái tổ hợp này trong vắc xin có ưu điểm khác là các con vật được chủng ngừa sẽ cùng một lúc được chủng ngừa kháng lại cả virus vector và pestivirus mới theo sáng chế.

Việc sử dụng virus Pseudorabies (PRV) làm virus vector tái tổ hợp sống đối với gen E2 pestivirus ở lợn CSFV được mô tả bởi van Zijl et al.⁽³⁸⁾ và Peeters et al.⁽³⁹⁾ đối với virus vector tái tổ hợp PRV khiếm khuyết sao chép.

Virus vector adenovirus ở lợn (PAV) tái tổ hợp sống dùng làm virus vector đối với gen E2 pestivirus ở lợn CSFV được mô tả bởi Hammond et al.^(40, 41).

Virus vector virus bệnh đậu lợn (SPV) tái tổ hợp sống dùng làm virus vector đối với gen E2 pestivirus ở lợn CSFV được mô tả bởi Hahn et al.⁽⁴²⁾

Ngoài ra, virus gây bệnh đậu mùa đã được mô tả làm virus vector thích hợp bởi Ruemenapf et al.,⁽³⁷⁾ mô tả sự biểu hiện của cả bốn protein cấu trúc, và, ví dụ, sự cảm ứng tính miễn dịch bảo vệ ở lợn được chủng ngừa bằng vector tái tổ hợp virus bệnh đậu mùa biểu hiện E2.

Virus CSFV sống bị làm giảm độc lực cũng rất thích hợp để làm virus vector tái tổ hợp sống. Đơn thuần làm ví dụ; CSFV sống bị làm giảm độc lực từ đó gen N^{pro} được làm mất, được mô tả bởi Mayer và cộng sự.⁽¹⁹⁾ Virus sống bị làm giảm độc lực như vậy cho phép, ví dụ, tại vị trí mất của gen N^{pro}, cài xen gen mã hóa gen E^{ms} hoặc E2.

Do đó, virus CSFV tái tổ hợp sống tạo ra một cách ngang bằng virus vector rất thích hợp đối với gen E^{ms} hoặc E2 pestivirus mới ở lợn.

Lượng rất thích hợp của virus vector tái tổ hợp sống này nằm trong khoảng từ 10⁵ TCID₅₀ đến 5x10⁹ TCID₅₀ virus vector với mỗi liều vắc xin, tùy vào mức độ giảm độc lực của virus.

Sự biểu hiện gen E^{ms}, E2 hoặc E1 pestivirus mới ở lợn có thể đạt được dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu khác loại thích hợp bất kỳ mang chức năng trong tế bào động vật có vú (xem dưới đây). Gen khởi đầu khác loại là gen khởi đầu không phải là gen khởi đầu chịu trách nhiệm phiên mã gen E^{ms}, E2 hoặc E1 pestivirus mới ở lợn ở dạng kiểu đại của pestivirus mới ở lợn theo sáng chế.

Do đó, phương án khác của sáng chế đề cập đến đoạn ADN chứa gen mã hóa gen E^{ms}, E2 hoặc E1 pestivirus mới ở lợn theo sáng chế, được đặc trưng bởi việc gen này chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng khác loại.

Gen khởi đầu chức năng trong tế bào động vật có vú là gen khởi đầu có khả năng điều khiển quá trình phiên mã của gen được định vị cùng chiều với gen khởi đầu trong tế bào động vật có vú.

Ví dụ về gen khởi đầu thích hợp mang chức năng trong tế bào động vật có vú bao gồm gen khởi đầu cổ điển như gen khởi đầu CAG (Niwa, H. et al., *Gene* 108: 193–199 (1991), gen khởi đầu sớm tức thì cytomegalovirus (ở người) (Seed, B. et al., *Nature* 329, 840-842, 1987; Fynan, E.F. et al., *PNAS* 90, 11478-11482, 1993; Ulmer, J.B. et al., *Science* 259, 1745-1748, 1993), virus Rous sarcoma LTR (RSV, Gorman, C.M. et al., *PNAS* 79, 6777-6781, 1982; Fynan et al., *supra*; Ulmer et al., *supra*), MPSV LTR (Stacey et al., *J. Virology* 50, 725-732, 1984), gen khởi đầu sớm tức thì SV40 (Sprague J. et al., *J. Virology* 45, 773, 1983), gen khởi đầu SV-40 (Berman, P.W. et al., *Science*, 222, 524-527, 1983), gen khởi đầu metallothionein (Brinster, R.L. et al., *Nature* 296, 39-42, 1982), gen khởi đầu sốc nhiệt (Voellmy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4949-53, 1985), gen khởi đầu muộn chính của Ad2 và gen khởi đầu β -actin (Tang et al., *Nature* 356, 152-154, 1992). Trình tự điều hòa cũng có thể bao gồm trình tự kết thúc và trình tự poly-adenyl hóa. Trong số các trình tự có thể được sử dụng là trình tự poly-adenyl hóa hormon tăng trưởng ở bò đã biết, trình tự poly-adenyl hóa SV40, trình tự kết thúc và trình tự poly-adenyl hóa cytomegalovirus ở người (hCMV).

Do đó, sáng chế còn đề cập đến virus vector tái tổ hợp sống chứa đoạn ADN chứa gen mã hóa protein E^{ms} và/hoặc E2 và/hoặc E1 theo sáng chế dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng.

Dạng phương án khác của sáng chế đề cập đến vắc xin, đề cập đến vắc xin kháng

lại CT nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ vắc xin này chứa virus vector tái tổ hợp chứa đoạn ADN chứa gen mã hóa protein E^{ms} và/hoặc E2 và/hoặc E1 theo sáng chế dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng và chất mang được dụng.

Dĩ nhiên là virus vector tái tổ hợp cần biểu hiện lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của E^{ms} và/hoặc E2 và/hoặc E1 và/hoặc E.

Phương án thay thế cho việc chủng ngừa bằng vắc xin bất hoạt toàn virus, vắc xin giả hạt hoặc virus vector tái tổ hợp sống, là sử dụng phương pháp chủng ngừa ADN.

Việc chủng ngừa bằng ADN dựa trên việc đưa đoạn ADN mang gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu thích hợp, vào động vật chủ. Khi ADN được hấp thu bởi các tế bào của vật chủ, gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1 được phiên mã và sản phẩm phiên mã được dịch mã thành protein E^{ms}, E2 hoặc E1 trong các tế bào của vật chủ này. Quá trình này mô phỏng sát quá trình nhiễm tự nhiên pestivirus ở lợn.

Gen khởi đầu thích hợp là gen khởi đầu mang chức năng ở các tế bào động vật có vú, như được lấy ví dụ ở trên.

Đoạn ADN mang gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu thích hợp có thể là, ví dụ plasmid. Plasmid này có thể có dạng vòng hoặc dạng thẳng.

Ví dụ về việc chủng ngừa ADN thành công ở lợn là chủng ngừa thành công kháng virus sốt lợn cổ điển như được mô tả bởi Tian, D.Y. et al.⁽⁴⁵⁾, by Sun, Y. et al.⁽⁴⁶⁾, và bởi Sun, Y. et al.⁽⁴⁷⁾.

Ví dụ khác về chủng ngừa ADN thành công ở lợn là, ví dụ, chủng ngừa thành công kháng lại bệnh Aujeszky như được mô tả trong Gerds et al.⁽⁴³⁾ Tài liệu này mô tả vắc xin ADN trong đó đoạn ADN được sử dụng mang glycoprotein C chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu sớm tức thì chủ yếu của cytomegalovirus ở người. Việc chủng ngừa được thực hiện bốn lần với khoảng nghỉ hai tuần với lượng 50µg ADN. Các con vật được chủng ngừa phát triển các kháng thể huyết thanh nhận diện kháng nguyên tương ứng trong thẩm tách miễn dịch và biểu hiện hoạt tính trung hòa.

Ví dụ khác về việc chủng ngừa ADN thành công cho lợn được đưa ra bởi

Gorres et al.⁽⁴⁴⁾ Tác giả này mô tả việc chủng ngừa ADN thành công cho lợn kháng lại cả dịch bệnh và cúm H1N1 ở lợn cổ điển. Chúng được chủng ngừa bằng một chủng ngừa chính và 2 lần tăng cường tương đồng ở thời điểm 3 và 6 tuần sau lần chủng ngừa chính, vắc xin ADN chứa gen HA của cúm H1N1 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng.

Do protein E2 của pestivirus mới theo sáng chế là protein sinh miễn dịch cao nhất, đây là protein được ưu tiên để sử dụng trong vắc xin ADN. Mặc dù vậy, có thể cần phải sử dụng các phương pháp nêu trên ^{(45), (46), (47)} hoặc dựa vào các phương pháp đo khác như được mô tả trong ⁽⁹⁾ để tăng cường tính sinh miễn dịch của vắc xin ADN.

Do đó, dạng khác nữa của phương án này đề cập đến vắc xin kháng lại CT nhóm A-II ở lợn, được đặc trưng bởi vắc xin này chứa đoạn ADN chứa gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1 theo sáng chế dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng, và chất mang được dùng.

Dĩ nhiên là đoạn ADN chứa gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1 cần biểu hiện lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của protein E^{ms}, E2 hoặc E1.

Thành phần tạo nên "lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch" đối với vắc xin theo sáng chế dựa trên toàn bộ pestivirus ở lợn theo sáng chế, giả hạt theo sáng chế, vector tái tổ hợp hoặc vắc xin ADN theo sáng chế phụ thuộc vào tác dụng mong muốn và sinh vật đích.

Thuật ngữ "lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến lượng CTAPV, giả hạt, vector tái tổ hợp sống hoặc vắc xin ADN cần để gây ra đáp ứng miễn dịch ở lợn đến mức làm giảm tác dụng bệnh học do sự nhiễm pestivirus CT nhóm A-II kiểu đại gây ra, so với tác dụng bệnh học do sự nhiễm pestivirus CT nhóm A-II kiểu đại gây ra ở lợn chưa được tạo miễn dịch.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định việc xử lý có "cho hiệu quả sinh miễn dịch" hay không, ví dụ bằng cách gây nhiễm thử thách bằng thử nghiệm cho động vật được chủng ngừa và sau đó xác định các dấu hiệu lâm sàng của bệnh ở động vật đích, các thông số huyết thanh học hoặc bằng cách đo sự tái phân lập của tác nhân gây bệnh, sau đó so sánh các số liệu tìm được với số liệu quan sát được ở lợn bị nhiễm thực địa.

Lượng virus sử dụng sẽ phụ thuộc vào con đường sử dụng, sự có mặt của tá dược và thời điểm sử dụng. Lượng này sẽ được lấy ví dụ minh họa dưới đây và, ngoài ra, tài liệu trích dẫn ở trên và dưới đây liên quan đến vắc xin đối với vắc xin pestivirus khác cũng cung cấp thêm các hướng dẫn.

Lượng được ưu tiên của vắc xin sống chứa virus theo sáng chế được thể hiện, ví dụ dưới dạng liều gây nhiễm mô nuôi cấy (TCID₅₀). Ví dụ đối với virus sống, liều nằm trong khoảng từ 10 đến 10^9 TCID₅₀ mỗi con vật có thể được sử dụng thuận lợi, phụ thuộc vào độc lực còn lại của virus. Tốt hơn là, liều nằm trong khoảng 10^2 đến 10^6 TCID₅₀ được sử dụng.

Có thể áp dụng nhiều cách sử dụng, tất cả đều đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vắc xin theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng cho động vật bằng cách tiêm (trong cơ hoặc thông qua đường trong màng bụng) hoặc qua đường uống.

Protocol sử dụng có thể được tối ưu hóa theo thực hành chủng ngừa chuẩn. Ở tất cả các trường hợp, việc đưa vào qua dụng cụ tiêm trong da (IDAL) là cách đưa vào được ưu tiên.

Nếu vắc xin chứa virus bất hoạt hoặc các giả hạt theo sáng chế, liều cũng sẽ được thể hiện dưới dạng số các hạt virus cần sử dụng. Liều này thường sẽ ở mức cao hơn so với khi sử dụng các hạt virus sống, do các hạt virus sống sao chép đến mức độ nhất định trong động vật đích, trước khi chúng được loại bỏ bởi hệ miễn dịch. Đối với vắc xin dựa trên virus bất hoạt, lượng hạt virus nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^9 hạt thường sẽ thích hợp, tùy vào tá dược sử dụng.

Nếu vắc xin chứa các cấu trúc dưới phân tử, ví dụ protein E^{ms}, E2 hoặc E1 theo sáng chế, liều cũng có thể được thể hiện theo microgam protein. Đối với vắc xin trên cơ sở các cấu trúc dưới phân tử, liều thích hợp thường sẽ nằm trong khoảng từ 5 đến 500 microgam protein, cũng phụ thuộc vào tá dược sử dụng.

Nếu vắc xin chứa đoạn ADN chứa gen mã hóa protein E^{ms}, E2 hoặc E1, liều sẽ được thể hiện theo microgam ADN. Đối với vắc xin trên cơ sở các cấu trúc dưới phân tử, liều thích hợp thường sẽ nằm trong khoảng từ 5 đến 500 microgam ADN, ví dụ, phụ thuộc vào tính hiệu quả của plasmit biểu hiện sử dụng. Trong nhiều trường hợp, lượng trong khoảng từ 20 đến 50 microgam plasmit ở mỗi động vật sẽ đủ để chủng

ngừa hiệu quả.

Vắc xin theo sáng chế có thể có dạng bất kỳ thích hợp để sử dụng trong trường hợp trang trại lợn, và phù hợp với con đường sử dụng mong muốn và tác dụng mong muốn. Việc bào chế vắc xin theo sáng chế được tiến hành bằng các phương pháp tạo ra vắc xin pestivirus truyền thống đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Đường dùng qua miệng được ưu tiên vì dễ sử dụng vắc xin.

Đối với việc dùng qua đường miệng, tốt hơn là vắc xin được trộn với chất mang thích hợp để dùng qua đường miệng nghĩa là xenluloza, thức ăn hoặc chất có khả năng chuyển hóa như alpha-xenluloza hoặc các dầu có nguồn gốc thực vật hoặc động vật khác.

Trong thực tế, lợn được chủng ngừa kháng lại nhiều virus hoặc vi sinh vật gây bệnh khác nhau.

Do đó, việc kết hợp vắc xin theo sáng chế cho lợn với chất sinh miễn dịch khác của virus hoặc vi sinh vật gây bệnh cho lợn, hoặc thông tin di truyền mã hóa chất sinh miễn dịch của virus hoặc vi sinh vật này là rất được chú ý, về cả lý do thực tiễn và lý do kinh tế, chất sinh miễn dịch khác của,

Do đó, dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến vắc xin theo sáng chế, trong đó vắc xin chứa ít nhất một vi sinh vật gây bệnh lợn hoặc virus gây bệnh lợn khác và/hoặc ít nhất một thành phần sinh miễn dịch khác và/hoặc vật liệu di truyền mã hóa thành phần sinh miễn dịch khác này, của vi sinh vật gây bệnh lợn hoặc virus gây bệnh lợn. Chất sinh miễn dịch hoặc thành phần sinh miễn dịch là hợp chất gây ứng miễn dịch ở động vật. Nó có thể là, ví dụ toàn bộ virus hoặc vi khuẩn, hoặc protein hoặc gốc đường của virus hoặc vi khuẩn.

Virus và vi sinh vật gây bệnh phổ biến nhất gây bệnh cho lợn là *Brachyspira hyodysenteriae*, virus sốt lợn châu Phi, virus Nipah, Circovirus ở lợn, virus Torque Teno ở lợn, virus Pseudorabies, virus cúm ở lợn, parvovirus ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS), virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PEDV), virus gây bệnh chân và miệng, virus dạ dày-ruột truyền nhiễm, Rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma*

hyopneumoniae và *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Do đó, dạng được ưu tiên hơn của sáng chế đề cập đến vắc xin theo sáng chế, trong đó virus hoặc vi sinh vật gây bệnh cho lợn được chọn từ nhóm gồm *Brachyspira hyodysenteriae*, virus sốt lợn châu Phi, virus Nipah, Circovirus ở lợn, virus Torque Teno ở lợn, virus Pseudorabies, virus cúm ở lợn, parvovirus ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS), virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PEDV), virus gây bệnh chân và miệng, virus dạ dày-ruột truyền nhiễm, Rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Phương án khác nữa đề cập đến phương pháp bào chế vắc xin theo sáng chế trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn virus theo sáng chế và/hoặc protein E^{ms} theo sáng chế và/hoặc protein E2 theo sáng chế và/hoặc protein E1 theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc virus vector tái tổ hợp sống theo sáng chế và/hoặc giả hạt theo sáng chế, và chất mang dược dụng.

Phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến virus theo sáng chế và/hoặc protein E^{ms} theo sáng chế và/hoặc protein E2 theo sáng chế và/hoặc protein E1 theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc đoạn ADN theo sáng chế và/hoặc virus vector tái tổ hợp sống theo sáng chế và/hoặc giả hạt theo sáng chế, để sử dụng trong vắc xin kháng lại CT nhóm A-II ở lợn.

Như được nêu ở trên, CT A-II thường được tìm thấy, có nghĩa là quan trọng khi biết là pestivirus mới theo sáng chế có mặt ở trang trại hoặc trong quần thể lợn nhất định trước khi các dấu hiệu lâm sàng đầu tiên biểu lộ. Do đó, đối với tác dụng bảo vệ hiệu quả chống lại bệnh, việc phát hiện nhanh và chính xác sự có mặt của pestivirus mới theo sáng chế là quan trọng.

Do đó, mục đích khác của sáng chế là đề xuất công cụ chẩn đoán thích hợp để phát hiện pestivirus mới theo sáng chế.

Các công cụ này dựa một phần trên tính sẵn có của các kháng thể kháng lại virus. Các kháng thể này có thể, ví dụ được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán

đổi với pestivirus mới theo sáng chế.

Các kháng thể hoặc huyết thanh miễn dịch chứa các kháng thể kháng pestivirus mới theo sáng chế có thể thu được nhanh chóng và dễ dàng thông qua việc chủng ngừa, ví dụ lợn, gia cầm hoặc ví dụ thỏ bằng virus theo sáng chế sau đó, sau khoảng bốn tuần, lấy máu, ly tâm máu đã đông tụ và gạn lấy huyết thanh. Các phương pháp này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp khác để bào chế kháng thể kháng pestivirus mới theo sáng chế, mà có thể là đa dòng, đơn đặc hiệu hoặc đơn dòng (hoặc dẫn xuất của nó) cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nếu các kháng thể đa dòng được mong muốn, các kỹ thuật để tạo ra và xử lý huyết thanh đa dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này trong hàng thập kỷ, xem, ví dụ Mayer và Walter ⁽³⁵⁾.

Các kháng thể đơn dòng, có tính phản ứng kháng lại virus theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột thuần chủng bởi kỹ thuật cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem ví dụ Kohler và Milstein ⁽³⁶⁾.

Do đó, phương án khác của sáng chế đề cập đến các kháng thể hoặc huyết thanh miễn dịch phản ứng với virus theo sáng chế.

Kit chẩn đoán dựa trên việc phát hiện CTAPV có thể, ví dụ bao gồm thử nghiệm ELISA chuẩn. Theo một ví dụ về thử nghiệm này, thành giếng của các đĩa ELISA được phủ các kháng thể nhằm kháng lại virus. Sau khi ủ với vật liệu cần thử nghiệm, các kháng thể đánh dấu phản ứng với virus được cho vào các giếng. Nếu vật liệu cần thử nghiệm này quả thực chứa pestivirus mới theo sáng chế, virus này sẽ liên kết với các kháng thể được phủ lên giếng ELISA. Các kháng thể đã đánh dấu phản ứng với virus sau đó được cho vào các giếng sẽ quay lại liên kết với virus và phản ứng tạo màu sẽ cho biết sự có mặt của vật liệu kháng nguyên của virus.

Do đó, vẫn phương án khác của sáng chế đề cập đến kit chẩn đoán để phát hiện pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II, mà bao gồm các kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế hoặc với chất sinh miễn dịch của nó. Chất sinh miễn dịch của virus cần được hiểu theo nghĩa rộng. Nó có thể là, ví dụ virus ở dạng phân rã, hoặc vật liệu vỏ virus chứa protein màng ngoài của virus. Miễn là vật liệu của virus phản ứng với huyết thanh miễn dịch kháng lại virus, vật liệu này được xem là

chất sinh miễn dịch.

Kit chẩn đoán dựa trên việc phát hiện trong huyết thanh của các kháng thể phản ứng với pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II cũng có thể ví dụ bao gồm thử nghiệm ELISA chuẩn. Trong thử nghiệm này, thành giếng của đĩa ELISA có thể, ví dụ được phủ virus theo sáng chế hoặc chất sinh miễn dịch của nó. Sau khi ủ vật liệu cần thử nghiệm, ví dụ huyết thanh của động vật nghi bị nhiễm pestivirus mới theo sáng chế, các kháng thể được đánh dấu phản ứng với virus theo sáng chế được cho vào các giếng. Nếu kháng pestivirus mới theo sáng chế các kháng thể sẽ có mặt trong huyết thanh thử nghiệm, các kháng thể này sẽ liên kết với virus được phủ lên các giếng của ELISA. Kết quả là, các kháng thể đánh dấu được bổ sung sau phản ứng với virus sẽ không liên kết và không thấy có phản ứng tạo màu nào. Việc không có phản ứng tạo màu sẽ cho biết sự có mặt của các kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế.

Do đó, vẫn phương án khác của sáng chế đề cập đến kit chẩn đoán để phát hiện các kháng thể phản ứng với pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II chứa virus theo sáng chế hoặc chất sinh miễn dịch của nó.

Thiết kế của thử nghiệm miễn dịch có thể thay đổi. Ví dụ, thử nghiệm miễn dịch có thể dựa trên phản ứng cạnh tranh hoặc phản ứng trực tiếp. Ngoài ra, protocol có thể sử dụng giá đỡ rắn hoặc có thể sử dụng vật liệu tế bào. Việc phát hiện phức kháng thể-kháng nguyên có thể bao gồm việc sử dụng các kháng thể đánh dấu; các chất đánh dấu có thể là, ví dụ, enzym, phân tử phát huỳnh quang, phân tử phát quang hóa học, phân tử có hoạt tính phóng xạ hoặc phân tử nhuộm.

Phương pháp thích hợp để phát hiện các kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế trong mẫu bao gồm, ngoài ELISA nêu trên, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFT) và phân tích thẩm tách Western.

Thử nghiệm chẩn đoán nhanh và dễ dàng khác để chẩn đoán sự có mặt hoặc không có mặt pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II là thử nghiệm PCR như được nêu ở trên, bao gồm bộ đoạn môi PCR phản ứng đặc hiệu với bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế. Đặc hiệu trong trường hợp này có nghĩa là duy nhất đối với, ví dụ bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế, nghĩa là không phản ứng với bộ gen của pestivirus khác.

Dĩ nhiên là, nhiều đoạn mồi hơn có thể được sử dụng so với số đoạn mồi được xác định ở trên. Sáng chế đề xuất lần đầu tiên trình tự đặc hiệu của bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế. Điều này cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này lựa chọn các đoạn mồi chọn lọc khác mà không cần các cố gắng phụ trợ. Bằng cách phân tích bằng máy tính đơn giản bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế trình tự gen được cung cấp bởi sáng chế với, bộ gen đã biết của pestivirus khác, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể phát triển các đoạn mồi PCR đặc hiệu khác để chẩn đoán phát hiện pestivirus mới theo sáng chế và/hoặc phân biệt pestivirus mới theo sáng chế và các tác nhân gây bệnh do virus (ở lợn) khác.

Đoạn mồi PCR phản ứng đặc hiệu với bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế được hiểu là các đoạn mồi chỉ phản ứng với bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế và không phản ứng với bộ gen của virus gây bệnh (ở lợn), hoặc nhóm virus gây bệnh (ở lợn) khác.

Do đó, phương án khác đề cập đến kit chẩn đoán để phát hiện pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II, đặc trưng ở chỗ kit thử nghiệm này bao gồm bộ đoạn mồi PCR phản ứng đặc hiệu với bộ gen của pestivirus mới theo sáng chế.

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến kit chẩn đoán để phát hiện pestivirus ở lợn liên quan đến chứng run bầm sinh nhóm A-II, trong đó thử nghiệm này bao gồm bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 15-16.

Dạng đặc biệt của thử nghiệm chẩn đoán được cung cấp bởi thử nghiệm qRT-PCR được mô tả chi tiết trong ví dụ 10. Thử nghiệm này rất thích hợp để định lượng lượng virus có mặt trong nhiều mẫu như mẫu huyết thanh, mẫu tinh trùng và mẫu mô. Các thử nghiệm này cho phép, ngoài việc phát hiện ARN virus, định lượng nhanh chóng và tin cậy số lượng các bản sao ARN có mặt trong các mẫu này.

Ví dụ 10 mô tả cách ARN được phân lập và đưa qua phản ứng RT, sau đó các đoạn mồi oligonucleotit được sử dụng để khuếch đại bộ gen 5' UTR của bộ gen CTAPV. Phần này của bộ gen virus được chọn dựa vào trình tự nucleotit bảo toàn giữa các biến thể CTAPV 1 – 9 (dựa vào sự sắp thẳng trình tự nucleotit). Trình tự đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ 10 là như sau: CTAPV-PAN2-F3-B: CGTGCCCAAAGAGAAATCGG (SEQ ID NO: 35) và CTAPV-PAN2-R3-B (SEQ ID NO: 36): CCGGCACTCTATCAAGCAGT.

Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng có thể sử dụng phần bất kỳ của bộ gen virus thể hiện trình tự nucleotit bảo toàn giữa các biến thể CTAPV để lựa chọn đoạn môi thích hợp.

Ví dụ 10 thể hiện cách phản ứng qRT-PCR theo sáng chế được sử dụng thành công để phát hiện ARN virus trong ví dụ tinh dịch của lợn lòi đực.

Ví dụ 11 thể hiện việc sử dụng kỹ thuật chẩn đoán này, mà lợn nái tơ không có CTAPV có thể bị nhiễm CTAPV thông qua tinh dịch của lợn lòi đực nhiễm CTAPV.

Tài liệu tham khảo

- 1) Maplesden, D.C. and G.C. Brown, Can J Comp Med Vet Sci, **2**: 170-2 (1957).
- 2) Bolske, G., T. Kronevi, and N.O. Lindgren, Nord Vet Med, **30**: 534-7 (1978).
- 3) White, M. <http://www.nadis.org.uk/bulletins/congenital-tremor.aspx>.
- 4) Ha, Y., K. Jung, and C. Chae, Vet Rec, **156**: 383-4 (2005).
- 5) Stevenson, G.W., et al., J Vet Diagn Invest, **13**: 57-62 (2001).
- 6) Kennedy, S., et al., Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **15**: 151-156 (2003).
- 7) Van Gennip, H.G.P. et al(A)., Vaccine 19: 447-459 (2001)
- 8) Reimann, I. et al(B)., Virology 322: 143-157 (2004)
- 9) Beer, M. et al(C)., Vaccine 25: 5665-5670 (2007)
- 10) Wehrle, F. et al(D)., Journal of General Virology 88: 2247-2258 (2007)
- 11) Dong, X.N. and Chen, Y.H., Vaccine 25:205-230 (2007).
- 12) Moennig, V., G. Floegel-Niesmann, and I. Greiser-Wilke, The Veterinary Journal 165: 11-20 (2003).
- 13) Deregts, D. and K.G. Loewen, Can. Vet. J. 36: 371-8 (1995).
- 14) Viralzone-Expasy. Pestivirus. 2010 16-apr-2013; có sẵn trên:
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html.
- 15) Lindenbach, B.D., H.-J. Thiel, and C. Rice, Flaviviridae: the virus and their replication. Fields virology: 1101-1152 (2007).
- 16) Stark, R., et al., J. Virol., 67: 7088-95 (1993).
- 17) Rumenapf, T., et al., J. Virol., 72: 2544-2547 (1998).
- 18) Tratschin, J.D., et al., J. Virol., 72: 7681-7684 (1998).
- 19) Mayer, D., M.A. Hofmann, and J.D. Tratschin, Vaccine. 22: 317-328 (2004).

- 20) Heimann, M., et al., J. Virol. 80: 1915-21 (2006).
- 21) Schneider, R., et al., Science 261: 1169-1171 (1993).
- 22) Risatti, G.R. et al., Journ. of Virol. 79: 3787-3796 (2005).
- 23) Risatti, G.R. et al., Virology 364: 371-82 (2007).
- 24) de Smit, A. J. et al., Vaccine 19: 1467-1476 (2001).
- 25) Widjojoatmodjo, M.N. et al., J. Virol. 74: 2973-2980 (2000).
- 26) Van Gennip, H.G., Vaccine 20: 1544-56 (2002).
- 27) Hulst, M.M. et al., J. Virol. 67: 5435-5442 (1993)
- 28) Bouma, A. et al., Vet. Microbiol. 66: 101-114 (1999)
- 29) Van Rijn, P.A. et al., Vaccine 17: 433-440 (1999)
- 30) Moorman, R.J.M. et al., Vet. Microbiol. 73: 209-219 (2000)
- 31) Donofrio, G. et al., Clinical and Vaccine Immunol. 13: 698-701 (2006)
- 32) Luttick D. et al., Proc. of the OIE symposium on Classical Swine Fever, Birmingham UK, July 9-10, Summaries p. 17 (1998)
- 33) Floegel-Niesmann et al., Vet Microbiol. 96: 367-384 (2003)
- 34) Baculovirus Expression Vector, A Laboratory Manual. By David R. O'Reilly, Lois K. Miller, and Verne A. Luckow. Publisher: Oxford University Press, USA ISBN-10: 0195091310 (September 23, 1993), ISBN-13: 978-0195091311 (May 1994).
- 35) Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. In: Methods in Molecular Biology™, Volume 388 (2007). Editors: David W. Murhammer. ISBN: 978-1-58829-537-8 (Print) 978-1-59745-457-5 (Online)
- 36) Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression system by Gerd Gellissen, ISBN: 3-527-31036-3
- 37) Ruemenapf, T. et al., J. Virol. 65: 589-597 (1991)
- 38) Van Zijl, M. et al., J. Virol. 65: 2761-2765 (1991)
- 39) Peeters, B. et al., J. Gen. Virol. 78: 3311-3315 (1997)
- 40) Hammond, J.M. et al., Vaccine 18: 1040-1050 (2000)
- 41) Hammond, J.M. et al., Archives of Virology 146: 1787-1793 (2001)
- 42) Hahn, J. et al., J. Virol Methods 93: 49-56 (2001)
- 43) Gerdt et al, Journal of General Virology 78: 2139-2146 (1997)

- 44) Gorres et al., Clinical Vaccine Immunology 18: 1987-1995 (2011)
- 45) Tian, D.Y. et al., Vaccine 30: 3587-3594 (2012)
- 46) Sun, Y. et al., Vaccine 29: 8364-8372 (2011)
- 47) Sun, Y. et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 137: 20-27 (2010)
- 48) Done, J.T. et al., Br. Vet. Journ. 142 :145-150 (1986)
- 49) Becher, P. *et al.*, Journal of General Virology 78 : 1357-1366 (1997)
- 50) Patterson, D.S.P. *et al.*, J. of Neurochem. 26: 481-485 (1976)

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phát hiện virus mới, CTAPV 1, trên trang trại lợn tại Hà Lan.

Trên trang trại lợn nằm ở Hà Lan, sự bùng phát chứng run bầm sinh typ A-II được chẩn đoán vào đầu năm 2012. Lợn con sinh ra từ các con lợn nái tơ, là lứa đầu tiên, bị ảnh hưởng là chính nhưng ở các lợn nái lứa sau đôi khi cũng bị ảnh hưởng. Việc chẩn đoán dựa trên các quan sát lâm sàng và sự loại trừ sau đó chứng run bầm sinh typ A-I, A-III, A-IV và A-V là nguyên nhân gây bệnh có thể có. Về mặt lâm sàng, lợn con bị ảnh hưởng thể hiện con run ở các mức độ khác nhau, do sự co cơ quá mức trong quá trình vận động. Các triệu chứng này giảm khi ngủ. Hiện tượng mất lợn con là tác dụng thứ cấp do sự mất khả năng tự ăn của các con vật bị ảnh hưởng gây ra, đặc biệt là trong tuần đầu tiên sau khi sinh. Về khía cạnh mô học, não và tủy sống được đặc trưng bởi sự giảm mức độ myelin hóa. Như được mô tả thêm dưới đây, không phải tất cả các lợn bị ảnh hưởng đều sống sót. Ở những con lợn sống sót, con run giảm và cuối cùng biến mất khi lợn lớn lên.

