



(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)



1-0038919

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 7/00; A61K 9/00;
A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2015-02461

(22) 03/12/2013

(86) PCT/US2013/072922 03/12/2013

(87) WO/2014/089117 12/06/2014

(30) 61/734,919 07/12/2012 US

(45) 26/02/2024 431

(43) 26/10/2015 331A

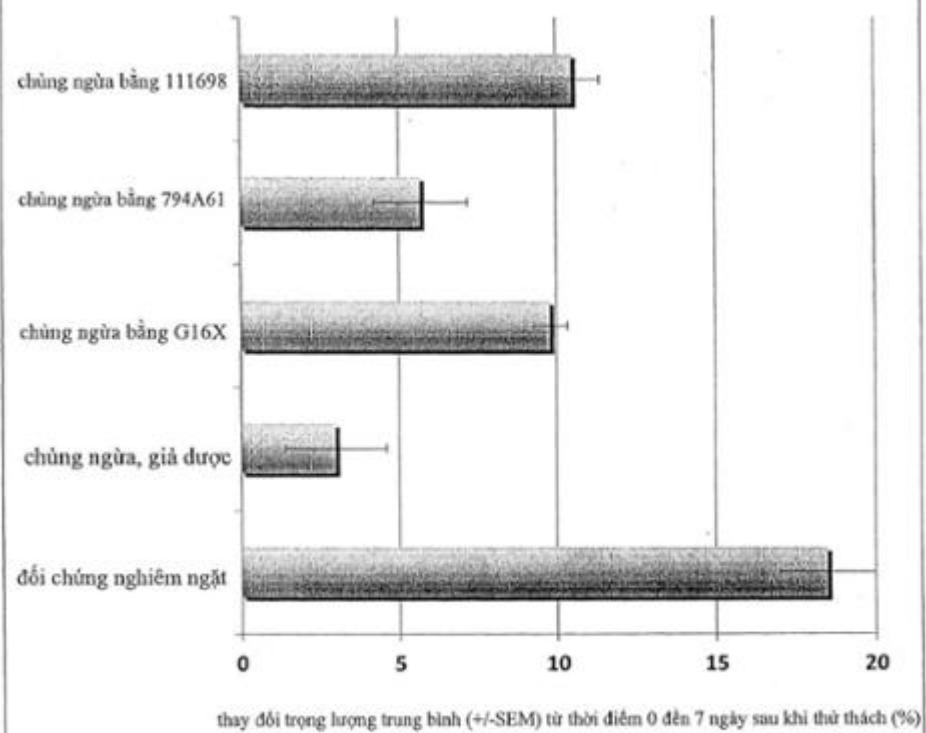
(73) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (US)
352 Henry Admin Bldg. 506 S. Wright Street Urbana, Illinois 61801 - US

(72) ZUCKERMANN, Federico (US); CALZADA-NOVA, Gabriela (MX);
SCHNITZLEIN, William (US).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) VIRUT GÂY HỘI CHỨNG HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN ĐƯỢC PHÂN LẬP
VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) được phân lập, chế phẩm chứa virus được phân lập này, và phương pháp sử dụng virus được phân lập này. Virus được phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng để gây miễn dịch ở động vật có vú, bao gồm lợn. Sáng chế cũng liên quan đến phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại virus PRRS ở lợn bằng cách sử dụng chế phẩm chứa virus được phân lập nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome), và sử dụng chế phẩm này, kể cả làm vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) được đặc trưng bởi sự suy giảm sinh sản nghiêm trọng và tỷ lệ sảy thai muộn cao và sinh sớm ở lợn cái, và bệnh hô hấp và chết ở lợn con. PRRS gây ra bởi loại virut nhỏ, có vỏ bọc, có hệ gen ARN sợi đơn, dương, thuộc họ Arteriviridae, giống Arterivirus. Virut PRRS sao chép tự nhiên trong đại thực bào phế nang, và có thể duy trì virut- huyết trong một khoảng thời gian dài, gây ra các bệnh nhiễm trùng dai dẳng kéo dài hàng tháng trong một số trường hợp. Bệnh này đột ngột xuất hiện vào cuối những năm 80 của thế kỷ 20 ở Mỹ và châu Âu, và từ đó lan ra khắp thế giới, gây ra các tổn thất lớn về mặt kinh tế cho ngành công nghiệp chăn nuôi lợn. Virut này có thể tiếp tục tồn tại ở các trang trại bị nhiễm bệnh, chủ yếu là do sự có mặt của nó trong lợn cái mang mầm bệnh dai dẳng.

Virut PRRS được phân loại thành hai kiểu gen dựa trên lục địa xuất xứ của nó. Chủng virut PRRS bắt nguồn từ Bắc Mỹ được phân loại là kiểu gen typ 2, trong lúc đó chủng virut PRRS bắt nguồn từ châu Âu được xác định là kiểu gen typ 1. Hiện nay, cả hai kiểu gen này lan truyền trên toàn cầu. Hai kiểu gen này khác nhau khoảng 40% ở mức hệ gen và còn khác biệt về huyết thanh học. Các thể phân lập trong mỗi kiểu gen cũng thể hiện mức không đồng nhất trình tự nucleotit đáng kể lên đến 20%. Virut PRRS dường như tiến hóa bằng cách đột biến ngẫu nhiên và tái tổ hợp trong gen.

Dựa trên việc phân tích trình tự của chủng Tây Ban Nha, ước tính rằng virut PRRS có tỷ lệ đột biến nằm trong khoảng từ 1 đến 3×10^{-2} đột biến thay thế đối với mỗi vị trí và năm, tương tự như tỷ lệ đột biến của các virut ARN tiến hóa nhanh khác. Sự biến đổi gen không nổi bật của virut PRRS quan sát được trong suốt 25 năm cuối và sự xuất hiện trong phạm vi các thể phân lập của virut PRRS tạo ra bệnh suất cao hơn và tỷ lệ chết cao hơn các thể phân lập sớm hơn là đáng chú ý. Ngoài ra, sự thật là mỗi nguồn virut PRRS

gốc thường tồn tại dưới dạng hỗn hợp các loài có liên quan về mặt di truyền đang được nhận diện ngày càng tăng.

Dạng sinh học thông thường được sử dụng trong thuốc thú y để bảo vệ động vật khỏi các bệnh virus bao gồm vaccin virus sống đã biến đổi (MLV: Modified Live Vaccine). Phương pháp được sử dụng thường xuyên nhất để sản xuất vaccin chứa virus sống giảm độc lực là tiến hành cấy chuyển liên tiếp virus gây bệnh trong nền (thường là môi trường nuôi cấy tế bào) không phải là tế bào vật chủ tự nhiên và/hoặc trong các điều kiện đối nghịch cho tới khi nó bị giảm độc lực đủ từ độc lực nguyên thủy của nó (khả năng gây bệnh), nhưng vẫn giữ nguyên được khả năng gây miễn dịch bảo vệ của nó. Vào năm 1996, vaccin MLV đầu tiên được đưa vào thị trường Bắc Mỹ và vaccin này dựa trên chủng VR-2332 của virus PRRS đã phân lập vào năm 1991. Chủng vaccin giảm độc lực này được tạo ra bằng 25 lần cấy chuyển liên tiếp virus này ở 35-37°C trong tế bào thận khỉ (simian) (MA-104/MARC-145), tiếp theo là 12 lần cấy chuyển bổ sung ở 31°C trong cùng một loại tế bào, cho tổng cộng 36 lần cấy chuyển.

Sau đó, do sự giảm nhận thấy được ở hiệu lực bảo vệ của vaccin MLV PRRS gốc, có thể do các thay đổi di truyền tiến hóa trong hệ gen của các thể phân lập virus PRRS phổ biến, làm xuất hiện nhiều chủng khác biệt (khác loại) về độc tính và di truyền của virus PRRS, một kiểu vaccin MLV thứ hai của được đưa ra vào năm 1999. Cơ sở của sáng kiến này là để tăng tính đồng nhất di truyền của chủng vaccin cao hơn tính đồng nhất di truyền của các virus hiện nay lan truyền trong khoảng cuối những năm 90 của thế kỷ 20. Chủng vaccin giảm độc lực này được tạo ra từ virus PRRS JA-142 phân lập từ trường hợp mắc PRRS nghiêm trọng năm 1997 và là kết quả của bước cấy chuyển liên tiếp thứ 200 của thể phân lập này ở nhiệt độ 37°C trong trong dòng tế bào thận khỉ MARC-145. Hai thể phân lập tổ tiên đối với các vaccin này, VR-2332 và JA-142, đã được mô tả là tương ứng có mức độc tính trung bình và cao, điều đó giải thích nhu cầu cần đến số lần cấy chuyển vừa phải trong các điều kiện đối nghịch (VR-2332) hoặc số lần cấy chuyển liên tiếp cao hơn nhiều trong môi trường yếu hơn (JA-142) trong môi trường nuôi cấy tế bào để tạo ra virus giảm độc lực dùng cho vaccin. Đặc biệt là, việc cấy nhiễm các chủng virus PRRS giảm độc lực cho lợn tạo ra virus huyết kéo dài trên 4 tuần. Trong thời gian này virus được tỏa ra trong các chất bài tiết của cơ thể, tạo ra sự truyền virus vaccin đến các động vật chưa được tiêm chủng. Kết quả là, việc sử dụng các vaccin này dẫn đến sự đảo nghịch của chúng từ dạng giảm độc lực thành kiểu hình có độc tính.

Việc gây nhiễm lợn bằng virus PRRS kiểu đại hoặc việc chủng ngừa chúng bằng dạng tác nhân gây bệnh sống giảm độc lực này tạo ra các kháng thể đặc hiệu nhưng không trung hòa virus và tạo ra ít kháng thể trung hòa. Ngoài ra, trong thời gian này, các lượng giới hạn của tế bào tiết (SC: Secreting Cell) interferon (IFN) gamma được tạo ra.

Việc tạo ra các kháng thể trung hòa virus cũng như SC IFN gamma đặc hiệu virus được cho là yếu tố quyết định chính để tạo ra tính miễn dịch bảo vệ chống lại virus PRRS. Thừa nhận rằng virus PRRS vốn đã kích thích sự mất cân bằng (nghĩa là, đáp ứng thể dịch mạnh được đặc trưng bởi sự sản sinh dư thừa các kháng thể không trung hòa và tính miễn dịch tế bào trên cơ sở IFN gamma, qua trung gian tế bào T, bị giới hạn, nhưng có khả năng bảo vệ) và các đáp ứng miễn dịch không bảo vệ. Trước đây đã có đề xuất rằng biến số có liên quan nhất xác định sự phát triển của đáp ứng miễn dịch thích nghi không bảo vệ thường quan sát được với việc tiêm chủng hoặc gây nhiễm là thiếu đáp ứng miễn dịch bẩm sinh phù hợp tạo ra bởi virus PRRS. Thông thường, các tế bào bị nhiễm virus tiết ra IFN typ I (IFN alpha và IFN beta), tạo ra các thay đổi về mặt phân tử trong các tế bào lân cận để giúp chúng tự bảo vệ không bị nhiễm virus. Đặc biệt là, đáp ứng IFN alpha của lợn với sự nhiễm virus PRRS gần như là không tồn tại.

