



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

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

(11)



1-0035838

(51)⁷ C07K 16/10; C12N 1/21; C12N 15/13; (13) B
G01N 33/577; C12N 15/70; C12N 5/20;
G01N 33/569; C07K 14/145; C12N
15/47

(21) 1-2016-01329

(22) 15/01/2014

(86) PCT/CN2014/070647 15/01/2014

(87) WO/2015/062171 07/05/2015

(30) 201310516761.8 28/10/2013 CN

(45) 25/05/2023 422

(43) 26/09/2016 342A

(73) BEIJING PONY BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

Room 405-406, 4th Floor, Block B Zhongguancun Intellectual Property Building, 21
South Haidian Road, Haidian District, Beijing 100080 China

(72) Jun JI (CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG VÀ KHÁNG NGUYÊN VÀ GEN CỦA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng của virus bệnh dại có vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trên SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trên SEQ ID NO: 2. Kháng thể này có thể được tạo ra bằng tế bào lai với số lưu trữ CGMCC 7956. Sáng chế còn đề cập đến protein kháng nguyên để điều chế kháng thể đơn dòng, có trình tự axit amin như được thể hiện trên SEQ ID NO: 3. Protein kháng nguyên này có thể được mã hóa bởi gen được thể hiện trên SEQ ID NO: 4, và có thể được sử dụng để điều chế kháng thể đơn dòng hiệu lực cao. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có hiệu lực bằng với các sản phẩm tương tự của nước ngoài, và trong kiểm tra RFFIT, nó thể hiện cường độ huỳnh quang tương đối cao và lâu bền.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng virus bệnh dại, protein kháng nguyên của virus bệnh dại, gen mã hóa chúng, và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, thử nghiệm ức chế điểm huỳnh quang nhanh (rapid fluorescence focus inhibition test: RFFIT) thường được sử dụng để kiểm tra virus bệnh dại trên toàn thế giới: một lượng cố định của virus được ủ ở 37°C cùng với dung dịch pha loãng theo dãy của huyết thanh cần được kiểm tra và huyết thanh đối chứng với hiệu giá đã biết, sau đó huyền phù tế bào nhạy được bổ sung vào. Sau khi ủ lại, các tế bào tạo ra một lớp đơn. Sau đó, nó được định hình bằng axeton lạnh, và được nhuộm bằng kháng thể đơn dòng được đánh dấu huỳnh quang kháng nucleoprotein (nucleoprotein: NP) của virus bệnh dại, để kiểm tra sự có mặt của virus mà không được trung hòa (điểm huỳnh quang). Sau đó, hiệu giá của kháng thể trong mỗi huyết thanh cần kiểm tra được tính toán. Việc phát hiện bằng RFFIT luôn luôn cần kháng thể NP được đánh dấu huỳnh quang, do đó, chất phản ứng chẩn đoán nhạy và hữu hiệu của kháng thể đơn dòng được đánh dấu huỳnh quang kháng NP của virus bệnh dại là quan trọng đối với kỹ thuật này.

Lượng virus bệnh dại là thấp trong môi trường nuôi cấy, và khó để tạo ra nhiều NP tinh chế từ các hạt virus bệnh dại. Ngoài ra, NP của virus bệnh dại không chứa nhóm sacarit bất kỳ, sự miễn dịch của nó là kém, và khó để điều chế kháng thể kháng NP. Hiện nay, đối với chất cơ bản này, không có chất phản ứng chẩn đoán của kháng thể đơn dòng được đánh dấu huỳnh quang kháng NP của virus bệnh dại được công nhận với số chấp nhận chính thức ở Trung Quốc, trong khi việc nhập khẩu các sản phẩm này thì đắt đỏ và cần khoảng thời gian dài. Việc phát hiện nhanh kháng nguyên và kháng thể virus bệnh dại chưa từng được thực hiện ở Trung Quốc, điều này có sự tác động

đáng kể đến công việc bao gồm chẩn đoán lâm sàng về bệnh dại, kiểm soát chất lượng vacxin và điều tra dịch tễ học. Do đó, việc tiếp cận kháng thể mới kháng virus bệnh dại có ý nghĩa lớn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng mới kháng virus bệnh dại, protein kháng nguyên tương ứng mà có thể được sử dụng để điều chế kháng thể đơn dòng có hiệu giá cao, và gen mã hóa của chúng, và sử dụng chúng.

Để đạt được mục đích nêu trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng có vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trên SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trên SEQ ID NO: 2.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất tế bào lai với số lưu trữ CGMCC 7956.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai với số lưu trữ CGMCC 7956.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc khía cạnh thứ ba để điều chế chất phản ứng để phát hiện virus bệnh dại.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc khía cạnh thứ ba để điều chế chất phản ứng để phát hiện kháng thể kháng virus bệnh dại.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất kit được dự định để phát hiện kháng thể kháng virus bệnh dại ở mẫu cần kiểm tra, kit chứa kháng thể đơn dòng được đánh dấu huỳnh quang và chất định hình, và kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc khía cạnh thứ ba.

Trong đó mẫu được kiểm tra thường là huyết thanh.

Chất định hình có thể là dung dịch axeton chứa nước nồng độ 75-85% (thể tích/thể tích).