Dựa trên thông tin về những lần bùng phát, nguồn gốc gây nhiễm của bệnh được nghi ngờ. Ở 20 tuần đầu của năm 2012, tổng cộng 48 lứa lợn con có triệu chứng về chứng run bầm sinh được sinh từ lợn nái tơ, trong số tổng 231 lứa lợn con từ lợn nái tơ. Điều này tương đương với 21% của tất cả các lứa lợn con sinh ra từ lợn nái tơ. Ở đỉnh điểm của đợt nhiễm bệnh, 8 tuần sau lần bùng phát ban đầu, 85% lứa lợn con của lợn nái tơ cho thấy lợn con mắc chứng run bầm sinh typ A-II. Phần trăm mất lợn con (lợn con chết) cho đến khi cai sữa là 26% ở các lứa lợn con bị ảnh hưởng, so với 11% lứa lợn con không bị ảnh hưởng. Ở các lứa lợn con bị ảnh hưởng, 60% trường hợp tử vong ở lợn con là do chứng run bầm sinh. Tổng số lợn con sinh ra ở mỗi lứa không bị

ảnh hưởng. Chứng run bẩm sinh tác động lên cả lợn đực và lợn cái, và tỷ lệ phổ biến trong lứa thay đổi trong khoảng <10%-100%.

Trước đợt bùng phát năm 2012, chứng run bẩm sinh được quan sát ở một vài lứa lợn con vào tháng 11/2009 và 12/2010.

Các vấn đề với các đợt bùng phát chứng run bẩm sinh tiếp diễn trên trang trại này từ 2012, và các lợn con bị ảnh hưởng thu được vào năm 2013 và 2014 (xem dưới đây). Tuy nhiên, tỷ lệ mắc bệnh giảm.

Mẫu huyết thanh thu được vào tháng 3/2012 (6 mẫu, tất cả lợn con đều mắc triệu chứng CT typ A-II) và tháng 4/2012 (5 mẫu, tất cả lợn con đều mắc triệu chứng CT typ A-II). Virut mới CTAPV 1 được phát hiện ở 11/11 mẫu.

Thêm nhiều mẫu huyết thanh thu được từ cùng một trang trại vào tháng 7/2012. Tổng cộng 16 mẫu huyết thanh từ lợn con sinh ra từ 2 lợn nái và 1 lợn nái tơ được phân tích. Không con nào trong số các con lợn con này thể hiện chứng run bẩm sinh. CTAPV được tìm thấy ở 1/16 mẫu.

Đợt bùng phát mới của bệnh này được chẩn đoán vào tháng 1/2013. Bốn lợn con mới sinh chưa nhận sữa non thu được để mổ khám xác, tất cả đều thể hiện CT typ A-II. Virut này được đặt tên là CTAPV 1A bởi vì nó có nguồn gốc từ cùng một trang trại, nhưng đã qua một khoảng thời gian dài từ đợt bùng phát đầu đến lúc xuất hiện các vấn đề lâm sàng mới. Virut mới CTAPV 1A được phát hiện ở 4/4 lợn con.

Đợt bùng phát mới của bệnh này được chẩn đoán vào tháng 3/2013. Ba lợn con mới sinh chưa nhận sữa non thu được để mổ khám xác, tất cả đều thể hiện CT typ A-II. Virut này được đặt tên là CTAPV 1B. Virut mới CTAPV 1 được phát hiện ở 3/3 mẫu.

Đợt bùng phát mới của bệnh này được chẩn đoán vào tháng 1/2014. Bốn lợn con mới sinh chưa nhận sữa non thu được (mẫu bệnh lấy từ trực tràng), tất cả đều thể hiện CT typ A-II. Virut này được đặt tên là CTAPV 1C. Virut mới CTAPV 1 được phát hiện ở 4/4 mẫu. Việc mổ khám xác trên 3 lợn con khác được thực hiện vào tháng 2/2014, một lần nữa cả 3 lợn con đều thể hiện CT typ A-II, và CTAPV được phát hiện ở 3/3 mẫu.

Việc mổ khám xác được thực hiện trên lợn con từ các đợt bùng phát vào tháng 1/2013, 3/2013 và 2/2014. Não và tủy sống cho thấy các dấu hiệu về sự mất myelin

(xem Ví dụ 2).

Bảy lợn con (6 con trước khi sinh ra, tuần cuối cùng của kỳ thai nghén; 1 con mới sinh) từ trang trại không có tiền sử chứng run bẩm sinh typ A-II được sử dụng làm đối chứng âm đối với PCR và để mổ khám xác. Tất cả các mẫu huyết tương đều âm tính với virus CTAPV, và không quan sát thấy bất thường nào về mặt mô học ở các con lợn con này.

Gom mẫu huyết thanh và phân

Các mẫu phân và huyết thanh được thu nhận trên các trang trại ở Hà Lan mà có vấn đề với CT typ A-II ở lợn mới sinh. Máu được gom vào trong ống (loại: Vacuette 8ml Sep Clot Activator ref: 455071) và huyết thanh được phân lập bằng cách ly tâm 20 phút ở 3000 x g ở 4°C. Phân được gom bằng cách sử dụng tấm bông khô và để vào trong ống vô trùng chứa 2 ml dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). Sau đó, tấm bông có phân được khuấy mạnh và vớt bỏ. Cả mẫu huyết thanh và mẫu phân được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi phân tích.

Phân lập ARN virus bằng cách xử lý ADNaza tùy ý

Để phân lập ARN virus, kit mini ARN virus QIAamp (Qiagen) được sử dụng kết hợp với kit ADNaza không chứa ARNaza (Qiagen).

Vấn tắt là, 1% dung dịch chất mang-ARN/AVE trong đệm AVL được điều chế. 560µl chất mang-ARN/AVE trong AVL được trộn với 140µl mẫu và được ủ 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 560µl etanol (>99%) được bổ sung và mẫu được chuyển vào cột quay mini QIAamp. Cột được ly tâm trong 1 phút ở 6000 x g. Cột được rửa bằng cách bổ sung 250µl AW1 và quay cột trong 30 giây ở 6000 x g. Hỗn hợp ADNaza được điều chế bằng cách trộn 10µL ADNaza với 70µl đệm RDD mỗi mẫu. 80µl hỗn hợp ADNaza được ủ trên màng trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp tục rửa bằng cách đặt 250µl AW1 lên cột và quay nó trong 30 giây ở 6000 x g, sau đó bổ sung 500µl AW2 vào cột và ly tâm 3 phút ở 13000 x g. Các ống gom được thay thế và cột được ly tâm thêm một phút nữa. Cột quay được chuyển vào ống Eppendorf 1,5 ml, trong đó 65µl đệm AVE được bổ sung lên màng và được ly tâm 1 phút ở 6000 x g. Các mẫu ARN được đặt trước phản ứng phiên mã ngược ngay.

Phản ứng phiên mã ngược

ARN được phiên mã thành ADN bổ trợ bằng cách sử dụng hệ thống tổng hợp chuỗi thứ nhất SuperScript® III First-Strand Synthesis System đối với RT-PCR (Invitrogen). Protocol của nhà sản xuất được bám sát với một vài cải biến nhỏ. Tổng kết lại, 1µl hexame ngẫu nhiên và 1µl dNTP 10mM được trộn với 8µl ARN. Hỗn hợp này trước tiên được ủ 5 phút ở 65°C, sau đó để đông lạnh trên đá. Sau đó, thêm 10µl hỗn hợp tổng hợp ADN bổ trợ, gồm 2µl 10x đệm RT, 4µl MgCL₂, 2µl DTT, 1µl ARNazaOUT và 1µl Superscript®III RT, vào các mẫu. Các mẫu trước tiên được ủ 10 phút ở 25°C, sau đó 50 phút ở 50°C, sau đó 5 phút ở 85°C và cuối cùng là làm đông lạnh trên đá. Thêm 1µl ARNaza H vào các mẫu và mẫu được ủ 20 phút ở 37°C. Mẫu ADN bổ trợ thu được được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

PCR

A. Hỗn hợp đoạn môi CTAPV-PAN2-F1R1, -F2R1, -F1R2, -F2R2, bảng 1,2

Mỗi phản ứng PCR chứa 27µl WFI, 1µl Super Taq Plus 5µl 10x đệm Super Taq PCR, 5µl dNTP, 5µl đoạn môi xuôi và 5µl đoạn môi ngược. Tổng quan về các đoạn môi sử dụng được nêu trong bảng 1. Chương trình PCR được sử dụng để phát hiện CTAPV bao gồm pha khởi động 4 phút, ở 95°C. Sau đó là 35 chu trình gồm gây biến tính liên tục trong 30 giây ở 95°C, bắt cặp trong 30 giây ở nhiệt độ gắn môi thích hợp đối với cặp đoạn môi (xem bảng 1) và kéo dài chuỗi trong 30 giây ở 72°C. Giai đoạn kéo dài chuỗi ở 72°C được giữ trong 10 phút. Tất cả các sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di bằng gel agarosa 1,5%. Xem Fig. 1.

B. Hỗn hợp đoạn môi CTAPV-PAN-FW-RV, PANdeg-FW-PANdeg-REV, bảng 1,2

Mỗi phản ứng PCR chứa 27µl WFI, 1µl Super Taq Plus 5µl 10x đệm Super Taq PCR, 5µl dNTP, 5µl đoạn môi xuôi và 5µl đoạn môi ngược. Tổng quan về đoạn môi sử dụng được nêu trong bảng 2. Chương trình PCR được sử dụng để phát hiện CTAPV bao gồm pha khởi động 4 phút, ở 95°C. Sau đó là 40 chu trình gồm gây biến tính liên tục trong 30 giây ở 95°C, bắt cặp trong 30 giây ở nhiệt độ gắn môi thích hợp đối với cặp đoạn môi (xem bảng 2) và kéo dài chuỗi trong 60 giây ở 72°C. Giai đoạn kéo dài chuỗi cuối cùng ở 72°C được giữ trong 10 phút. Tất cả các sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di bằng gel agarosa 1,5%.

C. Hỗn hợp đoạn môi CTAPV-PAN2-F3R3, -F4R4, bảng 1,2

Mỗi phản ứng PCR chứa 27 μ l WFI, 1 μ l Super Taq Plus 5 μ l 10x đệm Super Taq PCR, 5 μ l dNTP, 5 μ l đoạn mồi xuôi và 5 μ l đoạn mồi ngược. Tổng quan về các đoạn mồi sử dụng được nêu trong bảng 1. Chương trình PCR được sử dụng để phát hiện CTAPV bao gồm pha khởi động 4 phút, ở 95°C. Sau đó là 35 chu trình gồm gây biến tính liên tục trong 30 giây ở 95°C, bắt cặp trong 30 giây ở nhiệt độ gắn mồi thích hợp đối với cặp đoạn mồi (xem bảng 1) và kéo dài chuỗi trong 30 giây ở 72°C. Giai đoạn kéo dài chuỗi ở 72°C được giữ trong 10 phút. Tất cả các sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di bằng gel agarosa 1,5%.

Bảng 1: Tổng quan về các đoạn mồi

Tên đoạn mồi	Tên ngắn	Trình tự ADN
CTAPV-PAN2-F2	F2	5'-CGGATACAGAAATACTAC-3'
CTAPV-PAN2-R2	R2	5'-CCGAATGCAGCTARCAGAGG-3'
CTAPV-PAN2-F1	F1	5'-GCCATGATGGAGGAAGTG-3'
CTAPV-PAN2-R1	R1	5'-GGGCAGRTTTGTGGATTCAG-3'
CTAPV-PAN-FW	PAN-FW	5'-GAAACAGCCATGCCAAAAAATGAG-3'
CTAPV-PAN-REV	PAN-RV	5'-AGTGGGTTCCAGGGGTAGATCAG-3'
CTAPV-PANdeg-FW	PANdeg-FW	5'-GAAACAGCCATGCCMAARAATGAG-3'
CTAPV-PANdeg-REV	PANdeg-RV	5'-AGTGGGTTCCAGGRGTAGATYAG-3'
CTAPV-PAN2-F3	F3	5'-GAGTACGGGGCAGACGTCAC-3'
CTAPV-PAN2-R3	R3	5'-CATCCGCCGGCACTCTATCAAGCAG-3'
CTAPV-PAN2-F4	F4	5'-ATGCATAATGCTTTGATTGG-3'
CTAPV-PAN2-R4	R4	5'-GTGACGTCTGCCCCGTACTC-3'

Bảng 2: Tổng quan về hỗn hợp đoạn mồi được sử dụng, và đặc điểm hóa đích

Hỗn hợp đoạn mồi	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Đích
F1-R1	60,2	156	NS5B
F1-R2	60,2	277	NS5B

F2-R1	50,9	213	NS5B
F2-R2	50,9	335	NS5B
PAN-FW - PAN-RV	58,0	896	NS5B
PANdeg-FW - PANdeg-RV	58,0	896	NS5B
F3-R3	50,0	182	5'-UTR
F4-R4	50,0	182	5'-UTR

D. PCR định lượng dựa trên xanh SYBR

Đường chuẩn để định lượng các kết quả qPCR

Để thu được chuẩn cho qPCR, sản phẩm PCR 155 bp của trình tự CTAPV chứa trình tự đích qPCR được tách dòng vào vector plasmit TOPO4 (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR CTAPV 155bp để tách dòng thu được bằng cách thực hiện PCR với đoạn mồi CTAPV-PAN2-F1 và CTAPV-PAN2-R1, xem bảng 3. Sau đó, sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarosa 1,5%. Vạch 155 bp được cắt ra và ADN được chiết từ gel agarosa trước khi tách dòng vào vector TOPO4.

Kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) được sử dụng để nối sản phẩm PCR vào vector pCR®4-TOPO4® và biến nạp vector này vào One Shot® TOP10 Chemically Competent E. Coli. Tổng kết lại, 4µl ADN được trộn với 1µl dung dịch muối và 1µl vector TOPO. Sản phẩm nối được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được đặt lên đá. 2µl hỗn hợp nối được thêm vào One Shot® TOP10 Chemically Competent E. Coli. Sau khi ủ 30 phút trên đá, hỗn hợp được làm sốc nhiệt trong bể nước 42°C trong 30 giây và đặt trở lại lên đá. Sau đó, 250µl môi trường SOC ấm được bổ sung và hỗn hợp được ủ 1 giờ ở 37°C trong tủ ủ lắc, sau đó 100µl hỗn hợp được dàn lên đĩa thạch LB + 100 µg/ml ampicilin. Đĩa này được ủ qua đêm trong tủ ủ 37°C.

Các khuẩn lạc được tách dòng chính xác được nhận diện bằng cách sử dụng PCR từ khuẩn lạc sử dụng đoạn mồi M13 (xem bảng 3 dưới đây; (SEQ ID NO: 30 và 31)) trong các phân tích PCR chuẩn, sau đó điện di gel. Các khuẩn lạc chính xác được cho phát triển trong môi trường LBACF (môi trường MSD AH lô sản xuất số 318781; môi trường Luria-Bertani, không có thành phần động vật) có ampicilin, từ đó ADN plasmit được phân lập sử dụng kit QIAGEN® Plasmid Midi (Qiagen) theo protocol của nhà sản xuất. Để kiểm tra các đột biến, ADN plasmit được đọc trình tự sử dụng đoạn mồi M13.

Bảng 3: Tổng quan về hỗn hợp đoạn mồi được sử dụng để phân tích qPCR

Tên đoạn mồi	Trình tự ADN của đoạn mồi	Nhiệt độ gắn mồi
CTAPV-PAN2-F1	5'-GCCATGATGGAGGAAGTG-3'	60,0°C
CTAPV-PAN2-R1	5'-GGGCAGRTTTGTGGATTTCAG-3'	60,0°C
M13 Fw	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	55,0°C
M13 Rv	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	55,0°C

Các phần pha loãng chuẩn của trình tự đích được tính toán bằng cách đo nồng độ ADN plasmit của vector. Công thức để tính toán số bản sao plasmit/ μ l được mô tả dưới đây (Công thức 1). Nồng độ ADN (ng/ μ l) được đo sử dụng phép quang phổ. A, G, T và C là số các nucleotit đồng âm trong plasmit. $6,02 \cdot 10^{23}$ là số Avogadro. Phép nhân với 2 sẽ chuyển nồng độ ssADN thành nồng độ dsADN, và phép nhân với 10^9 sẽ chuyển gam thành nanogam. Đối với các phản ứng qPCR, tám mẫu pha loãng được tạo ra chứa 10^8 - 10^1 bản sao/ 2μ l.

Công thức 1: Công thức để tính bản sao plasmit/ μ l.

bản sao plasmit/ μ l

$$= \text{nồng độ ADN (ng/}\mu\text{l)} \\ / \left(\left(\frac{(A * 328,24 + G * 344,24 + T * 303,22 + C * 304,16)}{(6,02 * 10^{23})} \right) * 2 \right. \\ \left. * 10^9 \right)$$

qPCR

qPCR dựa trên xanh SYBR được phát triển. Mỗi phản ứng chứa 10μ l hỗn hợp tổng qPCR nhanh KAPA SYBR, $0,4\mu$ l đoạn mồi xuôi 10μ M, $0,4\mu$ l đoạn mồi ngược 10μ M, $7,2\mu$ l WFI và 2μ l khuôn. Đoạn mồi CTAPV-PAN-F1 và CTAPV-PAN-R1 được sử dụng (xem bảng 4). Chương trình sau đây được sử dụng: 3 phút ở 95°C , sau đó là 39 chu trình gồm 10 giây liên tục ở 95°C , 10 giây ở 60°C và đọc đĩa trong hệ thống Biorad CFX. Kết quả được phân tích sử dụng phần mềm Biorad CFX. Các kết quả được so sánh bằng đường chuẩn như nêu trên; pha loãng sản phẩm CTAPV 155

bp theo bậc 10 lần, được tách dòng vào plasmid TOPO4. Việc phân tích đường cong nóng chảy trong khoảng 65°C --> 95°C; mỗi 0,5°C 0,05 giây được bao gồm trong chương trình qPCR.

Tính đặc hiệu của phản ứng qPCR được xác nhận bằng điện di gel sản phẩm PCR đã khuếch đại. Độ dốc đường cong chuẩn và phân bố chẵn trên trục y được tính toán bằng phần mềm CFX. $r^2 > 0,99$. Hiệu quả PCR được tính từ độ dốc nằm trong khoảng 95-105%.

Bảng 4: hỗn hợp phản ứng qPCR

	Dung dịch sử dụng	Thể tích (μl)/phản ứng
Hỗn hợp tổng KAPA SYBR Fast qPCR	2x	10
CTAPV-PAN2-F1	10μM	0,4
CTAPV-PAN2-R1	10μM	0,4
WFI	n.a.	7,2
Khuôn (ADN bổ trợ)	n.a.	2

Đọc trình tự nucleotit

Việc đọc trình tự Sanger được thực hiện theo phương pháp nêu trong tài liệu tham khảo. Trình tự được phân tích sử dụng Sequencer 5.0 và Clone Manager 9.

Phân tích phát sinh loài

Thực hiện phân tích phát sinh loài để phân loại CTAPV 1 ở dạng pestivirus.

Trình tự axit amin của toàn bộ gen của virus mới được sử dụng để tạo ra cây phát sinh loài dựa vào phương pháp xác suất tối đa kết nối liền kề (Neighbor-Joining Maximum Likelihood), mô hình hiệu chỉnh Poisson và phân tích bootstrap (500 bản sao).

Các cây này được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình MEGA, version 5, sử dụng các thiết lập chuẩn. (các phương pháp MEGA5: phân tích gen tiến hóa phân tử sử dụng xác suất tối đa, khoảng cách tiến hóa, và tiết kiệm tối đa. Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei và Sudhir Kumar. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731–2739. 2011 doi:10.1093/molbev/msr121 Advance

Access công bố 4/5/2011).

Ví dụ 2

Virut CTAPV có thể được tìm thấy ở các cơ quan và PBL; Mô học chỉ định sự mất myelin ở não và tủy sống

Phân tích PCR của các cơ quan sau của lợn con mới sinh chưa nhận sữa non bị mổ khám xác (CTAPV 1A/1B, 2013) mắc chứng run bầm sinh typ A-II chỉ ra sự có mặt của virut CTAPV.

CTAPV có thể được phát hiện trong máu, huyết thanh, huyết tương, và PBL (bạch cầu máu ngoại biên), tim, ruột non, ruột già, não, tủy sống vùng ngực, tủy sống vùng thắt lưng, gan, hạch bạch huyết bẹn, phổi, túi mật, bàng quang, thận, amidan và lá lách. Lượng cao nhất được phát hiện trong huyết thanh và amidan.

Các cơ quan giống nhau là các mẫu từ lợn con đối chứng trước khi sinh (tuần cuối cùng của thai kỳ) từ trang trại không có tiền sử về CT typ A-II. Tất cả các cơ quan đều âm tính trong PCR.

Não và tủy sống của lợn con đối chứng và lợn con nhiễm CTAPV được mổ để khám xác, được cố định bằng formalin và nhuộm màu hematoxylin-eosin. Xét nghiệm mô học cho thấy các dấu hiệu về sự mất myelin cho riêng lợn con nhiễm CTAPV (Fig. 2 A-D).

Các biến thể CTAPV từ các trang trại ở các vị trí địa lý khác nhau.

Các biến thể CTAPV 2-9 được thu nhận từ các trang trại lợn ở Hà Lan ở các đợt bùng phát trong năm 2013 trở đi.

Bảng 5 chỉ ra số lợn con được làm thí nghiệm trên từng trang trại, và số lợn con PCR dương tính với CTAPV (huyết thanh/mẫu bệnh lấy từ trực tràng).

Bảng 5: Tổng quan về các biến thể CTAPV từ các trang trại khác nhau ở Hà Lan. Kết quả phân tích PCR của CTAPV trong mẫu huyết thanh và/hoặc trực tràng

Biến thể	Trang trại	Dương tính với CTAPV có các triệu chứng	Âm tính với CTAPV có các triệu chứng	Dương tính với CTAPV không có các triệu chứng	Tổng số các mẫu	Ngày
CTAPV 1	1	6	0	0	6	15/3/12

CTAPV 1	1	5	0	0	5	5/4/12
CTAPV 1	1	0	0	1	15	20/7/12
CTAPV 1A	1	4	0	0	4	28/1/13
CTAPV 1B	1	3	0	0	3	5/3/13
CTAPV 1C	1	4	0	0	4	31/1/14
CTAPV 1C	1	3	0	0	3	12/2/14
CTAPV 2	2	8	0	0	8	14/8/13
CTAPV 3	3	8	0	0	8	11/10/13
CTAPV 4	3	0	0	4	8	11/10/13
CTAPV 5	4	5	0	0	5	31/5/13
CTAPV 6	5	10	0	0	10	4/12/13
CTAPV 7	6	15	0	0	15	8/1/14
CTAPV 7	6	4	0	0	4	24/1/14
CTAPV 8	7	4	0	0	4	6/3/14
CTAPV 9	8	4	0	0	4	12/2/14
Đối chứng âm tính	9	0	0	0	1	5/3/13
Đối chứng âm tính	9	0	0	0	6	18/12/14
Tổng		83	0	5	113	

Sự kết hợp bệnh là 100% đối với lợn con thể hiện CT typ A-II. Virut CTAPV được phát hiện ở tất cả các con lợn con mắc chứng run bầm sinh typ II, và không có ở trong mẫu đối chứng được lấy ở trang trại không có tiền sử CT typ A-II.

CTAPV 1 được thấy ở một con lợn con không thể hiện chứng run bầm sinh. Lợn con này được lấy từ trang trại 1, trang trại có tiền sử CT typ A-II.

CTAPV 4 được thấy ở lợn con không thể hiện chứng run bầm sinh. CTAPV 4 được thấy ở cùng một trang trại nơi tìm thấy CTAPV 3 (trang trại 3). Do đó, CTAPV 4 có mặt trên trang trại có tiền sử CT typ A-II.

Tổng cộng 12 biến thể từ 8 vị trí địa lý khác nhau được tìm thấy.

- Biến thể CTAPV 1, 1A, 1B, 1C lấy từ cùng một trang trại ở các thời điểm khác nhau.
- Biến thể CTAPV 3 và 4 lấy từ cùng một trang trại
- Mặc dù được tìm thấy ở các vị trí địa lý khác nhau, biến thể CTAPV 5 và 8 là giống nhau tại mức nucleotit

Bảng 6 thể hiện tính phản ứng của cặp đoạn mỗi.

Biến thể	F1R1	F1R2	F2R1	F2R2	F3R3	F4R4	PAN-FW - PAN- RV	PANdeg-FW - PANdeg-RV
CTAPV 1	+	+	+	+	+	+	+	+
CTAPV 1A	+	+	+	+	+	+	+	+
CTAPV 1B	+	+	+	+	+	+	+	-
CTAPV 1C	+	na	na	na	+	+	-	-
CTAPV2	+	+	+	+	+	na	+	na
CTAPV 3	-	-	+	+	+	na	na	na
CTAPV 4	na	na	na	na	+	na	na	na
CTAPV 5	+	+	+	+	+	na	+	na
CTAPV 6	+	+	+	+	+	na	na	na
CTAPV 7	+	na	na	+	+	+	+	+
CTAPV 8	+	na	na	+	+	+	+	+
CTAPV 9	na	na	na	na	+	na	na	na

Bảng 6: Tính phản ứng cặp đoạn mỗi.

Tất cả các biến thể có thể được phát hiện bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR F3R3

Tất cả các biến thể có thể được phát hiện bằng cách sử dụng một trong số các hỗn hợp đoạn mỗi PCR F1R1, F1R2, F2R1, F2R2, tuy nhiên, biến thể CTAPV 9 không được thử nghiệm.

Độc trình tự bộ gen

Trình tự bộ gen hoàn chỉnh của CTAPV 1 thu được bằng cách đọc trình tự Sanger.

Trong số các biến thể khác, CTAPV 1A, 1B, 1C, 2, 3, 4, 6, 8 và 9, 5000 bp đầu tiên bao gồm trình tự mã hóa đối với E^{ms}, E1 và E2 được thu nhận.

Chỉ trình tự nucleotit giới hạn gồm 1073 nt là sẵn có đối với M7

Dựa vào việc đọc trình tự bộ gen, kết luận rằng CTAPV 5 = CTAPV 8

Ví dụ 3

Phân tích phát sinh loài của biến thể CTAPV và CTAPV

Cây phát sinh loài của CTAPV 1 và pestivirus đã biết khác được biểu diễn trên Fig. 3. Phần trăm hỗ trợ bootstrap được chỉ ra ở mỗi nốt. Thanh khoảng cách chỉ ra số các thay thế nucleotit ở mỗi vị trí.

Cây phát sinh loài của 10 trong số các biến thể CTAPV được mô tả trong đơn sáng chế này được biểu diễn trên Fig. 4. Chỉ các biến thể CTAPV 1, 1A, 1B, 1C, 2, 3, 4, 6, 8 và 9 được bao gồm trong phân tích này. Trình tự nucleotit 1- 5000 bp được bao gồm trong phân tích này, bao gồm trình tự mã hóa cho E^{ms}, E1 và E2.

CTAPV 7 không được bao gồm do chỉ 1073 nt có sẵn đối với M7.

CTAPV 5 không được bao gồm, do CTAPV 5 = CTAPV 8

Ví dụ 4

Phân tích protein E2 dự đoán/trình tự nucleotit cho thấy rằng protein E2 của CTAPV 1B = protein E2 của CTAPV 1. Protein CTAPV 8 thể hiện 14 thay thế axit amin so với CTAPV 1.

Cơ quan được xét nghiệm sau khi mổ xác mà có thể đóng vai trò làm vật liệu khởi đầu cho các thử nghiệm gây nhiễm là có sẵn đối với CTAPV 1B, nhưng không có sẵn đối với CTAPV 1. Các tác giả sáng chế phân tích trình tự nucleotit và trình tự axit amin của các gen/protein E^{ms}-E1-E2 của CTAPV 1 và 1B. Trình tự axit amin giống nhau 100% (Fig. 5). Trình tự protein E2 là chữ cái in nghiêng. Protein E^{ms} được gạch chân bằng đường kẻ đậm, trình tự protein E1 được gạch chân bằng đường kẻ mảnh.

Cơ quan được xét nghiệm sau khi mổ xác mà có thể đóng vai trò làm vật liệu khởi đầu cho các thử nghiệm gây nhiễm là có sẵn đối với CTAPV 8. Các tác giả sáng chế phân tích trình tự nucleotit và trình tự axit amin của các gen/protein E^{ms}-E1-2 của CTAPV 1B và 8 (so sánh axit amin trên Fig. 6). Trình tự axit amin giống nhau 95%. Trình tự protein E2 là chữ cái in nghiêng. Protein E^{ms} được gạch chân bằng đường kẻ đậm, protein E1 được gạch chân bằng đường kẻ mảnh. CTAPV 8 có 14 thay thế axit amin (độ đồng nhất 93,3%) so với CTAPV 1B, trong số đó 9 thay thế là dương tính (dương tính 97,6%).

Ví dụ 5

Chuẩn bị vật liệu thử thách

Vật liệu thử thách thu được từ cơ quan được mổ để xét nghiệm (vật liệu thực địa) của lợn con bị ảnh hưởng bởi CTAPV 1B (2013) và CTAPV 8 (2014). Cơ quan được mổ để xét nghiệm được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng.

CTAPV 1B

Não của 3 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất.

Tủy sống của 3 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Lá lách của 3 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Amidan của 3 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

CTAPV 8

Não của 4 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Tủy sống của 4 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Lá lách của 4 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Amidan của 4 lợn con của lứa bị ảnh hưởng được tập hợp lại trước khi làm đồng nhất

Các mô tập hợp được cân sau khi làm tan giá. Sau đó, PBS 9 lần trọng lượng mô (CTAPV 1B) hoặc môi trường M6B8 có $10\mu\text{M}$ HEPES (Sigma H3375-250G, CTAPV 8) được bổ sung vào vật liệu mô. Mô được làm đồng nhất bằng cách sử dụng bộ trộn, sau đó lắc bằng các hạt thủy tinh nhỏ trong 5 phút. Trong quá trình làm đồng nhất, khối nghiền cơ quan được giữ trên đá. Khối nghiền cơ quan được ly tâm trong 1 giờ ở $3200 \times g$. Chất nổi bề mặt trước tiên được cho đi qua bộ lọc $0,45\mu\text{m}$, và sau đó qua bộ lọc $0,22\mu\text{m}$. Thể đồng nhất sau khi lọc được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng.

dụng.

Ví dụ 6

Thử nghiệm gây nhiễm ở lợn con độ tuổi cai sữa để thu được vật liệu gây nhiễm:

Thử nghiệm thử thách với các thể đồng nhất cơ quan CTAPV 1B và CTAPV 8 thu được từ các thể phân lập thực địa được thực hiện ở lợn con SPF/khỏe mạnh ở độ tuổi cai sữa 4 đến 8 tuần tuổi của giống lợn thành phẩm thương mại.

Tại thời điểm đặt vào cơ sở thử nghiệm, mẫu máu CPDA (xitrat phosphat dextroza adenin), mẫu bệnh lấy từ trực tràng, mẫu bệnh lấy từ họng-miệng và mẫu bệnh lấy từ mũi thu được từ động vật. Các con vật được nhốt vào hai phòng thử nghiệm riêng biệt: nhóm A 8 con và nhóm B 8 con. Không có sự tiếp xúc vật lý hoặc tiếp xúc gián tiếp thông qua người trông nom động vật giữa các phòng.

Ở nhóm A, sáu con lợn được chủng ngừa thể đồng nhất CTAPV 1B qua con đường trong cơ (IM), dưới da (SC), trong mũi (N) và miệng (OR).

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất kết hợp lá lách + tủy sống + não

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất kết hợp lá lách + amidan + não

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất kết hợp não + tủy sống

Hai con lợn đóng vai trò vật cảnh báo tiếp xúc (contact sentinel).

Các lượng (thể tích) IM, SC và N là 1,0 ml mỗi liều, bên trái và bên phải hoặc lượng là 4 ml. Liều dùng qua mũi được xịt. Liều thử thách được đưa ra trong bảng 7.

Sau khi chủng ngừa, tất cả các con lợn được quan sát hàng ngày đối với các dấu hiệu lâm sàng, nhưng các con vật vẫn không có triệu chứng trong quá trình thử nghiệm.

Máu CPDA, mẫu bệnh lấy từ mũi, mẫu bệnh lấy từ họng-miệng và mẫu bệnh lấy từ trực tràng được lấy vào ngày 0, ngày 3, ngày 7, ngày 10 và ngày 14 sau khi chủng ngừa để giám sát sự nhiễm và bài tiết CTAPV 1B qua phân tích qPCR. Huyết tương thu được từ máu CPDA bằng cách sử dụng kit Leucosep® (Greiner Mat. số 163 288). Kết quả của phân tích qPCR trên mẫu huyết tương được trình bày trong bảng 7.

Tất cả các con vật được chủng ngừa đều thể hiện kết quả qPCR dương tính với CTAPV trong huyết thanh ở ngày 10. Dựa vào sự bài tiết virus, các con vật bị giết ở các thời điểm khác nhau để thu được vật liệu gây nhiễm mới cho các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* tiếp theo.

Tại thời điểm mổ để khám xác, não, tủy sống, lá lách, amidan, và máu được lấy từ các con vật.