Đã mặc nhiên công nhận rằng việc không có mặt đáp ứng miễn dịch bẩm sinh không phù hợp với sự nhiễm hoặc chủng ngừa bởi virus PRRS có thể ít nhất một phần chịu trách nhiệm sản sinh chậm các kháng thể trung hòa virus đặc hiệu và phát triển mở rộng đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào của lợn chống lại virus này. Do đó, virus PRRS có thể kìm hãm sự phát triển của đáp ứng kiểu Th- 1 bằng cách không tạo ra IFN alpha đủ khi vật chủ bị nhiễm. Về điều này, biết được rằng các tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDC: Plasmacytoid Dendritic Cell) có một vai trò trung tâm trong quá trình cảm ứng trạng thái kháng virus sớm do việc tiết IFN alpha nhanh chóng và thừa thãi của chúng ngoài các cytokin khác, ví dụ yếu tố hoại tử khối u (TNF: Tumor Necrosis Factor) alpha và interleukin 6 (IL-6), có tác động đáng kể lên sự phát triển của tính miễn dịch thích nghi. Dù là pDC chỉ là một phân đoạn nhỏ (<1%) của quần thể tế bào đơn nhân máu ngoại vi của lợn (PBMC: Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cell), điều này giải thích cho việc phần lớn IFN alpha tiết ra trong các mẫu PBMC mới phân lập của lợn. Đặc biệt là, không giống với các virus khác của lợn kích thích pDC tiết ra các lượng IFN alpha dư thừa, virus PRRS tạo ra ít đáp ứng IFN alpha bởi tiểu quần thể tế bào này, và thậm chí có ảnh hưởng bất lợi lên chức năng của chúng bằng cách ức chế một cách mạnh

mẽ khả năng của pDC đã kích thích trong việc tiết IFN alpha và TNF alpha. Sự cản trở này có thể được mong đợi một cách hợp lý là có tác động đáng kể lên bản chất của đáp ứng miễn dịch thích nghi tiếp theo của vật chủ. Hỗ trợ cho giả thuyết này được đề xuất bằng cách tăng cường tác dụng tạo ra nguồn IFN alpha ngoại sinh tại thời điểm gây miễn dịch bằng vaccin PRRS MLV lên cường độ của đáp ứng IFN gamma qua trung gian tế bào T đặc hiệu virus PRRS.

Trong lĩnh vực này, rất cần một vaccin có hiệu lực và kinh tế để bảo vệ lợn khỏi tác động của bệnh nhiễm PRRS sao cho tối thiểu hóa được các tổn thất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất ở đây thể phân lập của Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS). Hệ gen của thể phân lập của virus này có thể mã hóa protein được chọn từ nhóm bao gồm protein E chứa valin ở vị trí 31 liên quan đến SEQ ID NO: 25, protein E chứa alanin ở vị trí 60 liên quan đến SEQ ID NO: 25, hoặc protein GP3 chứa valin ở vị trí 94 liên quan đến SEQ ID NO: 21. Hệ gen của thể phân lập của virus này cũng có thể mã hóa protein E chứa valin ở vị trí 31 liên quan đến SEQ ID NO: 25, protein E chứa alanin ở vị trí 60 liên quan đến SEQ ID NO: 25, và protein GP3 chứa valin ở vị trí 94 liên quan đến SEQ ID NO: 21. Hệ gen của thể phân lập của virus này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc thể tương đương ARN của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất ở đây vaccin chứa thể phân lập của virus này và chất mang được dụng. Vaccin theo sáng chế còn có thể chứa chất phụ trợ miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất ở đây phương pháp gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với virus PRRS ở động vật có vú, mà có thể bao gồm bước cho động vật có vú cần điều trị sử dụng vaccin này. Vaccin theo sáng chế còn có thể chứa chất phụ trợ miễn dịch.

Theo một phương án, chất phụ trợ miễn dịch có thể là interferon alpha (IFN- α); interferon beta (IFN- β); interleukin-12; interleukin-15, interleukin-18; interferon α mã hóa axit nucleic; interleukin-12 mã hóa axit nucleic; interleukin-15 mã hóa axit nucleic; interleukin-18 mã hóa axit nucleic; interleukin β mã hóa axit nucleic; chất có tác dụng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon α ; chất có tác dụng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon β ; poly IC; hoặc poly ICLC. Chất phụ trợ miễn

dịch có thể được sử dụng đồng thời với vaccin, trong vòng 24 giờ sau khi sử dụng vaccin, hoặc trong vòng 24 giờ trước khi sử dụng vaccin. Việc sử dụng này có thể là trong cơ, trong chân bì, ở niêm mạc, qua đường miệng, dưới lưỡi, trong mắt, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, khu trú, hoặc qua chân bì. Việc sử dụng này có thể là trong cơ.

Sáng chế còn đề xuất ở đây thể phân lập của Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) được lưu trữ bởi Cơ quan lưu trữ tế bào nuôi cấy Mỹ (ATCC: American Type Culture Collection) có số lưu trữ là ATCC Patent Deposit No. PTA-120658.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng đã được phân lập của Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), trong đó chủng này là G16X, 111698, hoặc 794A61. Theo một phương án, chủng này là G16X. Theo một phương án, chủng này có trình tự ARN hệ gen nêu trong SEQ ID NO:1 (chủng G16X). Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng đã được phân lập của Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), trong đó chủng này có trình tự ARN hệ gen nêu trong SEQ ID NO:1 (chủng G16X) hoặc SEQ ID NO:3 (chủng 111698). Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng đã được phân lập của PRRSV có trình tự protein E được đặc trưng bởi các trình tự nêu trong SEQ ID NO:12 và SEQ ID NO:14; trình tự GP3 được đặc trưng bởi SEQ ID NO:16 hoặc SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:17; trình tự Nsp2 được đặc trưng bởi SEQ ID NO:7; và/hoặc trình tự GP4 được đặc trưng bởi SEQ ID NO:19.

Theo một phương án 6, sáng chế đề xuất chủng đã được phân lập của PRRSV, trong đó chủng này có trình tự axit nucleic đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:1 (G16X) và có một hoặc nhiều thay thế axit amin đã mã hóa liên quan đến trình tự protein của chủng virut PRRS 89-46448-40, được chọn từ nhóm bao gồm: Protein Nsp2 V/M67V; Protein Nsp2 P/S490P, Nsp2 P495L; Nsp2 Y338H; Protein E I31V; Protein E T60A; Protein GP3 I94V; và Protein GP3 P/S96S. Theo một phương án, chủng này có một hoặc nhiều axit amin đã mã hóa như sau: Protein Nsp2 67V; Protein Nsp2 490P; Protein Nsp2 Y338H; Protein Nsp2 P495L; Protein E 31V; Protein E 60A; Protein GP3 94V; Protein GP3 L213F; Protein GP3 96S và Protein GP4 A32S. Theo các phương án khác, chủng này có mức đồng nhất tính theo phần trăm như được mô tả ở đây. Theo một phương án, có lợi nếu chủng vaccin của PRRSV có kiểu hình có đáp ứng interferon alpha cao, ví dụ, bởi các đại thực bào khi được sử dụng ở lợn.

Theo phương án 7, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa ít nhất một

Theo phương án 7, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa ít nhất một chủng PRRSV đã phân lập được chọn từ nhóm bao gồm G16X, 111698, và chủng theo phương án 6, và còn chứa chất mang được dùng để sử dụng trong thí nghiệm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) ở động vật, trong đó trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật sử dụng chế phẩm gây miễn dịch được mô tả ở đây. Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch còn chứa chất phụ trợ miễn dịch.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch còn chứa chất phụ trợ miễn dịch. Theo một phương án, chất phụ trợ miễn dịch chứa ít nhất một trong số interferon α , interferon β , interleukin-12, interleukin-15, interleukin-18, interferon α mã hóa axit nucleic được biểu hiện trong tế bào của lợn, interleukin-12 mã hóa axit nucleic được biểu hiện trong tế bào của lợn, interleukin-15 mã hóa axit nucleic được biểu hiện trong tế bào của lợn, interleukin-18 mã hóa axit nucleic được biểu hiện trong tế bào của lợn, interleukin β mã hóa axit nucleic được biểu hiện trong tế bào của lợn, chất có tác dụng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon β hoặc interferon α hoặc cả hai, và poly IC hoặc poly ICLC. Theo một phương án, chất phụ trợ miễn dịch được sử dụng đồng thời với chế phẩm gây miễn dịch, trong vòng 24 giờ sau khi sử dụng chế phẩm gây miễn dịch, hoặc trong vòng 24 giờ trước khi sử dụng chế phẩm gây miễn dịch.

Theo một phương án, đường sử dụng chế phẩm gây miễn dịch là trong cơ, trong chân bì, ở niêm mạc, qua đường miệng, dưới lưỡi, trong mắt, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, khu trú, hoặc qua chân bì. Theo một phương án, đường sử dụng là trong cơ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa sự thay đổi thể trọng (%) ở lợn ở thời điểm 7 và 14 ngày sau khi nhiễm các thể phân lập virus PRRS 89-46448-40, NADC-20 hoặc chất cấy nhiễm giả. Phần trăm tăng thể trọng được xác định dựa trên trọng lượng tại thời điểm kích thích. Tính giá trị trung bình ($\pm$ SEM) của mỗi nhóm.

Fig.2 thể hiện mức virus huyết trong huyết thanh sau khi lợn bị nhiễm thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 hoặc NADC-20 hoặc chất cấy nhiễm giả. Lượng virus nhiễm ($TCID_{50}/ml$) trong mẫu huyết thanh của lợn được xác định trong tế bào ZMAC (ATCC

No. PTA-8764, tế bào mô phổi *Sus scrofa* (lợn/heo)).

Fig.3 chứng minh điểm số bệnh học chung ở phổi lợn bị nhiễm 14 ngày đầu bởi các thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 hoặc NADC-20, hoặc chất cấy nhiễm giả. Toàn bộ điểm số bệnh học chung ở phổi được xác định dựa trên hệ tính điểm đã biết trong lĩnh vực này.