Chất đánh dấu huỳnh quang có thể là các loại chất đánh dấu huỳnh quang khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này, như florescein isothioxyanat (FITC), tetraethyl rođamin (RB200) và carboxy tetramethylrođamin (TAMRA), v.v..

Kit theo sáng chế còn có thể chứa chất pha loãng kháng thể, dung dịch rửa, chất chuẩn, và dung dịch chặn. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể tạo ra sự lựa chọn theo nhu cầu, nên sẽ không được nêu chi tiết ở đây.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất protein kháng nguyên có trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 3.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất gen mã hóa protein kháng nguyên theo khía cạnh thứ bảy. Tốt hơn là, theo sáng chế, trình tự cơ sở của gen mã hóa protein kháng nguyên nêu trên được thể hiện trên SEQ ID NO: 4.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp có gen theo khía cạnh thứ tám.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất thể biến nạp chứa vector tái tổ hợp theo khía cạnh thứ chín.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế còn đề xuất gen mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất.

Trình tự cơ sở của gen mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất có thể được thể hiện trên SEQ ID NO: 11.

Trình tự cơ sở của gen mã hóa chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng theo khía cạnh thứ nhất có thể được thể hiện trên SEQ ID NO: 12.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có hiệu giá tương đương với các sản phẩm nước ngoài tương tự, và có thể biểu hiện cường độ huỳnh quang cao và

lâu bền khi được dùng trong phát hiện RFFIT. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng được điều chế bằng cách tạo miễn dịch bằng protein kháng nguyên theo sáng chế (làm kháng nguyên) có hiệu giá cao.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết trong phần mô tả các phương án sau.

Số lưu trữ sinh vật

Tế bào lai theo sáng chế là tế bào lai của chuột, và được lưu trữ ở Trung tâm thu thập chủng vi sinh vật của Trung Quốc ((China General Microbiological Culture Collection Center: CGMCC), Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, #3, No. 1 Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing 100101) vào ngày 12 tháng 7 năm 2013, với số lưu trữ CGMCC 7956.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết như sau. Cần phải hiểu rằng các phương án được mô tả ở đây chỉ được dự định để minh họa và giải thích sáng chế, mà không giới hạn sáng chế.

Trong các ví dụ sau, virus bệnh dại được phân lập từ não của chó dại ở Bắc Kinh bởi trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh của Trung Quốc, trong khi DMEM và huyết thanh bào thai bò (fetal serum of bovine: FBS) được mua từ Thermo. Trong các ví dụ này, các thử nghiệm được thực hiện trong các điều kiện thông thường trong trường hợp mà điều kiện cụ thể không được chỉ rõ.

Ví dụ 1

(1) Điều chế protein kháng nguyên

Dựa vào tài liệu: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition (J. Sambrook *et al.*, Science Press, 2002), Chapters 7-8, toàn bộ ARN của tế bào bị nhiễm virus bệnh dại được tách chiết (trung tâm kiểm soát và

phòng ngừa bệnh của Trung Quốc được giao phó để thực hiện quy trình này). ADN bổ trợ tương ứng thu được bằng cách sao chép ngược, khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bổ trợ thu được bằng cách sao chép ngược làm khuôn mẫu. Đoạn mỗi ngược được dùng trong PCR được thể hiện trên SEQ ID NO: 5, và đoạn mỗi xuôi được thể hiện trên SEQ ID NO: 6.

Đoạn mỗi ngược: 5'-GAACCATATGGATGCCGACAAGATTGTG-3' (SEQ ID NO: 5)

Đoạn mỗi xuôi: 5'-ACCTCGAGTTATGAGTCATTCGAATACG-3' (SEQ ID NO: 6)

BGI được giao để xác định trình tự gen thu được bằng cách khuếch đại PCR, và trình tự cơ sở được xác định như được thể hiện trên SEQ ID NO: 4.

TTATGAGTCATTCGAATACGTCTTGTTTAGAACTCGGCGAATGAGTTTGGACGGG
CTTGATGATTGGAAGTACTGAGACATATCTCCGTATATGCGATCTTTTAGTCGACCTCC
ATTCATCATAATTCGAGCATAAACAGCTTCTGGACCTCTGGTTTCACCGGAGAAGTAGTCT
TCGTCATCAGAGTTGACAGTTCATCATCTGCCAATGCCACGTCAGTCTTTGTGAGTTCAG
CTGCCTCGTATTCTTGAAGTTCTTTCTCATCTCTGAAGAATCTTCTTTCGAATGTTCTCT
CCCAAAGAATTCCTCCCCTAGATAGCCCCCTAGAACAGACATCTCATGAGGAGCACATGCG
GCAATAACTGTTGCATTTAGGGATCTGATTTGACCCATATAGCATCCAACAAAGTGAATAA
GATTGAACACATGACCAACGGCATTTCGATGAATAAGGAGACTTCCCACTCAAGCCTAGTGA
ACGGAAGTGAATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCCGTCTCCTGCCCTGGCTCGAACATTCTT
CTTATCTCTTCCTCAAAGTTCTTATGGAAGAAGTACAATATTGCTTCTCTTGCGGTGAGAT
TGATCTGCTTTATGAACCCAGTAAACGATACCAGCCCTGAACAGTCTTCATAAGCAGTAAC
AACTGTGCCCCGCTCTGATTGCTGAATATAGATGCTCAATCCGAGAGAAAAACATGTCGTAG
GTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATGGTACTCCAATTAGCACACATTTTGTGAGTTG
TCATTAGAGTATGGTGCTCCACGATTTTAACAAAAGGAGCTGTTTCAAAAATCTGCTCTAT
CCTATCTGCAATGTTTGTTTTATAGTTACCGGTGTTTTGTCCTGATATTTTGCTCAACCTA
TACAGACTTAGGAGAAGACCAACCAAGATGCATGCTCAGAGACGGTGGGGTCCCTTGTCA
TCTCCATGCCCTCTGTGAGAGCCCAATTCCCTTCTACATCATTACGTTTTATTTCCACCAG
AGAATTTGGGGTGATCTTGTCTCCTTTTCGTGCAATCACGATTCCATAGCTGGTCCAGTCT
TCCGGACACGTCCCCTCAAAGAACTGCATTGCTGCTGCCAAGTAGGAACATACATCGTCGG
GATCAAGTTTGGCGGCATTCATGCCTGATAAACTGATTTGTATGCTTTGTTCAAGTCGGG