Bảng 7: Liều thử thách và kết quả thử thách CTAPV 1B

CTAPV 1B:

Con vật	Thử thách		T=0	T=3d p chall	T=7d p chall	T=10d p chall	T=14d p chall
	Vật liệu	Bản sao ARN tái thử thách /ml trong 10% thể đồng nhất	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml
326	sentinel		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
365			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
366	lá lách + tủy sống +não	4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	6,15E+05	n.d.	n.d.	2,38E+05	N/A
367		4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	n.d.	n.d.	n.d.	3,24E+04	2,00E+06
368	lá lách + amidan+ não	4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	8,65E+05	n.d.	n.d.	3,50E+05	N/A
369		4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	n.d.	n.d.	n.d.	2,16E+05	2,67E+06
370	não + tủy sống	4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	3,91E+05	n.d.	n.d.	3,24E+05	3,31E+06
371		4ml đường miệng; 2x1 ml IM 2x1 ml đường mũi; 2x1 ml SC	n.d.	n.d.	4,06E+04	5,23E+05	N/A

n.d.: không phát hiện được

N/A: Không phân tích (con vật đã bị giết)

Ở nhóm B, sáu con lợn được chủng ngừa bằng thể đồng nhất CTAPV 8 thông qua đường trong cơ (IM), dưới da (SC), trong mũi (N) và miệng (OR).

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất lá lách + amidan + não + tủy sống

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất lá lách + amidan

Hai con lợn nhận chất để chủng ngừa từ thể đồng nhất não + tủy sống

Hai con lợn đóng vai trò làm vật cảnh báo tiếp xúc.

Lượng IM, SC và N là 2,0 ml mỗi liều, bên trái và bên phải hoặc lượng này bằng 3 hoặc 4 ml. Liều dùng qua đường mũi được xịt. Các liều thử thách được đưa ra trong bảng 8.

Sau khi chủng ngừa, tất cả các con lợn được quan sát hằng ngày đối với các dấu hiệu lâm sàng, nhưng các con vật vẫn không có triệu chứng trong quá trình thử nghiệm.

Máu CPDA, mẫu bệnh lấy từ mũi, mẫu bệnh lấy từ họng-miệng và mẫu bệnh lấy từ trực tràng được lấy vào ngày 0, ngày 3, ngày 7 và ngày 14 sau khi chủng ngừa sự nhiễm giám sát và bài tiết CTAPV-8 qua phân tích qPCR. Huyết tương thu được từ máu CPDA bằng cách sử dụng kit Leucosep® (Greiner Mat. số 163 288). Kết quả phân tích qPCR trên mẫu huyết tương được trình bày trong bảng 8.

Tất cả các con vật được chủng ngừa đều thể hiện kết quả qPCR dương tính với CTAPV trong huyết thanh ở ngày 3 và/hoặc ngày 7. Dựa vào sự bài tiết virus, các con vật bị giết ở các thời điểm khác nhau để thu được vật liệu gây nhiễm mới cho các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* tiếp theo.

Tại thời điểm mổ để khám xác, não, tủy sống, lá lách, amidan, và máu được lấy từ các con vật.

Vật liệu cơ quan được sử dụng làm vật liệu thử thách trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa như được mô tả trong ví dụ 8/9.

Bảng 8: Liều thử thách và kết quả thử thách CTAPV 8

CTAPV 8:

Con vật	Thử thách		T=0	T=3d p chall	T=7d p chall	T=14d p chall
	Vật liệu	Con đường	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml	Bản sao ARN huyết tương /ml
394	sentinel		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
395			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
397	trộn 4	IM, mũi miệng + SC	3ml đường miệng; 2x2 ml IM	1,04E+06	5,50E+03	2,55E+06
398	cơ quan		2x2 ml đường mũi; 2x2 ml SC	n.d.	5,22E+03	8,35E+04
399	lá lách +	IM, mũi miệng + SC	4 ml đường miệng; 2x2 ml IM	n.d.	7,92E+03	N/A
400	amidan		2x2 ml đường mũi; 2x2 ml SC	n.d.	2,46E+03	1,57E+05
401	não +	IM, mũi miệng + SC	4 ml đường miệng; 2x2 ml IM	n.d.	3,28E+03	1,73E+04
402	tủy sống		2x2 ml đường mũi; 2x2 ml SC	n.d.	5,07E+03	4,77E+06

n.d.: không phát hiện được

N/A: không phân tích (con vật đã bị giết)

Ví dụ 7

Chuẩn bị vật liệu thử thách cho thử nghiệm thử thách chủng ngừa

Vật liệu thử nghiệm thu được từ ví dụ 6.

CTAPV 1B

Não, tủy sống, lá lách và amidan của 1 con vật được mổ khám xác từ ví dụ 6, nhóm A

CTAPV 8

Não, tủy sống, lá lách và amidan của 1 con vật được mổ khám xác từ ví dụ 6, nhóm B

Các mô sau khi tập hợp được cân lên sau khi tan giá. Sau đó, cho môi trường 9 lần trọng lượng mô M6B8 có HEPES 10 μ M (Sigma H3375-250G) vào vật liệu mô. Mô được làm đồng nhất bằng cách sử dụng bộ trộn, sau đó lắng bằng các hạt thủy tinh nhỏ trong 5 phút. Trong quá trình làm đồng nhất, khối nghiền cơ quan được giữ trên đá. Khối nghiền cơ quan được ly tâm 1 giờ ở 3200 x g. Chất nổi bề mặt trước tiên được cho đi qua bộ lọc 0,45 μ m, và sau đó qua bộ lọc 0,22 μ m ngoại trừ vật liệu dùng qua đường miệng. Thể đồng nhất sau khi lọc được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 8

Thử nghiệm thách thức chủng ngừa

Thiết kế vắc xin: biểu hiện protein E2:

Trình tự axit amin của virus CTAPV 1 được phân tích. Điểm bắt đầu và kết thúc của gen E2 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắp thẳng bộ gen virus CTAPV với protein E2 của virus sốt lợn cổ điển (CSF) (Ngân hàng gen: AAS 20412.1) và protein E2 của virus tiêu chảy ở bò (BVDV) (Ngân hàng gen: AGN03787.1), và các vị trí chia tách dự đoán của protein E2 được xác định bằng cách sử dụng phần mềm SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Trình tự axit amin dự đoán của E2 CTAPV 1 (SEQ ID NO: 32):

SCHKRQDYYSIQLVVDGKTGVEKRSIVGKWTVTITREGREPRIMEQISMVSNDSLSETYCY

NRLNTSSWGRQPARQRGCGQTVPFWPGDNVLEEQYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKG
 NVQCQRNGSSLILQLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGPVTQGTCTVYSWAFAPRGWYYNRK
 DGYWLQYVKKNDYQYWTKMPTASSATTMYRH

Sau đó, trình tự nucleotit của E2 CTAPV để biểu hiện protein E2 của CTAPV trong hệ biểu hiện baculovirus ở các tế bào côn trùng được tối ưu hóa bằng cách sử dụng thuật toán Genscript OptimumGene™ (www.genscript.com) (SEQ ID NO: 33).

CGCGGATCCAAATATG

TCATGTCACAAGCGTCAAGACTACTACTCTATCCAACCTGGTGGTGGACGGAAAACTGGC
 GTGGAAAAGCGTTCT

ATCGTGGGCAAGTGGACGGTCATCACCAGGGAGGGCAGAGAACCGCGCCTAATGGAGCA
 AATTTCGATGGTATCT

AACGACTCTCTTTCAGAAACCTACTGCTATAACCGTCTCAATACTAGCTCTTGGGGTCGTC
 AACCTGCCCCGTCAG

CGCGGATGTGGGCAAACCGTCCCCTTCTGGCCTGGTGACAACGTACTCGAGGAACAGTAC
 TATAGCACCGGATAC

TGGGTAAACGCTACTGGCGGTTGCCAACTACGCGAGGGAGTTTGGTTATCTCGTAAGGGG
 AACGTGCAATGTCAG

CGTAATGGCTCATCGCTGATCCTTCAACTCGCTATTAAAGAGGAAAACGACACCATGGAA
 ATCCCGTGCGATCCA

GTCGAGACTGAATCAATGGGCCCCGTTACTCAAGGCACGTGTGTGTACAGCTGGGCTTTC
 GCCCCTAGGGGATGG

TACTATAACCGTAAGGACGGCTACTGGCTTCAATACGTGAAGAAAAACGATTACCAGTAC
 TGGACCAAAATGCCC

ACTGCATCCAGCGCGACCACTATGTACCGTCACCATCACCATCACCATCACTAAGAATTC
 TCGAG

Các vị trí giới hạn BamHI và EcoRI được gạch chân. Codon khởi đầu được chỉ ra dưới dạng chữ in nghiêng và codon kết thúc được chỉ ra dưới dạng chữ in đậm.

Biến nạp và biểu hiện:

Gen E2 của CTAPV được tổng hợp tại Genscript và được tách dòng trực tiếp vào vectơ plasmid (pFastbac1) bằng cách sử dụng vị trí giới hạn BamHI và EcoRI. Plasmid được biến nạp vào *E. coli* bằng cách sử dụng kỹ thuật biến nạp chuẩn, và sau

đó ADN của plasmit được tinh sạch và được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào côn trùng SF9. Bước chuyển nhiễm được tiến hành như sau:

2ml huyền phù tế bào chứa 5×10^5 tế bào/ml được cho vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng. Các tế bào được cố định vào đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ 27°C . Dung dịch chuyển nhiễm sau (200 μl môi trường không có kháng sinh, 5 μl miniprep ADN và 6 μl cellfectin (Invitrogen)) được điều chế và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Sau 45 phút, bổ sung 0,8ml môi trường vào dung dịch chuyển nhiễm và hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào đã cố định. Các tế bào sau khi chuyển nhiễm được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 27°C . Sau 5 giờ, 1ml môi trường khác (được bổ sung gentamycin và natamycin) được bổ sung vào các tế bào. Các tế bào này được cho sinh trưởng trong 3 ngày ở nhiệt độ 27°C . Chất nổi bề mặt được bảo quản ở nhiệt độ -70°C làm nguồn cung cấp virus P1.

Việc biểu hiện protein E2 của CTAPV trong môi trường nuôi cấy SF9 được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di gel SDS-page. Các mẫu thu được từ môi trường nuôi cấy SF9 được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch đệm mẫu Bio-Rad Laemmli có β -mercaptoethanol 5%, và sau đó các mẫu này được gia nhiệt đến nhiệt độ 99°C trong 10 phút. Tất cả các mẫu và chất đánh dấu Precision Plus proteinTM All Blue (Bio-Rad) được nạp vào gel đúc sẵn Bio-Rad CriterionTM TGXTM (kDTM bất kỳ) và điện di ở 200V trong 42 phút. Đệm điện di được sử dụng là 1x Tris/Glyxin/SDS. Sau khi điện di, gel được nhuộm trong 1 giờ trong dung dịch đệm nhuộm protein InstantBlueTM (Expedeon).

Tinh sạch:

Sau khi biểu hiện ở các tế bào SF9, protein E2 được tinh sạch theo hai cách khác nhau. Phương pháp tinh sạch thứ nhất là bằng cách tạo ra sản phẩm phân giải toàn bộ tế bào. Môi trường nuôi cấy SF9 biểu hiện E2 của CTAPV được tạo viên, tạo lại huyền phù trong PBS và nghiền bằng sóng âm bằng cách sử dụng thiết bị nghiền bằng sóng âm Branson (2 lần 30 xung, đầu ra 5, chu trình làm việc 55%). Sau khi nghiền bằng sóng âm, sản phẩm phân giải được ly tâm trong 10 phút ở 8000 vòng/phút. Viên chứa E2 được biểu hiện quá được tạo lại huyền phù trong PBS. Một cách khác để tinh sạch protein E2 là bằng phương pháp tinh sạch sử dụng IMAC và chất tẩy anion. Phương pháp này được mô tả trong BMC Biotechnology 2012, 12:95.

(BMC Biotechnology 2012, 12:95; Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression; Benjamin Schlager, Anna Straessle and Ernst Hafen). Đệm phân giải chứa chất tẩy gây biến tính dạng anion (SDS) được sử dụng để phân giải giống cây có E2 được biểu hiện quá. Lượng chất tẩy dư được loại bỏ bằng cách làm lạnh và tinh sạch, trước khi tinh sạch ái lực.

Protein E2 được biểu hiện ở tế bào SF9 và tinh sạch như nêu trên được cho chạy trên gel SDS-page cùng với các chất chuẩn albumin huyết thanh bò với nồng độ protein đã biết. Nồng độ protein được ước lượng bằng cách so sánh cường độ vạch sử dụng phần mềm Genetools (Syngene phiên bản 3.08.07).

Bào chế theo công thức

Vắcxin cuối cùng được bào chế trong nhũ tương nước trong dầu dựa trên dầu khoáng. Tỷ lệ nước:dầu dựa trên trọng lượng là 45:55. Kích cỡ giọt của nhũ tương thường là nhỏ hơn 1µm và độ nhớt là khoảng 80 -150 mPa.sec.

Vắcxin 1: pha nước gồm protein E2 được tinh sạch (nồng độ E2 ước lượng 60µg/ml)

Vắcxin 2: pha nước gồm toàn bộ sản phẩm phân giải tế bào (nồng độ E2 ước lượng 62µg/ml)

Tăng cường chủng ngừa

Đối với thử nghiệm này, chuẩn bị 48 con lợn con giai đoạn cai sữa 5 tuần tuổi. 3 x 8 con mỗi nhóm được nuôi nhốt trong chuồng 1, và 3 x 8 con mỗi nhóm được nuôi nhốt trong chuồng 2. Không có tiếp xúc nào giữa các con giữa các chuồng.

Trong mỗi nhóm gồm 8 con, 6 con lợn con nhận chủng ngừa lần đầu với vắcxin 1, 2 con lợn con còn lại không được chủng ngừa khi bắt đầu nghiên cứu.

Ở t=21 ngày, 5 trong số 6 con được chủng ngừa lần đầu trong mỗi nhóm nhận chủng ngừa tăng cường với vắcxin 2.

Các mẫu máu được gom trước khi chủng ngừa lần đầu, ở ngày 21 sau khi gây nhiễm trước khi chủng ngừa tăng cường, và ở ngày 39, trước khi thử thách.

Trong mỗi nhóm, 4 con nhận chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường, cộng 2 con không được chủng ngừa được chuyển sang cơ sở thử thách trước khi thử thách.

Trong mỗi nhóm, 1 con chỉ nhận chủng ngừa lần đầu, và 1 con nhận cả chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường được theo dõi trong thêm hai tuần.

Thử thách

36 con vật dùng trong thử nghiệm này được nuôi nhốt trong chuồng 3, 3 x 6 con mỗi nhóm, nhóm 1-3, và trong chuồng 4, 3 x 6 con mỗi nhóm, nhóm 4-6, được nuôi nhốt. Các con trong chuồng 3 lấy từ chuồng 1, các con trong chuồng 4 lấy từ chuồng 2.

Không thể có sự tiếp xúc nào giữa các con giữa các chuồng. Không thể có sự tiếp xúc vật lý nào giữa các con ở các nhóm khác nhau trong chuồng, nhưng có thể có tiếp xúc không khí.

Các con này được thử thách với vật liệu virus sống vào ngày 39 sau chủng ngừa lần đầu.

Trong chuồng 3, 3x 6 con lợn con (nhóm 1-3) được thử thách với vật liệu thử thách CTAPV 1 (xem trên đây).

Nhóm 1: 10,0 ml qua đường miệng và 2 x 2,0 ml qua đường mũi

Nhóm 2: 2 x 1,0 ml IM

Nhóm 3: 2 x 1,0 ml IM

Trong chuồng 4, 3x 6 con lợn con (nhóm 4-6) được thử thách với vật liệu thử thách CTAPV 8 (xem trên đây).

Nhóm 1: 10,0 ml qua đường miệng và 2 x 2,0 ml qua đường mũi

Nhóm 2: 2 x 1,0 ml IM

Nhóm 3: 2 x 1,0 ml IM

Các mẫu máu trong huyết thanh và mẫu bệnh lấy từ mũi, trực tràng và miệng-họng được gom trước khi thử thách, và vào 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23 và 27 ngày sau thử thách để theo dõi sự nhiễm và bài tiết virus CTAPV thông qua phân tích qPCR. Ba con (hai con được chủng ngừa, một không được chủng ngừa) trong mỗi nhóm được mổ khám xác ở ngày 13 sau thử thách, 3 con còn lại (hai con được chủng ngừa, một không được chủng ngừa) được mổ khám xác ở ngày 27 sau thử thách. Hạch bạch huyết bẹn, hạch bạch huyết màng treo ruột và amidan được lấy mẫu ở thời điểm mổ khám xác.

Ví dụ 9

Các kháng thể đối với protein E2 của CTAPV

Biểu hiện protein E2 trong E. Coli:

Trình tự axit amin của virus CTAPV 1 được phân tích. Điểm bắt đầu và kết thúc của gen E2 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắp thẳng bộ gen virus CTAPV với protein E2 của virus sốt lợn cổ điển (CSF) (Ngân hàng gen: AAS 20412.1) và protein E2 của virus tiêu chảy ở bò (BVDV) (Ngân hàng gen: AGN03787.1), và các vị trí chia tách dự đoán của protein E2 được xác định bằng cách sử dụng phần mềm SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Trình tự axit amin dự đoán của CTAPV 1 E2 (SEQ ID NO: 32):

SCHKRQDYYSIQLVVDGKTGVEKRSIVGKWTVITREGREPRLMEQISMVSNDSLSETYCY
NRLNTSSWGRQPARQRGCGQTVPFWPGDNVLEEYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKG
NVQCQRNGSSLILQLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGPTVQTGTCVYSWAFAPRGWYYNRK
DGYWLQYVKKNDYQYWTMPTASSATTMYRH

Trình tự protein để biểu hiện trong E. Coli (bao gồm đuôi HIS)

SCHKRQDYYSIQLVVDGKTGVEKRSIVGKWTVITREGREPRLMEQISMVSNDSLSETYCY
NRLNTSSWGRQPARQRGCGQTVPFWPGDNVLEEYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKG
NVQCQRNGSSLILQLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGPTVQTGTCVYSWAFAPRGWYYNRK
DGYWLQYVKKNDYQYWTMPTASSATTMYRHHHHHHH

Sau đó, trình tự nucleotit của E2 CTAPV để biểu hiện protein E2 của CTAPV trong E. Coli được tối ưu hóa bằng cách sử dụng thuật toán Genscript OptimumGene™ (www.genscript.com) (SEQ ID NO: 34).

CATATGTCGTGTACAAACGCCAAGATTATTATTCTATTCAACTGGTCGTGGATGGTAAA
ACGGGTGTCGAAAAACGCTCT
ATCGTCGGTAAATGGACCGTGATTACGCGTGAAGGCCGCGAACCGCGTCTGATGGAACA
GATCAGTATGGTTTCC
AACGATAGCCTGTCTGAAACCTATTGCTACAACCGCCTGAATACGAGCTCTTGGGGTTCGT
CAGCCGGCACGTCAA
CGCGGCTGTGGTCAGACCGTCCCGTTTTGGCCGGGCGACAACGTGCTGGAAGAACAATAT
TACAGTACCGTTAT

TGGGTGAATGCAACGGGCGGTTGCCAGCTGCGTGAAGGCGTTTGGCTGTCTCGTAAGGGT
AACGTCCAGTGTCAA

CGCAATGGCAGTTCCTGATTCTGCAACTGGCGATCAAAGAAGAAAACGATACCATGGA
AATCCCGTGCGACCCG

GTCGAAACCGAATCAATGGGCCCCGGTGACCCAGGGCACGTGTGTTTATTCGTGGGCATTC
GCACCGCGCGGCTGG

TATTACAACCGTAAAGATGGTTATTGGCTGCAGTACGTGAAGAAAAACGACTATCAATAC
TGGACCAAAATGCCG

ACGGCATCATCGGCTACCACGATGTACCGTCATCACCATCACCATCACCATTA**ACTCGAG**

Vị trí giới hạn được thêm vào (in đậm) là NdeI và XhoI.

Biến nạp và biểu hiện:

Gen E2 của CTAPV được tổng hợp tại Genscript và được tách dòng trực tiếp vào vector plasmit (pET22b) bằng cách sử dụng vị trí giới hạn NdeI và XhoI. Plasmit được biến nạp thành E. coli BL21star + pLysS bằng cách sử dụng các kỹ thuật biến nạp tiêu chuẩn, và việc biểu hiện được cảm ứng.

Sự biểu hiện nhận được bằng cách cho các chủng biểu hiện sinh trưởng trong môi trường tự cảm ứng trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sự biểu hiện được kiểm tra bằng cách chạy điện di gel SDS-page.

E2 được phát hiện có trong phần không hòa tan. Protein E2 được tinh sạch bằng cách áp dụng phương pháp tinh sạch sử dụng IMAC và chất tẩy anion. Phương pháp này được mô tả trong BMC Biotechnology 2012, 12:95. (BMC Biotechnology 2012, 12:95; Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression; Benjamin Schlager, Anna Straessle and Ernst Hafen). Dung dịch đệm phân giải chứa chất tẩy gây biến tính dạng anion (SDS) được sử dụng để phân giải giống cấy có E2 được biểu hiện quá mức. Lượng chất tẩy dư được loại bỏ bằng cách làm lạnh và tinh sạch, trước khi tinh sạch ái lực.

Protein sau khi tinh sạch được kiểm tra trên SDS-page như được mô tả trong Ví dụ 8. Protein đã tinh sạch được phối trộn trong GNE và được sử dụng để tiêm vào thỏ để tạo ra kháng thể. Nồng độ ước lượng của protein trong pha nước là 0,5mg/ml.

Fig. 7 cho thấy rằng các kháng thể sản sinh ở thỏ (huyết thanh t=4 tuần sau

chúng ngừa) nhận biết đặc hiệu một vạch khoảng 25 kDa tương ứng với protein E2 của CTAPV được biểu hiện trong hệ biểu hiện baculovirut/SF9 (làn 2). Làn 1 chứa chất đánh dấu và làn 3 chứa sản phẩm biểu hiện không liên quan trong hệ biểu hiện baculovirut/SF9.

Ví dụ 10

qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR

Mẫu động vật

Mẫu huyết thanh và lá lách của lợn được gom từ các con lợn được gây nhiễm bằng thử nghiệm và lợn đối chứng. Máu được gom (Vacuolette 8 ml Sep Clot Activator ref: 455071; Greiner Bio-one) và huyết thanh thu được bằng cách ly tâm 20 phút ở 3000 x g ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu tinh trùng thu được từ công ty lấy giống trên thị trường và được thử nghiệm mà không xử lý sơ bộ.

10% thể đồng nhất mô được chuẩn bị trong PBS trên đá lạnh. Việc làm đồng nhất được thực hiện trong ống Gentle Macs M với thiết bị phân tách Gentle Macs (Miltenyi Biotec). Vật liệu được làm đồng nhất này sau đó được ly tâm hai lần, lần đầu ở 3200 x g trong 30 phút và sau đó ở 10000 x g trong 10 phút. Sau đó, việc xử lý ADNaza được thực hiện: 24µl 10x dung dịch đệm Turbo ADNaza và 20µl Turbo ADNaza (AMBion) được bổ sung vào 250µl phần dịch nổi trên bề mặt và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút.

Chiết ARN

ARN được chiết từ các mẫu này bằng công cụ Magnapure 96 (Roche) với kỹ thuật phân giải bên ngoài. Hệ này tinh sạch ADN, ARN, và axit nucleic của virut bằng cách sử dụng công nghệ hạt thủy tinh từ tính. 200µl mẫu được trộn với 250µl dung dịch đệm phân giải/gắn kết của kit phân lập tổng thể axit nucleic của magnapure và thực hiện chiết trong thiết bị Magnapure bằng cách sử dụng quy trình phân giải bên ngoài. Các mẫu ARN được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng tiếp.

qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR

Thiết kế đoạn mồi đặc hiệu

Các đoạn mồi oligonucleotit được sử dụng để khuếch đại bộ gen 5' UTR của bộ

gen CTAPV. Phần này của bộ gen virus được chọn dựa trên trình tự nucleotit bảo toàn giữa các biến thể CTAPV 1 – 9 (dựa trên việc sắp thẳng trình tự nucleotit). Trình tự đoạn mỗi là như sau: CTAPV-PAN2-F3-B: CGTGCCCAAAGAGAAATCGG (SEQ ID NO: 35) và CTAPV-PAN2-R3-B (SEQ ID NO: 36): CCGGCACTCTATCAAGCAGT.

Phương pháp qRT-PCR

qRT-PCR một bước dựa trên SYBR được nghiên cứu phát triển bằng cách sử dụng kit qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR Superscript III Platinum (ThermoFisher). Mỗi phản ứng chứa 25µl 2x hỗn hợp phản ứng xanh SYBR, 1µl hỗn hợp Superscript III RT/Platinum Taq Mix, 1µl đoạn mỗi CTAPV-PAN2-F3-B 10µm, 1µl đoạn mỗi CTAPV-PAN2-R3-B 10µm, 17µl ARNaza không chứa nước và 5µl khuôn ARN. Tất cả các phản ứng được thực hiện trên BioRad CFX96 với các thông số chu trình sau; nhiệt độ phản ứng ở 55°C trong 3 phút, biến tính sơ bộ ở 95°C trong 5 phút và sau đó 40 chu trình gồm 95°C trong 15 giây, 60°C trong 30 giây sau đó là chương trình đường cong nóng chảy từ 60°C đến 95°C với 0,5°C/5 giây.

Tạo đường chuẩn

Để định lượng ARN đã phát hiện trong qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR, đường chuẩn được tạo cấu trúc chứa trình tự đích q-PCR có các phần pha loãng chuẩn có thể được tính. Trình tự dài 177 cặp bazơ từ phần 5'UTR (162-338) của bộ gen CTAPV được tổng hợp (Genscript) và được nối trong vector pUC57 mà sau đó được chuyển nhiễm vào *E. coli*. ADN plasmit được phân lập bằng midiprep.

Công thức để tính bản sao plasmit /µl là:

Bản sao plasmit /µl =

Nồng độ ADN (ng/µl) / ((A x 328,4 + G x 344,24 + T x 303,22 + C x 304,16) / (6,02 x 10²³)) x 2 x 10⁹.

Nồng độ ADN của plasmit là 100ng/µl. Tám phần pha loãng được tạo ra chứa 10⁸ đến 10¹ bản sao/2µl.

Kết quả

Xác nhận bằng qRT-PCR.

Đường chuẩn với tám phần pha loãng chứa 10^8 đến 10^1 bản sao/5 μ l và mẫu đối chứng âm được bao gồm trong thử nghiệm để xác nhận qRT-PCR. Fig. 1A thể hiện sơ đồ trong đó chu kỳ qPCR được vẽ đồ thị dựa trên đơn vị phát huỳnh quang tương đối theo thời gian thực. Mỗi mẫu được thử nghiệm hai lần. Đường thẳng ở khoảng 100 RFU là đường giới hạn, đường thẳng ở 0 RFU là mẫu đối chứng âm. Mẫu sao chép có lượng khuôn lớn nhất là mẫu thể hiện sự tăng phát huỳnh quang ban đầu quanh chu trình 10 (10^8 , sau đó là 10^7 ở chu trình 12 v.v.). Fig. 1B được tạo ra từ cùng số liệu thử nghiệm, nhưng ở đây đường cong chuẩn số lượng bắt đầu pha Log (o) được vẽ đồ thị dựa trên chu kỳ định lượng. Đường chuẩn có hiệu quả là 102% và R^2 bằng 0,997, đường này nằm trong phạm vi dùng cho qPCR đặc hiệu và định lượng được trong đó hiệu quả cần nằm trong khoảng từ 95% đến 105% và R^2 phải cao hơn 0,990. Fig. 1C thể hiện đường cong nóng chảy của các mẫu được thể hiện trong bảng A và B. Tất cả các mẫu dương thể hiện đường cong giống nhau và điểm nóng chảy cụ thể, có nghĩa là đoạn cụ thể được khuếch đại và đoạn này giống nhau trong mỗi phản ứng.

Các số liệu này cho thấy rằng qRT-PCR khai triển đáp ứng được các yêu cầu về việc phát hiện và định lượng CTAPV. Sau đó, qRT-PCR được sử dụng để phân tích mẫu trong số mẫu nghi ngờ dương tính với CTAPV và mẫu đối chứng. Việc giải thích số liệu này là dựa trên RFU trong mỗi chu trình cộng thêm các đặc tính của đường cong nóng chảy. Đường cong nóng chảy bất thường là chỉ thị cho độ không đặc hiệu của amplicon (đơn vị siêu sao chép).

Phát hiện và định lượng ARN của CTAPV trong mẫu huyết thanh, lá lách và tinh trùng.

Huyết thanh và lá lách từ lợn nái tơ được cho gây nhiễm bằng thử nghiệm và từ lợn nái tơ đối chứng được thử nghiệm hai lần về sự có mặt ARN của CTAPV. Tương tự, mẫu tinh trùng cũng được thử nghiệm. Kết quả (trung bình) được thể hiện trong bảng 9. Trong các thử nghiệm được thực hiện, các đường chuẩn được xác nhận là nằm trong khoảng chất lượng đối với qPCR chính xác (Fig. 9B, xem trên đây). Tương tự, điểm nóng chảy đặc trưng của CTAPV được xác nhận trong đường cong nóng chảy của tất cả các mẫu này. Dựa trên số liệu này, các tác giả sáng chế có thể kết luận rằng, qRT-PCR thích hợp để phát hiện và định lượng ARN của CTAPV trong mẫu huyết thanh, lá lách và mẫu tinh trùng.

Bảng 9: Định lượng ARN của CTAPV trong mẫu huyết thanh, tinh trùng và lá lách của lợn.

	Giá trị Ct *	Bản sao ARN / 5µl*	Bản sao ARN /ml*
Lợn nái tơ dương tính với CTAPV trong huyết thanh 1	27,41	9,99E+02	5,00E+04
Lợn nái tơ âm tính với CTAPV trong huyết thanh 2	ND	-	-
Lợn nái tơ dương tính với CTAPV trong lá lách 3	29,45	7,93E+02	3,97E+04
Lợn nái tơ âm tính với CTAPV trong lá lách 4	ND	-	-
Lợn lòi đực dương tính với CTAPV trong tinh trùng 1	29,75	5,39E+02	2,70E+04
Lợn lòi đực âm tính với CTAPV trong tinh trùng 2	ND	-	-

*có nghĩa là thử nghiệm hai lần; ND: không phát hiện được; lá lách chỉ 10% (trọng lượng/thể tích) mẫu thể đồng nhất.

Cột bản sao ARN/5µl thể hiện số lượng bản sao của virus trong 5µl mẫu ARN đã chiết thu được từ 200µl mẫu ban đầu.

Cột bản sao ARN/mL thể hiện số lượng bản sao của virus trong mẫu ban đầu (huyết thanh, tinh trùng) hoặc 10% thể đồng nhất (lá lách).

Ví dụ 11

Tinh trùng dương tính với CTAPV gây nhiễm ở lợn nái tơ và đời con

Động vật

Sáu con lợn nái tơ thu được từ trang trại SPF/High Health. Tinh trùng từ lợn lòi đực dương tính với CTAPV được sử dụng để thụ tinh nhân tạo cho lợn nái tơ.

Phương pháp

Máu được gom từ lợn nái tơ và đời con (Vacuolette 5/8 ml Sep Clot Activator ref: 455071; Greiner Bio-one) và huyết thanh thu được bằng cách ly tâm 20 phút ở 3000 x g ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu tinh trùng được thử nghiệm mà không xử lý sơ bộ.

Bước chiết ARN và qRT-PCR được thực hiện như được mô tả trong đoạn “qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR” ở ví dụ 10.

Kết quả

Các con lợn nái tơ được thử nghiệm âm tính với huyết thanh đối với CTAPV trước khi thụ tinh (qRT-PCR). Tinh trùng lợn lòi đực dương tính với CTAPV như được phân tích bằng qRT-PCR. Ở $t=+4$ tuần sau khi thụ tinh, lợn nái tơ 4 và 5 chứa lượng CTAPV phát hiện được trong huyết thanh. Vào ngày sinh nở, lợn nái tơ 1, 2 và 6 chứa các lượng CTAPV phát hiện được trong huyết thanh. Lợn con có lượng CTAPV phát hiện được trong huyết thanh được sinh ra từ 5 trong 6 con lợn nái tơ (xem kết quả ở Bảng 10). Lợn con khỏe mạnh và không biểu hiện chứng run lâm sàng hoặc tỷ lệ mắc gia tăng của các triệu chứng lâm sàng khác liên quan đến chứng run bẩm sinh typ AII như tật choãi chân.