Fig.4A-4D cho biết các khác biệt axit amin dự đoán trong cấu trúc ban đầu của protein 2 không cấu trúc (Nsp2, Fig.4A), protein E (Fig.4B), và glycoprotein GP3 (Fig.4C) và GP4 (Fig.4D) giữa thể phân lập virus PRRS 89- 46448-40 và các chủng 794A61, 111698 và G16X tạo ra. Các chữ cái in đậm cho biết các vị trí axit amin phân biệt trong trình tự axit amin dự đoán của protein E và GP3 nguyên vẹn và phần liên tục (được chỉ ra bởi < and >) của Nsp2 và GP4 của PRRSV 89-46448-40, 794A61, 111698, và G16X. Các cặp chữ cái được đóng khung cho biết vị trí đa hình trong một số protein của virus PRRS 89-46448-40.

Fig.5 thể hiện đáp ứng interferon alpha của đại thực bào phế nang lợn với sự nhiễm các typ virus PRRS khác nhau. Tế bào ZMAC bị nhiễm virus PRRS ở độ bội nhiễm (MOI: Multiplicities of Infection) đã cho. Lượng interferon alpha trong dịch nổi của môi trường nuôi cấy được thu hồi ở thời điểm 8 giờ sau khi tế bào được tiếp xúc với virus đã cho được xác định bằng thử nghiệm ELISA đặc hiệu đối với interferon alpha của lợn.

Fig.6 thể hiện tác động của các chủng virus PRRS khác nhau lên đáp ứng interferon alpha của đại thực bào phế nang với poly(I:C). Tế bào ZMAC hoặc được gây nhiễm giả hoặc được gây nhiễm bằng virus đã cho (MOI=5). Sau 2 giờ ủ, môi trường nuôi cấy tế bào được tiếp xúc với 25mg/ml poly(I:C). Môi trường nuôi cấy tế bào được thu hồi sau 8 giờ và được kiểm tra sự có mặt của interferon alpha bằng thử nghiệm ELISA đặc hiệu đối với interferon alpha của lợn.

Fig.7 cho biết sự thay đổi thể trọng (%) ở lợn không có virus PRRS và lợn đã chủng ngừa ở thời điểm 7 ngày sau khi kích thích bằng virus PRRS có độc tính. Phần trăm tăng thể trọng được xác định dựa trên trọng lượng tại thời điểm kích thích. Tính giá trị trung bình ($\pm$ SEM) của mỗi nhóm.

Fig.8 minh họa mức độ và tần suất virus huyết ở lợn không có virus PRRS và lợn đã chủng ngừa sau khi kích thích bằng virus PRRS có độc tính. Số lượng bản sao hệ gen của virus PRRS trong mẫu huyết thanh thu hồi từ lợn ở thời điểm 7 ngày sau khi kích

thích bằng virus PRRS có độc tính được xác định bằng phản ứng chuỗi polyme (PCR: Polymerase Chain Reaction) thời gian thực định lượng.

Fig.9 thể hiện lượng tải virus trong dịch BAL của lợn không có virus PRRS và lợn đã chủng ngừa sau khi kích thích bằng virus PRRS có độc tính. Lượng virus nhiễm ($TCID_{50}/ml$) trong mẫu dịch BAL của lợn thu được ở thời điểm 14 ngày sau khi kích thích bằng virus PRRS có độc tính được chuẩn độ trong tế bào ZMAC.

Fig.10A thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin của protein E của chủng virus PRRS G16X (SEQ ID NO: 26), 89-46448-40, 794A61, và 111698 (SEQ ID NO:25 đối với ba chủng sau). Fig.10B thể hiện trình tự axit amin của protein E từ G16X (SEQ ID NO: 26), và Fig.10C thể hiện trình tự axit amin của protein E từ chủng 89-46448-40 (SEQ ID NO: 25).

Fig.11A thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin của GP4 của chủng virus PRRS G16X (SEQ ID NO: 23), 89-46448-40 (SEQ ID NO: 23), 794A61 (SEQ ID NO: 23), và 111698 (SEQ ID NO: 24). Fig.11B thể hiện trình tự axit amin của GP4 từ chủng 89-46448-40 (SEQ ID NO: 23). Fig.11C thể hiện trình tự axit amin của GP4 đi kèm với thể phân lập PRRSV 89-46448-40 (SEQ ID NO. 24).

Fig.12A thể hiện sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin của GP3 của chủng virus PRRS G16X (SEQ ID NO: 22), 89-46448-40 (SEQ ID NO: 21), 794A61 (SEQ ID NO: 22), và 111698 (SEQ ID NO: 48). Fig.12B thể hiện trình tự axit amin của GP3 từ chủng 89-46448-40 (SEQ ID NO: 21). Fig.12C thể hiện trình tự axit amin của GP3 đi kèm với thể phân lập PRRSV G16X (SEQ ID NO. 22).

Fig.13 thể hiện mức interferon alpha trong huyết thanh ở lợn sau khi cấy nhiễm chủng bằng Ingelvac PRRS MLV hoặc G16X. Hai nhóm lợn ($n=6$) được cấy nhiễm bằng hoặc Ingelvac PRRS MLV hoặc G16X như được mô tả trong phần chất và phương pháp. Mẫu huyết thanh được thu hồi ở các thời điểm đã cho sau khi chủng ngừa và mức interferon alpha được đo bằng phương pháp ELISA. Số liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SE của 6 mẫu được thử nghiệm tại mỗi thời điểm trong mỗi nhóm xử lý. Động vật được chủng ngừa giả có $<2pg/ml$ huyết thanh tại mỗi thời điểm thử nghiệm (số liệu không được thể hiện).

Fig.14 thể hiện sự thay đổi thể trọng (BW: Body Weight) ở lợn sau khi tiếp xúc với virus PRRS có độc tính. Lợn được chủng ngừa giả, chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV hoặc chủng ngừa bằng virus G16X (mỗi nhóm $n=6$) được xác định trọng lượng

ngay trước và ở thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi được kích thích bằng thể phân lập PRRSV LTX1 kiểu đại. Các động vật không được kích thích và không được chủng ngừa (đối chứng tuyệt đối, n=6) cũng được xác định trọng lượng tại 4 thời điểm nêu trên. Các thay đổi về BW tại các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích được xác định trên các cơ sở riêng rẽ và tính % thay đổi trọng lượng tương đối với BW của nó tại thời điểm kích thích. Kết quả thể hiện % thay đổi trọng lượng trung bình của mỗi nhóm +/- SDEV. Tất cả các nhóm bao gồm 6 động vật mỗi nhóm, trừ nhóm G16X. Nhóm này có 6 động vật cho tới ngày 10 thì nhóm này được giảm xuống còn 5 động vật. Một động vật trong nhóm này được loại ra do bị xoắn ruột nên động vật này cần phải gây mê vào ngày 10 sau khi kích thích bằng virus.

Fig.15 thể hiện mức độ và tần suất virus huyết ở lợn sau khi tiếp xúc với virus PRRS có độc tính. Mẫu huyết thanh được thu hồi từ động vật được chủng ngừa giả, chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV hoặc chủng ngừa bằng virus G16X ngay trước và VÀO ngày đã cho sau khi kích thích bằng virus PRRS LTX1 kiểu đại. Mẫu cũng được lấy tại các thời điểm này đối với các động vật không được thử nghiệm và không được chủng ngừa (đối chứng tuyệt đối) (n=6). Lượng tải virus trong huyết thanh được xác định bằng cách thực hiện bước chuẩn độ virus nhiễm trong tế bào ZMAC. Kết quả được thể hiện đối với mỗi động vật riêng rẽ và sau đó được lấy trung bình đối với các thành viên của mỗi nhóm (vạch ngang màu đỏ). Mỗi động vật trong nhóm G16X được loại ra khỏi thử nghiệm ở ngày thứ 10 sau khi kích thích (xem phần ghi chú của Fig.14).

Fig.16 thể hiện lượng tải virus trong dịch BAL của lợn sau khi tiếp xúc với virus PRRS có độc tính. Dịch BAL được thu hồi từ phổi của động vật được chủng ngừa giả, chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV hoặc chủng ngừa bằng virus G16X ở ngày thứ 14 sau khi kích thích bằng virus PRRS LTX1 kiểu đại. Mẫu cũng thu được tại thời điểm này từ động vật không được thử nghiệm và không được chủng ngừa (đối chứng tuyệt đối) (n=6). Lượng tải virus trong dịch BAL của mỗi động vật được xác định bằng cách thực hiện bước chuẩn độ virus nhiễm trong tế bào ZMAC. Kết quả được thể hiện đối với mỗi động vật riêng rẽ và sau đó lấy trung bình đối với các thành viên của mỗi nhóm chỉ sử dụng mẫu dương tính với virus (vạch ngang).

Mô tả chi tiết sáng chế

Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn đầu tiên xuất hiện ở Mỹ vào những

năm 80 của thế kỷ 20. Chứng cứ thuyết phục về nhu cầu cần đến các biện pháp mới để kiểm soát PRRS được minh họa tốt nhất bởi sự gia tăng đáng kể tỷ lệ mắc PRRS trong quần thể lợn ở Mỹ trong một số năm cuối của thế kỷ 20. Các khảo sát huyết thanh học thực hiện bởi Cơ quan thanh tra sức khỏe động vật và cây trồng (APHIS: Animal and Plant Health Inspection Service) cho biết rằng tỷ lệ mắc PRRS ban đầu là 35% ở đàn lợn chăn nuôi/giết mổ ở Mỹ vào năm 2000, tăng tới 53% vào năm 2006. Kể từ đó, tỷ lệ này tiếp tục tăng nên vào năm 2009, giá trị này chạm ngưỡng báo động là cao tới 71%, thể hiện mức tăng >200% trong khoảng thời gian 9 năm. Hiện nay, trên 70% đàn lợn ở Mỹ bị nhiễm virus PRRS typ Bắc Mỹ (kiểu gen 2), gây tổn thất về mặt kinh tế là 664 triệu đô la Mỹ hằng năm, làm cho nó trở thành một bệnh chiếm chi phí lớn nhất trong ngành công nghiệp chăn nuôi lợn.

Là một bài toán kinh tế chủ yếu trong ngành công nghiệp chăn nuôi lợn, Hội đồng chăn nuôi lợn quốc gia (NPB: National Pork Board) coi việc kiểm soát và loại trừ virus PRRS ra khỏi đàn lợn thương mại là ưu tiên hàng đầu. Tuy nhiên, việc kiểm soát bệnh đã chứng tỏ khó khăn gặp phải phần lớn là do hệ gen của ARN của virus này có tỷ lệ đột biến cao gây ra hiện tượng đa dạng hóa virus do di truyền/kháng nguyên đáng kể và không đổi. Điều này được minh họa rõ ràng bởi sự tồn tại của 9 dòng virus PRRS typ 2 (hoặc kiểu Bắc Mỹ) có các khác biệt phát sinh chủng loại chủ yếu trong số chúng. 9 dòng virus PRRS kiểu Bắc Mỹ khác biệt phát sinh kể từ lần xuất hiện đầu tiên của tác nhân gây bệnh chủ yếu ở lợn này 25 năm trước, và bao gồm tính đa dạng di truyền mạnh mẽ của virus PRRSV hiện đang tồn tại trên thế giới. Các dòng này là khác biệt về mặt di truyền, như được chứng minh bởi độ đa dạng nội dòng bằng ít nhất 11%. Phần lớn (>95%) virus PRRS đã được phân lập ở Mỹ thuộc bốn trong số các dòng này, đó là các dòng 1, 5, 8 và 9.