GGCTTTCCCTAGGGTTATACAGGGCTTTTTCAAATCTTTGATAGCAGGGTACTTGTACTCA
TATTGATCCGCGATAATCTCAGGCCTCAAAGAGACCACCTGATTATTAGCTCTGAACACAA
TCTTGTCGGCATCCAT (SEQ ID NO: 4)

Dựa vào tài liệu *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition (J. Sambrook *et al.*, Science Press, 2002), Chapters 1 and 15, gen với trình tự cơ sở như được thể hiện trên SEQ ID NO: 4 được chèn vào giữa các vị trí giới hạn NdeI và XhoI của pET28a⁺ (với đuôi His), để tạo thành plasmit pET28a⁺-RV tái tổ hợp. Sau đó, plasmit tái tổ hợp pET28a⁺-RV được chuyển thành chủng biểu hiện sinh vật tiền nhân *E. coli* BL21. Các dòng dương tính được sàng lọc và việc đưa vào thành công gen đích được xác minh bằng PCR (đoạn mỗi được thể hiện trên SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6), để điều chế thể biến nạp có khả năng biểu hiện gen nêu trên. Thể biến nạp này được nuôi cấy, và vi khuẩn được đánh sóng siêu âm để thu được dung dịch chứa protein kháng nguyên. Sau khi tinh chế, thu được dung dịch chứa 12,5mg/ml protein kháng nguyên (trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 3 dưới đây), được bảo quản ở -80°C trước khi sử dụng (thao tác cụ thể để tinh chế: lấy dung dịch chứa protein kháng nguyên, và lọc qua bộ lọc màng 0,45µm. Protein kháng nguyên tương ứng được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực ion DEAE. Sau khi tinh chế, mẫu được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, để chọn dung dịch tách rửa tốt nhất chứa thành phần kháng nguyên. Và ngoài ra, việc tinh chế ái lực cột niken được thực hiện).

MDADKIVFRANNQVVSLRPEIIADQYEEKYPAIKDLKKPCITLGKAPDLNKAYKSV
LSGMNAAKLDPDDVCSYLAAAMQFFEGTCPEDWTSYGIVIAARKGDKITPNSLVEIKRNDVE
GNWALTGGMEMTRDPTVSEHASLVGLLSLYRLSKISGQNTGNYKTNIADRIEQIFETAPF
VKIVEHHTLMTTHKMCANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRAGTVVTAYEDCSGL
VSFTGFIKQINLTAREAILYFFHKNFEEEIRRMFEPGQETAVPHSYFIHFRSLGLSGKSPY
SSNAVGHVFNLIHFVGCYMGQIRSLNATVIAACAPHEMSVLGGYLGEFFGRGTFERRFFR
DEKELQEYEAELTKTDVALADDGTVNSDDEDFSGETRGPEAVYARIMMNGGRLKRSHIR
RYVSVSSNHQARPNSFAEFLNKTYSNDS (SEQ ID NO: 3)

(2) Điều chế tế bào lai

Theo phương pháp được mô tả trong tài liệu: *Short Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, Science Press, 2009), Chapter 2, chuột Balb/c cái được gây miễn dịch bằng protein kháng nguyên thu được từ bước (1). Việc tách dòng phụ được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm pha loãng giới hạn, và các dòng dương tính được sàng lọc nhờ phương pháp ELISA (có dựa vào quy trình cơ bản trong tài liệu: *Short Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, Science Press, 2009), Chapter 1, section 1.1), cuối cùng là chọn lọc dòng tế bào đã được tách dòng mà có kết quả dương tính tốt nhất, tức là lượng biểu hiện kháng thể tốt nhất. Tế bào nuôi cấy được lưu trữ trong CGMCC vào ngày 12 tháng 7 năm 2013, với số lưu trữ CGMCC 7956.

(3) Điều chế kháng thể đơn dòng

Dựa vào tài liệu: *Short Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, Science Press, 2009), Chapter 1, nuôi cấy tế bào lai CGMCC 7956 thu được trong bước (2), và dựa vào tài liệu: *Short Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, Science Press, 2007), Chapter 8, kháng thể đơn dòng được tách chiết và được tinh chế từ môi trường nuôi cấy, do đó thu được kháng thể đơn dòng đã tinh chế (hoặc có thể thu được dựa vào phương pháp được mô tả trong điểm 2 của CN 101560255A).