Bảng 10: Tinh trùng dương tính với CTAPV gây nhiễm ở lợn nái tơ và đời con

lợn nái tơ	bản sao ARN $t=$ thai kỳ 4 tuần	bản sao ARN /mL khi sinh*	Kết quả qRT-PCR huyết thanh lợn con:	Điểm lâm sàng:
52		1,65E+02	6 trong số 10 con dương tính với CTAPV	10 x không có chứng run bẩm sinh
53		4,15E+01	6 trong số 11 con dương tính với CTAPV	11 x không có chứng run bẩm sinh
54		ND**	0 trong số 16 con dương tính với CTAPV	16 x không có chứng run bẩm sinh
55	2,47E+02	ND	1 trong số 15 con dương tính với CTAPV	15 x không có chứng run bẩm sinh
56	8,70E+01	ND	3 trong số 17 con dương tính với CTAPV	17 x không có chứng run bẩm sinh
57	ND	3,19E+04	11 trong số 18 con dương tính với CTAPV	18 x không có chứng run bẩm sinh

*cột bản sao ARN thể hiện số lượng bản sao ARN của virus trong mỗi mL trong mẫu ban đầu (huyết thanh)

**ND: không được phát hiện / thấp hơn mức phát hiện

Ví dụ 12

Gây nhiễm ở lợn nái tơ mang thai bằng biến thể CTAPV 1B thu được từ “lợn con mắc chứng run” và tác động đến lợn con mới sinh: tinh trùng dương tính với CTAPV

Động vật

Sáu con lợn nái tơ thu được từ trang trại SPF/khỏe mạnh. Lợn nái tơ được thụ tinh thông qua phương pháp thụ tinh nhân tạo bằng tinh trùng dương tính với CTAPV. Việc mang thai được xác nhận ở ngày 28 của thai kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật siêu âm. Tất cả các con lợn nái tơ sinh lứa lợn con vào ngày 115 hoặc ngày 116 của thai kỳ.

Gây nhiễm

Ba trong số các lợn nái tơ được gây nhiễm vào ngày 32 sau khi thụ tinh bằng chất chủng ngừa CTAPV1B gồm thể đồng nhất cơ quan của lá lách và não thu được từ lợn được mổ khám xác 371 ở $t=11$ ngày sau gây nhiễm bằng vật liệu nhiễm CTAPV1B. Thử nghiệm này được mô tả trong Ví dụ 6/Bảng 7. Thể đồng nhất được chuẩn bị như sau. Bổ sung môi trường M6B8 trọng lượng mô (MSD AH) 9 lần với HEPES $10\mu\text{M}$ (Sigma H3375-250G) vào 14 gam lá lách và 8 gam não. Mô này được làm đồng nhất bằng cách sử dụng thiết bị trộn, sau đó lắc bằng hạt thủy tinh nhỏ trong 5 phút. Trong khi làm đồng nhất và sau đó là xử lý, khối nghiền cơ quan được giữ trên đá lạnh. Khối nghiền cơ quan này được ly tâm 1 giờ ở $3200 \times g$ ở nhiệt độ 4°C . Chất nổi bề mặt được cho đi qua bộ lọc $0,22\mu\text{m}$. Thể đồng nhất sau khi lọc được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng. Ba con lợn nái tơ này được tiêm trong cơ 5mL chất chủng ngừa (hai lần tiêm, mỗi lần 2,5mL vào cổ bên trái và bên phải).

Ba con lợn nái tơ còn lại được gây nhiễm chất chủng ngừa chứa huyết thanh thu được từ cùng một con lợn ở thời điểm mổ khám xác. Huyết thanh được lọc qua bộ lọc $0,22\mu\text{m}$ trước khi tiêm. Ba con lợn nái tơ này được tiêm trong cơ 5mL chất chủng ngừa (hai lần tiêm, mỗi lần 2,5mL ở cổ bên trái và bên phải).

Lượng CTAPV định lượng trong chất chủng ngừa được xác định bằng qRT-PCR như được mô tả trong Ví dụ 10.

Gom huyết thanh

Huyết thanh được gom trước khi gây nhiễm cho lợn nái tơ, và ở $t=10$ ngày sau khi thụ tinh. Huyết thanh cũng được gom từ lợn con mới sinh trong vài giờ sau khi sinh. Máu được gom (Vacuette 5/8 ml Sep Clot Activator ref: 455071; Greiner Bio-one) và huyết thanh thu được bằng cách ly tâm 20 phút ở $3000 \times g$ ở nhiệt độ 4°C . Việc chiết ARN và qRT-PCR được thực hiện như được mô tả trong đoạn “qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR”, Ví dụ 10.

Kết quả

Thể đồng nhất hỗn hợp của lá lách và não được sử dụng để gây nhiễm ba con lợn nái tơ đầu tiên chứa các $4,5\text{E}+02$ bản sao bộ gen trong mỗi $5\mu\text{l}$ ARN đã chiết. Số lượng này tương đương với $2,3\text{E}+04$ bản sao bộ gen trong mỗi mL trong thể đồng nhất

được sử dụng để gây nhiễm lợn nái tơ.

Chất chủng ngừa huyết thanh được sử dụng để gây nhiễm ba con lợn nái tơ còn lại chứa $1,2E+04$ bộ gen trong mỗi $5\mu\text{l}$ ARN đã chiết, bằng $6,0E+05$ bản sao bộ gen trong mỗi mL được sử dụng để gây nhiễm lợn nái tơ.

Bảng 11 là lượng định lượng (số bộ gen trong mỗi mL huyết thanh) ở ngày 10 sau gây nhiễm như được xác định bằng kết quả qRT-PCR. Năm trong số sáu con lợn nái tơ sinh ra lợn con mắc chứng run bầm sinh typ A-II nghiêm trọng. Một con lợn nái tơ, con lợn nái tơ này có lượng virus tương đối thấp trong huyết thanh ở $t=10$ ngày sau gây nhiễm, sinh ra lợn con tương đối khỏe mạnh trong đó chỉ quan sát thấy 2 con lợn con có các triệu chứng nhẹ. Thông tin về lứa lợn con được ghi sau khi sinh được thể hiện trong Bảng 11. Tỷ lệ mắc tật choãi chân gia tăng liên quan đến chứng run lâm sàng, như được mô tả bởi M. White (<http://www.nadis.org.uk/bulletins/congenital-tremor.aspx?altTemplate=PDF>).

Sự có mặt của CTAPV ở ba con lợn con trong mỗi lứa (các con có chứng run lâm sàng nghiêm trọng, ngoại trừ các con lợn con do lợn nái tơ 44 sinh ra không biểu hiện chứng run lâm sàng) được kiểm tra bằng thử nghiệm qRT-PCR được mô tả trong ví dụ 10. Số lượng lợn con dương tính với CTAPV được nêu trong Bảng 11

Bảng 11: Định lượng ARN ở mẫu huyết thanh lợn nái tơ vào ngày 10 sau khi tiêm chủng, và thông tin về lứa lợn con.

Lợn nái tơ	Gây nhiễm	Bản sao ARN / mL*	Số lợn con sinh ra mắc CT typ A-II (lợn con sống – Triệu chứng # nghiêm trọng / # nhẹ / # không có triệu chứng)	CTAPV có trong lợn con (lợn con được thử nghiệm / lợn con dương tính)
42	Thể đồng nhất cơ quan	$1,1E+05$	9 – 4/4/1	3 / 3
43	Thể đồng nhất cơ quan	$4,5E+04$	15 – 7/7/1	3 / 3
44	Thể đồng nhất cơ quan	$5,5E+02$	14 – 0/2/12	3 / 2
45	Huyết thanh	$1,2E+05$	18 – 9/8/0 (1 không được ghi)	3 / 3
47	Huyết thanh	$1,3E+05$	16 – 11/4/1	3 / 3
48	Huyết thanh	$1,2E+05$	15 – 8/7/0	3 / 3

*có nghĩa là thử nghiệm hai lần; Cột bản sao ARN /mL thể hiện số lượng bản sao của virus trong mẫu ban đầu (huyết thanh).

Ví dụ 13

Gây nhiễm lợn nái tơ mang thai bằng biến thể CTAPV 1B thu được từ lợn con mắc chứng run (“lợn lắc”) và ảnh hưởng đến lợn con mới sinh: tình trạng âm tính với CTAPV

Động vật

Ba con lợn nái tơ thu được từ trang trại SPF/khỏe mạnh. Lợn nái tơ được thụ tinh bằng kỹ thuật thụ tinh nhân tạo với âm tính với CTAPV. Việc mang thai được xác nhận ở ngày 28 của thai kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật siêu âm. Tất cả các con lợn nái tơ sinh ra lứa lợn con vào ngày 114 hoặc ngày 115 của thai kỳ.

Gây nhiễm

Ba con lợn nái tơ được gây nhiễm chất chủng ngừa của huyết thanh thu được từ lợn 371 ở thời điểm mổ khám xác (xem ví dụ 12). Huyết thanh được lọc trên bộ lọc 0,22 μ m trước khi tiêm. Ba con lợn nái tơ được tiêm trong cơ 5mL chất chủng ngừa (hai lần tiêm, mỗi lần 2,5mL ở cổ bên trái và bên phải) ở thời điểm 32 ngày của thai kỳ.

Lượng CTAPV định lượng trong chất chủng ngừa được xác định bằng qRT-PCR như được mô tả trong các ví dụ 10 và 12.

Gom huyết thanh

Huyết thanh được gom trước khi gây nhiễm các con lợn nái tơ, và ở t=10 ngày sau khi thụ tinh. Huyết thanh cũng được gom từ lợn con mới sinh trong vòng một giờ sau khi sinh. Máu được gom (Vacuollette 5/8 ml Sep Clot Activator ref: 455071; Greiner Bio-one) và huyết thanh thu được bằng cách ly tâm 20 phút ở 3000 x g ở nhiệt độ 4°C. Việc chiết ARN và qRT-PCR được thực hiện như được mô tả trong đoạn “qRT-PCR một bước dựa trên xanh SYBR”, Ví dụ 10.

Kết quả

Bảng 12 thể hiện lượng định lượng (số bộ gen trong mỗi mL huyết thanh) ở ngày 10 sau khi gây nhiễm như được xác định bằng kết quả qRT-PCR. Hai trong số ba con lợn nái tơ sinh ra lứa lợn con có chứng run bẩm sinh typ A-II nhẹ. Một con lợn nái tơ, con lợn nái tơ này có lượng virus tương đối thấp trong huyết thanh ở t=10 ngày sau

gây nhiễm, sinh ra lợn con khỏe mạnh. Thông tin về lứa lợn con được ghi sau khi sinh được nêu trong Bảng 11.

Sự có mặt của CTAPV ở lợn con mắc CT typ A-II được xác nhận bằng thử nghiệm qRT-PCR được mô tả trong ví dụ 10. Số lượng lợn con dương tính với CTAPV được nêu trong Bảng 12. Tỷ lệ mắc tật choãi chân tăng liên quan đến chúng run lâm sàng.

Bảng 12: Định lượng ARN trong mẫu huyết thanh lợn nái tơ vào ngày 10 sau khi tiêm chủng, và thông tin về lứa lợn con.

Lợn nái tơ	Gây nhiễm	Bản sao ARN / mL*	Lợn con sinh ra mắc CT typ A-II (lợn con sống – triệu chứng #nghiêm trọng/# nhẹ/ # không có triệu chứng)	CTAPV có trong lợn con (lợn con được thử nghiệm/lợn con dương tính)
49	Huyết thanh	5,85E+02	13 – 0/0/13	13 / 0
50	Huyết thanh	1,39E+04	13 – 3/8/2	13 / 11
51	Huyết thanh	2,32E+04	15 – 1/12/2	15 / 15

*có nghĩa là thử nghiệm hai lần; cột bản sao ARN /mL là số lượng bản sao của virus trong mẫu ban đầu (huyết thanh).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut được phân lập, là thành viên của chi pestivirus, virut này khác biệt ở chỗ,
 - a) virut này là tác nhân gây ra chứng run bầm sinh (CT) nhóm A-II ở lợn, và
 - b) virut này có bộ gen virut chứa gen mã hóa protein vỏ E^{rns}, gen mã hóa protein vỏ E2 và gen mã hóa protein vỏ E1, trong đó trình tự nucleotit của gen E^{rns} có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen E2 có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và trình tự nucleotit của gen E1 có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 5.
2. Môi trường nuôi cấy tế bào, khác biệt ở chỗ, môi trường này chứa virut theo điểm 1.
3. Gen mã hóa protein E^{rns} của pestivirus mà là tác nhân gây ra chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của gen này có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E^{rns} được nêu trong SEQ ID NO: 1.
4. Protein E^{rns}, khác biệt ở chỗ, protein E^{rns} được mã hóa bởi gen theo điểm 3.
5. Gen mã hóa protein E2 của pestivirus mà là tác nhân gây ra chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của gen này có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E2 được nêu trong SEQ ID NO: 3.
6. Protein E2, khác biệt ở chỗ, protein E2 được mã hóa bởi gen theo điểm 5.
7. Gen mã hóa protein E1 của pestivirus, là tác nhân gây ra chứng run bầm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của gen này có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit của gen E1 được nêu trong SEQ ID NO: 5.
8. Protein E1, khác biệt ở chỗ, protein E1 này được mã hóa bởi gen theo điểm 7.
9. Đoạn ADN chứa gen E^{rns} theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, gen E^{rns} chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng khác loại.
10. Đoạn ADN chứa gen E2 theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, gen E2 chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng khác loại.
11. Đoạn ADN chứa gen E1 theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, gen E1 chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu chức năng khác loại.

12. Vắc xin kháng lại chứng run bẩm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, vắc xin này chứa lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của virus theo điểm 1 và chất mang được dùng.

13. Vắc xin kháng lại chứng run bẩm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, vắc xin này chứa lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của protein E^{rns} theo điểm 4 và/hoặc lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của protein E2 theo điểm 6 và/hoặc lượng cho hiệu quả sinh miễn dịch của protein E1 theo điểm 8, và chất mang được dùng.

14. Vắc xin kháng lại chứng run bẩm sinh nhóm A-II ở lợn, khác biệt ở chỗ, vắc xin này chứa đoạn ADN theo điểm 9 và/hoặc đoạn ADN theo điểm 10 và/hoặc đoạn ADN theo điểm 11, và chất mang được dùng.

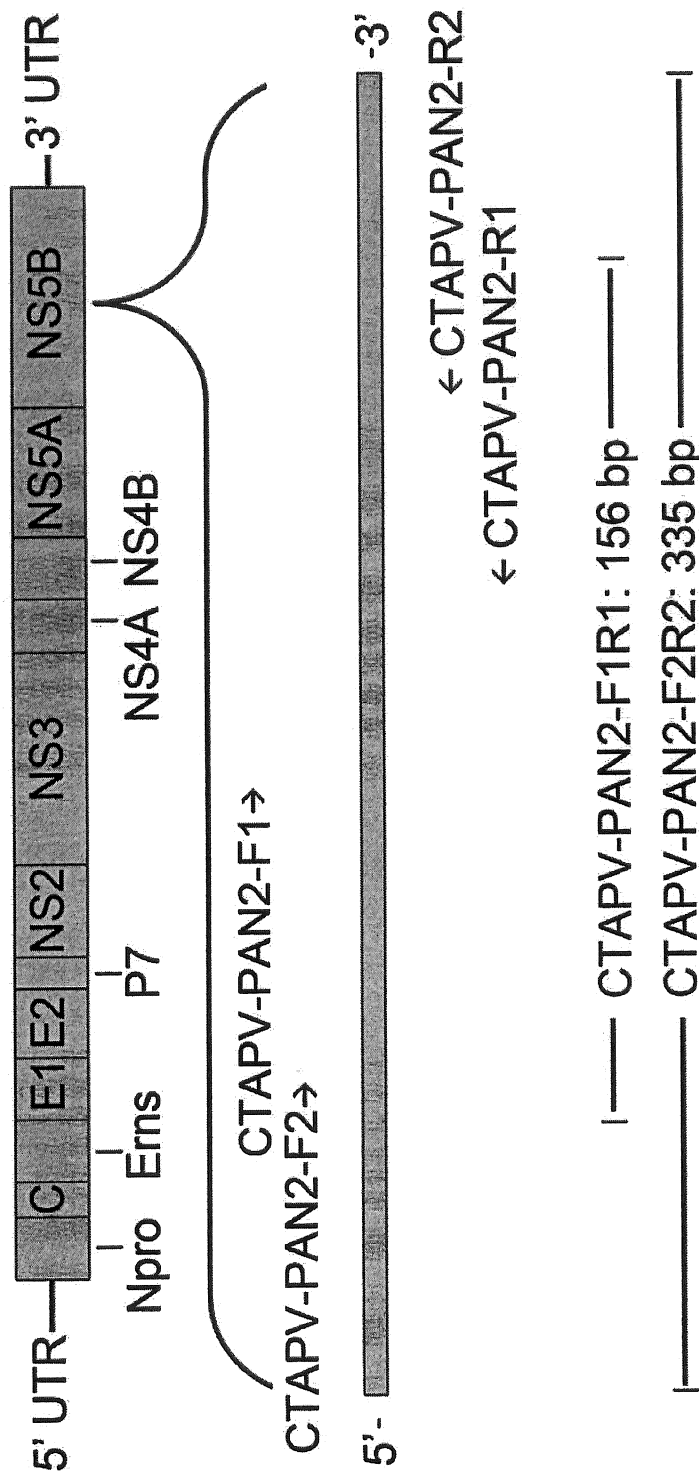


Fig. 1

2/11

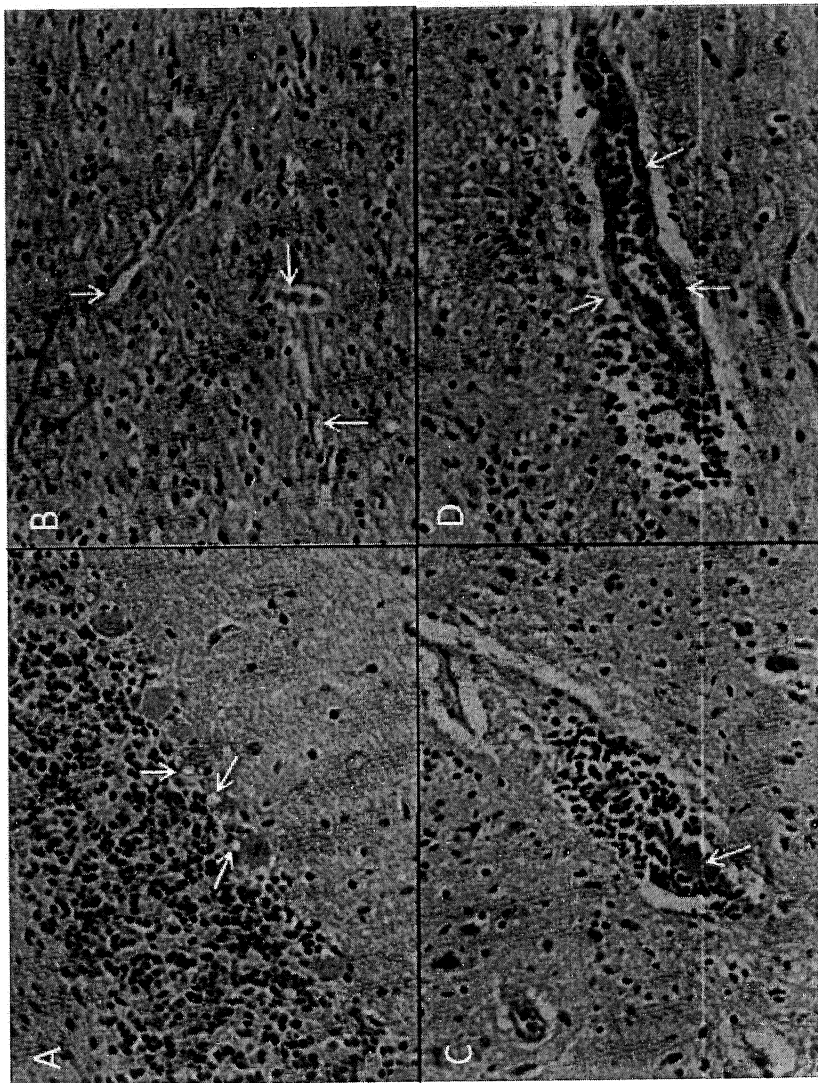


Fig. 2

3/11

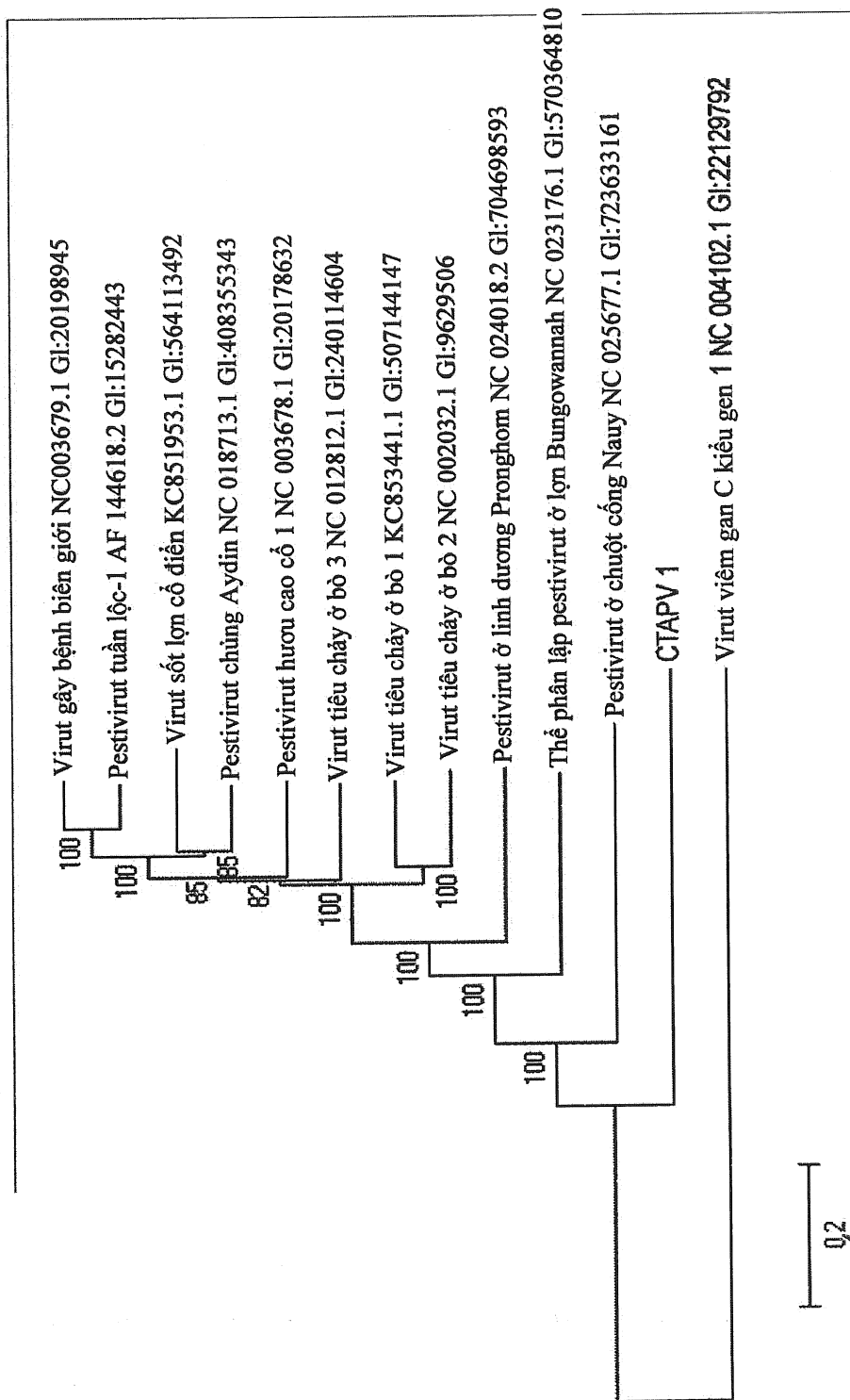


Fig. 3

4/11

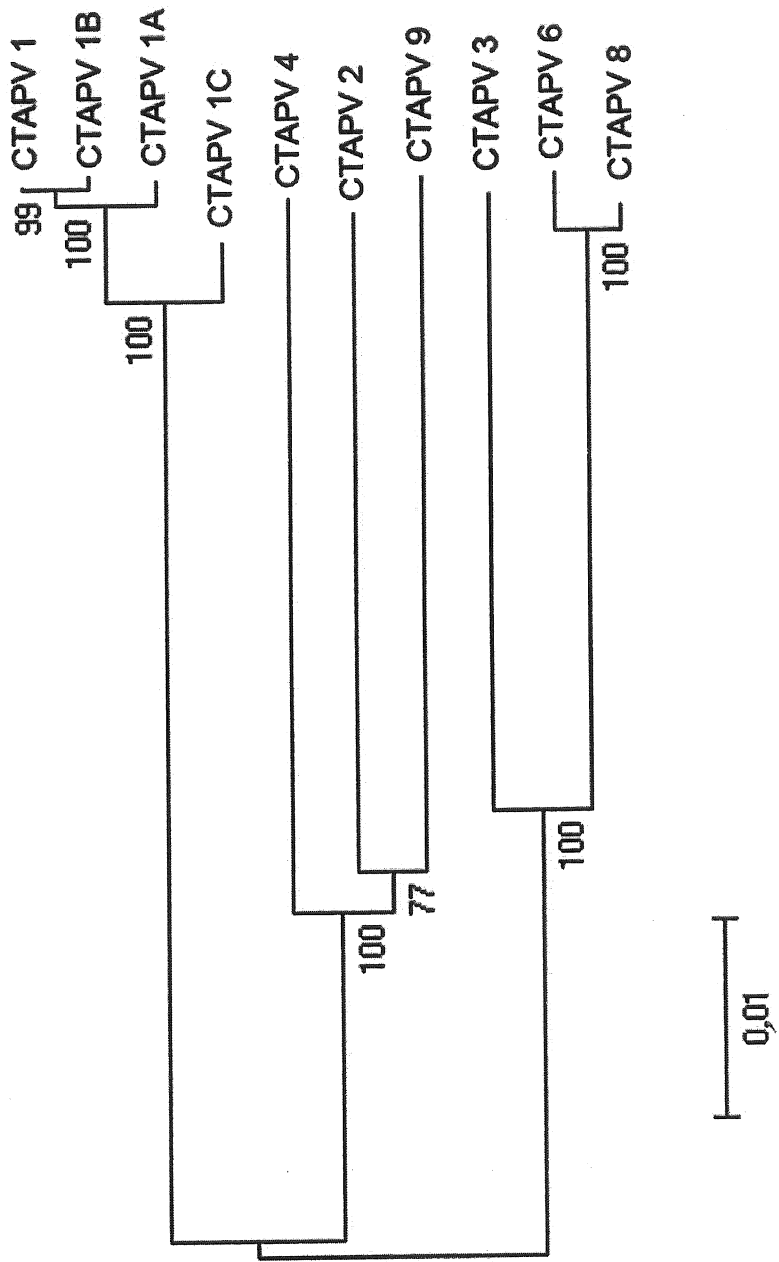


Fig. 4

Q:CTAPV 1B
S:CTAPV 1

Thống kê sự sắp thẳng

Điểm **Kỳ vọng** **Phương pháp** **Độ đồng nhất** **Dương tính** **Khoảng trống** **Khung**
1334 bits(3452) 0,0(0) Điều chỉnh ma trận thành phần 648/648(100%) 648/648(100%) 0/648(0%)
Dấu hiệu:

Truy vấn 1	<u>KVQWFLKDENSTGINQILWQIQINRTLHGEWPNQICHGMPNETITDEELRSLGMIDTSPR</u>	60
Đối tượng 1	<u>KVQWFLKDENSTGINQILWQIQINRTLHGEWPNQICHGMPNETITDEELRSLGMIDTSPR</u>	60
Truy vấn 61	<u>TNYTCCQLQYHEWKKHGWNCNYPQKQVWIRRI TALQANLTGAYEGPECAVICRFNGSYNIV</u>	120
Đối tượng 61	<u>TNYTCCQLQYHEWKKHGWNCNYPQKQVWIRRI TALQANLTGAYEGPECAVICRFNGSYNIV</u>	120
Truy vấn 121	<u>KQARDEVSPLTGCKEGHPFLFSGERSDTSCLRPPSTSWVRPVKMDEASLADSFAGVDDKA</u>	180
Đối tượng 121	<u>KQARDEVSPLTGCKEGHPFLFSGERSDTSCLRPPSTSWVRPVKMDEASLADSFAGVDDKA</u>	180
Truy vấn 181	<u>IILIRKGASGIINFLDTIGRWLPVAAEAAIVPYCETYTVTGMVHVKNCLPRGLPKHSKII</u>	240
Đối tượng 181	<u>IILIRKGASGIINFLDTIGRWLPVAAEAAIVPYCETYTVTGMVHVKNCLPRGLPKHSKII</u>	240
Truy vấn 241	<u>SPTIIYLGEGDPAHNIQHFLFGSGIAKWVLVLLGVLGEWYGELASTIYLLLEYGSEWLEHE</u>	300
Đối tượng 241	<u>SPTIIYLGEGDPAHNIQHFLFGSGIAKWVLVLLGVLGEWYGELASTIYLLLEYGSEWLEHE</u>	300
Truy vấn 301	<u>SLVTEGLIPGINITIIELPASHTVPGVWVWAGRWVCVKPDWWPTQIWIETIVA EVWHILKI</u>	360
Đối tượng 301	<u>SLVTEGLIPGINITIIELPASHTVPGVWVWAGRWVCVKPDWWPTQIWIETIVA EVWHILKI</u>	360
Truy vấn 361	<u>LASALVNIVTAFVNLELVYLVIILVKISKGNLIGAILWCLLLGAEGSCHKRQDYYSIQL</u>	420
Đối tượng 361	<u>LASALVNIVTAFVNLELVYLVIILVKISKGNLIGAILWCLLLGAEGSCHKRQDYYSIQL</u>	420
Truy vấn 421	<u>VVDGKTGVEKRSIVGKWTVITREGREPRIMEQISMVSNDSLSETYCYNRLNTSSWGRQPA</u>	480
Đối tượng 421	<u>VVDGKTGVEKRSIVGKWTVITREGREPRIMEQISMVSNDSLSETYCYNRLNTSSWGRQPA</u>	480
Truy vấn 481	<u>RQRGCGQTVPFWPGDNVLEEQYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKGNVQCQRNGSSLIL</u>	540
Đối tượng 481	<u>RQRGCGQTVPFWPGDNVLEEQYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKGNVQCQRNGSSLIL</u>	540
Truy vấn 541	<u>QLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGVPVTOGTCVYSWAFAPRGWYYNRKDG YWLQYVKKNDY</u>	600
Đối tượng 541	<u>QLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGVPVTOGTCVYSWAFAPRGWYYNRKDG YWLQYVKKNDY</u>	600
Truy vấn 601	<u>QYWTKMPTASSATTMYRHLLPLLVA CLMGGRISVWIVAMLLSLQVEAS</u>	648
Đối tượng 601	<u>QYWTKMPTASSATTMYRHLLPLLVA CLMGGRISVWIVAMLLSLQVEAS</u>	648

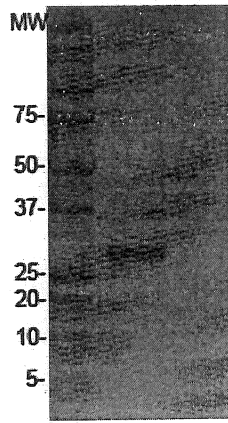
Fig. 5

Q=CTAPV 1B
S=CTAPV 8

Thống kê sắp thẳng đối với sự bắt cặp #1

Điểm	Kỳ vọng	Phương pháp	Độ đồng nhất	Dương tính	Khoảng trống	Khung
1286 bits(3328)	0,0(0)	Điều chỉnh ma trận thành phần	616/648(95%)	635/648(97%)	0/648(0%)	
Dấu hiệu:						
Truy vấn 1		<u>KVQWFLKDENSTGINOILWQROINRTLHGEWPNQICHGMPNETITDEELRSLGMIDTSPR</u>				60
Đối tượng 1		<u>KVQWFLKDENSTGI+QILWQROI+R+LHGEWP+QICHGMPNETITDEELRSLGMIDTSPR</u>				60
Truy vấn 61		<u>TNYTCCOLOYHEWKKHGWCNYPQKQVWIRITALQANLTGAYEGPECAVICRFNGSYNIV</u>				120
Đối tượng 61		<u>TNYTCCOLOYHEWKKHGWCNYPQKQ WIRITALQANLTGAYEGPECAVICRFNGSYNIV</u>				120
Truy vấn 121		<u>KQARDEVSPLTGCKEGHPFLFSGERSDTSCLRPPSTSWVRPVKMDEASLADSFAGHVDKA</u>				180
Đối tượng 121		<u>KQARDEVSPLTGCKEGHPFLFS ERSDTSCLRPPSTSWVRPVKMDEAS+AD FAHGVDKA</u>				180
Truy vấn 181		<u>IILIRKGASGIINFLDTIGRWLPVAEAAIVPYCETYTVTGMVHVKNCLPRGLPKHSKI I</u>				240
Đối tượng 181		<u>IILIRKGASGIINFLDTIG WLPVAEA I PYCETYTVTGMVHVKNCLP+GLPKHSKI I</u>				240
Truy vấn 241		<u>SPTIIYLGEGDPAHNIQHLFGSGIAKWVLVLLGVLGEWYGEASTIYLLLEYGSEWLEHE</u>				300
Đối tượng 241		<u>SPT+IYLGEGDPAHNIQHLFGSGIAKWVLVLLGVLGEWYGEASTIYLLLEY SEWLEHE</u>				300
Truy vấn 301		<u>SLVTEGLIPGINITI ELPASHTVPGWVWVAGRWVCVKPDWWPTQIWIETIVA E VWHILKI</u>				360
Đối tượng 301		<u>SL+TEGLIPGINITI ELPASHTVPGWVWVAG+WVCVKPDWWPTQIWIET+VAE WHILKI</u>				360
Truy vấn 361		<u>LASALVNIVTAFVNLELVYLVIILVKISKGNLIGAILWCLLLSGAEGSCHKRQDYYSIQL</u>				420
Đối tượng 361		<u>LASALVNIVTAFVNLELVYLVIILVKISKGNLIGAILWCLLLSGAEGSCHKRQDYI+IQL</u>				420
Truy vấn 421		<u>VVDGKTGVEKRSIVGKWTVITREGREPRLEMQISMVSNDSLSETYCYNRLNTSSWGRQPA</u>				480
Đối tượng 421		<u>VV+ KTGVEKRSI+GKWTVIT+EGREPRLEMQI+MVSNDLSSETYCYNRLNTSSW RQPA</u>				480
Truy vấn 481		<u>RQRGCGQTVFPWPGDNVLEEQYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKGNVQCQRNGSSLIL</u>				540
Đối tượng 481		<u>+QRGCGQTVP+WPGDNVLEEQYYSTGYWVNATGGCQLREGVWLSRKGNVQCQRNGSSL+L</u>				540
Truy vấn 541		<u>QLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGVPV TQGTVCVYSWAFAPRGWYYNRKDGYNLQYVKKNDY</u>				600
Đối tượng 541		<u>QLAIKEENDTMEIPCDPVETESMGPV QGTVCVYSWAFAPRGWYYNRKDGYNLQY+KKNDY</u>				600
Truy vấn 601		<u>QYWTKMPTASSATTMYRHLLPLL VACLMGGRISVWIVAMLLSLQVEAS</u>				648
Đối tượng 601		<u>QYWTKM P ASSA TMYRHLLPLL VACLMGGRISVWIVAMLLSLQVEAS</u>				648