Nói chung, cho rằng mức hiệu lực bảo vệ của vaccin PRRS MLV chống lại bệnh gây ra do nhiễm virus PRRS có độc tính phần lớn phụ thuộc vào sự giống nhau (tính tương đồng) về mặt di truyền của hai virus. Do đó, dựa trên các kiến thức thu thập được trong lĩnh vực này, sự gia tăng phụ thuộc thời gian về tính đa dạng di truyền ở các chủng virus PRRS hiện hành làm cho vaccin virus PRRS giảm độc lực có kiểu gen lỗi thời không có khả năng truyền lại tính miễn dịch bảo vệ có tác dụng đủ để chống lại các virus PRRS tiến hóa gần đây ở lợn. Do đó, cần lưu ý rằng hai loại vaccin hiện nay đang sử dụng được tạo ra từ các virus kiểu đại cổ điển phân lập vào năm 1991 và 1997, và thuộc

về hoặc dòng 5 hoặc 8, rất xa về mặt phát sinh chủng loại với phần lớn (60%) chủng virus PRRS hiện đang lan truyền trong lĩnh vực này, thuộc dòng 1 hoặc 9. Trong lúc sự khác nhau như vậy có thể tác động đến khả năng gây miễn dịch của hai vaccin thương mại này, các yếu tố khác như bản chất của virus gây miễn dịch lên hiệu lực của nó dưới dạng vaccin, vẫn chưa được chú ý đến.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra ba chủng biến thể mới gọi là G16X, 794A61, và 111698, được sinh ra từ thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 Bắc Mỹ, và ngạc nhiên là, kích thích IFN alpha mạnh hơn đáng kể ở đại thực bào phế nang lợn bị nhiễm virus khi so sánh với chủng virus bố mẹ. Các biến thể mới này được tạo ra từ chủng bố mẹ nhờ việc tinh chế vết tan hoặc pha loãng điểm cuối. Một số đột biến điểm mới trong ba chủng biến thể này phân biệt chúng với virus 89-46448-40 bố mẹ, dựa trên trình tự ORF5 của nó thuộc dòng virus PRRS sớm nhất xuất hiện ở Bắc Mỹ, đó là dòng 5. Tất nhiên là virus 89-46448-40 có độc lực không đáng kể, và có thể là quần thể hỗn tạp bao gồm các virus có liên quan về mặt di truyền nhưng khác nhau về trình tự nucleotit trong hệ gen của chúng bởi một số đột biến nucleotit đơn. Trình tự của chủng virus G16X, 794A61, và 111698 khác biệt bởi một số đột biến điểm đồng nghĩa và không đồng nghĩa với virus 89-46448-40, mà dựa trên trình tự nucleotit ORF5 của chúng tất cả thuộc dòng phụ 5.1 của PRRSV typ 2. Các đột biến trong hệ gen của ba chủng mới tạo ra từ 2 đến 5 thay đổi axit amin so với các protein được mã hóa bởi virus 89-46448-40.

Ngoài ra, ngạc nhiên là G16X không ức chế sự tổng hợp của interferon alpha bởi đại thực bào lợn tiếp xúc với poly (I:C) trong phân tử ARN chuỗi kép (ds: double stranded) tổng hợp, không giống như virus 89-46448-40. Thay vào đó, chủng G16X làm tăng đáp ứng của phân tử này, mà là chất gây cảm ứng mạnh của quá trình sản sinh cytokin này bởi đại thực bào phế nang lợn. Đặc biệt là, cho dù G16X, 794A61, và 111698 gần như là đẳng gen, chúng có hiệu lực vaccin khác nhau đáng kể [kém (794A61), trung bình (111698) và tốt (G16X)] trong việc tạo ra sự bảo vệ khi kích thích tiếp theo bằng thể phân lập virus PRRS thuộc dòng 8 có độc lực cao hơn và không tương đồng về mặt di truyền (khác loại). Ngạc nhiên là, G16X có khả năng rất cao trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở lợn được sử dụng chủng này, khi so sánh với hai chủng khác (794A61 và 111698). Điều này được chứng minh bởi việc G16X gây giảm và/hoặc loại trừ virus kích thích dòng 8 (khác loại) nhiễm nhanh hơn. Ngoài ra, khi được đánh giá về hiệu lực vaccin của nó chống lại virus PRRS typ 2 thuộc dòng 1 có độc tính

khác loại khác, virus G16X còn có thể kích thích tính miễn dịch bảo vệ mạnh.

Ngoài ra, do độc lực không đáng kể được hiệu hiện bởi thể phân lập virus 89-46448-40 bố mẹ, và hiệu lực vacxin biểu kiến của ba chủng tạo ra, virus PRRS đột biến được mô tả ở đây có thể được sử dụng dưới dạng vacxin virus PRRS sống không phải biến đổi đặc tính sinh học của chúng bằng cách cấy chuyển liên tiếp trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy, hoặc bằng cách làm giảm độc lực. Hơn nữa, nguy cơ các vacxin này phát triển kiểu hình có độc tính là không xảy ra do độc lực tự nhiên thấp của thể phân lập virus tổ tiên. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chủng virus được tạo ra từ virus PRRS cổ điển có độc lực nhỏ có thể tạo ra tính miễn dịch bảo vệ ở lợn chống lại kích thích bởi virus PRRS khác loại có độc tính (dòng khác).

1. Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ dùng cho mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Đối với phần trích dẫn các khoảng giá trị số ở đây, mỗi số xem kẽ nằm giữa có cùng độ chính xác được dự tính rõ ràng. Ví dụ, đối với khoảng từ 6 đến 9, các số 7 và 8 được dự tính ngoài 6 và 9, và đối với khoảng từ 6,0 đến 7,0, các số 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, và 7,0 được dự tính rõ ràng.

“Tế bào” được dùng để chỉ một thực thể sinh học đã hiểu rõ trong lĩnh vực này và được dự định để bao gồm tế bào mà có thể là tế bào sơ cấp hoặc dòng tế bào. Khi một vài thuật ngữ trong số các thuật ngữ này được sử dụng ở đây, chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu được rằng việc sử dụng như vậy chỉ với mục đích nhấn mạnh các nét đặc thù đã hiểu rõ. Ví dụ, cụm từ “tế bào hoặc dòng tế bào” có thể nhấn mạnh sự đối lập giữa thể phân lập sơ cấp nguyên thủy đối lại với phiên bản bất tử mà có thể là dẫn xuất trực tiếp của thể phân lập sơ cấp nguyên thủy.

“Được phân lập” được dùng để chỉ trạng thái được thao tác khác biệt với trạng thái tự nhiên và/hoặc được biến đổi tương đối với chất ban đầu, trong trường hợp thuật ngữ này nghĩa là phù hợp với ngữ cảnh đang được làm rõ. Ví dụ, tế bào sơ cấp đã phân lập được cắt ra khỏi mô tự nhiên hoặc nguồn khác trong cơ thể vật chủ và được duy trì tách hẳn ra khỏi nguồn nguyên thủy. Một ví dụ khác, thành phần tế bào có thể được đặt trong môi trường nuôi cấy hoặc được tách tiếp ra khỏi mẫu trên cơ sở dịch thực rửa phổi, do đó thu được tế bào phân lập tương ứng.

“Peptit” hoặc “polypeptit” là trình tự liên kết của axit amin và có thể là tự nhiên,

tổng hợp, hoặc biến thể hoặc tổ hợp của tự nhiên và tổng hợp.

“Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn” hoặc “PRRS” được dùng để chỉ bệnh đôi khi được gọi là “bệnh bí hiểm ở lợn”, “hội chứng hô hấp và vô sinh ở lợn” và “bệnh tai xanh”. Thuật ngữ “hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn” hoặc “PRRS” được sử dụng để bao gồm các biến thể kháng nguyên, di truyền và gây bệnh trong số các thể phân lập virus PRRS như được mô tả trong tài liệu Wensvoort et al, 1992, J. Vet. Diagn. Invest., 4:134-138 và Mardassi et al., 1994, J. Gen. Virol., 75:681-685.

“Đã tinh chế” được dùng để chỉ tình trạng trong đó việc làm giàu, tách và/hoặc loại bỏ tương đối một chất so với chất ban đầu. Thuật ngữ này có thể bao gồm các tình trạng bao gồm tinh chế ít nhất tinh chế một phần và không cần thiết bao hàm trạng thái tinh khiết tuyệt đối. Ví dụ, thuật ngữ này có thể áp dụng cho virus PRRS là nguồn hỗn tạp gốc nhưng chủ yếu là đẳng gen, và có thể ít nhất là 75%, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 hoặc 100% đồng nhất về mặt di truyền. Một cách độc lập, thuật ngữ “đã tinh chế” có thể được áp dụng cho những gì mà thông thường có thể được coi là chế phẩm hoặc nguồn virus tinh khiết gốc.

“Điều trị” khi ám chỉ việc bảo vệ động vật khỏi bệnh tật, nghĩa là phòng ngừa, ức chế, ngăn chặn, hoặc loại trừ hoàn toàn bệnh. Phòng bệnh liên quan đến việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế cho động vật trước khi khởi phát bệnh. Ức chế bệnh liên quan đến việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế cho động vật sau khi nhiễm bệnh nhưng trước khi xuất hiện các biểu hiện lâm sàng của bệnh. Ngăn chặn bệnh liên quan đến việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế cho động vật sau khi xuất hiện các biểu hiện lâm sàng của bệnh.

“Biến thể” được dùng để chỉ trình tự protein được bộc lộ ở đây, có nghĩa là protein có trình tự ít nhất 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% giống với trình tự quy chiếu. Biến thể có thể còn giữ lại ít nhất một hoạt tính sinh học của protein quy chiếu, và có thể còn giữ lại ít nhất một tính chất miễn dịch hoặc gây miễn dịch của trình tự quy chiếu. Hoạt tính sinh học có thể làm tăng hoạt tính IFN alpha.

2. Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn

a. Virus

Được đề xuất ở đây là virus mà có thể là virus PRRS. Virus này có thể được phân lập, có thể được tinh chế, có thể được giảm độc lực, và có thể là virus sống đã cải biến.