(4) Xác định trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng

Dựa vào tài liệu: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition (J. Sambrook *et al.*, Science Press, 2002), Chapters 7 and 8, hoặc phương pháp được mô tả trong tài liệu: *Short Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, Science Press, 2009), ARN thông tin được tách chiết từ tế bào lai, trình tự gen mã hóa kháng thể đơn dòng được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp PCR sao chép ngược, để phân tích trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng tương ứng. Đoạn mã được sử dụng được nêu trong bảng

1. Trình tự ADN bổ trợ được xác định được thể hiện trên SEQ ID NO: 11 (chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 12 (chuỗi nặng) trong bảng 2. Và xác định rằng trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng lần lượt được thể hiện trên SEQ ID NO: 1 (chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 2 (chuỗi nặng) trong bảng 2.

Bảng 1

Vùng biến đổi	Đoạn mồi	Trình tự cơ sở
Chuỗi nhẹ	Đoạn mồi ngược	5'-GGGGATATCCACCATGATGAGTCCTGCCCAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 7)
	Đoạn mồi xuôi	5'-GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAGATGGA-3' (SEQ ID NO: 8)
Chuỗi nặng	Đoạn mồi ngược	5'-GGGGATATCCACCATGAACTTCGGGGTGAGCTGGGTTTT-3' (SEQ ID NO: 9)
	Đoạn mồi xuôi	5'-AGGTCTAGAATCTCCACACACAGGAGCCAGTGGATAGAC-3' (SEQ ID NO: 10)

Bảng 2

	Trình tự ADN bổ trợ	Trình tự axit amin
Chuỗi nhẹ	TCCACATGATGAGTCCTGCCCAGTTCTGTTTCTGT TAGTGCTCTGGATTCTGGGAAACCAACGGTGATGTTG TGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTATTA TTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTC AGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGGCATATTTGA ATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC GCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAG TCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG ATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATT TTCCTCAGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA TCAAACGGGCTGATGCGACCAACTGTATCCATCTCC CACCATCCATTT (SEQ ID NO: 11)	MMSPAQFLFLLVL WIRETNQDVVMTQ TPLTLSVLIIGQPA SISCKSSQSLDS DGKAYLNWLLQRP GQSPKRLIYLVSK LDSGVPDRFTGSG SGTDFTLKISRVE AEDLGVIYCWQGT HFPQTFGGGTKLE IKRADATNCIHLF PSI (SEQ ID NO: 1)
Chuỗi nặng	TGGGGGATATCCACCTAGAACTTCGGGGTGAGCTGG GTTTTCTTGCCCTCATTTTAAAAGGTGTCCAGTGT GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTTCACTAGCTATGCCATGTCTTGG GTTCTGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTC GCAATAATTAATAATGGTGGTAGTTTCACCTACTAT CCAGACAGTGTGAAGGGTTCGATTCACCATCTCCAGA GACAATGCCAAGAATACCCTGTACCTGCACATGACC AGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGT GCAAGACCTGGGATTGCTTACTGGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACAACAGCCCCA TCGGTCTATCCACTGGCTCCTGTGTGTGGAGATTCT AGACCATA (SEQ ID NO: 12)	MNFGVSWVFLALI LKGVQCEVQLVES GGGLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYA MSWVRQTPEKRLE WVAIINNGGSFTY YPDSVKGRFTISR DNAKNTLYLHMTS LRSEDAMYYCAR PGIAYWGQGLVT VSAAKTTAPSVYP LAPVCGDSRP (SEQ ID NO: 2)

(5) Xác định hiệu giá của kháng thể đơn dòng

Đầu tiên, theo tài liệu tham khảo: Tinh chế và ứng dụng kháng thể đơn dòng của virus bệnh dại (Liu Wentao et al., *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011), kháng thể đơn dòng được đánh dấu FITC, để thu được kháng thể được đánh dấu FITC dùng để kiểm tra RFFIT. Trong khi đó, lấy kháng thể được đánh dấu FITC và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Sự phát huỳnh quang có thể kéo dài tới 20 phút, thể hiện kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể biểu hiện đặc tính huỳnh quang tốt.

Kiểm tra RFFIT được thực hiện bằng cách sử dụng lần lượt kháng thể đơn dòng được đánh dấu FITC được cung cấp bởi LIGHT DIAGNOSTICS™ Rabies DFA Reagent được mua từ Millipore và kháng thể được đánh dấu FITC theo sáng chế, để phát hiện hiệu giá của 7 mẫu kháng thể. Quy trình cụ thể của kiểm tra RFFIT là như sau:

1) Môi trường đầy đủ (10% FBS trong DMEM) được trải trên toàn bộ đĩa (96 lỗ) với 100µL/lỗ.

2) 7 mẫu (nhà sản xuất như được nêu trong bảng 3, lần lượt được đánh số từ mẫu 1 đến 7) và tiêu chuẩn quốc gia (GB, mã NIBSC: RAI) được pha loãng liên tục trong ba lần, và quy trình cụ thể là như sau (lấy mẫu 1 làm ví dụ): 50µL mẫu 1 được bổ sung vào lỗ A1, và hút và thổi liên tục trong năm lần (trộn kỹ); 50µL được hút bằng pipet và được bổ sung vào lỗ A2, và hút và thổi liên tục trong năm lần; tiếp tục pha loãng cho đến lỗ A12, và hút 50µL. Các mẫu khác (kể cả mẫu 2-GB (24,4 IU)) được pha loãng theo cùng một phương pháp.