Fig. 6

**Fig. 7**

CTAPV-Typ1

AAGGTTCACTGGTTCTTAAAGGACGAAAACCTCGACGGGGATCAATCAGAT
 CCTGTGGCAAAGACAGATTAACAGAACCCTGCATGGAGAATGGCCTAACC
 AGATCTGCCATGGCATGCCAAATGAACTATTACAGATGAGGAATTACGT
 AGCCTGGGAATGATAGACACAAGCCCCAGAACAACTACACTTGCTGCCA
 GTTGCAATATCATGAATGGAAGAACATGGTTGGTGCAACTATCCACAAA
 AACAGGTCCTGGATCAGGAGGATAACGGCCCTACAAGCTAACCTCACC
 GCCTATGAGGGGCTGAGTGTGCCGTCATTTGTAGATTTAACGGCAGCTA
 TAACATCGTAAAACAAGCCAGAGATGAGGTGAGTCCACTGACAGGGTGCA
 AGGAAGGGCACCCCTTTTCTATTCTCTGGTGAAAGATCCGACACCTCATGC
 CTGAGGCCCCCTTCCACTAGTTGGGTAAAGACCGGTAAAAATGGACGAGGC
 GTCATTGGCTGATAGCTTCGCCCATGGGGTTGACAAGGCAATAATACTAA
 TCAGAAAAGGGGCATCAGGAATAATTAATTTCTAGACACTATTGGGAGG
 TGGCTACCGGTAGCTGAGGCAGCTATAGTACCATATTGTGAACTTACAC
 TGTGACAGGGATGTATGTCCATGTGAGAATTGTCTCCCTAGAGGGTTAC
 CGAAGCATTCAAAGATAATTTCCCCGACAATAATATACTTGGGGGAAGGT
 GACCCAGCCCATAATATTGACACTTATTTGGCTCAGGTATAGCAAAGTG
 GGTCTTAGTCTTACTCGGGGTTCTGGGTGAGTGGTATGGAGAATTGGCCT
 CTACAATATACCTTACTACTAGAGTATGGGTCTGAGTGGTTGGAACATGAA
 AGTCTGGTCACGGAAGGGTTGATCCCTGGCATCAATATTACAATAGAACT
 CCCAGCTAGTCATACTGTACCTGGTTGGGTGTGGGTGCGAGGCCGGTGGG
 TATGCGTGAAACCAGATTGGTGGCCCCACACAGATTTGGATTGAACTATA
 GTGGCAGAGGTCTGGCATATACTAAAAATATTGGCATCAGCCCTGGTAAA
 CATAGTCACTGCATTTCGTAAACCTGGAATTGGTATACCTGGTCATAATAT
 TAGTCAAATATCAAAGGGGAACCTGATAGGCGCTATATTGTGGTGCTA
 TTACTGTGAGGGGCTGAAGGCTCGTGCCACAAGAGACAAGACTATTACAG
 TATCCAGCTAGTCTGTGACGGAACCGGGCTAGAAAAACGATCTATAG
 TGGGCAAGTGGACAGTGATAACTAGGGAAGGTGCGGAACCAAGATTAAATG
 GAGCAAATAAGCATGGTGTCAAATGATAGCTTATCAGAACTTACTGCTA
 CAATAGGCTAAATACTAGCAGTTGGGGGCGACAACCGCAAGACAGAGAG
 GGTGTGGTCAAACCGTACCCTTTTGGCCTGGTGACAATGTCTTGGAAGAA
 CAATACTATAGCACAGGTTACTGGGTAAATGCAACAGGTGGTTGCCAGTT
 GAGAGAAGGCGTGTGGCTATCAAGAAAGGGCAATGTACAGTGCCAGCGTA
 ACGGCTCATCTTGATACTGCAACTGGCGATAAAAGAAGAGAATGACACT
 ATGGAATACCATGTGACCCGGTGGAACCGAAAGTATGGGTCCAGTTAC
 ACAGGGCACTTGCGTGTACAGCTGGGCATTGCCCCAAGAGGGTGGTATT
 ACAACAGGAAAGATGGTTATTGGCTCCAGTACGTAAAGAAAAACGACTAC
 CAGTACTGGACGAAAAATGCCCACTGCTTCATCCGCCACAACGATGTACCG
 CCATTTGCTCCCTTTACTGGTGGCCTGCCTCATGGGCGGTAGAATATCGG
 TATGGATTGTGGCGATGCTCCTGTCTTTACAGGTGGAAGCTAGT

E^{ms} gach chân đậm

E1 gach chân mảnh

E2 in nghiêng

Trình tự bắt đầu tại nt 1259 của bộ gen tham chiếu.

Fig. 8

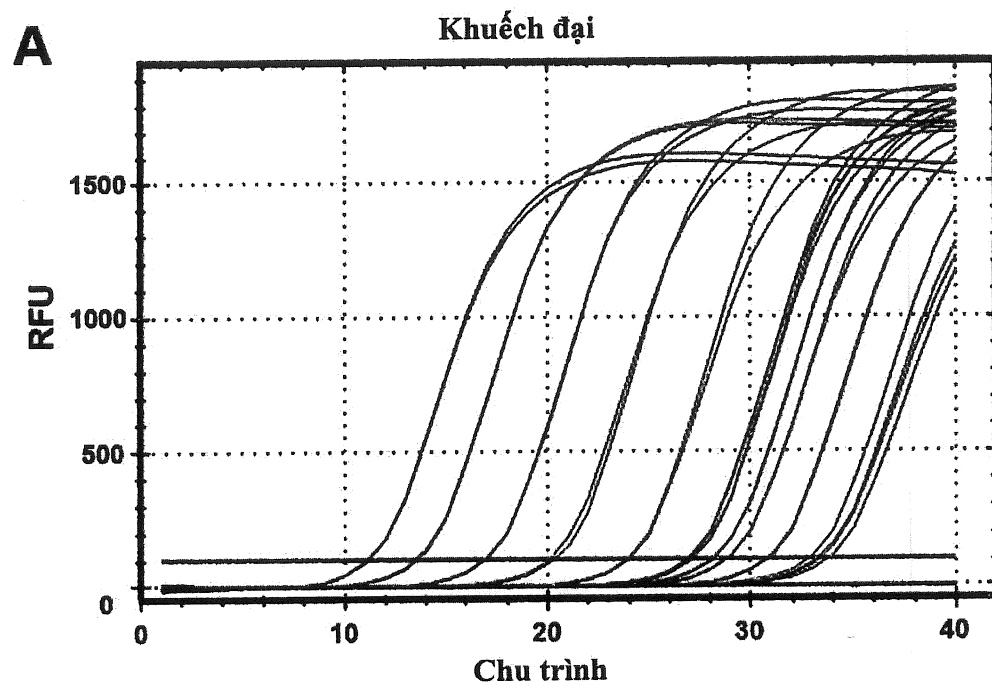


Fig. 9A

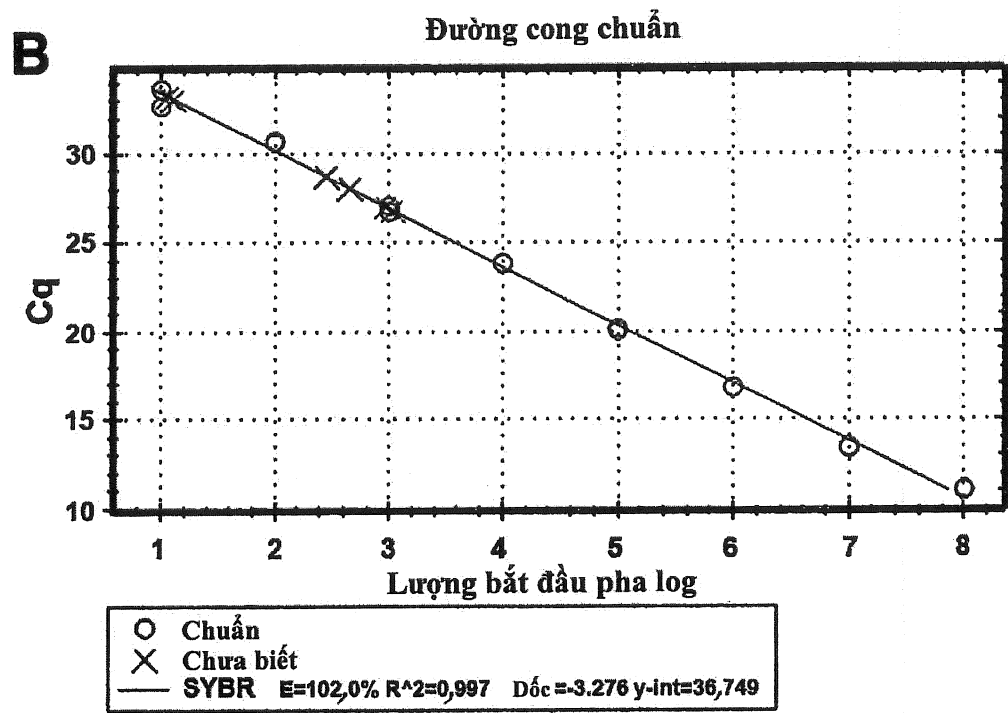


Fig. 9B

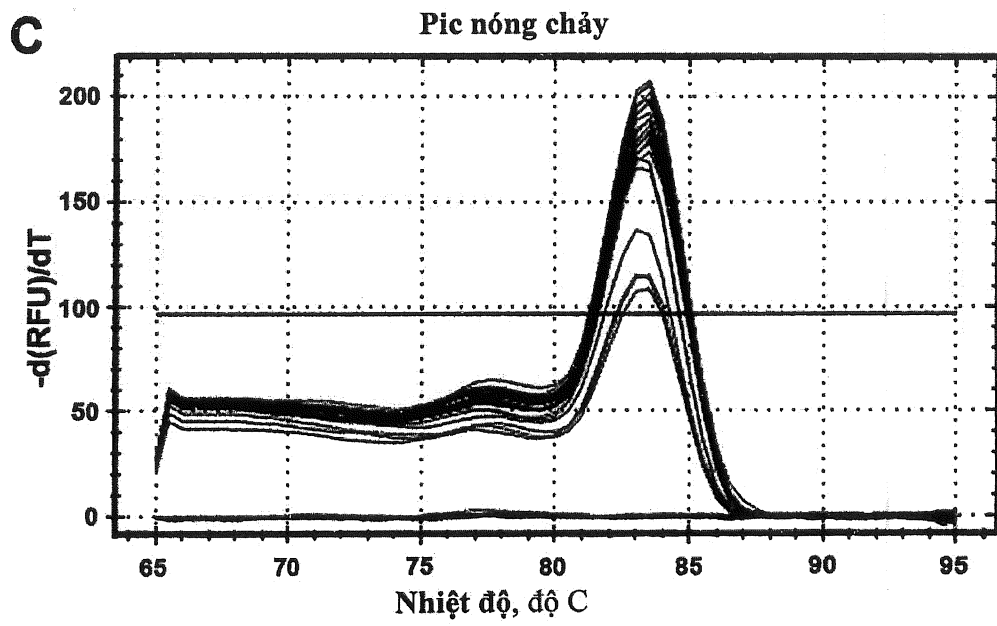


Fig. 9C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Intervet International B.V.

<120> Pestivirus ở lợn, protein của virus, gen mã hóa protein này và vắc xin dựa trên virus này

<130> 23911

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 642

<212> ADN

<213> virus mới

<400> 1

```

aaggttcagt gggtcttaaa ggacgaaaac tcgacgggga tcaatcagat cctgtggcaa      60
agacagatta acagaaccct gcatggagaa tggcctaacc agatctgcca tggcatgcca      120
aatgaaacta ttacagatga ggaattacgt agcctgggaa tgatagacac aagccccaga      180
acaaactaca cttgctgcca gttgcaatat catgaatgga agaaacatgg ttggtgcaac      240
tatccacaaa aacaggtctg gatcaggagg ataacggccc tacaagctaa cctcaccgga      300
gcctatgagg ggcttgagtg tgccgtcatt tgtagattta acggcagcta taacatcgta      360
aaacaagcca gagatgaggt gagtccactg acagggtgca aggaagggca cccttttcta      420
ttctctggtg aaagatccga cacctcatgc ctgaggcccc cttccactag ttgggtaaga      480
ccggtaaaaa tggacgaggc gtcattggct gatagcttcg cccatggggg tgacaaggca      540
ataatactaa tcagaaaagg ggcacagga ataattaatt tcctagacac tattgggagg      600
tggctaccgg tagctgaggc agctatagta ccatattgtg aa                        642

```

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> virus mới

<400> 2

```

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

```

```

Ile Leu Trp Gln Arg Gln Ile Asn Arg Thr Leu His Gly Glu Trp Pro
20              25              30

```

```

Asn Gln Ile Cys His Gly Met Pro Asn Glu Thr Ile Thr Asp Glu Glu
35              40              45

```


Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Asp Thr Ser Pro Arg Thr Asn Tyr Thr
50 55 60

Cys Cys Gln Leu Gln Tyr His Glu Trp Lys Lys His Gly Trp Cys Asn
65 70 75 80

Tyr Pro Gln Lys Gln Val Trp Ile Arg Arg Ile Thr Ala Leu Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Thr Gly Ala Tyr Glu Gly Pro Glu Cys Ala Val Ile Cys Arg
100 105 110

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

Pro Leu Thr Gly Cys Lys Glu Gly His Pro Phe Leu Phe Ser Gly Glu
130 135 140

Arg Ser Asp Thr Ser Cys Leu Arg Pro Pro Ser Thr Ser Trp Val Arg
145 150 155 160

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

Val Asp Lys Ala Ile Ile Leu Ile Arg Lys Gly Ala Ser Gly Ile Ile
180 185 190

Asn Phe Leu Asp Thr Ile Gly Arg Trp Leu Pro Val Ala Glu Ala Ala
195 200 205

Ile Val Pro Tyr Cys Glu
210

<210> 3

<211> 633

<212> ADN

<213> virut mới

<400> 3

tcgtgccaca agagacaaga ctattacagt atccagctag tcgttgacgg aaaaacgggc 60

gtagaaaaac gatctatagt gggcaagtgg acagtgataa ctagggaagg tcgggaacca 120

agattaatgg agcaaataag catggtgtca aatgatagct tatcagaaac ttactgctac 180

aataggctaa atactagcag ttgggggcca caaccggcaa gacagagagg gtgtgggtcaa 240

accgtaccct tttggcctgg tgacaatgtc ctggaagaac aatactatag cacagggttac 300

```

tgggtaaattg caacaggtgg ttgccagttg agagaaggcg tgtggctatc aagaaagggc 360
aatgtacagt gccagcgtaa cggctcatcc ttgatactgc aactggcgat aaaagaagag 420
aatgacacta tggaaatacc atgtgacccg gtggaaaccg aaagtatggg tccagttaca 480
cagggcactt gcgtgtacag ctgggcattc gcccgaagag ggtgggtatta caacaggaaa 540
gatggttatt ggctccagta cgtaaagaaa aacgactacc agtactggac gaaaatgccc 600
actgcttcat ccgccacaac gatgtaccgc cat 633

```

```

<210> 4
<211> 210
<212> PRT
<213> virut mới

```

```

<400> 4

```

```

Ser Cys His Lys Arg Gln Asp Tyr Tyr Ser Ile Gln Leu Val Val Asp
1          5          10          15

```

```

Gly Lys Thr Gly Val Glu Lys Arg Ser Ile Val Gly Lys Trp Thr Val
          20          25          30

```

```

Ile Thr Arg Glu Gly Arg Glu Pro Arg Leu Met Glu Gln Ile Ser Met
          35          40          45

```

```

Val Ser Asn Asp Ser Leu Ser Glu Thr Tyr Cys Tyr Asn Arg Leu Asn
          50          55          60

```

```

Thr Ser Ser Trp Gly Arg Gln Pro Ala Arg Gln Arg Gly Cys Gly Gln
65          70          75          80

```

```

Thr Val Pro Phe Trp Pro Gly Asp Asn Val Leu Glu Glu Gln Tyr Tyr
          85          90          95

```

```

Ser Thr Gly Tyr Trp Val Asn Ala Thr Gly Gly Cys Gln Leu Arg Glu
          100          105          110

```

```

Gly Val Trp Leu Ser Arg Lys Gly Asn Val Gln Cys Gln Arg Asn Gly
          115          120          125

```

```

Ser Ser Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ile Lys Glu Glu Asn Asp Thr Met
          130          135          140

```

```

Glu Ile Pro Cys Asp Pro Val Glu Thr Glu Ser Met Gly Pro Val Thr
145          150          155          160

```

Gln Gly Thr Cys Val Tyr Ser Trp Ala Phe Ala Pro Arg Gly Trp Tyr
 165 170 175

Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Tyr Trp Leu Gln Tyr Val Lys Lys Asn Asp
 180 185 190

Tyr Gln Tyr Trp Thr Lys Met Pro Thr Ala Ser Ser Ala Thr Thr Met
 195 200 205

Tyr Arg
 210

<210> 5
 <211> 579
 <212> ADN
 <213> virut mới

<400> 5
 acttacactg tgacagggat gtatgtccat gtgaagaatt gtctccctag aggggttacg 60
 aagcattcaa agataatttc cccgacaata atatacttgg gggaaggtga cccagcccat 120
 aatattcagc acttatttgg ctcaggtata gcaaagtggg tcttagtcct actcgggggtt 180
 ctgggtgagt ggtatggaga attggcctct acaatatact tactactaga gtatgggtct 240
 gagtgggttg aacatgaaag tctggtcacg gaaggggtga tccctggcat caatattaca 300
 atagaactcc cagctagtca tactgtacct ggttgggtgt gggtcgcagg ccggtgggta 360
 tgcgtgaaac cagattgggtg gcccacacag atttggattg aaactatagt ggcagaggtc 420
 tggcatatac taaaaatatt ggcacagcc ctggtaaaca tagtcactgc attcgtaaac 480
 ctggaattgg tatacctggg cataatatta gtcaaaatat caaaggggaa cctgataggc 540
 gctatattgt ggtgcctatt actgtcaggg gctgaaggc 579

<210> 6
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> virut mới

<400> 6

Thr Tyr Thr Val Thr Gly Met Tyr Val His Val Lys Asn Cys Leu Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Leu Pro Lys His Ser Lys Ile Ile Ser Pro Thr Ile Ile Tyr
 20 25 30

Leu Gly Glu Gly Asp Pro Ala His Asn Ile Gln His Leu Phe Gly Ser

35

40

45

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

Tyr Gly Glu Leu Ala Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Leu Glu Tyr Gly Ser
 65 70 75 80

Glu Trp Leu Glu His Glu Ser Leu Val Thr Glu Gly Leu Ile Pro Gly
 85 90 95

Ile Asn Ile Thr Ile Glu Leu Pro Ala Ser His Thr Val Pro Gly Trp
 100 105 110

Val Trp Val Ala Gly Arg Trp Val Cys Val Lys Pro Asp Trp Trp Pro
 115 120 125

Thr Gln Ile Trp Ile Glu Thr Ile Val Ala Glu Val Trp His Ile Leu
 130 135 140

Lys Ile Leu Ala Ser Ala Leu Val Asn Ile Val Thr Ala Phe Val Asn
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Val Tyr Leu Val Ile Ile Leu Val Lys Ile Ser Lys Gly
 165 170 175

Asn Leu Ile Gly Ala Ile Leu Trp Cys Leu Leu Leu Ser Gly Ala Glu
 180 185 190

Gly

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 7
 gccatgatgg aggaagtg

18

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 8
 gggcagrttt gtggattcag 20

 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

 <400> 9
 cggatacaga aatactac 18

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 10
 ccgaatgcag ctarcagagg 20

 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 11
 gaaacagcca tgccaaaaaa tgag 24

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 12
 agtgggttcc aggggtagat cag 23

 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 13
 gaaacagcca tgccmaaraa tgag 24

 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 14
 agtgggttcc aggrgtagat yag 23

 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 15
 gagtacgggg cagacgtcac 20

 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 16
 catccgccgg cactctatca agcag 25

 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 17
 atgcataatg ctttgattgg 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 18

gtgacgtctg ccccgctactc

20

<210> 19

<211> 11561

<212> ADN

<213> pestivirut mới

<400> 19

gcataatgct ttgattggct gcattatgta tgggacatcc taaattgttg tgagccctgt	60
ggtgagtggg ggaaaggggt taaccaggcc tctagtacca caggcaccaa cagacagggc	120
aactcgaacc tgagagagag gtaccgagct cttaagcccc gagtacgggg cagacgtcac	180
cgagtagtac acccaaagac caccacttct aggtgtaggg tctactgagg ctcggtgga	240
cgtgggcgtg cccaaagaga aatcggtggg gggcctgggg gtcggggcca ccatgccct	300
ttatggggta gaccttactg cttgatagag tgccggcgga tgcctcgggt aagagtataa	360
aatccgttgt ctattaacat ggaaaaacag attgcacatt acttaaaaaa agaaaaacaa	420
aggaatgggt ggacgggaact ggtggtagga gaaagtcaca ctaaaataac tacgctttct	480
ggaaagacct atcgaggtac ttgggaaatg gagaaacggc caaatcctta cggaacctat	540
tttcccagac ctagtcccca gcagctcaca gccctacacc cccaccaggt ggtaaattgc	600
aaggtgatag agtacaaggg gacggaccct aattatgggt attgccc aaa taaaacggg	660
gtgttcacg atgaaaagg tagaagggtg agcagccctc cattaggtat ttggaagata	720
agattggact acagcgacct gataaatata aacagaccag tccccactag aggggaaaac	780
tcttatcgag tcgagacctg cagtggggag ctggctactg taatgctggg acacaatagg	840
gtacttgtgg aagactgtag ggggctatac caatggaaac ccaactgtga aggaattgtg	900
ctctatgtaa aaacttggtc tgattgggca gatcaggtgg aaaaacagga gaagggaagc	960
ccccaaaaac cacaacggcc accaaggcga gaccacgaa aaggcttaca accacaagtc	1020
cccagagaaa ctgagggttac ggaaaagaag aggcaaccta gtgtcacctt agtagcaggg	1080
gggcagaagg cccaaatcat ctacaaaggc aggactaaaa ataaaaagac tccggatggg	1140
gtctataagt acccaggagc taaagaaggg gatgtggtaa aggtcaggaa gatgcttaag	1200
aattggcata tagccttgat aatgtacctg atatataatta taactccagg ttttgccaag	1260
gttcagtggt tcttaaagga cgaaaactcg acggggatca atcagatcct gtggcaaaga	1320
cagattaaca gaaccctgca tggagaatgg cctaaccaga tctgccatgg catgccaaat	1380
gaaactatta cagatgagga attacgtagc ctgggaatga tagacacaag cccagaaca	1440

aactacactt gctgccagtt gcaatatcat gaatggaaga aacatgggtg gtgcaactat	1500
ccacaaaaac aggtcttgat caggaggata acggccctac aagctaacct caccggagcc	1560
tatgaggggc ctgagtgtgc cgtcatttgt agatttaacg gcagctataa catcgtaaaa	1620
caagccagag atgaggtgag tccactgaca gggtgcaagg aagggcaccc ttttctattc	1680
tctggtgaaa gatccgacac ctcatgcctg agggcccctt ccactagttg ggtaagaccg	1740
gtaaaaatgg acgaggcgtc attggctgat agcttcgccc atgggggttga caaggcaata	1800
atactaataca gaaaaggggc atcaggaata attaatttcc tagacactat tgggaggtgg	1860
ctaccggtag ctgaggcagc tatagtacca tattgtgaaa cttacactgt gacagggatg	1920
tatgtccatg tgaagaattg tctccctaga gggttaccga agcattcaaa gataatttcc	1980
ccgacaataa tatacttggg ggaaggtgac ccagcccata atattcagca cttatttggc	2040
tcaggtatag caaagtgggt ctagtccta ctcggggttc tgggtgagtg gtatggagaa	2100
ttggcctcta caatatactt actactagag tatgggtctg agtggttgga acatgaaagt	2160
ctggtcacgg aagggttgat ccctggcatc aatattacaa tagaactccc agctagtcat	2220
actgtacctg gttgggtgtg ggtcgcaggc cgggtgggtat gcgtgaaacc agattgggtg	2280
cccacacaga tttggattga aactatagtg gcagaggtct ggcatatact aaaaatattg	2340
gcatcagccc tggtaaacad agtcactgca ttcgtaaacc tgggaattggt atacctggtc	2400
ataatattag tcaaaatatc aaaggggaac ctgataggcg ctatatgtg gtgcctatta	2460
ctgtcagggg ctgaaggctc gtgccacaag agacaagact attacagtat ccagctagtc	2520
gttgacggaa aaacgggcgt agaaaaacga tctatagtgg gcaagtggac agtgataact	2580
aggggaaggtc gggaaccaag attaattggag caaataagca tgggtgtcaaa tgatagctta	2640
tcagaaactt actgctacaa taggctaaat actagcagtt gggggcgaca accggcaaga	2700
cagagagggg gtggtcaaac cgtacccttt tggcctgggtg acaatgtcct ggaagaacaa	2760
tactatagca caggttactg ggtaaagtca acaggtgggt gccagttgag agaaggcgtg	2820
tggctatcaa gaaagggcaa tgtacagtgc cagcgtaacg gctcatcctt gatactgcaa	2880
ctggcgataa aagaagagaa tgacactatg gaaataccat gtgacccggt ggaaaccgaa	2940
agtatgggtc cagttacaca gggcacttgc gtgtacagct gggcattcgc cccaagaggg	3000
tggattaca acaggaaaga tggttattgg ctccagtacg taaagaaaaa cgactaccag	3060
tactggacga aaatgccac tgcttcatcc gccacaacga tgtaccgcca tttgctccct	3120
ttactgggtg cctgcctcat gggcggtaga atatcggtat ggattgtggc gatgctcctg	3180
tctttacagg tggaaagctag tgaagtaggt accaagcaac tggctgtcac gctaactctg	3240

tgaaaaatgg	actggacaga	attactcttc	tatattgtta	taatgctagc	cgtaaaggaa	3300
gaactcataa	aaaaaatagt	gactgcaagc	cttgtggcct	taaaaaatag	tccagtagcc	3360
ttgagcttcc	ttattgtact	caggcttgtg	gggggtagtg	aggcactccc	agtgggtttg	3420
ttattagaaa	agatgtgcat	agaccaaccg	gagtttggaa	cccctttcct	gatctaccta	3480
tgggacaatt	ggaagtggac	tgtactagtc	agcttctccg	caactgaatca	tgaaaaaact	3540
ataaaactgg	caagaaaact	gctgttggca	acacacataa	cagcgctcac	attgactggg	3600
ctgagtgatt	caatcttcta	tatgatgctt	ataatgacta	atttattaat	aaagacattc	3660
atatacttac	tgggagccag	tataaattgg	gtcgagagag	aaaaaaagaa	gttgctagtg	3720
aagagaacac	taatatataa	gaaagccgcg	atttgcagtc	aagatggaaa	tgaattggag	3780
aataaattta	ataagataac	tgtaaatacg	gatttcaccc	catgtaaact	tgaacttctg	3840
caactactca	gggctttttt	agtctctcta	tgcttttcct	attacaagcc	tctcctgtat	3900
gcggaaacta	ctctaaccgt	aatagtaatt	ggcgtacagg	agtacaacgt	agctatggct	3960
cgcgggcgaa	gcgtgggtcca	tagactgcta	gccatggcct	actacatata	cggccgtata	4020
cagggtgaca	tgttccagct	cgccactatc	cagtgcctgt	tgtcaagtcc	taggaaaatt	4080
atgaaacaca	tgatagaaaa	tccaactctt	aagaagctct	ggcaagggtga	aacagagctt	4140
tttaaccagg	gtgtcagcca	gtccaaaata	gtgaatccaa	agagtattgg	gctggaagaa	4200
ttacacaagg	gtatgtgcgg	cctcccaact	gtagtgcaaa	atttggtcat	atatgctaag	4260
aagaatgact	ctcttatctt	aggagagctg	ggttaccccc	ctgggggacct	caccagtgc	4320
gggtgggaaa	ttttaggtcc	tggcagaatc	ccaagatta	ccaacgttga	gtccgctaaa	4380
atggacttac	tctccaagct	tatgaccttt	ctgggggttg	agagctcaag	agtccccagg	4440
accccagtcc	actcgacaag	gaaattattg	aagatagtga	gaggcttaga	aactggatgg	4500
ggatacacc	atgcaggggg	gataagtagc	gcaaaacacg	tcacaggtga	aaaaaacttg	4560
atgactcaca	tggaaggcag	gaagggaaag	tatatcctac	aatcccaaga	acatggtgct	4620
gatgaggtag	aatatggagt	gaaaactgac	caaaaagcac	ccgacaatgc	cttatgctac	4680
tgctttaacc	ctgaagccac	aaacataaaa	ggagaaacgg	gagccatggt	gtttatgaag	4740
aagataggaa	aaaaatggac	tctcgtaaca	tcagatggta	acaaagccta	ttataatgta	4800
aacaacctga	aaggggtggtc	tggactaccg	ataatgttgc	actctaccgg	ggctatagta	4860
gggaggatta	agtcagcgta	ttcagatgaa	aacgacttgg	tagagggaact	tatcgactcc	4920
aggactatca	gcaagagcaa	tgaggcaaac	ctggatcacc	ttatcaagga	attagcagat	4980
atgcggaggg	gggagtttcg	ctccatcacc	cttggaacag	gagctgggaa	aactacagaa	5040

ctgcccaggc aataccttac aacggtgggt gcccataaat cagtgttggt cctagtcctt	5100
ttaaaagcac ctgctgaaag tgtctgtcgc ttcattgaggt ccaaataccc tactatcaac	5160
ttttccttga gagtggggga gcggaagag ggggatgtga gcagtggcat cacttacgcc	5220
acgtacggat tctgctgcca gctaaaccta gtccaactca aagaatggat atccaggtac	5280
tcaatggtgt tttttgatga ataccacaca gcaactccag aacaaatagc aataataagt	5340
aagatccatg cactgaaggt caaaaccagg atagtggcta tgtcagcaac tccccgggt	5400
accgtgacga ctgaaggcag gaaatttgat attgaagagg taggggttgc cactatagag	5460
aaaggagagg aacaaaaaag ggggcgtata gcggtagctg gtatgcagggt cccattagaa	5520
gacttgacgg ggaagaactg cctagtgttc gtcgcaacca aagaagctgc ggagacagag	5580
gctaaagaac tgcgtgccag gggagttaat gccacctact actattcagg catagaccct	5640
aagactctgg aacatgggat gaccaatcag ccatattgta ttgtggctac caatgctatc	5700
gaatcaggca taacttgtcc tgacttagac gtgggtcatag ataccatgca gaagtatgaa	5760
aaagtagtga atttttcagc aaagctgccc ttgattgtca cttcattagt aaagaagaaa	5820
attactaggg aagaacaggg ccagaggaaa ggtcgggtag gtagacaaaa gaagggaana	5880
tactactacc cttcaggagt ggtaccgaat ggggtcaaaag acctaagcta tttaatcctg	5940
caggctcaag agtacgggat cttggaacaa gttaataataa cagagtactt catcataatg	6000
aatgaggact ggggtcttta tgatgtagat gaggtagagg taagaatact tgagagaatg	6060
aacaaggaaa ttctgcttcc gctaggtatc gtggagaagc aaatcctgga aagaagcact	6120
cacccggaan aagtggcatt gttgtataac aaattagtag agaaaaaccc tatagtatac	6180
cctaaagtac aggaaggtga ggtcagcaag gaatacaata ccataatct ggccgtatac	6240
gataaactaa aagatgtcaa ccacaagcc atttatgtcc tagctgaaga ggagagagcc	6300
acggaaatga tgggccttga gtttgaacaa gacccttctg acttacagga ctcagtagct	6360
caactttgtg aagacatcaa gaggtataca aaactctctg ggatcactga gaaattatta	6420
gtaggcacga tgggtggggt tattggatat aaagccctaa ccagaaacca cgtgccctgg	6480
gtcagtaagg agtatagtta tgagctgacc gattcaccgg aacttacga aaattcattt	6540
gcacctttgg atgtcgacgt ccaaaacccc ggtgaggga aacaccaga gcaactggca	6600
gaccatcaac tgaggcaact actggagacc gggagagaca aggcgattga cttcttaaaa	6660
ggaatccgcg agttcgctag tggggccatt aacagtccaa aggcattaag tatatgggag	6720
aaaatgtatc agtacttgag gaagcatcag ggtgagatta tcgcatcagc ggcgtggggc	6780
agtgcacacg ccctccacga cagtattaaa tctaggcttg gagatgaggt cgctactgca	6840