Virut này có khả năng kích thích đáp ứng IFN alpha mạnh hơn ở tế bào đại thực bào phế nang lợn so sánh với virut 89-46448-40 quy chiếu.

Virut theo sáng chế có thể chứa hệ gen mã hóa protein mà có thể là NSP2, E, GP3, hoặc GP4, có thể chứa trình tự thể hiện trên các Fig.4, 10, 11, hoặc 12, hoặc biến thể của nó. Virut này còn có thể chứa hệ gen mã hóa protein, mà có thể là GP2 (SEQ ID NO: 31), GP5 (SEQ ID NO: 32), Protein nền (SEQ ID NO: 33), Protein nucleocapsid (SEQ ID NO: 34), NSP1 α (SEQ ID NO: 35), NSP1 β (SEQ ID NO: 36), NSP2 (SEQ ID NO: 37), NSP3 (SEQ ID NO: 38), NSP4 (SEQ ID NO: 39), NSP5 (SEQ ID NO: 40), NSP6 (SEQ ID NO: 41), NSP7 (SEQ ID NO: 42), NSP8 (SEQ ID NO: 43), NSP9 (SEQ ID NO: 44), NSP10 (SEQ ID NO: 45), NSP11 (SEQ ID NO: 46), hoặc NSP12 (SEQ ID NO: 47), hoặc biến thể của nó.

Protein NSP2 có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 4, mà có thể là các axit amin 63-72 của protein NSP2, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 4, protein NSP2 có thể chứa valin ở vị trí 5 (mà có thể là 67V trong protein NSP2). Protein NSP2 còn có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 6, mà có thể là các axit amin 334-343 của protein NSP2 có độ dài đầy đủ, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 6, protein NSP2 có thể chứa histidin ở vị trí 5 (mà có thể là 338H trong protein NSP2). Protein NSP2 có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 8, mà có thể là các axit amin 488-497 của protein NSP2 có độ dài đầy đủ, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 8, protein NSP2 có thể chứa prolin ở vị trí 3 (mà có thể là 490P trong protein NSP2), và có thể chứa leuxin ở vị trí 8 (mà có thể là 495L trong protein NSP2). Trình tự của protein NSP2 còn có thể chứa một hoặc nhiều SEQ ID NO: 5, 7, 9, và 10.

Protein E có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 25, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 25, protein E có thể chứa valin ở vị trí 31 (31V), và có thể chứa alanin ở vị trí 60 (60A). Trình tự của protein E có thể chứa SEQ ID NO: 26. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 25, trình tự của protein E còn có thể chứa SEQ ID NO: 11 hoặc 12 ở các vị trí 27-36 và liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 25, trình tự của protein E còn có thể chứa SEQ ID NO: 13 hoặc 14 ở các vị trí 56-65.

Protein GP3 có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 21, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 21, protein GP3 có thể chứa valin ở vị trí 94 (94V), có thể chứa serin ở vị trí 96 (96S), và có thể chứa phenylalanin ở vị trí 213 (213F). Trình tự của protein GP3 có thể chứa SEQ ID NO: 22. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 21,

trình tự của protein GP3 còn có thể chứa SEQ ID NO: 15 hoặc 16 ở các vị trí 90-99, và liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 21 trình tự của protein GP3 còn có thể chứa SEQ ID NO: 17 hoặc 18 ở các vị trí 209-218.

Protein GP4 có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 23, hoặc biến thể của nó. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 23, protein GP4 có thể chứa serin ở vị trí 32 (32S). Trình tự của protein GP4 có thể chứa SEQ ID NO: 24. Liên quan tới vị trí trong SEQ ID NO: 23, trình tự của protein GP4 có thể chứa SEQ ID NO: 19 hoặc 20 ở các vị trí 28-37.

Hệ gen của virus có thể mã hóa protein E chứa V31 và 60A, và protein GP3 chứa 94V. Hệ gen của virus cũng có thể mã hóa protein NSP2 chứa 495L, và protein GP3 chứa 94V. Hệ gen của virus có thể mã hóa protein NSP2 chứa 338H và 495L, protein GP3 chứa 94V và 213F, và protein GP4 chứa 32S.

Hệ gen của virus có thể chứa trình tự của hệ gen virus G16X, 794A61, hoặc 111698. Virus G16X có thể là chủng virus được lưu trữ theo hiệp định Budapest Treaty (22 tháng 10 năm 2013), bởi ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA, với số đăng ký PTA-120658 ký hiệu bởi kho lưu trữ và có chứng nhận định danh lưu trữ virus PRRSV G16X. Trình tự của hệ gen virus G16X, 794A61, và 111698 có thể tương ứng là SEQ ID NO: 1, 2, và 3, hoặc thể tương đương ARN của chúng. SEQ ID NOs: 1-3 thiếu 31 nucleotit đầu tiên ở đầu 5' của hệ gen virus G16X, 794A61, và 111698. Hệ gen của virus này còn có thể là biến thể của trình tự được bộc lộ ở đây. Biến thể hệ gen có thể ít nhất 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 hoặc 100% giống với SEQ ID NO: 1, 2, hoặc 3.

Virus theo sáng chế còn có thể chứa thể tương đương ARN của trình tự hệ gen virus PRRS được mô tả ở đây (nghĩa là, ARN bổ trợ 100% với ADN bổ trợ 100% với trình tự ADN quy chiếu). % độ đồng nhất của trình tự hệ gen với trình tự hệ gen khác đáng quan tâm có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, % độ đồng nhất trình tự có thể được xác định bởi phương pháp phân tích khoảng trống (GAP) (Needleman and Wunsch, 1970) (chương trình GCG) có điểm phạt tạo khoảng trống=5, và điểm phạt kéo dài khoảng trống=0,3. Trình tự truy vấn có thể có độ dài ít nhất là 150 nucleotit, và phân tích GAP có thể sắp thành hàng hai trình tự trên vùng chứa ít nhất 150 nucleotit. Trình tự truy vấn có thể có độ dài ít nhất là 300 nucleotit và phân tích GAP có thể sắp thành hàng hai trình tự trên vùng chứa ít nhất 300 nucleotit.

Phân tích GAP có thể sắp thành hàng hai trình tự trên toàn bộ chiều dài của chúng.

Biến thể còn có thể chứa một hoặc nhiều thể đột biến liên quan đến hệ gen virus G16X, 794A61, hoặc 111698, mà có thể là thể khuyết, thể xen hoặc thể thay thế của chúng. Biến thể này có thể cho phép virus tạo ra đáp ứng miễn dịch hữu hiệu ở động vật có vú khi chúng được sử dụng, và có thể cho phép virus không gây bệnh ở động vật có vú. Sự đột biến trong biến thể có thể xảy ra tự nhiên (nghĩa là, có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên), hoặc có thể được tổng hợp (có thể được tạo ra bằng sự đột biến hướng vị trí). Sự đột biến trong biến thể có thể được đưa vào bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Biến thể có thể lai với hệ gen G16X, 794A61, hoặc 111698 trong các điều kiện nghiêm ngặt. Thuật ngữ “điều kiện lai hóa nghiêm ngặt” và thuật ngữ tương tự như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ các thông số đã biết trong lĩnh vực này bao gồm sự thay đổi của nhiệt độ lai hóa với chiều dài của oligonucleotit. Ví dụ, điều kiện lai hóa nghiêm ngặt, như được sử dụng ở đây, có thể được dùng để chỉ việc lai hóa ở 65°C trong chất đệm lai hóa (3,5xSSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polyvinyl pyrrolidon, 0,02% albumin huyết thanh bò (BSA: Bovine Serum Albumin), 2,5mM NaH₂PO₄ (pH=7), 0,5% SDS, 2mM EDTA), tiếp đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,2.xSSC, 0,01% BSA ở 50°C. Theo cách khác, axit nucleic và/hoặc oligonucleotit (cũng có thể được dùng để chỉ “đoạn môi” hoặc “đoạn dò” hoặc “phân tử siARN” hoặc “phân tử đối nghĩa”) lai hóa với vùng của hệ gen quan tâm, trong các điều kiện được sử dụng trong kỹ thuật khuếch đại axit nucleic như PCR.

b. Chế phẩm

Cũng được đề xuất ở đây là chế phẩm chứa virus, hoặc thành phần gây miễn dịch (kháng nguyên) của nó. Chế phẩm này có thể là vaccin. Vaccin có thể có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú. Virus này còn có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm virus PRRS và di chứng hoặc triệu chứng của nó ở động vật có vú, và có thể phòng ngừa nhiễm virus PRRS ở động vật có vú. Chế phẩm này có thể chứa chất mang, mà có thể là dược dụng, và còn có thể chất phụ trợ chấp nhận được về mặt miễn dịch. Chất mang và chất phụ trợ có thể chấp nhận được để sử dụng trong thú y, như ở lợn. Chế phẩm này còn có thể chứa ít nhất một phân tử kích thích miễn dịch.

(1) Chất phụ trợ

Chất phụ trợ có thể là phân tử có khả năng tăng cường đáp ứng của hệ miễn dịch

với vaccin, và có thể gần như không ức chế đáp ứng miễn dịch. Các ví dụ về chất phụ trợ được tìm thấy trong tài liệu “Vaccin design: the subunit and adjuvant approach,” Michael F. Powell and Mark J. Newman, eds., Pharmaceutical Biotechnology v. 6, Plenum Press 1995, New York, ví dụ xem chương 7 “Tóm tắt về chất phụ trợ và tá dược dùng trong vaccin” của Frederick R. Vogel và Michael F. Powell và chương 29, “Liposom chứa xytokin làm chất phụ trợ cho vaccin có cấu trúc siêu phân tử” của Lachman và các đồng tác giả.

Chất phụ trợ có thể là interferon, mà có thể là interferon α , interferon β , hoặc interleukin β mã hóa axit nucleic, mà có thể được biểu hiện trong tế bào của lợn. Chất phụ trợ cũng có thể là poly IC, poly ICLC, hoặc chất có tác dụng làm giảm hoặc tăng hoạt tính của ít nhất một trong số các interferon α hoặc β . Interferon có thể là protein interferon, như protein interferon α , hoặc có thể là axit nucleic có khả năng biểu hiện interferon, như interferon α . Interferon tạo ra bằng cách biểu hiện từ trình tự axit nucleic được sử dụng ngoại sinh có thể thực hiện chức năng một mình hoặc phối hợp với interferon tạo ra bằng cách biểu hiện từ trình tự axit nucleic nội sinh riêng của động vật có vú, để tăng cường đáp ứng miễn dịch với vaccin được sử dụng cho động vật có vú. Interferon có thể gián tiếp hoặc trực tiếp tạo điều kiện thuận lợi cho việc tăng cường miễn dịch; ví dụ, interferon được biểu hiện từ axit nucleic được sử dụng ngoại sinh có thể gây cảm ứng hoặc hoạt hóa một hoặc nhiều loài trung gian mà sau đó có thể tạo điều kiện tăng cường miễn dịch.