3) Virus bệnh dại được bổ sung vào ($1,12 \times 10^8$ tế bào/lỗ) (80% liều lây nhiễm: pha loãng virus gốc gấp 16 lần): 0,5mL virus gốc được bổ sung vào 7,5mL môi trường đầy đủ (10%), trộn kỹ, và bổ sung vào đĩa 96 lỗ như nêu trên với 50µL/lỗ.

4) Ủ ở 37°C trong 1 giờ, và bổ sung tế bào BHK được điều chế trước đó với 50µL/lỗ. Tế bào BHK: BHK-21 [C-13], ATCC®CCL-10™, với mật độ

khoảng 70%, 75cm² FLASK, 12mL môi trường đầy đủ, trộn kỹ.

5) Sau 24 giờ, môi trường nuôi cấy được hút ra khỏi đĩa, đĩa này được rửa bằng PBS một lần, và PBS được hút. Nó được cố định trong 80% axeton (-20°C) trong 15 phút, kháng thể đơn dòng được đánh dấu FITC được cung cấp bởi LIGHT DIAGNOSTICS™ Rabies DFA Reagent được mua từ Millipore và kháng thể được đánh dấu FITC theo sáng chế lần lượt được bổ sung vào, và sau đó nó được ủ ở 37°C trong 30 phút.

6) Kháng thể này được loại bỏ, và mỗi lỗ được rửa 3 lần liên tiếp bằng cách bổ sung 200µL PBS; 2 giọt 80% glyxerol được bổ sung nhỏ giọt vào mỗi lỗ, để phủ hoàn toàn đáy lỗ. Sau đó, quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang đảo ngược, và số lượng tiêu điểm huỳnh quang với 50% điểm ngưỡng liều lây nhiễm trong hai hệ phản ứng kháng thể được so sánh, để tính toán hiệu giá của mẫu. Kết quả kiểm tra RFFIT của kháng thể được đánh dấu FITC được nêu trong bảng 3, và kết quả kiểm tra RFFIT của kháng thể đơn dòng được đánh dấu FITC được cung cấp bởi LIGHT DIAGNOSTICS™ Rabies DFA Reagent được nêu trong bảng 4.

Bảng 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Hiệu giá của mẫu
A	Mẫu 1 (được mua từ Henan Hualan Biological Engineering Inc.)						10%	75%					63,53 IU
B	Mẫu 2 (được mua từ Shandong Michel Biochemical Products Co., Ltd.)					15%	65%						23,24 IU
C	Mẫu 3 (được mua từ Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd.)						5%	55%					86,84 IU
D	Mẫu 4 (được mua từ Shenzhen)						5%	65%					73,65 IU

	Weiwiguangming Biological Products Co., Ltd.)												
E	Mẫu 5 (được mua từ Wuhan Zhongyuanruide Biological Products Co., Ltd.)							15%	75%				183,98 IU
F	Mẫu 6 (được mua từ Shandong Taibang Biological Products Co., Ltd.)							25%	80%				159,71 IU
G	Mẫu 7 (được mua từ Sichuan Yuandashuyang Pharmaceutical Inc.)						45%	95%					36,06 IU
H	GB (24,4 IU)					25%	65%						

Bảng 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Hiệu giá của mẫu
A	Mẫu 1						10%	75%					63,53 IU
B	Mẫu 2					20%	70%						20,82 IU
C	Mẫu 3						10%	55%					85,79 IU
D	Mẫu 4						5%	65%					73,65 IU
E	Mẫu 5							20%	70%				187,38 IU
F	Mẫu 6							25%	80%				159,71 IU
G	Mẫu 7					5%	55%						28,95 IU
H	GB (24,4 IU)					25%	65%						

Các kết quả từ ví dụ này thể hiện rằng kháng thể đơn dòng thu được bởi sáng chế có hiệu giá tương đối cao. Cụ thể, kháng thể đơn dòng theo sáng chế có hiệu giá tương đương với các kháng thể tương tự của nước ngoài (kháng thể đơn dòng được cung cấp bởi LIGHT DIAGNOSTICS™ Rabies DFA Reagent), và kết quả tương tự thu được khi được sử dụng trong kiểm tra

RFFIT, do đó nó có thể được dùng làm kháng thể thay thế.

Ví dụ kiểm tra 1

Ví dụ kiểm tra này được dự định để minh họa việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để phát hiện kháng thể kháng virus bệnh dại trong huyết thanh cần kiểm tra.

Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh của tỉnh Henan được ủy thác để phát hiện kháng thể kháng virus bệnh dại trong 50 mẫu huyết thanh, bằng cách sử dụng kit RFFIT (LIGHT DIAGNOSTICS™ Rabies DFA Reagent, Cat No: 5100, Millipore) và kit được kiểm tra (trong đó kháng thể được đánh dấu FITC được thay thế bằng kháng thể FITC thu được trong bước (5) từ ví dụ 1, ngoại trừ kháng thể được đánh dấu FITC, tất cả các chất phản ứng khác lần lượt giống với các chất phản ứng trong kit RFFIT). Trong số 50 mẫu huyết thanh, có 3 mẫu huyết thanh từ các đối tượng không được tiêm chủng bằng vắc xin dại, 12 mẫu huyết thanh từ các đối tượng không được tiêm chủng đầy đủ bằng vắc xin dại (11 đối tượng được thực hiện bằng cách thu gom máu sau 4 lần tiêm, và một đối tượng được thực hiện bằng cách thu gom máu sau 3 lần tiêm), và 35 mẫu huyết thanh từ các đối tượng được tiêm chủng đầy đủ bằng vắc xin dại. Vắc xin dại của người (số lô: 201109269) được tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào Vero do Liaoning Chengda Bio Co., Ltd. sản xuất được sử dụng để tiêm chủng. Việc thu thập mẫu tuân theo luật và quy định quốc gia. Tất cả các bệnh nhân đều đồng ý tham gia nghiên cứu trước khi thu thập mẫu. Quy trình kiểm tra cụ thể đề cập đến hướng dẫn của kit, và các kết quả được nêu trong bảng 5.

Bảng 5

Mẫu số	Số lần tiêm chủng	Kết quả kiểm tra (IU)	
		Kháng thể của sáng chế	Kháng thể được mua trên thị trường
01	4 lần tiêm	16,68	1,40
02	4 lần tiêm	170,38	115,37
03	4 lần tiêm	50,03	3,96
04	4 lần tiêm	6,68	0,84
05	4 lần tiêm	16,68	4,55
06	4 lần tiêm	14,94	3,96
07	4 lần tiêm	4,22	0,84
08	4 lần tiêm	38,01	9,04
09	4 lần tiêm	38,01	3,62
10	4 lần tiêm	167,52	72,87
11	4 lần tiêm	4,22	0,72
12	5 lần tiêm	12,67	2,17
13	5 lần tiêm	33,79	6,87
14	5 lần tiêm	20,03	9,04
15	5 lần tiêm	17,73	3,01
16	5 lần tiêm	16,68	2,29
17	5 lần tiêm	16,68	1,56
18	5 lần tiêm	38,01	7,52
19	5 lần tiêm	58,12	10,85
20	5 lần tiêm	6,68	0,72
21	5 lần tiêm	78,12	19,50
22	5 lần tiêm	38,01	6,50
23	5 lần tiêm	33,79	9,04
24	5 lần tiêm	33,79	3,01
25	5 lần tiêm	25,18	9,04
26	5 lần tiêm	7,89	1,32
27	5 lần tiêm	8,52	3,01
28	5 lần tiêm	50,03	9,04

29	5 lần tiêm	4,63	1,00
30	5 lần tiêm	33,79	12,57
31	5 lần tiêm	170,38	115,37
32	5 lần tiêm	2,23	0,68
33	5 lần tiêm	18,61	7,52
34	5 lần tiêm	16,68	4,09
35	5 lần tiêm	50,03	18,31
36	5 lần tiêm	22,63	3,62
37	5 lần tiêm	38,01	8,35
38	5 lần tiêm	14,94	4,67
39	5 lần tiêm	70,97	27,11
40	5 lần tiêm	21,95	3,01
41	5 lần tiêm	55,84	10,85
42	5 lần tiêm	50,03	10,85
43	5 lần tiêm	20,60	11,89
44	5 lần tiêm	65,84	20,60
55	5 lần tiêm	4,98	2,29
59	5 lần tiêm	38,01	11,89
45	Tử vong	0,74	0,68
54	Không được tiêm chủng	0,28	0,24
52	3 lần tiêm	0,67	0,76
53	Không được tiêm chủng	0,28	0,26
46	Không được tiêm chủng	0,24	0,24
SR	Tiêu chuẩn hóa	33,79	20,60
PC	Tiêu chuẩn hóa	8,52	6,87
NC	Tiêu chuẩn hóa	0,10	0,14

Các kết quả kiểm tra từ các phương pháp sử dụng kháng thể được đánh dấu FITC có sẵn trên thị trường và kháng thể được đánh dấu FITC theo sáng chế về cơ bản là phù hợp. Do đó, còn có thể thấy rằng hiệu giá của kháng thể đơn dòng thu được bởi sáng chế là cao, và kết quả kiểm tra chính xác có thể thu được trong khi sử dụng nó cho kiểm tra RFFIT.

Các ví dụ và ví dụ kiểm tra nêu trên thể hiện rằng kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất phản ứng chẩn đoán thay cho các kháng thể tồn tại và có cường độ huỳnh quang tương đối cao và lâu bền, do đó có thể đạt được kết quả đáng tin cậy.

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế được mô tả chi tiết ở trên. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở việc mô tả chi tiết các phương án nêu trên. Trong phạm vi của phương án kỹ thuật theo sáng chế, nhiều thay đổi đơn giản có thể được thực hiện đối với phương án kỹ thuật của sáng chế. Tất cả các cải biến đơn giản này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo cách khác, lưu ý rằng mỗi dấu hiệu kỹ thuật cụ thể của các phương án nêu trên có thể được kết hợp theo cách thích hợp bất kỳ, với điều kiện là không xuất hiện sự mâu thuẫn. Để tránh sự lặp lại không cần thiết, sáng chế sẽ không giải thích thêm các kết hợp khác nhau có thể.