gtaataatcc tcaagtatct agcatttggt gaaagagaac tgtccggact gactaggcaa	6900
gtcctaattg acattatagt gtattatata gtcaacaagc cccggtttga aggggatgac	6960
tatgcaaaga gaaagggag aaggctagtc attgaagtct tgatgggggc actggcaact	7020
tatgcagtgt ccaacttttg gggcgtgtcc atcaataaga tactgcaacc aatatctgac	7080
tatttacct atgccaccgc cactttggct ttccttcgcc caactttcat ggaatcagca	7140
gtggtggtcg cttcctctat ctatagagct ttcctctcca ttaaacaatgc ggaaaacagg	7200
agtcttgta cacagggtgc ttctgccgcc cttgaagtca tgggcttgac ccagtatca	7260
gccggcctag gcgtcttact ggggctcggg ctatgcgtgc tccatatgaa catcgacaaa	7320
aacgaggaga aaaggacact gatactgaaa atgtttgtca aaaactttat agaccaggcg	7380
gcactagacg agttagacaa actggagcca gaaaaataa tcctctcatt gttggagggt	7440
attcaaactt gcacaaacc ggtcagagca atcatgattt tgtacagggt gtactataag	7500
ggggaatcgt tcacagaagc tttgtctaag atggctggca agtccctcat cgtgatggtc	7560
atagtcgagt tcctagaact gacgggcaa acccaaggg ggtacataga tcttagtgcc	7620
aatttgctga ccttctcct agaaaaacta aaaaagatga ccaacctgc catcggggaa	7680
gctagaaagg tcttacttcc tatccatac ttgtactgtg aaacctggca gtctgacgcc	7740
agaatcaagg ctctgagtc ctatgatcaa gtggtagtgg aatgcaaata tgggtgcttca	7800
gcaaggtatt ccttccgaca tggggttcac gagatactgg aagaaaaaag aaccaagtgg	7860
tgtagaact tcttcttggt gggacctaac tttcacaacc cggatccaaa gaggatgaca	7920
ttctatgagt tcggccaagc aaaaaatgt cctgttgta taatgggtga agacataacc	7980
ttcggcaaata atggtatata tatcaaattc ggccataagc ctgatggggg aaggtaata	8040
aggggcacca cccacgccac tattagcagg gaggaactgc tggaaattct aacggctcca	8100
agccaagtgg ccataggcaa agtcaagctg accgattact gtaatcaaaa aggaataata	8160
gacaggaaac tggccgtact tgaaggtgac aaaatacatt tttggaaagc acaccgtgga	8220
tccaagatca cagatcaact cactattgag agtctgacag atgatttggg gtcagaaatc	8280
agggacatta catgggagct gtacacaggc gggacgtgca ccgttaaggg gatatccctt	8340
agatcatgcg cgccagggtca aagaaataag gctacggtct tgtgcgattg cactgacgta	8400
cttagcccct gttacttagt caacggaagg agaccatccc catttgacgt cgtggaagg	8460
tatgaatgcc accatcgga gccccgagc acgtatgagg acttagaaat ggaggaaata	8520
ctaaagagaa gggccctgt ttatgatcct ttgagtctgt ttgacactga cagtaaactg	8580
ctgcctcctg acacctatta cttggaagaa gatcaagaag acttcgagta tgcattgagg	8640

tggtggggcc	tcgggggttta	tgtaacggac	gggcctgcta	tttctcccc	ggacataagg	8700
gtacaccaca	gttctgtact	gttactgttg	acacctggag	tggactctga	gttgccctta	8760
cagtacatac	gttggttactc	tcatcaggtg	gaggtggaca	tctatattag	gggccaactt	8820
ctggaggagg	aagatactgc	cacggaggcg	gaagactctc	aggaagatag	tgatgaaggg	8880
atgggcgacg	tggttaataaa	agatgaggat	acattgtcca	caacagaatc	aataccccca	8940
ctagaagagg	aggaaggggg	cgaagagcca	atcacttatg	tggtcattag	gggattacaa	9000
gaagaaagat	atactagcca	tcttaaatta	agtgactgga	tcagtgaaaa	tatttcggag	9060
ccacatagag	tccaaattat	gcttgatgga	acggtgagag	tcacaataaa	agagggcaaa	9120
gtcaaacacc	tatttggggt	ctacagaatc	gaaaactccc	tggaagcaat	gtttaaagag	9180
accatagctg	accttcctgt	agccacccaa	ccgccccgag	ggccaatcta	cacggccaaa	9240
gagttggctc	aagggaacat	tgccccgata	caaccgcgag	caaactttta	tggaatgata	9300
gaggggagag	gtgatccaat	gacggcattc	gaagccttat	cagtcctgcg	gtcacaaaaa	9360
gtctcagcta	aggaagtga	gatgaacacc	cgcagggctc	aagcttttct	gaataaagtc	9420
agggggactg	ctgaggtcag	agcatcagaa	ttaacattaa	aatgcttgcc	agcacttggt	9480
aaagtaaattg	ggaggaaatt	gattagagag	gaaaccaaca	tccccaacca	aaggttggca	9540
tcaataatga	cctcaatagg	aattagatta	gaaaaactgc	cgggtggtag	agcaaacacc	9600
tctggctcta	agttcaggca	gtcgatctta	gaaaaaatgg	ataaatatga	aatgaacaa	9660
gttccagggt	tacatgagaa	aatgtgggca	gcattcttgg	caactgccag	gcaagactta	9720
agaaacacat	atgaagaagt	aacttatctt	gaactggaga	ccggaatcaa	ccggaaggga	9780
gctccagggt	tttttgagaa	agaaagttca	ataggagaag	tgctggaaag	aaaaggaaaa	9840
attgacgttg	taatccaaga	gattgaaaaa	ggcaaccact	tgtactatga	aacagccatg	9900
ccaaaaaatg	agaaaagaga	cgtgcttgat	gattggttgt	ctgaggactt	cgtcacttat	9960
aagaaaccac	gtgtaataca	gtaccctgag	gcagtcaccc	ggttggccat	cacccaaaata	10020
atgtacaagt	gggtaaaaca	gaaacctata	gtgattcccg	gttacgaggg	aaaaaccccg	10080
atctttgaaa	tattcgaaaa	agttagtgca	gattgggctc	agttcagaaa	cccggtagca	10140
gtcagctttg	ataccaaagc	ttgggacaca	caagtaacta	gagaggacct	caggctggtg	10200
gggcggtac	agaaatacta	ctacaaaaaa	aagtattgga	aattcattga	caatttgacg	10260
gcatgatgg	aggaagtgcc	tgtgatcact	gtagaaggag	atatgttcct	cagagttgga	10320
cagcgcggt	ccgggcagcc	tgatacctca	gcaggcaatt	ccatattaaa	tgtgctaaca	10380
atgtagtag	ccttctctga	atccacaaac	ctgcccatag	cggccgcctg	gaaggcttgt	10440

cggatccacg tctgtgggga cgatggcttt ttaatcacgg aatcagaatt agggcgga	10500
ttcgctgaaa aaggtgtccc tctgctagct gcattcggca aacctcaaaa gattacagag	10560
ggagcaagcc taaagataac cagtaatfff gacggaatag agttttgtag tcattctccc	10620
attagagtcc aaacaccaaa cataaggtgg atgccagcga ggcctacagc aacaattcta	10680
ggcaaaatga gtaccaggct gggtgagggt gctaccagat caggagaaga atatgaaaaa	10740
caggtggcat ttgcatatct actgatgtac ccctggaacc cactggtcag gagaatcagc	10800
ctcctactgt tgtcaaccac tgaccaatg gggagagagg aaaccccatg ctctgatgag	10860
ggggtgaagt atgttgggga ccctatcgct gcatacaggg atgtatgggg gcacaaatta	10920
gaggacgtag gacacgtcga tcagccgcag ttatcccga tgaattatag catgacttac	10980
ttagggatct ggaaaccaa gacgagccag cggtaggtg aacaatgctg tcgactggcc	11040
gagaaaaaca attgtgtggc acgtgctgat tccctaatta agaaaaaggt caagatcacc	11100
tatgaccgga ggataggagc ggctcagggtc attcgtaggt ggaagagct tgagtggacc	11160
agaaggaaac ctgaaccttc taatgcaacc gcagaagatg atatcttcct agtcctgtgg	11220
aaaagatfff caaagtacat tttccagaaa atgaagttca tgcagagaat gctggcccc	11280
tactaagtgg gaagcgttca tttaattata accagtatct ggtaagtata agacttgtgt	11340
aaataaaaca tataactgaa aggggcagggt ggccgtacag gctggggcga tcgccgcacc	11400
cccccttgc caggcgctc aacccatac accatgggggt tgttgtaaat acttgaaaga	11460
atggagtaat acgggtaata aacttacagg ccagtattgc cccatttgct ttgtagtggt	11520
gacgacctgt ataggtctga tctagatgaa gcaagggggc c	11561

<210> 20
 <211> 5048
 <212> ADN
 <213> pestivirus m6i

<400> 20	
gcataatgct ttgattggct gcattatgta tgggacatcc taaattgttg tgagccctgt	60
ggtgagtggg ggaaaggggt taaccaggcc tctagtacca caggcaccaa cagacagggc	120
aactcgaacc tgagagagag gtaccgagct cttagcccc gagtacgggg cagacgtcac	180
cgagtagtac acccaaagac caccacttct aggtgtaggg tctactgagg ctcggtgga	240
cgtgggcgtg cccaaagaga aatcgggtgg gggcctgggg gtcggggcca ccatgccct	300
ttatggggta gaccttactg cttgatagag tgccggcgga tgccctgggt aagagtataa	360
aatccgttgt ctattaacat ggaaaaacag attgcacatt acttaaaaaa agaaaaacaa	420

aggaatgggt ggacggaact ggtggtagga gaaagtcaca ctaaaataac tacgctttct	480
ggaaagacct atcgaggtag ttgggaaatg gagaaacggc caaatcctta cggaacctat	540
tttcccagac ctagtcccca gcagctcaca gccctacacc cccacccagt ggtaaattgc	600
aaggtgatag agtacaaggg gacggaccct aattatgggtg attgccccaa tacaaacggg	660
gtgttcacg atgaaaaggg tagaagggtg agcagccctc cattaggtat ttggaagata	720
agattggact acagcgacct gataaatata aacagaccag tccccactag aggggaaaac	780
tcttatcgag tcgagacctg cagtggggag ctggctactg taatgctggg acacaatagg	840
gtacttgtgg aagactgtag ggggctatac caatggaaac ccaactgtga aggaattgtg	900
ctctatgtaa aaacttggtc tgattgggca gatcagggtg aaaaacagga gaagggaagc	960
ccccaaaaac cacaacggcc accaaggcga gaccacgaa aaggcttaca accacaagtc	1020
cccagagaaa ctgagggttac agaaaagaag aggcaaccta gtgtcacctt agtagcaggg	1080
gggcagaagg cccaaatcat ctacaaaggc aggactaaaa ataaaaagac tccggatggg	1140
gtctataagt acccaggagc taaagaaggg gatgtggtaa aggtcaggaa gatgcttaag	1200
aattggcata tagccttgat aatatacctg atatatatta taactccagg ttttgccaag	1260
gttcagtggg tcttaaagga cgaaaactcg acggggatca atcagatcct gtggcaaaga	1320
cagattaaca gaaccctgca tggagaatgg cctaaccaga tctgccacgg catgccaaat	1380
gaaactatta cagatgagga attacgtagc ctgggaatga tagacacaag cccagaaca	1440
aactacactt gctgccagtt gcaatatcat gaatggaaga aacatgggtg gtgcaactat	1500
ccacaaaaac aggtctggat caggaggata acggccctac aagctaacct caccggagcc	1560
tatgaggggc ctgagtgtgc cgtcatttgt agatttaacg gcagctataa catcgtaaaa	1620
caagccagag atgagggtgag tccactgaca gggtgcaagg aagggcaccc ttttctattc	1680
tctggtgaaa gatccgacac ctcatgcctg agggcccctt ccactagttg ggtaagaccg	1740
gtaaaaatgg acgaggcgctc attggctgat agcttcgccc atgggggttg caaggcaata	1800
atactaatca gaaaaggggc atcaggaata attaatttcc tagacactat tgggaggtgg	1860
ctaccggtag ctgaggcagc tatagtacca tattgtgaaa cttaactgt gacagggatg	1920
tatgtccatg tgaagaattg tctccctaga gggttaccga agcattcaaa gataatttcc	1980
ccgacaataa tatacttggg ggaagggtgac ccagcccata atattcagca cttatttggc	2040
tcaggatatag caaagtgggt cttagtccta ctcggggttc tgggtgagtg gtatggagaa	2100
ttggcctcta caatatactt actactagag tatgggtctg agtgggttga acatgaaagt	2160
ttggtcacgg aagggttgat ccctggcatc aatattacaa tagaactccc agctagtcac	2220

actgtacctg gttgggtgtg ggtcgcaggc cggtgggtat gcgtgaaacc agattgggtg	2280
cccacacaga tttggattga aactatagtg gcagaggctt ggcatatact aaaaatattg	2340
gcatcagccc tggtaaacad agtcactgca ttcgtaaacc tggaattgggt atacctggtc	2400
ataatattag tcaaaatata aaaggggaac ctgataggcg ctatattgtg gtgcctatta	2460
ctgtcagggg ctgaaggctc gtgccacaag agacaagact attacagtat ccagctagtc	2520
gttgacggaa aaacgggctg agaaaaacga tctatagtgg gcaagtggac agtgataact	2580
aggaaggtc gggaaccaag attaattggag caaataagca tgggtgtcaaa tgatagctta	2640
tcagaaactt actgctacaa taggctaaat actagcagtt gggggcgaca accggcaaga	2700
cagagagggg gtgggtcaaac cgtacccttt tggcctgggt acaatgtcct ggaagaacaa	2760
tactatagca caggttactg ggtaaatgca acaggtgggt gccagttgag agaaggcgtg	2820
tggctatcaa gaaagggcaa tgtacagtgc cagcgtaacg gctcatcctt gatactgcaa	2880
ctggcgataa aagaagagaa tgacactatg gaaataccat gtgacccggt ggaaaccgaa	2940
agtatgggtc cagttacaca gggcacttgc gtgtacagct gggcattcgc cccaagaggg	3000
tgggtattaca acaggaaaga tggttattgg ctccagtacg taaagaaaaa cgactaccag	3060
tactggacga aaatgcccac tgcttcatcc gccacaacga tgtaccgcca tttgctccct	3120
ttactgggtg cctgcctcat gggcggtaga atatcggtat ggattgtggc gatgctcctg	3180
tctttacagg tggaagctag tgaagtaggt accaagcaac tggctgtcac gctaactctg	3240
tggaaaatgg actggacaga attactcttc tatattgtta taatgctagc cgttaaggaa	3300
gaactcataa aaaaaatagt gactgcaagc cttgtggcct taaaaaatag tccagtagcc	3360
ttgagcttcc ttattgtact caggcttgtg gggggtagtg aggcactccc agtgggtttg	3420
ttattagaaa agatgtgcat agaccaaccg gagtttggaa cccctttcct gatctaccta	3480
tgggacaatt ggaagtggac tgtactagtc agcttctccg cactgaatca tgaaaaaact	3540
ataaaaactg caagaaaact gctgttggca acacacataa cagcgctcac attgactggg	3600
ctgagtgatt caatcttcta tatgatgctt ataatagcta atttattaat aaagacattc	3660
atatacttac tgggagccag tataaattgg gtcgagagag aaaaaagaa gttgctagtg	3720
aagagaaaac taatatataa gaaagccgcg atttgcagtc aagatggaaa tgaattggag	3780
aataaattta ataagataac tgtaaagtcg gatctcacc ccatgtaaaact tgaacttctg	3840
caactactca gggctttttt agtctctcta tgcttttcct attacaagcc tctcctgtat	3900
gcggaaacta ctctaaccgt gatagtaatt ggcgtacagg agtacaacgt agctatggct	3960
cgcgggcgaa gcgtgggtcca tagactgcta gccatggcct attacatata cggccgtata	4020

cagggtgaca tgttccagct cgccactatc cagtgcctgt tgtcaagtcc taggaaaatt	4080
atgaaacaca tgatagaaaa tccaactctt aagaagctct ggcaagggtga aacagagctt	4140
tttaaccagg gtgtcagcca gtccaaaata gtgaatccaa agagcattgg gctggaagaa	4200
ttacacaagg gtatgtgcgg cctcccaact gtagtgcaaa atttgggtcat atatgctaag	4260
aagaatgact ctcttatctt aggagagctg ggttaccccc ctgggggacct caccagtgac	4320
gggtgggaaa ttttaggtcc tggcagaatc ccaaagatta ccaacggtga gtccgctaaa	4380
atggacttac tctccaagct tatgaccttt ctggggggtg agagctcaag agtccccagg	4440
acccagtgcc actcgacaag gaaattattg aagatagtga gaggcttaga aactggatgg	4500
ggatacacc atgcaggggg gataagtagc gcaaaacacg tcacagggtga aaaaaacttg	4560
atgactcaca tggaaggcag gaagggaag tatatcctac aatcccaaga acatggtgct	4620
gatgaggtag aatatggagt gaaaactgac caaaaagcac cgcacaatgc cttatgctac	4680
tgctttaacc ctgaagccac aaacataaaa ggagaaacgg gagccatggt gtttatgaag	4740
aagataggaa aaaaatggac tctcgtgaca tcagatggta acaaagccta ttataatgta	4800
aacaacctga aagggtggtc cggactaccg ataatgttg actctaccgg ggctatagta	4860
gggaggatta agtcagcgta ttcagatgaa aacgacttg tagaggaact tatcgactcc	4920
aggactatca gcaagagcaa tgaggcaaac ctggatcacc ttatcaagga attagcagat	4980
atgcggaggg gggagtttcg ctccatcacc cttggaacag gagctgggaa aactacagaa	5040
ctgcccag	5048

<210> 21
 <211> 5037
 <212> ADN
 <213> pestivirus m i

<400> 21	
tgattggctg cattatgtat gggacatcct aaattgttgt gagccctgtg gtgagtgggg	60
gaaaggggtt aaccaggcct ctagtaccac aggaccaac agacagggca actcgaacct	120
gagagagagg taccgagctc ttaagccccg agtacggggc agacgtcacc gagtagtaca	180
cccaaagacc accacttcta ggtgtagggg ctactgaggc tcgggtggac gtgggcgtgc	240
ccaaagagaa atcgggtggg ggctggggg tcggggccac catgcccctt tatggggtag	300
accttactgc ttgatagagt gccggcggat gcctcgggta agagtataaa atccgttgtc	360
tattaacatg gaaaaacaga ttgcacatta cttaaaaaaa gaaaaacaaa ggaatgggtg	420
gacggaactg gtggtaggag aaagtcacac taaaataact acgctttctg gaaagacct	480
tcgagggtact tgggaaatgg agaaacggcc aaatccttac ggaacctatt ttcccagacc	540

tagtccccag	cagctcacag	ccctacaccc	ccacccagtg	gtaaattgca	aggtgataga	600
gtacaagggg	acggacccta	attatgggtga	ttgcccacaa	acaaacgggg	tgttcacgca	660
tgaaaagggg	agaaggttga	gcagccctcc	attaggtatt	tggaagataa	gattggacta	720
cagcgacctg	ataaatataa	acagaccagt	cccactaga	ggggaaaact	cttatcgagt	780
cgagacctgc	agtggggagc	tggctactgt	aatgctggta	cacaataggg	tacttgtgga	840
agactgtagg	gggctatacc	aatggaaacc	caactgtgaa	ggaattgtgc	tctatgtaaa	900
aacttgttct	gattgggcag	atcaggtgga	aaaacaggag	aaggggaagc	ccccaaaacc	960
acaacggcca	ccaaggcgag	accacgaaa	aggcttaca	ccacaagtcc	ccagagaaac	1020
tgaggttacg	gaaaagaaga	ggcaacctag	tgtcacctta	gtagcagggg	ggcagaaggc	1080
ccaaatcatc	tacaaaggca	ggactaaaaa	taaaaagact	ccggatgggg	tctataagta	1140
cccaggagct	aaagaagggg	atgtggtaaa	ggtcaggaag	atgcttaaga	attggcatat	1200
agccttgata	atgtacctga	tatatattat	aactccaggt	tttgccaagg	ttcagtgggt	1260
cttaaaggac	gaaaactcga	cggggatcaa	tcagatcctg	tggcaaagac	agattaacag	1320
aaccctgcat	ggagaatggc	ctaaccagat	ctgccatggc	atgccaaatg	aaactattac	1380
agatgaggaa	ttacgtagcc	tgggaatgat	agacacaagc	cccagaacaa	actacacttg	1440
ctgccagttg	caatatcatg	aatggaagaa	acatggttgg	tgcaactatc	cacaaaaaca	1500
ggctctggatc	aggaggataa	cggccctaca	agctaacctc	accggagcct	atgagggggc	1560
tgagtgtgcc	gtcattttgta	gattttaacgg	cagctataac	atcgtaaaac	aagccagaga	1620
tgaggtgagt	ccactgacag	ggtgcaagga	agggcacctt	tttctattct	ctggtgaaag	1680
atccgacacc	tcatgcctga	ggcccccttc	cactagttgg	gtaagaccgg	taaaaatgga	1740
cgaggcgtca	ttggctgata	gcttcgcccc	tggggttgac	aaggcaataa	tactaatcag	1800
aaaaggggca	tcaggaataa	ttaatttcct	agacactatt	gggaggtggc	taccggtagc	1860
tgaggcagct	atagtaccat	attgtgaaac	ttacactgtg	acagggatgt	atgtccatgt	1920
gaagaattgt	ctccctagag	ggttaccgaa	gcattcaaag	ataatttccc	cgacaataat	1980
atacttgggg	gaaggtgacc	cagcccataa	tattcagcac	ttatttggct	caggtatagc	2040
aaagtgggtc	ttagtcctac	tcggggttct	gggtgagtgg	tatggagaat	tggcctctac	2100
aatatactta	ctactagagt	atgggtctga	gtggttgga	catgaaagtc	tggtcacgga	2160
agggttgatc	cctggcatca	atattacaat	agaactccca	gctagtcata	ctgtacctgg	2220
ttgggtgtgg	gtcgcaggcc	ggtgggtatg	cgtgaaacca	gattgggtggc	ccacacagat	2280
ttggattgaa	actatagtgg	cagaggtctg	gcatatacta	aaaatattgg	catcagccct	2340

ggtaaacata gtcactgcat tcgtaaacct ggaattggta tacctgggtca taatattagt	2400
caaaatatca aaggggaacc tgataggcgc tatattgtgg tgcctattac tgtcaggggc	2460
tgaaggctcg tgccacaaga gacaagacta ttacagtatc cagctagtcg ttgacggaaa	2520
aacgggcgta gaaaaacgat ctatagtggg caagtggaca gtgataacta gggaaggctcg	2580
ggaaccaaga ttaatggagc aaataagcat ggtgtcaaat gatagcttat cagaaactta	2640
ctgctacaat aggctaaata ctagcagttg ggggcgacaa ccggcaagac agagaggggtg	2700
tgggtcaaacc gtaccctttt ggcctgggtga caatgtcctg gaagaacaat actatagcac	2760
aggttactgg gtaaagtcaa cagggtggtt ccagttgaga gaaggcgtgt ggctatcaag	2820
aaagggcaat gtacagtgcc agcgtaacgg ctcatccttg atactgcaac tggcgataaa	2880
agaagagaat gacactatgg aaataccatg tgacccgggtg gaaaccgaaa gtatgggtcc	2940
agttacacag ggcacttgcg tgtacagctg ggcattcgcc ccaagaggggt ggtattacaa	3000
caggaaagat ggttattggc tccagtacgt aaagaaaaac gactaccagt actggacgaa	3060
aatgcccact gcttcatccg ccacaacgat gtaccgccat ttgctccctt tactgggtggc	3120
ctgcctcatg ggcggtagaa tatcggtatg gattgtggcg atgctcctgt ctttacaggt	3180
ggaagctagt gaagtaggta ccaagcaact ggctgtcacg ctaactctgt ggaaaatgga	3240
ctggacagaa ttactcttct atattgttat aatgctagcc gttaaggaag aactcataaa	3300
aaaaatagt actgcaagcc ttgtggcctt aaaaaatagt ccagtagcct tgagcttcct	3360
tattgtactc aggcttgtgg ggggtagtga ggcactccca gtggggtttgt tattagaaaa	3420
gatgtgcata gaccaaccgg agtttggaac ccctttcctg atctacctat gggacaattg	3480
gaagtggact gtactagtca gcttctccgc actgaatcat gaaaaaacta taaaactggc	3540
aagaaaactg ctgttggaac cacacataac agcgctcaca ttgactgggtc tgagtgattc	3600
aatcttctat atgatgctta taatgactaa tttattaata aagacattca tatatctact	3660
gggagccagt ataaattggg tcgagagaga aaaaaagaag ttgctagtga agagaacact	3720
aatatataag aaagccgcga tttgcagtca agatggaaat gaattggaga ataaatttaa	3780
taagataacc gtaaattgcg atttcacccc atgtaaaactt gaacttctgc aactactcag	3840
ggctttttta gtctctctat gcttttccta ttacaagcct ctctgtatg cggaaactac	3900
tctaaccgta atagtaattg gcgtacagga gtacaatgta gctatggctc gcgggcgaag	3960
cgtgggtccat agactgctag ccatggccta ctacatatac ggccgtatac agggtgacat	4020
gttcagctc gccactatcc agtgccctgt gtcaagtcct aggaaaatta tgaaacacat	4080
gatagaaaat ccaactctta agaagctctg gcaaggtgaa acagagcttt ttaaccaggg	4140

tgtcagccag tccaaaatag tgaatccaaa gagtattggg ctggaagaat tacacaaggg	4200
tatgtgcggc ctcccaactg tagtgcaaaa tttggtcata tatgctaaga agaattgactc	4260
tcttatctta ggagagctgg gttaccccc tggggacctc accagtgcg ggtgggaaat	4320
tttaggtcct ggcagaatcc caaagattac caacgttgag tccgctaaaa tggacttact	4380
ctccaagctt atgacctttc tgggggttga gagctcaaga gtccccagga cccagtgcca	4440
ctcgacaagg aaattattga agatagtgag aggcttagaa actggatggg gatacaccca	4500
tgcagggggg ataagtagcg caaaacacgt cacaggtgaa aaaaacttga tgactcacat	4560
ggaaggcagg aagggaaggt atatcctaca atcccaagaa catggtgctg atgaggtaga	4620
atatggagtg aaaactgacc aaaaagcacc cgacaatgcc ttatgctact gctttaaccc	4680
tgaagccaca aacataaaaag gagaaacggg agccatggtg tttatgaaga agataggaaa	4740
aaaatggact ctcgtaacat cagatggtaa caaagcttat tataatgtaa acaacctgaa	4800
agggtggtcc ggactaccga taatgttgca ctctaccggg gctatagtag ggaggattaa	4860
gtcagcgtat tcagatgaaa atgacttggg agaggaactt atcgactcca ggactatcag	4920
caagagcaat gaggcaaacc tggatcacct tatcaaggaa ttagcagata tgcggagggg	4980
ggagtttcgc tccatcacc ttggaacagg agctgggaaa actacagaac tgcccag	5037