Chất phụ trợ có thể có mặt ở mức đủ để tăng cường đáp ứng miễn dịch cho vaccin được sử dụng cho động vật có vú. Việc tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng chất phụ trợ có thể được đo dưới dạng mức tăng đáng kể bất kỳ, mà có thể là đáng kể về mặt thống kê, trong đáp ứng miễn dịch so với đáp ứng đối chứng khi không có mặt chất phụ trợ như được đánh giá bằng phương pháp bất kỳ được chấp nhận trong lĩnh vực này. Chất phụ trợ có thể chứa các thành phần khác như đã biết trong lĩnh vực này để tạo điều kiện thuận lợi phân phối axit nucleic có thể biểu hiện đến tế bào hoặc mô để biểu hiện hoặc tạo điều kiện thuận lợi phân phối chất gây cảm ứng hoặc chất tăng cường interferon cho tế bào hoặc mô thích hợp. Mức liều lượng của chất phụ trợ có thể được xác định bởi các phương pháp đã biết.

Chất phụ trợ có thể chứa cả axit nucleic có khả năng biểu hiện interferon và chất kích thích miễn dịch có thể gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon. Lượng

phối hợp của axit nucleic và chất gây cảm ứng hoặc chất tăng cường interferon có thể đủ để tạo ra mức gia tăng đo được của đáp ứng miễn dịch với vaccin.

Chất phụ trợ có thể chứa axit nucleic có thể biểu hiện mã hóa interferon α , chất có tác dụng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon β , hoặc cả hai. Chất gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon α có thể là poly IC hoặc poly ICLC. Lượng polyIC hoặc polyICLC có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 200 microgam mỗi kg thể trọng. Chất phụ trợ còn có thể chứa trình tự kích thích miễn dịch (ISS: immunostimulatory sequence) hoặc axit nucleic mã hóa xytokin. Chất phụ trợ cũng có thể là xytokin, alum (nhôm hydroxit), nhôm phosphat, hoặc canxi phosphat. Xytokin có thể là IL-2, IL-12, hoặc liposom chứa xytokin.

Chất phụ trợ có thể chứa cADN IFN alpha của lợn chứa vector biểu hiện động vật có vú, mà có thể được điều chế bằng phản ứng RT-PCR có sử dụng ARN phân lập từ lymphô bào lợn đã bị nhiễm trước bằng virus bệnh đại giả (để kích thích sản sinh IFN alpha). Đoạn môi để thực hiện phản ứng RT-PCR có thể được thiết kế dựa trên trình tự nucleotit của cADN IFN alpha của lợn (như đã mô tả trong tài liệu Lefevre and La Bonnardiere 1986). Sản phẩm có kích cỡ đoán trước (590bp) tạo ra từ phản ứng RT-PCR có thể được tách dòng thành plasmit pCR®2.1 (Invitrogen Corp., Rockville, MD), và đoạn xen có vị trí enzym giới hạn dự đoán có thể được xác định trình tự. cADN của IFN alpha có thể được cắt ra từ plasmit pCR®2.1 tái tổ hợp và đặt trong điều kiện điều hòa phiên mã gen khởi đầu xytomegalovirus trong pcADN3 (Invitrogen) để tạo ra pINA3. Để xác nhận rằng xytokin hoạt hóa được mã hóa bởi cADN đã khuếch đại, tế bào buồng trứng chuột hamster Trung quốc (CHO: Chinese Hamster Ovary) có thể được chuyển nhiễm bằng pINA3 và các quần lạc tế bào riêng rẽ kháng genetixin có thể được điều chế. Dịch nổi lên trên từ các quần lạc có thể được kiểm tra về khả năng ức chế sự sao chép chủng âm tính của virus gây viêm miệng mụn nước (VSV: Vesicular Stomatitis Virus) gây cảm ứng interferon trong tế bào thận bò Madin Derby (MDBK: Madin Derby bovine kidney). Các quần lạc tạo ra từ 0 đến trên 200000 đơn vị (1 đơn vị ức chế 50% sao chép VSV) IFN alpha có thể được phát hiện.

Chất phụ trợ còn có thể chứa hợp chất hóa học, polyICLC. Chất phụ trợ còn có thể chứa các hợp chất hóa học sau: Poly-L-Lysin, poly IC, và carboxymetylxenluloza có độ nhớt thấp. Poly IC (500ml; 4,0mg/ml); poly-L-lysin (250ml; 6,0mg/ml); và 2% carboxymetylxenluloza (250ml) có thể được điều chế trong 0,85% NaCl không chứa chất

gây sốt. Poly ICLC (polynucleotit đã làm ổn định) có thể được điều chế theo phương pháp của Levy, Baer và các đồng tác giả (1975), với các thay đổi nhỏ. Poly I:C có thể được ủ lại bằng cách gia nhiệt ở 71°C trong 1 giờ và làm nguội từ từ. Sau đó, poly I:C đã ủ có thể được trộn với các lượng bằng nhau của 6,0mg/ml poly-L-lysin trong dung dịch nước muối đẳng trương và 2% carboxymetylxenluloza. Nồng độ cuối cùng của poly I:C có thể là 1mg/ml. Chế phẩm này có thể được bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng.

(2) Chất kích thích miễn dịch

Chế phẩm này còn có thể chứa chất kích thích miễn dịch có tác dụng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon, như interferon α . Chất kích thích miễn dịch có thể thực hiện chức năng gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính của interferon tạo ra từ axit nucleic được sử dụng ngoại sinh có thể biểu hiện hoặc tạo ra từ axit nucleic nội sinh riêng với động vật có vú. Chất kích thích miễn dịch có thể thực hiện chức năng trực tiếp gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính interferon hoặc gián tiếp bằng cách gây cảm ứng hoặc tăng cường hoạt tính hoặc biểu hiện của loài trung gian. Chất kích thích miễn dịch có thể có chức năng gây cảm ứng hoặc tăng cường mức biểu hiện của interferon hoặc theo cách khác có thể tăng cường hoặc hoạt hóa interferon để tăng cường đáp ứng miễn dịch. Chất kích thích miễn dịch có thể là interferon α , interleukin 12 (IL-12), IL-18, hoặc IL-15.

(3) Chất mang

Chất mang có thể bao gồm dung dịch muối hoặc chất mang thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực này. Chất mang này có thể là như đã mô tả trong tài liệu Arnon, R (Ed.), Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton FL (1987). Chất mang có thể cho phép chế phẩm được bào chế dưới dạng viên nén, viên tròn, viên nang, chất lỏng, gel, si rô, hỗn dịch đặc, hỗn dịch, hoặc các dạng tương tự, mà có thể thích hợp để ăn uống qua đường miệng. Chất mang còn có thể chứa chất phụ trợ bổ sung, trong trường hợp này nó có thể được chọn bởi các tiêu chuẩn dựa trên kháng nguyên được sử dụng, cách thức sử dụng và đối tượng. Chất mang có thể bao gồm tá dược hoặc chất bổ trợ tạo điều kiện thuật lợi để bào chế chế phẩm này thành dạng thuốc có thể được sử dụng.

(4) Liều lượng

Chế phẩm này có thể chứa các hạt virus của virus, mà có thể là nằm trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} , 10^2 đến 10^9 , 10^2 đến 10^8 , 10^2 đến 10^7 , 10^2 đến 10^6 , 10^2 đến 10^5 , 10^2 đến 10^4 , 10^3 đến 10^{10} , 10^3 đến 10^9 , 10^3 đến 10^8 , 10^3 đến 10^7 , 10^3 đến 10^6 , 10^3 đến 10^5 , 10^4 đến

10^{10} , 10^4 đến 10^9 , 10^4 đến 10^8 , 10^4 đến 10^7 , 10^4 đến 10^6 , hoặc 10^5 đến 10^{10} , 10^5 đến 10^9 , 10^5 đến 10^8 , hoặc 10^5 đến 10^7 hạt virut.

(5) Bào chế

Chế phẩm này có thể chứa liposom cation, liposom anion, dạng xoắn ốc, hoặc vi nang. Liposom hoặc dạng xoắn ốc có thể làm tăng in vivo sự chuyển nhiễm của virut. Liposom có thể là lipit cầu hai lớp màng có phần bên trong chứa nước. Tất cả các phân tử có mặt trong dung dịch nước tại thời điểm hình thành liposom có thể được sát nhập vào phần bên trong chứa nước. Lượng liposom được bảo vệ khỏi vi môi trường bên ngoài và, do liposom hòa lẫn với màng tế bào nên được phân phối hiệu quả vào bào chất của tế bào. Ngoài ra, do tính kỵ nước của chúng, một số phân tử hữu cơ nhỏ có thể được trực tiếp sử dụng nội bào. Chế phẩm này còn có thể chứa tác nhân y tế khác, tác nhân được lý hoặc chất pha loãng.

Chế phẩm này có thể được bào chế dưới dạng dung dịch nước, dung dịch hoặc hỗn dịch lỏng, dạng rắn thích hợp để hòa tan hoặc tạo hỗn dịch thành chất lỏng trước khi tiêm, hoặc dưới dạng nhũ tương. Để tiêm, chế phẩm này có thể được bào chế trong dung dịch nước, mà có thể là trong dung dịch đệm tương hợp về mặt vật lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch nước muối sinh lý. Để sử dụng qua niêm mạc, chất thấm thích hợp với rào chắn cần thấm qua được sử dụng trong chế phẩm. Các chất thấm như vậy nói chung là đã biết trong lĩnh vực này. Chế phẩm có thể được bào chế cùng với lipid hoặc liposom cation. Chế phẩm được bào chế để sử dụng qua đường miệng có thể ở dạng viên nén, viên bao đường, viên nang, hoặc dung dịch, và có thể được bào chế để giải phóng chậm hoặc chỉ được giải phóng khi được phẩm đi đến ruột non hoặc ruột già.

Chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế dưới dạng dung dịch nước ở dạng tan trong nước. Hỗn dịch có thể được bào chế dưới dạng hỗn dịch tiêm dầu. Hỗn dịch có thể chứa dung môi hoặc chất dẫn ưa chất béo thích hợp, có thể là dầu béo như dầu vừng hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl oleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom. Hỗn dịch đối với dung dịch tiêm trong nước có thể chứa chất có tác dụng gia tăng độ nhớt của hỗn dịch, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Hỗn dịch còn có thể chứa chất làm ổn định thích hợp hoặc chất có tác dụng gia tăng độ tan của chế phẩm này để cho phép bào chế dung dịch đậm đặc hơn.