Ngoài ra, các phương án khác nhau theo sáng chế còn có thể được kết hợp tùy ý miễn là nó không chống lại hệ tư tưởng của sáng chế, và chúng cũng được coi là một phần của nội dung được mô tả.

YÊU CẦU BẢO HỘ:

1. Kháng thể đơn dòng có vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trên SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trên SEQ ID NO: 2.
2. Tế bào lai với số lưu trữ CGMCC 7956.
3. Kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai với số lưu trữ CGMCC 7956.
4. Kit được dự định để phát hiện kháng thể kháng virus bệnh dại trong mẫu được kiểm tra, trong đó kit này chứa kháng thể đơn dòng được đánh dấu huỳnh quang và chất định hình, và kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng theo điểm 1 hoặc 3.
5. Protein kháng nguyên có trình tự axit amin như được thể hiện trên SEQ ID NO: 3.
6. Gen mã hóa protein kháng nguyên theo điểm 5.
7. Gen theo điểm 6, trong đó trình tự cơ sở của gen được thể hiện trên SEQ ID NO: 4.
8. Vector tái tổ hợp chứa gen theo điểm 6 hoặc 7.
9. Thẻ biến nạp chứa vector tái tổ hợp theo điểm 8.
10. Gen mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng theo điểm 1.
11. Gen theo điểm 10, trong đó trình tự cơ sở của gen mã hóa chuỗi nhẹ được thể hiện trên SEQ ID NO: 11, và trình tự cơ sở của gen mã hóa chuỗi nặng được thể hiện trên SEQ ID NO: 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BEIJING APOLLO MEDICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO.LTD

<120> Kháng thể đơn dòng và kháng nguyên và gen của chúng, và sử dụng chúng

<130> PCT28197JIT

<160> 12

<170> Patent phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> Tế bào lai của chuột với số lưu trữ CGMCC 7956

<400> 1

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
20 25 30

Val Ile Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Ala Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Thr Asn Cys Ile His Leu Pro Pro
130 135 140

Ser Ile
145

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> Tế bào lai của chuột với số lưu trữ CGMCC 7956

<400> 2

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ile Ile Asn Asn Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu His Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 130 135 140
 Ala Pro Val Cys Gly Asp Ser Arg Pro
 145 150
 <210> 3
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Virut bệnh dại
 <400> 3
 Met Asp Ala Asp Lys Ile Val Phe Arg Ala Asn Asn Gln Val Val Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Pro Glu Ile Ile Ala Asp Gln Tyr Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala
 20 25 30
 Ile Lys Asp Leu Lys Lys Pro Cys Ile Thr Leu Gly Lys Ala Pro Asp
 35 40 45
 Leu Asn Lys Ala Tyr Lys Ser Val Leu Ser Gly Met Asn Ala Ala Lys
 50 55 60
 Leu Asp Pro Asp Asp Val Cys Ser Tyr Leu Ala Ala Ala Met Gln Phe
 65 70 75 80
 Phe Glu Gly Thr Cys Pro Glu Asp Trp Thr Ser Tyr Gly Ile Val Ile
 85 90 95
 Ala Arg Lys Gly Asp Lys Ile Thr Pro Asn Ser Leu Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Asn Asp Val Glu Gly Asn Trp Ala Leu Thr Gly Gly Met Glu Met
 115 120 125

Thr Arg Asp Pro Thr Val Ser Glu His Ala Ser Leu Val Gly Leu Leu
 130 135 140
 Leu Ser Leu Tyr Arg Leu Ser Lys Ile Ser Gly Gln Asn Thr Gly Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Asn Ile Ala Asp Arg Ile Glu Gln Ile Phe Glu Thr Ala
 165 170 175
 Pro Phe Val Lys Ile Val Glu His His Thr Leu Met Thr Thr His Lys
 180 185 190
 Met Cys Ala Asn Trp Ser Thr Ile Pro Asn Phe Arg Phe Leu Ala Gly
 195 200 205
 Thr Tyr Asp Met Phe Phe Ser Arg Ile Glu His Leu Tyr Ser Ala Ile
 210 215 220
 Arg Ala Gly Thr Val Val Thr Ala Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Phe Thr Gly Phe Ile Lys Gln Ile Asn Leu Thr Ala Arg Glu Ala
 245 250 255
 Ile Leu Tyr Phe Phe His Lys Asn Phe Glu Glu Glu Ile Arg Arg Met
 260 265 270
 Phe Glu Pro Gly Gln Glu Thr Ala Val Pro His Ser Tyr Phe Ile His
 275 280 285
 Phe Arg Ser Leu Gly Leu Ser Gly Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Asn Ala
 290 295 300
 Val Gly His Val Phe Asn Leu Ile His Phe Val Gly Cys Tyr Met Gly
 305 310 315 320
 Gln Ile Arg Ser Leu Asn Ala Thr Val Ile Ala Ala Cys Ala Pro His
 325 330 335
 Glu Met Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Gly Glu Glu Phe Phe Gly Arg
 340 345 350
 Gly Thr Phe Glu Arg Arg Phe Phe Arg Asp Glu Lys Glu Leu Gln Glu
 355 360 365
 Tyr Glu Ala Ala Glu Leu Thr Lys Thr Asp Val Ala Leu Ala Asp Asp
 370 375 380
 Gly Thr Val Asn Ser Asp Asp Glu Asp Tyr Phe Ser Gly Glu Thr Arg
 385 390 395 400
 Gly Pro Glu Ala Val Tyr Ala Arg Ile Met Met Asn Gly Gly Arg Leu
 405 410 415