<210> 22
 <211> 5039
 <212> ADN
 <213> pestivirus m i

<400> 22	
gcataatgct ttgattggct gcattatgta tgggacatcc taaattggtg tgagccctgt	60
ggtgagtggg ggaaaggggt taaccaggcc tctagtagca caggcaccaa cagacagggc	120
aactcgaacc tgagagagag gtaccgagct cttagcccc gagtacgggg cagacgtcac	180
cgagtagtac acccaaagac caccacttct aggtgtaggg tctactgagg ctcggtgga	240
cgtgggcgtg ccaaagaga aatcgggtgg tggcctgggg gtcggggcca ccatgccct	300
ttatggggta gaccttactg cttgatagag tgccggcgga tgcctcgggt aagagtataa	360
aatccgttgt ctattaacat ggaaaaacag attgcatatt acttaaaaaa agaaaaacaa	420
aggaatgggt ggacggaact ggtggttaga gaaagtcaca ctaaaataac tacgctttct	480
ggaaagacct atcgaggtac ttgggaaatg gagaaacggc caaatcctta cggaacctat	540
tttcccagac ctagtcccc gtagctcaca gccctacacc cccaccaggt ggtaaatgac	600
aaggtgatag agtacaaggg gacggacct aattatggtg attgcccacaa tacaacggg	660

gtgttcatcg atgaaaaggg tagaagggtg agcagccctc cattaggtat ttggaagata	720
agattggact acagcgacct gatcaatata aacagaccag tccccactag tggggaaaac	780
tcttatcgag tcgagacctg cagtggggag ctggctactg taatgccggt acacaatagg	840
gtacttgtgg aagactgtag ggggctatac caatggaaac ccaactgtga aggaattgtg	900
ctctacgtaa aaacttggtc tgattgggca gatcagggtg aaaaacagga gaagggaagc	960
ccccaaaaac cacaacggcc accaaggcga gaccacagaa aaggcttaca accacaagtc	1020
cccagagaaa ctgagggttac agaaaagaag aggcaaccta gtgttacctt agtagcaggg	1080
gggcagaagg cccaaatcat ctacaaaggc aggactaaaa ataaaaagac tccggatggg	1140
gtctataagt acccaggagc taaagaaggg gatgtggtaa aggtcaggaa gatgcttaag	1200
aattggcata tagccttagt aatgtacctg atatatatta taactccagg ttttgccaag	1260
gttcagtggg tcttaaagga cgaaaactcg acggggatca atcagatcct gtggcaaaga	1320
cagattaaca gaaccctgca tggagaatgg cctaaccaga tctgccacgg catgccaaat	1380
gaaactatta cggatgagga attacgtagc ctgggaatga tagacacaag cccagaaca	1440
aactacactt gctgccagtt gcaatatcat gaatggaaga aacatgggtg gtgcaactat	1500
ccacaaaaac aggtctggat caggagaata acggccctac aagctaacct caccggagcc	1560
tatgaggggc ctgagtgtgc cgtcatttgt agatttaacg gcagctataa catcgtaaaa	1620
caggccagag atgagggtgag tccactgaca gggtgcaagg aagggcaccc ttttctattc	1680
tctggtgaaa gatccgacac ctcatgcctg aggccccctt ccactagttg ggtaagaccg	1740
gtaaaaatgg acgagggtgc attggctgat ggcttcgccc atgggggttg caaggcaata	1800
atactaatca gaaaaggggc atcaggaata attaatttcc tagacactat tgggaggtgg	1860
ctaccggtag ctgaggcagc tatagtacca tattgtgaaa cttacactgt gacagggatg	1920
tatgtccatg tgaagaattg tctccctaga gggttaccga agcattcaaa aataatttcc	1980
ccgacaatga tatacttggg ggaagggtgac ccagcccata atattcagca cttatttggc	2040
tcaggatatag caaagtgggt cttagtccta ctcggggttc tgggtgagtg gtatggagaa	2100
ttggcctcta caatatactt actactagag tatgggtctg agtggttga acatgaaagt	2160
ctggtcacgg aagggttgat ccctggcatc aatattacaa tagaactccc agctagtcac	2220
actgtacctg gttgggtgtg ggtcgcaggc cgggtgggtat gcgtgaaacc agactgggtg	2280
cccacacaga tttggattga aactatgggtg gcagaggctt ggcatatact aaaaatattg	2340
gcatcagccc tggtaaacat agtcactgca ttcgtaaacc tgggaattggt atacctggtc	2400
ataatattag tcaaaatata aaaggggaac ctgataggcg ctatatgtg gtgcctatta	2460

ctgtcagggg	ctgaaggctc	gtgccacaag	agacaagact	attacagtat	ccagctagtc	2520
gttgaagaaa	aaacgggcgt	agaaaaacga	tctataatgg	gcaagtggac	agtgataact	2580
agggaaggtc	gggaaccaag	attaatggag	caaataagta	tgggtgtcaaa	tgatagcttg	2640
tcagaaactt	actgctacaa	taggctaaat	actagcagtt	gggggcgaca	accggcaaga	2700
cagagagggg	gtgggtcaaac	cgtacccttt	tggcctgggtg	acaatgtcct	ggaagaacaa	2760
tactatagca	caggttactg	ggtaaattgca	acaggtgggtt	gccagttgag	agaaggcgtg	2820
tggctatcaa	gaaagggcaa	tgtacagtgc	cagcgtaacg	gctcatcctt	gatactgcaa	2880
ctggcgataa	aagaagagaa	tgatactatg	gaaataccat	gtgacccggt	ggaaaccgaa	2940
agtatgggtc	cagttgcaca	gggcacttgc	gtgtacagct	gggcattcgc	ccaagagggg	3000
tgggtattaca	acaggaaaga	tggttatttg	ctccagtacg	taaagaaaaa	cgactaccag	3060
tactggacga	aaatgcccac	tgcttcatcc	gccgcaacga	tgtaccgcca	tttgctccct	3120
ttactgggtg	cctgccttat	gggcggtaga	atatcggtat	ggattgtggc	gatgctcctg	3180
tctttacagg	tggaagctag	tgaagtaggt	accaagcaac	tggctgtcac	gctaactctg	3240
tggaaaatgg	actggacaga	attactcttc	tatattgtta	taatgctagc	cgtaaggaa	3300
gaactcataa	aaaaaatagt	gactgcaagc	cttgtggcct	taaaaaatag	tccagtagcc	3360
ttgagcttcc	ttattgtact	caggcttgtg	gggggtagtg	aagcactccc	agtgggtttg	3420
ctattagaaa	agatgtgcat	agaccaaccg	gagtttggaa	cccctttcct	gatctaccta	3480
tgggacaatt	ggaagtggac	tgtactagtc	agcttctccg	cactgaatca	tgaaaaaact	3540
ataaaactgg	caagaaaact	gctgttggca	acacacataa	cggcgctcac	attgactggt	3600
ctgagtgatt	caatcttcta	tatgatgctt	ataatgacta	at ttattaat	aaagacattc	3660
atatacttac	tgggagccag	tatgaattgg	gtcgagagag	aaaaaaagaa	gttgctagtg	3720
aagagaaaac	taatataata	gaaagccgcg	at ttgcagtc	aagatggaaa	tgaattggag	3780
aataaattta	ataagataac	tgtaaattgcg	gatttcaccc	catgtaaact	tgaacttctg	3840
caactactca	gggctttttt	agtctctcta	tgcttttcct	attacaagcc	tctcctgtat	3900
gcggaaacta	ctctaaccgt	aatagtaatt	ggcgtacagg	agtacaacgt	agctatggct	3960
cgcgggcgaa	gcctgggtcca	tagactgcta	gccatggcct	actacatata	cggccgtata	4020
cagggtgaca	tgttccagct	cgccactatc	cagtgcctgt	tgtcaagtcc	taggaaaatt	4080
atgaaacaca	tgatagaaaa	tccaactctt	aagaagctct	ggcaagggtga	aacagagctt	4140
tttaaccagg	gtgtcagcca	gtccaaagta	gtgaatccaa	agagcattgg	gctggaagaa	4200
ttacacaagg	gtatgtgcgg	cctcccaact	gtagtgcaaa	at ttggcat	atatgctaag	4260

aagaatgact ctcttatctt aggagagctg ggttaccccc ctgggggacct caccagtgc	4320
gggtgggaaa ttttaggtcc tggcagaatc ccaaagatta ccaacgttga gtccgctaaa	4380
atggacttac tctccaagct tatgaccttt ctggggggtg agagctcaag agtccccagg	4440
actccagtcc actcgacaag gaaattattg aagatagtga gaggcctaga aactggatgg	4500
ggatacacc atgcaggggg gataagtagc gcaaaacacg tcacaggtga aaaaaacttg	4560
atgactcaca tgggaaggcag gaagggaag tatatcctac aatcccaaga acatggtgct	4620
gatgaggtag aatatggagt gaaaactgac caaaaagcac ccgacaatgc cttatgctat	4680
tgctttaacc ctgaagccac aaacataaaa ggagaaacgg gagccatggt gtttatgaag	4740
aagataggaa aaaaatggac tctcgtaaca tcagatggta acaaagccta ttataatgta	4800
aacaacctga aaggggtggtc cggactaccg ataatgttgc actctaccgg ggctatagta	4860
gggaggatta agtcagcgta ttcagatgaa aacgacttgg tagaggaact tatcgactcc	4920
aggactatca gcaagagcaa tgaggcaaac ctggatcacc ttatcaagga attagcagat	4980
atgcggaggg gggagtttcg ctccatcacc cttggaacag gagctgggaa aactacaga	5039

<210> 23
 <211> 5035
 <212> ADN
 <213> pestivirus m i

<400> 23	
cataatgctt tgattggctg cattatgtat gggacatcct aaattgttgt gagccctgtg	60
gtgagtgggg gaaaggggtt aaccaggcct ctagtaccac aggcaccaac agacagggca	120
actcgaacct gagagagagg taccgaactc ttaagtcccg agtacggggc agacgtcact	180
gagtagtaca cccaaagacc accacttcta ggtgtagggg ctactgaggc tcaggtggac	240
gtgggcgtgc ccaaagagaa atcgggtggcg gacctggggg tcgggtccac catgcccctt	300
tagggggtag accttactgc ttgatagagt gccggcggat gcctcgggta agagtataaa	360
atccgttggt tggttaacatg gaaaaacaga ttgcatatta cttaaaaaaa gaaaaacaaa	420
gaaatgggtg gacggaattg gtggtaggag aaagccatac aaaaataacc aactctctg	480
gaaagaccta tcgaggcact tgggaaatgg agaaacggtc gaatccttac ggaacctatc	540
tccccagacc tagtcctcga cagcttacag ccctacaccc ccacccagtg gtgaattgta	600
aggtgactga gtacaaagag ctagacccta attatggtga ctgcccaaata acaaacgggg	660
tgttcatcga cgaaaagggg agaaggctga gcagccctcc attgggcatt tggaaaataa	720
gactggacta cagcgacctg gtaaatataa acaaaccagc ctccgctagt ggaaaaaact	780
cttatcgagt cgagacctgt agtggggagc tggctactgt aacaccagta cacgacagag	840

tgcttgtaga agactgcagg gggctataacc aatggaaacc caattgtgaa ggaatgggtgc	900
tctatgtgaa aacttgttct gattgggcag accaggtaga aaaacaggag aaggaaagcc	960
ccccaaaacc ccagcgacca ccgaggcgag acccacgaaa aggattacaa ccacaagtcc	1020
ccaaagagac tgaggtcaca gaaaagaaga gacaaccag cgttacctta gtatcggggg	1080
ggcagaaggc ccaagtcac tacaagggca agactaagaa taaaaagact ccggtatggag	1140
tctataagta tccaggagcc agagaagggg atgtagtaaa ggtaggaag atgctgaaga	1200
attggcatat agctgtagtg atgtacctga tttatatcat aaccccgagc tttgccaaagg	1260
ttcagtgggtt cttaaaggat gaaaactcga cggggatcaa ccagatactg tggcaaagac	1320
agatcaatag atccctgcat ggagaatggc ccaaccagat ctgccacggc atgccgaacg	1380
aaaccatcac ggatgaagaa ttacgcagtc tgggaatgat tgacacaagc ccagaacaa	1440
actatacttg ctgccagttg caatatcatg aatggaagaa acatgggttg tgcaactatc	1500
cacaaaaaca gacttggatt aggaggataa cggccctaca aactaacctc accggagctt	1560
atgagggacc tgagtgcgct gttatttgtc gatttaatgg cagctataac atcgtaaaac	1620
aggccagaga cgaggtgagt ccactgacag ggtgtaagga agggcaccct ttcctatttt	1680
ctggtgaaag atccgatacc tcatgcctga ggcctccttc cacaagtttg gtaagaccag	1740
tgaagatgga tgaggcatca atagccgatg gctttgccca tggggttgac aaggcgataa	1800
tactgattag aaaaggggca tcaggaatca ttaatttcct agacaccatt gggaggtggc	1860
taccggtagc cgaagcaact atagtaccat attgtgaaac ttacactgtg acagggatgt	1920
atgtccatgt gaagaattgc ctccctagag ggttacctaa gcattcaaaa ataatttccc	1980
caacaatgat atacctgggg gaaggtgacc cagctcataa catccaacac ttatttggct	2040
caggtatagc aaagtgggtt ctagtcttac tcggggctct ggggtgagtgg tatggagaat	2100
tggcttctac aatataccta ctgctagagt atgggtctga gtgggttgaa catgaaagcc	2160
tgaccacgga aggggtgatc cccggcatta atatcacaac agaactccca gctagtcata	2220
cagtgcctgg ctgggtgtgg gtcgcaggcc agtgggtgtg tgtgaagcca gactggtggc	2280
ctacacagat ttggattgaa accgtgggtg cggaggcctg gcatatacta aaaatattgg	2340
catcagccct ggtgaacata gtcactgcat ttgtaaacct agaactggtc tacttgggtca	2400
taatattggc caaaatatca aaggggaacc tgataggcgc catattatgg tgcctattgt	2460
tgtcaggggc tgaaggctcg tgccacaaaa gacaagatta ttataatatc cagctgggtg	2520
tcgaagaaaa gacaggtgta gaaaaacgat ctataatggg caaatggact gtgataacta	2580
gggaaggccg ggaaccaaga ttaatggagc aaataaatat ggtgtcaa at gatacactgt	2640

cagaaactta	ctgctataat	aggctaaaca	ccagtagttg	ggggcgga	ccagtaagac	2700
agagaggggtg	tggtcagacc	gtgccctatt	ggcctggtga	taatatcctg	gaagaacaat	2760
actatagcac	aggttactgg	gtgaacgcga	caggcggttg	ccagctgaga	gaaggtgtgt	2820
ggctgtcaag	aaagggtaat	gtacagtgcc	agcgtaacgg	ctcatccttg	atactgcaat	2880
tagcgataaa	agaagaaaat	gacactatgg	aaataccatg	tgacccgggtg	gaaacagaaa	2940
gcatgggtcc	ggtcgcacag	ggcacttgcg	tgtatagctg	ggcattcgcc	ccaagaggggt	3000
ggtattacaa	taggaaagat	ggctattggc	tccagtacat	aaagaaaaac	gactaccagt	3060
actggacaaa	aatgcctacc	acctcgtccg	ctgcgacaat	gtaccgccac	ttgcttcccc	3120
tactggtggc	ttgccttatg	ggcggcagga	tatcggtgtg	gattgtagca	atgctcctat	3180
ctctgcaggt	ggaagctagc	gaagtaggta	ccaagcaact	ggctgtcaca	ctaactgtgt	3240
ggaaaatgga	ctggatagaa	ctactcttct	atattatcat	aatgctagcc	gtcaaggaag	3300
aacttataaa	gaaaatagtg	actgcaagcc	tagtggcctt	aaaaaatagt	ccagtggcctt	3360
tgagctttct	tgttgtactc	aggcttgtag	ggggcagtga	agcactccca	gtgggattac	3420
tattagaaaa	gatgtgcata	gaccaaccgg	agtttggaac	ccctttcctg	atctacctgt	3480
gggacaattg	gaagtggact	gtattagtca	gtttctccgc	actgaaccat	gaaaaaacta	3540
taaaactggc	aagaaaactg	ctattggcca	cacatataac	agcgctcata	ctgactggtc	3600
tgagtgattc	aatcttctac	atgatgctta	taataaccaa	cctactggta	aagacattca	3660
tatatattact	gggggccagc	atgaattggg	tcgagaaaga	aaaaaagaag	ttgctggtaa	3720
agaggaaatt	aatatataag	aaagccgcga	tttgcaagtca	ggatgagaat	gaattggaga	3780
ataaattcaa	taggatcact	gtaaatgcgg	atttcacccc	atgcaaactt	gaacttttac	3840
aactgcttag	ggctttttta	gtctctctat	gcttttccta	ttacaagcct	ctcctgtatg	3900
cagagaccac	tctaactgtc	atagtaattg	gcgtacaaga	gtacaacgta	gcaatggccc	3960
gcgggcggag	tttgggtccat	agactactag	ccatggccta	ctacatatat	ggccgcatgc	4020
agggtgacat	gttccaactc	gccaccattc	agtgcctggt	gtcaagcccg	aggaaaatta	4080
tgaaacatat	gatagaaaat	ccgactctta	agaagctatg	gcaaggcgaa	acagaacttt	4140
ttaaccaggg	tgtcaaccag	tccaagatag	tgaacccaag	gaaaattggg	ttggaggaat	4200
tacataaggg	catgtgcggc	ctccaaccg	tagtgcaaaa	tttggtcata	tatgcaaaga	4260
agaacgactc	tcttatttta	ggagagttgg	gttactcccc	tggggacctc	accagcgatg	4320
ggtgggaaat	tttaggccct	ggcagaatcc	caaagatcac	taatgttgag	tctgctaaaa	4380
tggacttact	ttccaaactc	atgaccttcc	tgggggattga	aagctcaagg	gtccccagaa	4440


```

ccccagtcca ctcaacaagg aaattattga agatagtaag aggcctggaa actggatggg      4500
ggtacaccca cgcaggagga attagcagcg cgaaacatgt tacagggtgaa aagaacttga      4560
tgaccacat ggagggcagg aagggttaagt atatcctaca atcccaagaa catgggtgctg      4620
atgaggtaga atatggagta aaaactgacc aaaaagcgcc cgacaatgcc ttgtgctatt      4680
gctttaaccc tgaagctaca aacataaaag gtgaaacagg ggccatgggtg ttcatagaaga      4740
agataggaaa aaaatggact ctctgacat cagatggtaa caaagcctat tataatgtaa      4800
ataatctgaa aggggtggtct ggactaccaa taatgttgca ctccaccggg gccatagtag      4860
ggaggattaa gtcagcatat tcagatgaaa atgacttggg ggaggaactt atcgattcta      4920
ggactatcag caagagtaat gaggcaaacc tggaccacct tatcaaggaa ttggccgata      4980
tgcgaggagg ggagttccgc tcaattaccc ttggaacggg agccgggaaa actac          5035

```

```

<210> 24
<211> 4921
<212> ADN
<213> pestivirus m i

```

```

<400> 24
tgattggctg cattatgtat gggacatctt aaattgctat gagccccgtg gtgagtgggg      60
gaaaggggtt aaccaggcct ctaggtccac aggcaccgat agacggggca actcaagcct      120
gagagagagg taccgaactc ttaagtcccg agtacggggc agacgtcacc gagtagtaca      180
cccaacgacc accacttcta ggtgtagggg ctactgaggc tcgggtggac gtgggcgcgc      240
ccaaagagaa atcgggtggg gacctggggg tcggggccac catgcccctt tacggggtag      300
accttactgc ttgatagagt gccggcggat gcctcaggta agagtataaa atccgttgtc      360
tattaacatg gaaaagcaga tcacatatta cttaaaaaaa gaaaaacaaa caaatggatg      420
gacggaatta gtggtaggag aaagtaatac gaaaataacc acgctctctg gaaaaaccta      480
ccgaggtagt tgggaaatgg agaaacggcc gaatccctac ggaacctatc tcccagacc      540
tagtcccaa cagcttacag ccctacaccc ccaccagta gtgaattgca aggtgattga      600
atacaaggat aaggacccta attatggtga ttgcccaa atacaaatgggg tggtcatcga      660
cgaaaaaggc agaaggctga gcagccctcc attgggtatt tggaagataa ggttgacta      720
cagcgacctg gtgaatataa acagaccaat ccccgctggg gaaaaaaact tctaccgagt      780
tgagacctgt agtgggggagc tggctactgt gacactggta cacaaaagag tacttgtgga      840
agaccgtagg ggattgtacc aatggaaacc caactgtgaa gggatgggtg tctatgtgaa      900
aacttgttct gattgggcag atcaggtgga aaaacaggag aaggaaagcc ccccaaaccc      960

```

tcagcgacca ccaaggcgag atccccgaag aggggttaciaa ccacaagtcc ccaaagagac	1020
tgaggtcact gaaaagaaga gacaacccag tgtcacctta gtatcggggg ggcagaaggc	1080
ccaagtcata taaaaaggca ggactaagaa caaaaagact ccggacgggg tctataagta	1140
tccgggggct aaagaggggg atgtgataaa ggtcaggaag atgctgaaga attggcacgt	1200
agctctggta atgtatctaa tatatatcat aaccccaggc ttcgccaagg ttcagtgggt	1260
cttaaaagat gaaaactcaa cggggatcag tcagatactg tggcgaagac agatcaacag	1320
atctctgcat ggagaatggc ctaatcagat ctgccacggt atgccaaatg aaactattac	1380
ggacgaggaa ttacgcagcc tgggaatgat agatacaagc ccagaacga actacacttg	1440
ttgccagttg caatatcatg agtggaagaa acatgggttg tgtaactatc cacaaaaaca	1500
ggcttggatt aggaggataa cggccttaca agccaacctc accggagctt acgcgggacc	1560
tgagtgcgct gtcatctgtc gatttaacgg tagctataac atcgtaaagc aagccagaga	1620
tgaggtaagt cactgacag ggtgtaagga agggcacccc ttcctattct ctgacgaaag	1680
atccgacacc tcatgcctga ggctctcttc cactagctgg gtaagaccag taaaaatgga	1740
cgaggcatca attgccgatg gctttgcccc tgggggttgac aaggcaataa tactgatcag	1800
aaaaggggca actggaatta ttaatttctt agatactatc gggaggtggc taccggtagc	1860
tgaagcaacc ataacaccat attgtgaaac ttataccgtc acagggatgt atgtccatgt	1920
gaagaattgc ctccccaaag ggttacctaa gcattcaaaa ataatttccc caacgatgat	1980
atatctgggg gaaggtgacc cagcccataa tattcagcac ctgtttggct caggtatagc	2040
aaagtgggtt ctagtcttac tcggggttct gggtgagtgg tatggagaat tggcttctac	2100
gatataccta ctactagagt atgggtctga gtggttgaa catgaaagtc tgaccacgga	2160
agggttgatc cctggcatca acatcacaat agaactccca gccagtcaca cagtgcctgg	2220
ttgggtgtgg gtcgcaggcc agtgggtatg cgtgaagcca gactggtggc ctacacagat	2280
ctggatcgaa actatgggtg cgagggcctg gcataacta aaaatattgg catcagccct	2340
ggtgaacata gtaactgcat ttgtgaacct ggaattagtc tacctgggtca taatactagt	2400
taaaatatca aaggggaacc tgattggtgc catactatgg tgacctgttac tatcaggggc	2460
tgaaggctct tgccacaaaa gacaagacta ttacaatgtc cagctgatcg tcgatgaaaa	2520
gacaggcgta gaaagacgat ctataatggg caagtggact gtgataacca ggggaaggcag	2580
ggaaccaaga ttaatggagc aaataaacat ggtgtcaaat gacagcctgt cagagactta	2640
ctgctataat aggctaaata ccagcagttg gaggcggcaa ccggcaaaac agagaggggtg	2700
tggtcaaact gtgccctatt ggctggcgga caatgtctta gaagaacaat actatagtac	2760

aggggtattgg	gtgaacgtga	caggcggttg	tcagctgaga	gaaggcgtgt	ggctatcaag	2820
aaagggcaat	gtacagtgcc	agcgtaacgg	ctcagccttg	atgctgcaat	tggcgataaa	2880
agaagaaaat	gacactatgg	aaataccgtg	tgacccggtg	gaaacagaaa	gcatgggtcc	2940
agttgcacaa	ggcacttgcg	tgtatagctg	ggcatttgcc	ccaagagggg	ggtactataa	3000
taagaaagat	ggttactggc	tccaatacat	aaagaaaaac	gactaccagt	actggacaaa	3060
aatgcctgct	gcctcgtccg	ccgcaacgat	gtaccgccat	ttgcttccct	tactagtggc	3120
ctgcctgatg	ggcggcagga	tatcggtgtg	gattgtggcg	atgctcctgt	ctttgcaggt	3180
ggaagccagc	gaagtgggta	ctaagcaact	ggctgtcact	ctaaccctgt	ggaaaatgga	3240
ctggacggaa	ctgcttttct	atgttgatcat	aatgctagcc	gttaaggaag	agcttggtta	3300
gaaaatagt	accgcaagcc	ttgtggccct	aaaaaacagt	ccagtagctt	tgagctttct	3360
tattgttctc	aggcttgtgg	ggggcagtga	agcactccca	gtaggtttac	tattagaaaa	3420
gatgtgcata	gaccaaccgg	agttcggaac	ccctttcctg	atctacctgt	gggacaattg	3480
gaagtggact	gtactagtca	gcttctctgc	actgaatcat	gaaaaaacta	taaaactggc	3540
aagaaaactg	ttattggcaa	cacatataac	agcgctcaca	ctgaccggtc	tgagtgattc	3600
aatcttttat	gtgatgctta	taatgaccaa	cctactaata	aagacattta	tatatctact	3660
gggggctagt	atgaattggg	tcgagagaga	aaagaagaag	ttgctagtaa	agaggaaact	3720
aatatataag	aaagctgcaa	tttgcaatca	agatgagaat	gaattggaga	ataaatttaa	3780
caagataacc	gtaaatgcgg	acttcacccc	atgtaaacct	gaactcttac	aactactcag	3840
ggctttttta	gtctctttat	gttttttcta	ttacaagccc	ctcctgtatg	cagagaccac	3900
cctaactgtt	atagtgattg	gcgtacaaga	gtacaatgtg	gctatggccc	gcgggcgaag	3960
cgtgattcat	agattgctag	ccatggccta	ctacgtatac	ggccgcatgc	agggtgacat	4020
gtttcagctc	gccaccatcc	agtgcctgtt	gtcgagtccg	aggaaagtta	tgaaacacat	4080
gatagaaaac	ccaactctca	agaagctctg	gcaaggcgaa	acagaacttt	ttaaccaggg	4140
tgtcagccaa	tccaaaatag	tgaacccaaa	gaagattggg	ctagaggaat	tacataaggg	4200
catgtgcggc	ctcccaactg	tagtgcaaaa	tttggtcata	tatgcgaaga	agaatgactc	4260
tcttatctta	ggagagttag	gttacccccc	cggggacctc	actagtgatg	ggtgggaaat	4320
actaggtcct	ggcagaatcc	caaagatcac	taacgtcgag	tctgctaaaa	tggaacttgct	4380
ctccaaactt	atgacctttc	tggggatcga	aagctcaagg	gtccccagga	ctccaatcca	4440
cccaacaagg	aaattactga	agatagtaag	aggcctggaa	actggatggg	ggtataactca	4500
tgcaggggga	ataagcagcg	caaaacatgt	tacaggtgaa	aaaaacttga	tgaccacat	4560

ggagggccgg aagggcaagt atatacctaca atcccaagaa cacggtgccg atgaggtaga 4620
 atatggagta aaaactgata aaaaagcacc cgacaatgcc ttatgctact gctttaaccc 4680
 tgaagccaca aatataaaaag gagaaacggg agccatggta ttcatgaaga agataggaaa 4740
 aaaatggact ctcgtaacat cagatggtaa caaggcctat tataatgtga acaacctgaa 4800
 aggggtggtct ggactaccga taatgttgca ctctactggg gccatagtag gaggataaag 4860
 tcagcatatt cagatgaaaa cgacttggtg gaggaactta ttgactctag gactatcagc 4920
 a 4921

<210> 25
 <211> 4702
 <212> ADN
 <213> pestivirus m  i

<400> 25
 gagtacgggg cagacgtcac tgagtagtac acccaaagac caccactttt aggtgtaggg 60
 tctactgagg ctcaggtgga cgtgggctg cccaaagaga aatcgggtgt gaacctgggg 120
 gtcgggttca ccatgcccct ttagggggta gaccttactg cttgatagag tgccggcgga 180
 tgcctcgggt aagagtataa aatccgttgt acattaacat ggaaaaacag attgcatatt 240
 atttaaaaaa agaaaaacaa agaaatgggt ggacggaact ggtagtagga gaaagctata 300
 caaaaataac cacgctctct gggcggacct atcgaggtac ctgggaaatg gagaaacggc 360
 cgaatcctta cggaacctac ctaccaagc ccagtcctca acagcttaca gccctacacc 420
 cccaccaggt agtgaattgt aaggtgactg agtacaaga gctggaccct aattatggtg 480
 attgcccag cacaatggg gtgttcacg acgaaaagg tagaaggctg agtggccctc 540
 cattgggtat ttggaagata agactggact acagcgacct ggtaaatatg aacagaccag 600
 ccccgctag taaaaaaac tcgtatcgag tcgagacctg cagtggggag ctggctattg 660
 tgacaccggt acacgatagg gtacttgtgg aggactgcag ggggctatat caatggaaac 720
 ccaactgtga aggaatggtg ctctatgtga aaacttggtc tgattgggca gatcaggtgg 780
 aaaaacagga gaaggaaagc ccccaaac ctcagcgacc accgaggcga gaccacgga 840
 aagggttaca accacaagtc cccaaagaga ctgaggtcac agaaaagaag agacaacct 900
 gcgttacctt agtatcggg gggcagaagg cccaagtcac ctacaaaggc aagactaaga 960
 ataaaaagac cccgatgga gtctataaat atccaggagc cagacaaggg gatgtagtaa 1020
 aagttaggaa gatgctgaag aattggcata tagcagtagt actatgcctg atttacatca 1080
 taacccaag ccttgccaag gttcagtggt tcctaaagga tgaaaactcg acggggatta 1140
 accaggtact gtggcgaaga cagatcaata gatctctgca tggagaatgg cccaaccagg 1200

tctgccacgg	tatgccaaat	gaaaccatca	cagatgagga	attgcgcgagc	ctgggaatga	1260
tagatacaag	ccccaaaaca	aactatactt	gttgccagtt	gcaatatcat	gagtgggaaga	1320
aacatggctg	gtgcaactat	ccacaaaaac	agacttggat	taggaggata	atggccctac	1380
aagccaacct	caccggagct	tatgagggac	ctgagtgcgc	tgttatctgt	cgattcaacg	1440
gcagttataa	catcgtaaaa	caggccagag	acgaagtaag	tccactgacg	gggtgcaagg	1500
aagggcaccc	tttcctattt	tccggtgaaa	aatccggctc	ctcatgcctg	aggcctcctt	1560
ccactagttg	ggtaaggcca	gtgaagatgg	atgaggcatc	aatagctgat	ggctttgccc	1620
atggggttga	caaagcaata	atactaatta	gaaaaggggc	atcaggaatt	ataaatttcc	1680
tagacactat	tgggaggtgg	ctacctgtag	ccgaagcagc	tatagtacca	tattgtgaaa	1740
cttacactgt	gacagggatg	tatgtccatg	tgaggaattg	cctccctaga	gggttaccca	1800
agcattcaaa	aataatttcc	ccgacgttaa	tatacctagg	ggaagggtgac	ccagcccata	1860
acatccagca	cttatTTTggc	tcaggtatag	caaagtgggt	tctagtctta	ctcgggggtcc	1920
tgggtgagtg	gtatggagaa	ttggcttcta	caatatatct	actactagag	tatgggtctg	1980
agtggttgga	acatgaaaac	ctgatcacgg	aagggttgat	ccctggcatt	aatatcacao	2040
tagaactccc	agctagtcac	acagtgcctg	gttgggtgtg	ggttgcaggc	caatgggtgt	2100
gtgtgaagcc	agactgggtg	cctacacaga	tttggattga	aaccatggta	gcagaggcct	2160
ggcatatact	aaaaatacta	gcacagccc	tgggtgaacat	agtcactgca	tttataaacc	2220
tgggaattggt	ctacctggtc	ataatactag	tcaaagtatc	aaaggggaac	ctgataggcg	2280
ccatactatg	gtgcctatta	ctgtcagggg	ctgaaggctc	atgccacaaa	agagaagatt	2340
attacaatat	ccagctagtt	gttgaagaaa	aaacaggtgt	ggaaaaacga	tctgtaatgg	2400
gcaaatggac	tgtggtatcc	agggaaggtc	aggaaaccaag	gttaatggag	caaataaata	2460
tgggtgtcaaa	tgataggctg	tcagaaactt	actgctacaa	taggctaaat	accagtagtt	2520
ggggacggca	accggcaaga	cagagagggg	gtggtcagat	tgtgccctat	tggcctgggtg	2580
acaatgtcct	agaggaacaa	tactatagca	caggttactg	ggtgaacgca	acaggcggtt	2640
gccagctgag	agaaggcgtg	tggctatcaa	gaaagggcaa	tgtacagtgc	cagcgtaacg	2700
gctcatcctt	aacactgcaa	ttagcgataa	aagaagagaa	tgacactatg	gaaataccat	2760
gtgaccgggt	ggaaacagaa	agcatgggtc	cagtagcaca	gggcacttgc	gtgtatagct	2820
gggcattcgc	cccaagaggg	tggattata	ataggaaaga	cggttatttg	cttcagtaca	2880
taaagaaaaa	cgactaccag	tactggacaa	aaatgcctac	tgccctcgcc	gctgcaacga	2940
tgtaccgcca	tttacttccc	ttactgggtg	cctgccttat	gggcggcaga	atatcggtgt	3000

ggattgtggc aatgctccta tctctacagg tggagctag cgaagtaggc accaagcaac	3060
tggctgtcac actaactctg tggaaaatgg actggacaga actactcttc tatatcgta	3120
taatgttagc cgtcaaggaa gaactcataa agaaaatagt gactgcaagc ctagtggcct	3180
taaaaaatag tccagtagcc ttgagctttc ttattgtact caggcttgta gggggcagtg	3240
aagcactccc agtggggttta ctattagaaa agatgtgcat agaccaaccg gagttcggaa	3300
cccctttcct gatctacctg tgggacaatt ggaagtggac tgtactagtc agcttctccg	3360
cactgaacca tgaaaaaact atcaaactgg caagaaaact gctattggcc acacatataa	3420
cagcgtcac attgactggg ctgagtgatt caatctttta catgatgctt ataatgacca	3480
acttactaat aaagacattc atatatctac tgggggccag cataaattgg gtcgagaaag	3540
aaaaaaagaa gctgctggta aagaggaaat taatatataa gaaagccgca atttgtagtc	3600
aggatgagaa tgaactggag aataaattca acaggataac tataaatgcg gatttcaccc	3660
catgcaaact tgaactttta caactactca gggctttttt agtctctata tgtttttcat	3720
attataagcc tctcctgtat gcagagacca ccttaactgt aatagtaatt ggtgtacaag	3780
agtacaatgt agcaatggcc cgcgggcgaa gcgtagtcca tagactacta gctatggcct	3840
actacatata tggccgcata cagggtgaca tgttccaact tgccactatt cagtgcctgt	3900
tgtcgagccc taggaaaatc atgaaacaca tgatagaaaa cccaactctt aagaagctct	3960
ggcaaggcga aacagaactt tttaaccagg gtgtcagcca gtccaaaata gtgaattcaa	4020
gaaaaattgg gctggaggaa ttacacaagg gcatgtgtgg cctcccaact gtagtgcaaa	4080
at ttggtcat atatgcaaag aagaatgact ctctcatttt aggagagttg gggtaccccc	4140
ctggggacct caccagtgat ggggtggaaa ttttaggccc tggcagaatt ccaaagatca	4200
ctaattgtcg gtctgccaaa atggacttac tctccaaact catgaccttt ctggggattg	4260
aaagctcaag ggtccctaga accccagtc actcaacaag gaaattactg aagatagtaa	4320
ggggcttgga aactggatgg gggtacactc acgcaggggg aatcagcagc gcaaaacacg	4380
ttacaggtga aaaaaacttg atgaccaca tggagggcag gaagggtag tatatcctac	4440
aatcccaaga acatgggtgcc gatgaggtag aatatggtgt aaaaactgac caaaaagcac	4500
ctgacaatgc cttatgctac tgctttaacc ctgaagccac aaacataaaa ggtgaaacgg	4560
gagccatggg gttcatgaag aagataggaa aaaaatggac tctcgtaaca tcagacggta	4620
acaaagccta ttataatgtg aacaacctga aagggtggtc tggactacca ataatgttgc	4680
actccaccgg ggccatagta gg	4702