Chế phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể thu được bằng cách kết hợp các

hợp chất hoạt tính với tá dược rắn. Việc thu được chế phẩm này có thể còn bao gồm bước nghiền hỗn hợp tạo ra và xử lý hỗn hợp hạt, sau khi bổ sung chất phù trợ, để nhận được viên nén hoặc nhân viên bao đường. Tá dược rắn có thể là chất độn như đường, bao gồm lactoza, sucroza, manitol, hoặc sorbitol; chế phẩm xenluloza như tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gồm tragacant, metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, natri carboxymetylxenluloza, hoặc polyvinylpyrrolidon (PVP). Chế phẩm còn có thể chứa chất làm rắn, mà có thể là polyvinyl pyrrolidon liên kết ngang, aga, hoặc axit alginic hoặc muối của nó như natri alginat.

Chế phẩm này có thể là nhân viên bao đường, mà có thể có lớp bao thích hợp. Lớp bao có thể chứa dung dịch đường đậm đặc, và có thể chứa gồm arabic, bột talc, polyvinyl pyrrolidon, carbopol gel, polyethylene glycol, titan dioxit, dung dịch sơn, hoặc dung môi hữu cơ thích hợp hoặc hỗn hợp dung môi. Viên nén hoặc viên bao đường có thể chứa lớp bao chứa thuốc nhuộm hoặc chất màu, mà có thể được sử dụng để phân biệt hoặc để xác định các chế phẩm chứa liều lượng hợp chất hoạt tính khác nhau.

Chế phẩm này có thể được bào chế để sử dụng qua đường miệng dưới dạng viên nang nắp lồng khít chứa gelatin, hoặc có thể được bào chế dưới dạng viên nang kín chứa gelatin hoặc chất dẻo hóa, như glyxerol hoặc sorbitol. Viên nang nắp lồng khít có thể chứa chế phẩm được trộn với chất độn như lactoza, chất kết dính như tinh bột, hoặc chất làm trơn như bột talc hoặc magie stearat, hoặc chất làm ổn định. Chế phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể được bào chế dưới dạng viên nang mềm, và chế phẩm này có thể được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất lỏng thích hợp, như dầu béo, parafin lỏng, hoặc polyetylen glycol lỏng. Viên nang mềm còn có thể chứa chất làm ổn định.

Trong trường hợp chế phẩm chứa vacxin ADN, chế phẩm này có thể chứa ADN được đưa vào trong liposom hoặc thể xoắn ốc để tăng cường sự chuyển nhiễm in vivo. Chế phẩm có thể chứa chất phụ trợ di truyền, mà có thể là trình tự kích thích miễn dịch (ISS) hoặc axit nucleic mã hóa xytokin. Chất phụ trợ di truyền có thể là chất như đã mô tả trong tài liệu: Horner A.A. et al., 1998, Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant, Cell Immunology, 190:77-82.

(6) Phương pháp bào chế

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo cách đã biết như bằng các quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bao đường, làm bay hơi, nhũ hóa, bao nang, sấy hoặc làm đông khô thông thường.

3. Phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch

Sáng chế đề xuất ở đây phương pháp tạo ra hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú, có thể là lợn. Phương pháp này có thể bao gồm bước cho động vật có vú cần điều trị sử dụng chế phẩm chứa virus. Phương pháp này còn có thể bao gồm bước sử dụng chế phẩm gây miễn dịch, mà có thể là liều lớn, và có thể bao gồm bước sử dụng chất phụ trợ như được mô tả ở đây. Chế phẩm có thể tạo ra tính miễn dịch bảo vệ cho động vật chống lại virus PRRS. Chế phẩm cũng có thể tạo ra sự tăng trọng lớn hơn và virus huyết ít hơn ở động vật có vú so sánh với động vật có vú không được sử dụng chế phẩm này. Chế phẩm này có thể gây cảm ứng tính miễn dịch ở động vật có vú, mà có thể hỗ trợ đạt được mức sảy thai thấp hơn và/hoặc đẻ bình thường, hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh hô hấp và giảm tỷ lệ tử vong ở động vật có vú, so sánh với động vật có vú không được sử dụng chế phẩm này.

a. Cách sử dụng

Chế phẩm chứa virus có thể được sử dụng bằng đường có tác dụng bất kỳ, mà có thể là toàn thân hoặc khu trú. Đường sử dụng có thể là ngoài đường tiêu hóa, trong cơ, trong chân bì, dưới da, qua đường miệng, ở niêm mạc, dưới lưỡi, trong mắt, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong tủy sống, khu trú, hoặc qua chân bì. Đường sử dụng cũng có thể là qua đường trực tràng, đường âm đạo, hoặc đường ruột. Cách sử dụng có thể là tiêm, mà có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kim tiêm và xy lanh. Việc sử dụng này cũng có thể là nhờ điện di, hạt vi mô mang điện dương, phân phối bằng siêu âm, hoặc nhờ hạt biolistic.

Việc sử dụng cũng có thể dựa trên việc bào chế của chế phẩm này với lipid hoặc liposom mang điện dương, mà có thể áp dụng với dạng ADN hoặc dạng protein của chất phụ trợ xytokin hoặc với chất hóa học như chất có khả năng kích thích miễn dịch, ví dụ bằng cách gây cảm ứng xytokin nội sinh. Ví dụ về việc sử dụng này được mô tả trong tài liệu Pachuk et al., 2000, Curr Opin Mol Ther Apr 2(2):188-98; Van Slooten et al. 2001, Biochim Biophys Acta 1530:134-45; Van Slooten et al., 2000, Pharm Res 17:42-48; Lachman et al., 1996, Eur Xytokin Netw 7:693-8

Chất phụ trợ có thể có mặt trong chế phẩm chứa virus. Chất phụ trợ cũng có thể được sử dụng đồng thời với chế phẩm chứa virus hoặc trong vòng 1, 2, 4, 8, 12, 18, hoặc 24 giờ.

b. Thời điểm sử dụng

Chế phẩm có thể được sử dụng cho động vật có vú khi động vật có vú nằm trong khoảng từ 2 tuần đến 30 tuần tuổi, hoặc khi động vật có vú trưởng thành. Chế phẩm này cũng có thể được sử dụng lần thứ hai từ 2 đến 5 tuần sau lần sử dụng đầu tiên, và cũng có thể được sử dụng một số lần bổ sung nữa. Chế phẩm này có thể được sử dụng cho lợn giống đực hoặc cái, và có thể được sử dụng trước khi gây giống hoặc sau khi đẻ.

Cách bào chế, đường sử dụng và liều lượng chính xác để gây đáp ứng miễn dịch có thể được chọn bởi thầy thuốc lâm sàng riêng rẽ hoặc xem xét tình trạng của lợn, như được mô tả trong tài liệu Fingl et. al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975, Chương 1, trang 1. Bác sỹ thú y hoặc bác sỹ chăm sóc sẽ hiểu làm thế nào và khi nào kết thúc, dừng, hoặc điều chỉnh sử dụng do độc tính, hoặc do loạn chức năng cơ quan, hoặc do các tác động tiêu cực khác. Ngược lại, thầy thuốc thực hành cũng sẽ biết cách điều chỉnh quá trình điều trị đến mức cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không đủ (loại trừ độc tính). Độ lớn của liều được sử dụng để kiểm soát rối loạn quan tâm có thể thay đổi tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh được điều trị và đường sử dụng. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh có thể, ví dụ, được đánh giá từng phần bằng các phương pháp đánh giá tiên lượng chuẩn. Ngoài ra, liều lượng và có lẽ cả tần suất sử dụng liều, cũng có thể thay đổi tùy thuộc vào tuổi, thể trọng và đáp ứng của mỗi cá thể. Một kế hoạch so sánh được với những gì thảo luận trên đây cũng có thể được sử dụng trong thuốc thú y.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có nhiều khía cạnh được minh họa bằng các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế dưới đây.

Ví dụ 1

Thành phần vacxin PRRS

Ví dụ này là ví dụ cụ thể về vacxin được mô tả ở đây. Cụ thể, ví dụ này mô tả ba Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) gần như đẳng gen, đã phân lập và tinh chế được gọi là 794A61, 111698 và G16X, mỗi virus trong số chúng được tạo ra từ nguồn thể phân lập virus Bắc Mỹ cổ điển gốc PRRS 89- 46448-40 đương nhiên có độc lực không đáng kể. Nguồn virus 89-46448-40 nguyên thủy gốc bao gồm quần thể hỗn tạp của các biến thể virus PRRS có liên quan về mặt di truyền, từ đó ba chủng được tinh chế thành đồng nhất bằng cách sử dụng thử nghiệm vết tan chuẩn hoặc phương pháp pha

loãng điểm cuối. Phép phân tích trình tự hệ gen của ba chủng này cho thấy rằng chúng khác với kiểu gen virus có mặt trong nguồn virus 89-46448-40 gốc bởi một số thể đột biến điểm cùng nghĩa và không cùng nghĩa. Loại sau của thể đột biến nucleotit tạo ra ba protein virus cấu trúc và một protein virus không cấu trúc có các thay đổi axit amin mới mà không thể hiện trong quần thể virus bố mẹ. Ba chủng phân lập này cũng khác nhau về mặt sinh học với virus 89-46448-40 bố mẹ về khả năng của chúng kích thích đáp ứng interferon alpha đáng kể bởi đại thực bào phế nang lợn bị nhiễm virus. Ngoài ra, không giống virus 89-46448-40 bố mẹ, chủng G16X không ức chế sự tổng hợp interferon alpha bởi đại thực bào phế nang lợn tiếp xúc với poly(I:C), mà còn tăng cường đáp ứng của chúng với phân tử hoạt hóa này. Đặc biệt, dù là ba chủng này gần như đẳng gen, thì chúng vẫn khác nhau đáng kể về tiềm lực vacxin của chúng, như được chứng minh bởi mức độ hiệu lực vacxin của chúng (794A61: kém; 111698: trung bình và G16X: tốt) trong việc tạo ra tác dụng bảo vệ khi kích thích tiếp theo bằng thể phân lập virus PRRS khác nhau về mặt di truyền (khác loại). Một thể phân lập vacxin (G16X) phân biệt với chính nó với hai chủng khác (794A61 và 111698) bằng cách trội hơn về khả năng của nó trong việc tạo ra tác dụng bảo vệ mạnh hơn ở lợn đã gây miễn dịch, như được chứng minh bởi sự giảm và/hoặc loại trừ nhanh chóng hơn virus kích thích có độc tính ra khỏi mô.