Lys Arg Ser His Ile Arg Arg Tyr Val Ser Val Ser Ser Asn His Gln
 420 425 430

Ala Arg Pro Asn Ser Phe Ala Glu Phe Leu Asn Lys Thr Tyr Ser Asn
 435 440 445

Asp Ser
 450

<210> 4
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

<400> 4
 ttatgagtca ttcgaatacg tcttgtttag aaactcggcg aatgagtttg gacgggcttg 60
 atgattggaa ctgactgaga catatctccg tatatgcatg ctttttagtc gacctccatt 120
 catcataatt cgagcataaa cagcttcttg acctctggtt tcaccggaga agtagtcttc 180
 gtcacagag ttgacagttc catcatctgc caatgccacg tcagtctttg tcagttcagc 240
 tgcctcgtat tcttgaagtt ctttctcatc tctgaagaat cttctttcga atgttcctct 300
 cccaaagaat tcctccccta gatagcccc tagaacagac atctcatgag gagcacatgc 360
 ggcaataact gttgcattta gggatctgat ttgaccata tagcatccaa caaagtgaat 420
 aagattgaac acatgaccaa cggcattcga tgaataagga gacttccac tcaagcctag 480
 tgaacggaag tgaatgaaat aagagtgagg aacagccgtc tcctgccctg gctcgaacat 540
 tcttcttata tcttctcaa agttcttatg gaagaagtac aatattgctt ctcttgcggt 600
 gagattgatc tgctttatga acccagtaaa cgataccagc cctgaacagt cttcataagc 660
 agtaacaact gtgcccgctc tgattgctga atatagatgc tcaatccgag agaaaaacat 720
 gtcgtaggtt cgggccaaaa atctgaagtt cgggtatggt ctccaattag cacacatatt 780
 gtgagttgtc attagagtat ggtgctccac gattttaaca aaaggagctg tttcaaaaat 840
 ctgctctatc ctatctgcaa tgtttgtttt atagttaccg gtgttttgct ctgatatttt 900
 gctcaaccta tacagactta ggagaagacc aaccaaagat gcatgctcag agacggtggg 960
 gtcccttgct atctccatgc ctctgtcag agcccaattc cttctacat cattacgttt 1020
 tatttccacc agagaatttg gggatgctt gtctcctttt cgtgcaatca cgattccata 1080
 gctggtccag tcttccggac acgtcccctc aaagaactgc attgctgctg ccaagtagga 1140
 acatacatcg tcgggatcaa gtttggcggc attcatgcct gataaaactg atttgatagc 1200
 tttgttcaag tcgggggctt tccctagggg tatacagggc tttttcaaat ctttgatagc 1260
 aggggtactg tactcatatt gatccgcatg aatctcaggc ctcaaagaga ccacctgatt 1320
 attagctctg aacacaatct tgtcggcatc cat 1353

<210> 5
 <211> 28

<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	5	
	gaaccatatg gatgccgaca agattgtg	28
<210>	6	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	6	
	acctcgagtt atgagtcatt cgaatacg	28
<210>	7	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	7	
	ggggatatcc accatgatga gtcctgcca gttcc	35
<210>	8	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	8	
	gcgtctagaa ctggatggtg ggagatgga	29
<210>	9	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	9	
	ggggatatcc accatgaact tcggggtgag ctgggtttt	39
<210>	10	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự được tổng hợp	
<400>	10	
	aggtctagaa tctccacaca caggagccag tggatagac	39

<210> 11
 <211> 444
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

<400> 11
 tccacatgat gagtcctgcc cagttcctgt ttctgttagt gctctggatt cgggaaacca 60
 acggtgatgt tgtgatgacc cagactccac tcactttgtc ggttattatt ggacaaccag 120
 cctccatctc ttgcaagtca agtcagagcc tcttagatag tgatggaaag gcatatttga 180
 attggttggt acagaggcca ggccagtctc caaagcgcct aatctatctg gtgtctaaac 240
 tggactctgg agtccctgac aggttcactg gcagtggatc agggacagat ttcacactga 300
 aaatcagcag agtggaggct gaggatttgg gagtttatta ttgctggcaa ggtacacatt 360
 ttcctcagac gttcggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gcgaccaact 420
 gtatccatct cccaccatcc attt 444

<210> 12
 <211> 476
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

<400> 12
 tgggggatat ccacctagaa cttcgggggtg agctggggtt tccttgccct cattttaaaa 60
 ggtgtccagt gtgaagtgca gctggtggag tctgggggag gcttagtgaa gcctggaggg 120
 tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagctatgc catgtcttgg 180
 gttcgccaga ctccggagaa gaggctggag tgggtcgcaa taattaataa tgggtgtagt 240
 ttcacctact atccagacag tgtgaagggt cgattcacca tctccagaga caatgccaaag 300
 aataccctgt acctgcacat gaccagtctg aggtctgagg acacggccat gtattactgt 360
 gcaagacctg ggattgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa 420
 acaacagccc catcgggtcta tccactggct cctgtgtgtg gagattctag accata 476