<210> 26
 <211> 4543
 <212> ADN
 <213> pestivirus m6i

<400> 26
 cggtggtgga cctggggggcc gggggccacca tgctccttta cgggggtagac cttactgctt 60
 gatagagtgc cggcggatgc ctctgggtaag agtataaaat ccgttgtcta ttaatatgga 120
 aaaacagatc gcacattact taaaaaaaga aaaacaaaca aacggatgga cggaactggt 180
 ggtaggagaa agtcatacaa aaataaccac gctctctgga aaaacctatc gaggaacttg 240
 ggaaatggag aagcgggtcaa atccttatgg aacctatctc ccagaccta gtccccaaca 300
 gcttacagcc ctacaccccc acccagtggg aaattgcagg gtgatcgaat acaaggaaaa 360
 tgaccctaata tatggtgatt gcccaaatac aaatgggggtg ttcgtcgacg aaaaaggcag 420
 gaggctgagt agccctccat tgggtatctg gaagataaga ttggactata gtgacctggt 480
 gaacataaat agaccgaccc ccgctgggtg gaaaaactct taccgagtcg agacctgcag 540
 tggggagctg gctactgtaa cactggtaca caaaagggtg attgtggaag accgtagggg 600
 attataccag tggaaacca actgtgatgg gatggtgctc tatgtgaaaa cttgttctga 660
 ttgggcagac caggtagaaa aacaggagaa ggaaagtccc ccaaacctc agcggccacc 720
 aaggcgagat ccccgaaaag gggtacaacc acaagtcccc aaagagattg aggttactga 780
 aaagaagaga caaccagcg tcaccctagt atctgggggg cagaaggccc aagtcactta 840
 taaaggcagg actaagaata aaaggacccc ggatgggggtc tataagtatc cgggagccaa 900
 agaaggggat gtgacgaagg tcaggaagat gctaaagaat tggcatatag ccttggtaat 960
 gtacctataa tatgttataa cccaggttt cgccaaagtc cagtgggttct taaaggatga 1020
 aaactcgacg gggatcagtc agatactgtg gcaaagacag atcagcagat ccctgcatgg 1080
 agaatggcct gatcagatct gccacggcat gccaaatgaa actattacgg atgaggaatt 1140
 acgcagcctg ggaatgatag atacaagccc cagaacaaac tacacctggt gccagttgca 1200
 atatcacgag tggaagaaac atggctgggtg taactatcca caaaaacaag cttggattag 1260
 gagaataacg gccttacaag ccaacctcac cggagcttat gagggacccg agtgcgctgt 1320
 catctgtcga ttcaatggca gctataacat cgtaaagcag gctagagatg aggtaagtcc 1380
 gttgacaggg tgcaaggaag ggcacccctt cctattctct gacgaaagat ccgacacctc 1440
 atgcctgagg cctccttcca ctagctgggt gagaccagta aaaatggacg aagcatcaat 1500
 ggccgatggc tttgcccatt gggttgacaa ggcaataata ctaatcagaa aaggggcatc 1560
 aggaatcatc aacttcttag acaccattgg gaggtggcta ccagtagctg aagcaactat 1620

aacaccatat	tgtgaaactt	acaccgtgac	agggatgtat	gtccatgtga	agaattgcct	1680
ccccaagg	ttacctaacg	attcaaaaat	aatttcccca	acaatgat	atctggggga	1740
aggtgacccg	gcccataata	tccagcatct	gtttggctca	ggtatagcaa	agtgggttct	1800
agtcttactc	ggggttctgg	gtgagtggta	tggagaattg	gcctctacaa	tatacctgct	1860
actagagtat	gggtctgagt	ggttggaaca	cgaaagtctg	atcacggaag	gattgattcc	1920
tggcatcaat	atcacaatag	aactcccagc	cagtcataca	gtgcctgggt	gggtgtgggt	1980
cgcaggccag	tgggtatgcg	tgaaccaga	ctgggtgcct	acacagattt	ggatcgaaac	2040
tgttgtggcg	gaggcctggc	atatactaaa	aatactggca	tcagccctgg	tgaatatagt	2100
cactgcattt	gtgaacctgg	aattagtcta	cctggtcata	atactagtta	aagtatcaaa	2160
ggggaacctg	attggcgcta	tactatgggtg	cctattgctg	tcaggggctg	aaggctcttg	2220
ccacaaaaga	caagactatt	acaatatcca	gctagttgtc	gaagaaaaga	caggcgtaga	2280
aaaacgatct	ataataggca	agtggactgt	gataaccaag	gaaggtaggg	aaccaagatt	2340
aatggagcaa	ataaacatgg	tgtcaaataa	tagcctgtca	gagacttact	gctataatag	2400
gctaaatacc	agcagttgga	ggcggcaacc	ggcaaatacag	agaggggtgtg	gtcaaactgt	2460
gccctattgg	cctggtgaca	atgtcctaga	ggaacaatac	tatagcacag	gttactgggt	2520
gaacgcaaca	ggcggttgtc	agctgaggga	aggcgtatgg	ctatcaagaa	agggcaatgt	2580
acagtgccag	cgtaacggct	catccttgat	gctgcaattg	gcgataaaaag	aagaaaacga	2640
cactatggaa	ataccatgtg	acccgggtgga	aacagaaagc	atgggtccag	ttgcacaggg	2700
cacttgtgtg	tacagctggg	catttgcccc	aaggggggtgg	tactataata	ggaaagacgg	2760
ttactggctc	caatacaaaa	agaaaaacga	ctaccagtac	tggacaaaaa	tgcccgtgtc	2820
ctcgtccgcc	gcaacaatgt	accgccattt	gctcccctta	ctagtggcct	gcctgatggg	2880
cggcaggata	tcggtgtgga	ttgtggcaat	gctcctgtct	ctacaggtgg	aagccagtga	2940
agtgggtact	aagcaactgg	ctgtcactct	aactctgtgg	aaaatggact	ggacagagct	3000
gcttttctat	gttatcataa	tgctagctgt	taaggaagaa	ctcgtaaaga	aaatagtgac	3060
cgcaagcctt	gtggccctaa	aaaatagtcc	agtagccttg	agctttctta	ttgttctcag	3120
gcttgtgggg	ggcagtgaag	cactcccagt	gggtctacta	ttagaaaaga	tgtgtataga	3180
ccaaccggag	ttcggaaacc	ctttcctgat	ctacctgtgg	gacaattgga	agtggactgt	3240
actagttagc	ttctctgcac	tgaatcatga	aaaaactata	aaactggcaa	gaaaactgtt	3300
attggcaaca	catataacag	cactcacatt	gaccggtctg	agtgattcaa	tcttttatgt	3360
aatgcttata	acgaccaacc	tactgataaa	gacattcata	tattttattgg	gggctagcat	3420

gaattggggtt gagagagaaa aaaggaaatt actagtaaag aggagactaa tatataagaa	3480
agccgcaatt tgcaatcagg atgagaatga actggagaat aaattttaaca agataaccgt	3540
aaatacggat ttcaccccat gcaaacttga actttttgcaa ctactcaggg ctttttttagt	3600
ctcattatgt ttttcctatt acaagcctct cttgtatgca gagactaccc taactgttat	3660
agtgattggt gtacaagagt acaacgtagc tatggcccg cggcgaagcg tggttcacag	3720
attgctagcc atggcctatt acatatatgg ccgcatgcag ggtgacatgt ttcagctcgc	3780
caccatccag tgccctgttg ctagtccgag gaaagtcatg aagcacatga tagaaaatcc	3840
aactctcagg aagctctggc aaggcgaaac agaacttttt aaccaggggtg tcagccagtc	3900
caaaaatagtg aacccaaaga agattgggct agaagaatta cataagggta tgtgcgggtct	3960
cccaaccgta gtccaaaact tggatcatata tgcaaagaag aatgactctc ttatcttagg	4020
ggagttgggt taccctcctg gggacctcac tagtgatggg tgggaaatat taggtcctgg	4080
cagaatccca aagattacca atgtcgagtc tgctaaaatg gacttactct ccaaactcat	4140
gacctttctg gggattgaaa gctcaagggt cccagggact ccagtcacc caacaaggaa	4200
attattgaag atagtaagag gcctggaaac tggatggggg tacactcatg cagggggaat	4260
aagcagcgca aaacatgtca caggtgaaaa aaacttgatg acccacatgg aaggccggaa	4320
gggcaagtat atcctacaat cccaagaaca tggtgctgac gaggtagaat atggagtaaa	4380
gactgatcaa aaagcaccg acaatgcct atgctactgc tttaaccctg aagccacaaa	4440
tataaaagga gaaacgggag ccatgggtgt catgaagaag ataggaaaaa aatggactct	4500
cgtaacatca gatggtaaca aggcctatta caatgtgaaa caa	4543

<210> 27
 <211> 1073
 <212> ADN
 <213> pestivirus mới

<400> 27	
ggcctggggg tcgggtccac catgcccctt taggggtag accttactgc ttgatagagt	60
gccggcggat gcctcgggta agagtataaa atccgttgtt tgttaacatg gaaaaacaga	120
ttgtatatta cttaaaaaa gaaaaacaaa gaaatgggtg gacggaattg gtggtaggag	180
aaagccatac aaaaataacc aactctctg gaaagaccta tcgagggtact tgggaaatgg	240
agaaacggtc gaatccttac ggaacctatc tccccagacc tagtcctcga cagcttacag	300
ccctacaccc ccaccagtg gtgaattgta aggtgactga gtacaaagag ctagacccta	360
attatggtga ctgcccacaa acaaacgggg tgttcacga tgaaaagggt agaaggctga	420
gtagccctcc attgggcatt tggaagataa gactggacta cagcgacctg gtaaataata	480

acaaaccagc ccccgctagt aggaaaaact cttatcgagt cgagacctgc agtggggagc 540
 tggctactgt aacaccagta cacgacagag tgcttgtaga agactgcagg gggctatacc 600
 aatggaaacc caattgtgaa ggaatgggtgc tctatgtgaa aacttggttct gattgggcag 660
 atcaggtaga aaaccaggag aaggaaagcc ccccaaaacc tcagcgacca ccgaggcgag 720
 acccacgaaa aggattacaa ccacaagtcc ccaaagagac tgaggtcaca gaaaagaaga 780
 gacaaccagc cgtcacctta gtatcggggg ggcagaaggc ccaagtcac tacaagggca 840
 agactaagaa taaaaagact ccggatggag tctataagta tccaggagcc agagaaggag 900
 atgtagtaaa ggtaggaag atgctgaaga attggcatat agctgtagtg atgtacctga 960
 tctatatcat aaccccgagc tttgccagg ttcagtgggt cttaaaggat gaaaactcga 1020
 cggggattaa ccagatactg tggcaaagac agatcaatag atccctgcat gga 1073

<210> 28
 <211> 5050
 <212> ADN
 <213> pestivirus m i

<400> 28
 cctctagtac cacaggcacc gatagacggg gcaactcgaa cctgagagag aggtaccgaa 60
 ctcttaagtc ccgagtacgg ggcagacgtc accgagtagt acaccaacg accaccactc 120
 ctaggtgtag ggtctactga ggctcgggtg gacgtgggcg tgcccaaaga gaaatcggtg 180
 gtggacctgg gggccggggc caccatgctc ctttacgggg tagaccttac tgcttgatag 240
 agtgccggcg gatgcctcgg gtaagagtat aaaatccgtt gtctattaat atggaaaaac 300
 agatcgcata ttacttaaaa aaagaaaaac aaacaaacgg atggacggaa ctggtggtag 360
 gagaaagtca taaaaaata accacgctct ctggaaaaac ctatcgagga acttgggaaa 420
 tggagaagcg gtcaaactct tatggaacct atctcccag acctagtccc caacagctta 480
 cagccctaca cccccacca gtggtgaatt gtaaggatgat cgaatacaag gagaaggacc 540
 ctaattatgg cgattgccca aatacaaatg ggggtgttcgt cgacgaaaaa ggcagaaggc 600
 tgagtagccc tccattgggt atttggaaga taagattgga ctatagtgac ctggtgaaca 660
 taaatagacc gacccccgct ggtgggaaaa actcttaccg agtcgagacc tgcagtgggg 720
 agctgggtac tgtaacactg gtacacaaaa gggtaattgt ggaagaccgt aggggattat 780
 accagtggaa acccaactgt gatgggatgg tgctctatgt gaaaacttgt tctgattggg 840
 cagaccaggt agaaaaacag gagaaggaaa gtcccccaa acctcagcgg ccaccaaggc 900
 gagatccccg aaaaggggta caaccacaag tccccaaaga gattgagggt actgaaaaga 960

agagacaacc	cagcgtcacc	ctagtatctg	gggggcagaa	ggcccaagtc	atctataaag	1020
gcaggactaa	gaataaaagg	accccggatg	gggtctataa	gtatccggga	gccaaagaag	1080
gggatgtgac	gaaggtcagg	aagatgctaa	agaattggca	tatagccttg	gtaatgtacc	1140
taatatatgt	tataacccca	ggtttcgcca	aagtccagtg	gttcttaaag	gatgaaaact	1200
cgacggggat	cagtcagata	ctgtggcaaa	gacagatcag	cagatccctg	catggagaat	1260
ggcctgatca	gatctgccac	ggcatgccaa	atgaaactat	tacggatgag	gaattacgca	1320
gcctgggaat	gatagataca	agccccagaa	caaactacac	ctgttgccag	ttgcaatatc	1380
acgagtggaa	gaaacatggc	tgggtgtaact	atccacaaaa	acaagcttgg	attaggagaa	1440
taacggcctt	acaagccaac	ctcaccggag	cttatgaggg	acccgagtg	gctgtcatct	1500
gtcgattcaa	tggcagctat	aacatcgtaa	agcaggctag	agatgaggta	agtccgttga	1560
cagggtgcaa	ggaagggcac	cccttcctat	tctctgacga	aagatccgac	acctcatgcc	1620
tgaggcctcc	ttccactagc	tgggtgagac	cagtaaaaat	ggacgaagca	tcaatggccg	1680
atggctttgc	ccatgggggt	gacaaggcaa	taataactaat	cagaaaagg	gcatcaggaa	1740
tcatcaactt	cctagacacc	attgggggg	ggctaccagt	agctgaagca	actataacac	1800
catattgtga	aacttacacc	gtgacaggga	tgtatgtcca	tgtgaagaat	tgcctcccca	1860
aagggttacc	taagcattca	aaaataattt	ccccaacaat	gatatatctg	ggggaagg	1920
acccggccca	taatatccag	catctgtttg	gctcaggtat	agcaaagtgg	gttctagtct	1980
tactcgggg	tctgggtgag	tgggtatggag	aattggcctc	tacaatatac	ctgctactag	2040
agtatgagtc	tgagtgggtg	gaacacgaaa	gtctgatcac	ggaaggattg	attcctggca	2100
tcaatatcac	aatagaactc	ccagccagtc	atacagtgcc	tgggtgggtg	tgggtcgcag	2160
gccagtgggt	atgcgtgaaa	ccagactgg	ggcctacaca	gatttggatc	gaaactgttg	2220
tggcggaggc	ctggcatata	ctaaaaatac	tggcatcagc	cctgggtgaat	atagtcactg	2280
catttgtgaa	cctggaatta	gtctacctgg	tcataatact	agttaaaata	tcaaagggga	2340
acctgattgg	cgctatacta	tgggtgcctat	tgctgtcagg	ggctgaaggc	tcttgccaca	2400
aaagacaaga	ctattacaat	atccagctag	ttgtcgaaga	aaagacaggc	gtagaaaaac	2460
gatctataat	aggcaagtgg	actgtgataa	ccaaggaagg	tagggaacca	agattaatgg	2520
agcaaataaa	catggtgtca	aatgatagcc	tgtcagagac	ttactgctat	aataggctaa	2580
ataccagcag	ttggaggcgg	caaccggcaa	aacagagagg	gtgtgggtcaa	actgtgccct	2640
attggcctgg	tgacaatgtc	ctagaggaac	aatactatag	cacagggttac	tgggtgaacg	2700
caacaggcgg	ttgtcagctg	agggaaggcg	tatggctatc	aagaaagggc	aatgtacagt	2760

gccagcgtaa	cggtcatcc	ttgatgctgc	aattggcgat	aaaagaagaa	aacgacacta	2820
tggaaatacc	atgtgacccg	gtggaaacag	aaagcatggg	tccagttgca	cagggcactt	2880
gtgtgtacag	ctgggcattt	gccccaaagg	ggtggtacta	taataggaaa	gacggttact	2940
ggctccaata	cataaagaaa	aacgactacc	agtactggac	aaaaatgccc	gctgcctcgt	3000
ccgccgcaac	aatgtaccgc	catttgctcc	ccttactagt	ggcctgcctg	atgggcggca	3060
ggatatcggg	gtggattgtg	gcaatgctcc	tgtctctaca	ggtggaagcc	agcgaagtgg	3120
gtactaagca	actggctgtc	actctaactc	tgtggaaaat	ggactggaca	gagctgcttt	3180
tctatgttgt	cataatgcta	gctgttaagg	aagaactcgt	aaagaaaata	gtgaccgcaa	3240
gccttgtagc	cctaaaaaat	agtccagtag	ccttgagctt	tcttattggt	ctcaggcttg	3300
tggggggcag	tgaagcactc	ccagtgggtc	tactattaga	aaagatgtgt	atagaccaac	3360
cggagttcgg	aaccctttc	ctgatctacc	tgtgggacaa	ttggaagtgg	actgtactag	3420
ttagcttctc	tgcactgaat	catgaaaaaa	ctataaaact	ggcaagaaaa	ctgttattgg	3480
caacacatat	aacagcactc	acattgaccg	gtctgagtga	ttcaatcttt	tatgtaatgc	3540
ttataacgac	caacctactg	ataaagacat	tcatatat	attgggggct	agcatgaatt	3600
gggttgagag	agaaaaaagg	aaattactag	taaagaggag	actaatatat	aagaaagccg	3660
caatttgcaa	tcaggatgag	aatgaactgg	agaataaatt	taacaagata	accgtaaata	3720
cggatttcac	cccatgcaaa	cttgaacttt	tgcaactact	cagggccttt	ttagtctcat	3780
tatgtttttc	ctattacaag	cctctcttgt	atgcagagac	taccctaact	gttatagtga	3840
ttggtgtaca	agagtacaac	gtagctatgg	cccgcgggcg	aagcgtgggt	cacagattgc	3900
tagccatggc	ctattacata	tatggccgca	tgcagggtga	catgtttcag	ctcgccacca	3960
tccagtgcct	gttgtcgagt	ccgaggaaag	tcatgaagca	catgatagaa	aatccaactc	4020
tcaggaagct	ctggcaaggc	gaaacagaac	tttttaacca	gggtgtcagc	cagtccaaaa	4080
tagtgaacct	aaagaagatt	gggctagaag	aattacataa	gggtatgtgc	ggtctcccaa	4140
ccgtagtcca	aaacttggtc	atatatgcaa	agaagaatga	ctctcttata	ttaggggagt	4200
tgggttacct	cctgggggac	ctcactagt	atgggtggga	aatattaggt	cctggcagaa	4260
tcccaaagat	taccaatgtc	gagtctgcta	aatggactt	actctccaaa	ctcatgacct	4320
ttctggggat	tgaaagctca	agggctccca	ggactccagt	ccacccaaca	aggaaattac	4380
tgaagatagt	aagaggcctg	gaaactggat	gggggtacac	tcatgcaggg	ggaataagca	4440
gcgcaaaaaca	tgtcacaggt	gaaaaaaaact	tgatgaccca	catggaaggc	cgggaaggga	4500
agtatatcct	acaatcccaa	gaacatgggt	ctgacgaggt	agaatatgga	gtaaagactg	4560

atcaaaaagc	acccgacaat	gccctatgct	actgcttta	ccctgaagcc	acaaatataa	4620
aaggagaaac	gggagccatg	gtgttcatga	agaagatagg	aaaaaatgg	actctcgtaa	4680
catcagatgg	taacaaggcc	tattacaatg	tgaacaacct	gaaaggggtg	tctggactac	4740
caataatggt	gcactctact	ggggccatag	tagggaggat	aaagtcagca	tattcagatg	4800
aaaatgactt	ggtggaggaa	cttattgact	ctaggactat	cagcaagagc	aatgagacaa	4860
acctggacca	tcttatcaag	gaattggcag	atatgcggag	gggggagttt	cgctcaatca	4920
cccttggaac	gggagctggg	aaaactacgg	aactgcccag	gcaatatctc	acaacggtag	4980
gtgcccataa	atctgtgttg	gtcctagtcc	ctttaaagc	acccgccgag	agtgtctgtc	5040
gcttcatgag						5050

<210> 29
 <211> 4664
 <212> ADN
 <213> pestivirus m6i

<400> 29	
gcgtgcccac	agagaaatcg
gtggtggacc	tgggggtcgg
gtccaccatg	cccctttagg
gggtagacct	tactgcttga
tagagtgccg	gcggatgcct
cgggtaagag	tataaaatcc
ggtgtctatt	aacatggaaa
agcagattgc	atattactta
aaaaaagaaa	aacaaagaaa
tgggtggacg	gaactggtag
tgggagaaag	ccatacgaaa
ataaccacac	tttctggaaa
gatctatcga	ggtacatggg
aaatggagaa	acggtcgaat
ccttacggaa	cctatcttcc
tagacctagt	cctcaacagc
ttacagctct	acacccccac
ccagtgggtg	attgtaagggt
gaccgagtat	aaggagctgg
accctaatta	tgggtgattgc
ccgaagacaa	atgggggtatt
catcgacgaa	aagggtcgaa
ggctgagcag	ccctccattg
ggaatttgga	agataagact
ggactacagc	gacctggtaa
atataaacag	accagctctc
gctagtggaa	aaaactctta
tcgagtcgag	acctgcagtg
gggaactggc	tattgtaaca
ccggtacacg	ataggggtact
tgtagaagac	tacagggggc
tataccaatg	gaaacccaac
tgtgaaggaa	tgggtgctcta
tgtgaaaact	tgctctgact
gggcagacca	ggtggaaaaa
caggaaagag	aaaaccccc
aaaacctcag	cgaccaccga
ggcgagaccc	acgaaaagg
ttacaaccgc	aagtcacctaa
agagactgag	gtcactgaaa
agaggagaca	accagcgtt
accttagtat	cggggggaca
gaaggcccaa	gtcatctaca
aaggcaagac	taagaataaa
aagactccgg	atggagtcta
taagtatcca	ggagccagag
aaggggatgt	ggtaaagggt
aggaagatgc	tgaagaattg
gcatatagct	gtagcaatgt
tcctgattta	tatcataacc
ccaggctttg	ccaaggttca
gtggttctta	aaggatgaga
actcgacggg	gatcaatcag
atactgtggc	gaagacaaat

caatagatcc ctgcatggag aatggcccaa ccagatctgc catggtatgc cgaatgaaac	1140
catcacggat gaggaattac gtagtctggg aatgatagat acaagtccca gaacaaacta	1200
cacttgttgc cagttgcaat atcatgagtg gaagaaacat ggttggtgca actatccaca	1260
aaaacagact tggattagga gaataacggc cctacaggct aacctcaccg gaacttatga	1320
gggacctgag tgcgctgtca tctgtcgatt taacggcagc tataacatcg taaaacaggc	1380
cagagacgag gtgagccac tgacaggggtg taaggagggg caccctttcc tattttctgg	1440
tgcaagatcc gacacctcgt gtctgaggcc tccttcact agttgggtca gaccagtga	1500
gatggatgag gcatcaatgg ccgatggctt tgcccatggg gttgacaagg caataatact	1560
aattagaaaa ggagcatcag gaattattaa tttcctagac actattggga ggtggctacc	1620
agtagccgaa gcaactatag taccatattg tgaaacttac actgtgacag ggatgtatat	1680
ccatgtgaag aattgcctcc ccaaagggtt acctaagcat tcaaaaataa tttccccgac	1740
aatgatatac ctgggggaag gtgaccagc ccataacatc cagcacttat ttggctcagg	1800
tatagcaaag tgggtcctag tcttactcgg ggtcctgggt gagtggtatg gagaattggc	1860
ctctacaata tacctactac tggagtacgg gtctgagtgg ttggaacatg aaagcttgat	1920
tacagaaggg ttgatccctg gcattaatat cacagtagaa ctcccagcta gccaaacagt	1980
gcctggttgg gtgtgggtcg caggccagtg ggtatgtgtg aagccagact ggtggcctac	2040
tcagatttggt attgaaaccg tgggtggcga ggcctggcat atactaaaaa tactggcatc	2100
agcccttggtg aacatagtca ctgcatttgt aaacttgga ttggtctacc tggtcataat	2160
attagtcaaa atatcaaagg ggaacctaata aggcgccata ttatggtgcc tattattgtc	2220
aggggctgaa ggctcatgcc acaaaagaca agactattac aatattcagt tagttgtcga	2280
agaaaaaaca ggtgtagaaa aacgatccat aatgggcaaa tggactgtaa taactaggga	2340
aggtcgggaa ccaagattaa tggagcaaat aaatatggtg ttcaacgata gcctgtcaga	2400
aacttactgc tataataggc taaacaccag tagttggggg cgacaaccgg caagacagag	2460
aggggtgtggt cagactgtac cctattggcc tggtgacaat gtcctagaag aacaatacta	2520
tagcactggt tactgggtga acacaacagg cggttgccag ttgagagaag gagtgtggct	2580
atcaagaaaa ggcaacgtac agtgccagcg taatggctca tccttgatac tgcaattagc	2640
aataaaagaa gagaatgaca ctatggaaat accatgtgac ccggtggaaa cagaaagcat	2700
gggtccagtt gcacagggtg cttgcgtata tagctgggca ttcgccccaa gaggggtggtg	2760
ttataatagg aaagacggtt attggcttca gtacataaag aaaaacgact accagtactg	2820
gacaaaaatg cctaccgcct cgtccgctgc aacaatgtac cgccatttgc ttcccttact	2880

ggtagcttgc ctcatgggcg gcaggatatac ggtgtggatt gtagcaatgc tcctatctct	2940
acagggtggaa gctagcgaag tgggtaccaa gcaactggct gtcacactaa ctctgtggaa	3000
aatggactgg acagaactac tcttttatat tgttataatg ctagccatca aggaagagct	3060
cataaagaaa atagtgactg caagcctagt agccttaaaa aatagtccag tggctttgag	3120
ttttcttatt gtactcaggc ttgtaggggg cagtgaagca ctcccagtag gtttactgct	3180
agaaaagatg tgtatagacc aaccggagtt tggaaccctt ttctgatct acctgtggga	3240
caattggaag tggactgtac tagtcagctt ctccgcactg aacctgaaa aaactataaa	3300
actggcaaga aaactgctac tggccacgca tataacagcg ctacattga ctggtctgag	3360
tgattcaatc ttctacatga tgcttataat gaccaaccta ctgataaaga cattcatata	3420
tctactgggg gccagcataa attgggtcga gaaagaaaa agaaaattgc tggcgaagag	3480
gaaattaata tataagaaag ccgcgatttg caatcatgaa gagaatgaat tggagaataa	3540
atttaacagg ataactgtaa atgcggactt caccctatgc aaactcgaac ttctacaatt	3600
acttagggct tttttagtct ctttatgttt ttctattat aagcctcttc tgtatgcaga	3660
gaccacccta actgttatag taattggcgt acaagagtac aatgtagcaa tggcccgtgg	3720
gcgaagtgtg gtccatagac tactagccat ggctactac atatatggcc gcatacaggg	3780
tgaaatgttc caactcgcca ctatccagtg cctgttgtca agcccgagga aaattatgaa	3840
acacatgata gaaaatccaa ctcttaagaa gctctggcaa ggcgaaacag aactttttta	3900
ccagggtgtc agccagtcca aaatagtga tccaaggaaa attgggctgg ggaattaca	3960
taagggcatg tgcggcctcc caactgtagt gcaaaatcta gtcatatatg caaagaagaa	4020
tgactctctc attttaggag agttgggtta cccctctggg gacctacca gtgatgggtg	4080
ggaaatttta ggtcctggca gaatcccaaa aatcactaat gttgagtccg caaaatgga	4140
cttactctcc aaactcatga ctttcttggg gattgaaagc tcaagagtcc ccagaacccc	4200
agtccactca acaagaaagt tattgaagat agtaagaggc ctcgaaactg gatgggggta	4260
cactcatgca ggaggaatca gtagcgcaaa acacgttaca ggtgagaaga acttgatgac	4320
ccacatggag ggtaggaagg gtaagtatat cctacaatcc caagaacatg gcgctgatga	4380
ggtagaatat ggggtgaaaa ctgacaaaa agcacccgac aatgccttgt gctactgctt	4440
taaccctgaa gccacaaaca taaaagggtga aacgggagcc atggtgttca tgaagaagat	4500
aggaaaaaaa tggactcttg taacatcgga tggttaacaaa gcctattaca atgtaaacaa	4560
cttgaaaggg tggctctggac ttccaataat gttgcactcc accggggcca tagtagggag	4620
gattaagtca gcatattcgg atgaaaatga cttggtggag gaac	4664

<210> 30
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 30
 gtaaaacgac ggccag

16

<210> 31
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 31
 caggaaacag ctatgac

17

<210> 32
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> virut mới

<400> 32

Ser Cys His Lys Arg Gln Asp Tyr Tyr Ser Ile Gln Leu Val Val Asp
 1 5 10 15

Gly Lys Thr Gly Val Glu Lys Arg Ser Ile Val Gly Lys Trp Thr Val
 20 25 30

Ile Thr Arg Glu Gly Arg Glu Pro Arg Leu Met Glu Gln Ile Ser Met
 35 40 45

Val Ser Asn Asp Ser Leu Ser Glu Thr Tyr Cys Tyr Asn Arg Leu Asn
 50 55 60

Thr Ser Ser Trp Gly Arg Gln Pro Ala Arg Gln Arg Gly Cys Gly Gln
 65 70 75 80

Thr Val Pro Phe Trp Pro Gly Asp Asn Val Leu Glu Glu Gln Tyr Tyr
 85 90 95

Ser Thr Gly Tyr Trp Val Asn Ala Thr Gly Gly Cys Gln Leu Arg Glu
 100 105 110

Gly Val Trp Leu Ser Arg Lys Gly Asn Val Gln Cys Gln Arg Asn Gly
 115 120 125

Ser Ser Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ile Lys Glu Glu Asn Asp Thr Met
 130 135 140

Glu Ile Pro Cys Asp Pro Val Glu Thr Glu Ser Met Gly Pro Val Thr
 145 150 155 160

Gln Gly Thr Cys Val Tyr Ser Trp Ala Phe Ala Pro Arg Gly Trp Tyr
 165 170 175

Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Tyr Trp Leu Gln Tyr Val Lys Lys Asn Asp
 180 185 190

Tyr Gln Tyr Trp Thr Lys Met Pro Thr Ala Ser Ser Ala Thr Thr Met
 195 200 205

Tyr Arg His
 210

<210> 33
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN được làm thích nghi với baculo

<400> 33
 cgcggatcca aatatgtcat gtcacaagcg tcaagactac tactctatcc aactgggtggt 60
 ggacggaaaa actggcgtgg aaaagcgttc tatcgtgggc aagtggacgg tcatacaccag 120
 ggagggcaga gaaccgcgcc taatggagca aatttcgatg gtatctaacg actctctttc 180
 agaaacctac tgctataacc gtctcaatac tagctcttgg ggtcgtcaac ctgcccgtca 240
 gcgcggatgt gggcaaaccg tccccttctg gcctggtgac aacgtactcg aggaacagta 300
 ctatagcacc ggatactggg ttaacgctac tggcggttgc caactacgcg agggagtttg 360
 gttatctcgt aaggggaacg tgcaatgtca gcgtaatggc tcatcgctga tccttcaact 420
 cgctattaa gaggaaaacg acaccatgga aatcccgtgc gatccagtcg agactgaatc 480
 aatgggcccc gttactcaag gcacgtgtgt gtacagctgg gctttcgccc ctaggggatg 540
 gtactataac cgtaaggacg gctactggct tcaatacgtg aagaaaaacg attaccagta 600
 ctggaccaa atgcccactg catccagcgc gaccactatg taccgtcacc atcaccatca 660

ccatcactaa gaattctcga g

681

<210> 34
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AND nhân tạo

<400> 34
 catatgtcgt gtcacaaacg ccaagattat tattctattc aactggtcgt ggatggtaaa 60
 acgggtgtcg aaaaacgctc tatcgtcggt aaatggaccg tgattacgcg tgaaggccgc 120
 gaaccgctc tgatggaaca gatcagtatg gtttccaacg atagcctgtc tgaaacctat 180
 tgctacaacc gcctgaatac gagctcttgg ggctcgtcagc cggcacgtca acgcggtgtg 240
 ggtcagaccg tcccgttttg gccgggacgac aacgtgctgg aagaacaata ttacagtacc 300
 gggtattggg tgaatgcaac gggcggttgc cagctgctg aaggcgtttg gctgtctcgt 360
 aagggtaacg tccagtgtca acgcaatggc agttccctga ttctgcaact ggcgatcaaa 420
 gaagaaaacg ataccatgga aatcccgtgc gaccggtcg aaaccgaatc aatgggcccg 480
 gtgaccagc gcacgtgtgt ttattcgtgg gcattcgcac cgcgcggctg gtattacaac 540
 cgtaaagatg gttattggct gcagtacgtg aagaaaaacg actatcaata ctggaccaa 600
 atgccgacgg catcatcggc taccacgatg taccgtcatc accatcacca tcaccattaa 660
 ctcgag 666

<210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi Q-pcr

<400> 35
 cgtgcccaaa gagaaatcgg 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi Q-pcr

<400> 36
 ccggcactct atcaagcagt 20