Ba chủng PRRSV (G16X, 794A61 và 111698) được tạo ra bằng cách tinh chế vết tan (794A61 và G16X) hoặc bằng cách pha loãng điểm cuối (111698) từ nguồn cấy chuyển thấp của virus PRRS 89-46448-40. Virus 89-46448-40 được phân lập ở phòng thí nghiệm National Veterinary Services Laboratory (NVSL) ở Ames, Iowa, từ tiêu bản của động vật được đưa ra để xem xét là trường hợp chẩn đoán (được định danh là 89-46448) từ trang trại Iowa đã trải qua đợt bùng nổ PRRS vào năm 1989 (Wesley và các đồng tác giả, 1998). Đặc biệt là, trường hợp 89-46448 là một trong những đợt bùng nổ PRRS đã ghi nhận công khai cũ nhất từ đó virus PRRS được tìm ra (Wesley và các đồng tác giả, 1998). Do đó, virus 89-46448-40 có khả năng là một trong những virus PRRS cổ điển được phân lập ở Mỹ. Việc phân lập virus ở NVSL được thực hiện bằng cách xếp chồng các lớp đơn nhân tử của dòng tế bào khỉ Green châu Phi MA-104 với huyền phù đã làm trong chứa mô đã tắm ướt thu được từ động vật bị nhiễm bệnh. Việc phân lập virus được chỉ báo bởi sự phát triển của tác dụng bệnh học tế bào trong từ 6 đến 8 ngày sau khi cấy nhiễm giống nuôi cấy tế bào như được mô tả bởi Kim và các đồng tác giả (1993,

“Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line,” Arch. Virol. 133, 477-83). Dịch nuôi cấy được thu hồi ở thời điểm 10 ngày sau khi chủng ngừa và bảo quản ở -70°C . Các lần cấy chuyển tiếp theo của thể phân lập virus 89-46448-40 trong tế bào MA-104 được thực hiện ở NVSL bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Kim và các đồng tác giả (1993). Trong khoảng thời gian từ cuối năm 1992 đến đầu năm 1993, phần mẫu đại diện của một số thể phân lập virus PRRS, bao gồm thể phân lập 89-46448-40, được phân bố dưới dạng virus PRRS tham chiếu bởi NVSL tới vài phòng thí nghiệm chẩn đoán thú y (VDL: Veterinary Diagnostic Laboratory) ở Mỹ. Phòng thí nghiệm VDL ở Đại học Illinois (Urbana, IL) nhận được lọ chứa khoảng 1ml môi trường nuôi cấy được thu hồi từ lần cấy chuyển thứ hai trong tế bào MA-104 của thể phân lập 89-46448-40 (89-46448-40 MA104/2) từ tiêu bản mà từ đó nó được phân lập. Ở phòng thí nghiệm VDL của Đại học Illinois, dòng tế bào MARC-145, quần lạc tế bào chấp nhận virus PRRS bắt nguồn từ tế bào MA-104, được sử dụng làm vật chủ để chuẩn bị nguồn virus 89-46448-40 gốc từ phần mẫu đại diện 89-46448-40 MA104/2. Virus được lan truyền bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, và các lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 phát triển trong bình nuôi cấy mô dung tích 75cm^2 chứa môi trường cơ bản tối thiểu Eagle (MEM: Eagle’s Minimal Essential Medium) có độ pH được điều chỉnh đến giá trị 7,2, 5% huyết thanh bào thai bò, 0,15% natri bicacbonat và kháng sinh được thêm vào (MEM đầy đủ) được sử dụng. Bình chứa tế bào MARC-145 và 10ml môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO_2 trong vài ngày cho tới khi lớp đơn phân tử tế bào nhập dòng được tạo ra. Ở thời điểm này, các lớp đơn phân tử của tế bào được cấy nhiễm bằng 1ml huyền phù virus đã pha loãng và ủ trong 1 giờ ở 37°C để cho phép hấp thu virus. Sau đó, chất chủng ngừa được loại bỏ và 10ml MEM đầy đủ sạch được thêm vào. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO_2 cho tới khi tác dụng bệnh học tế bào, xảy ra trong vòng 4 ngày, được quan sát. Khi $>75\%$ tế bào trong các lớp đơn phân tử thể hiện tác dụng bệnh học tế bào, hỗn hợp các trong bình được thu hồi, gộp lại vào trong một bình, chia thành các phần mẫu đại diện 1-2ml đựng trong các lọ thủy tinh vô khuẩn và bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng. Hiệu giá của giống virus được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn và tế bào MARC-145 (xem phần Vật liệu và Phương pháp, Ví dụ 1). Ví dụ, nguồn virus gốc được điều chế vào tháng 7 năm 1994 (“nguồn 794 gốc”) có hiệu giá bằng $10^{7,4}$ TCID₅₀ và

tương ứng với lần cấy chuyển thứ hai của thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 trong tế bào MARC-145 ở phòng thí nghiệm VDL của Đại học Illinois, nghĩa là, lần cấy chuyển toàn diện thứ tư của virus này trong tế bào nuôi cấy, kể cả việc phân lập nó trong tế bào MA-104.

Cả chủng virus 111698 và 794A61 được phân lập trực tiếp từ virus PRRS “nguồn 794 gốc”. Để tạo ra virus 111698, 1,0ml dịch pha loãng 3000 lần ($MOI = 0,001$) của nguồn “794” gốc được sử dụng làm chất cấy nhiễm để làm nhiễm lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 trong bình nuôi cấy mô dung tích 75cm^2 (lặp lại ba lần). Sau 4 ngày ở 37°C trong khí quyển 5% CO_2 đã làm ẩm, tại thời điểm $>75\%$ mỗi trong số ba lớp đơn phân tử thể hiện tác dụng bệnh học tế bào, hỗn hợp trong bình được thu hồi. Hỗn hợp thu được được ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ mảnh vụn tế bào và phần nổi lên trên, được xác định là virus 111698, được chia thành các phần mẫu đại diện và bảo quản ở -80°C . Ngược lại, virus 794A61 là sản phẩm của 6 lần tinh chế vết tan của nguồn “794” gốc. Ban đầu, các lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 trong đĩa nuôi cấy mô đường kính 35mm được phủ bằng dịch pha loãng 10 lần liên tiếp của nguồn “794” gốc trong môi trường MEM, $\text{pH}=7,2$, được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và $50\mu\text{g/ml}$ gentamixin. Sau khi lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, các chất cấy nhiễm được lấy ra, và các lớp đơn phân tử được phủ bằng 3ml hỗn hợp (1:1) bao gồm 2X MEM được bổ sung 6% huyết thanh bào thai bò, $100\mu\text{g/ml}$ gentamixin và 2% agarosa có điểm nóng chảy thấp. Sau 30 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh (để cho phép agarosa đông cứng lại), đĩa được để ở 37°C và trong khí quyển 5% CO_2 đã làm ẩm, trong 4 ngày. Tại thời điểm này để tăng mức hiện vết tan, $100\mu\text{l}$ 100mg/ml thiazolyl xanh tetrazoli bromua (metylthiazolyldiphenyl-tetrazoli bromua, MTT) được cho lên phía trên của mỗi lớp phủ agarosa và tế bào được cho trở lại nhiệt độ 37°C và trong khí quyển 5% CO_2 đã làm ẩm trong 2-3 giờ trước khi các vết tan xuất hiện dưới dạng các vùng trong suốt có đường bao sẫm màu. Một số vết tan đã phân lập kỹ trong các lớp đơn phân tử này đã nhiễm thành công bằng dịch pha loãng nhất của chất cấy nhiễm được chọn lựa bằng cách sử dụng pipet Pasteur và chuyển vào lọ chứa 0,5ml môi trường MEM được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và $50\mu\text{g/ml}$ gentamixin. Một trong số các vết tan đã chọn được trải qua hai chu kỳ làm đông lạnh ở -80°C trước khi sử dụng làm chất cấy nhiễm. Quy trình tinh chế vết tan này được lặp lại 5 lần nữa với vết tan đã chọn sau lần thứ 6 được gọi là 794A61. Sau khi trải qua hai chu kỳ làm đông

lạnh ở -80°C , 0,1ml chế phẩm 794A61 được sử dụng để gây nhiễm đĩa nuôi cấy mô đường kính 35mm như đã mô tả trên đây. Tuy nhiên, trong trường hợp này, lớp đơn phân tử được phủ bằng 3ml MEM được bổ sung 3% huyết thanh bào thai bò và $50\mu\text{g/ml}$ gentamixin. Sau 3 ngày trong môi trường khí quyển 5% CO_2 ở 37°C và đã làm ấm, khoảng 20% lớp đơn phân tử đã gây nhiễm thể hiện tác dụng bệnh học tế bào. Tại thời điểm này, môi trường được thu hồi, ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ mảnh vụn tế bào và phần nổi lên trên, được xác định là virus 794A61 P1, được bảo quản ở -80°C . Một lần cấy chuyển nữa của virus này trong các lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 trong bình nuôi cấy mô dung tích 75cm^2 như đã mô tả trên đây ở $\text{MOI} = 0,01$ được thực hiện để tạo ra virus 794A61 P2.

Việc phân lập virus G16X được tiến hành gián tiếp từ virus “nguồn 794 gốc”, trong đó nguồn chất cấy nhiễm là sản phẩm của việc cấy chuyển liên tiếp virus “nguồn 794 gốc” trong các lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 trong bình dung tích 75cm^2 . Trong trường hợp này, mỗi lớp đơn phân tử được gây nhiễm bằng 1ml “nguồn 794 gốc” không được pha loãng ($\text{MOI} = 1$). Sau 3 ngày ở 37°C trong khí quyển 5% CO_2 đã làm ấm, tại thời điểm $>90\%$ mỗi trong số ba lớp đơn phân tử thể hiện tác dụng bệnh học tế bào, hỗn hợp trong bình được thu hồi. Hỗn hợp thu được được ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ mảnh vụn tế bào và phần nổi lên trên, được gọi là virus VR, được chia thành các phần mẫu đại diện và bảo quản ở -80°C . Chế phẩm virus VR này được trải qua 5 lần tinh chế vết tan như đã mô tả trên đây, ngoại trừ ở thời điểm 4-5 ngày sau khi gây nhiễm, các vết tan riêng rẽ được xác định là các vùng mờ đục so với nền lớp đơn phân tử tế bào không bị gây nhiễm tương đối trong. Vết tan được phân lập ở lần tinh chế vết tan thứ năm được cấy chuyển trong đĩa nuôi cấy mô đường kính 35mm trong các điều kiện đã mô tả trên đây, là kết quả của lần gây nhiễm này và bốn lần gây nhiễm tiếp theo của tế bào MARC-145 ở các MOI khác nhau trong các bình nuôi cấy mô dung tích 25 hoặc 75cm^2 . Môi trường nổi lên trên từ lần cấy chuyển thứ 5 không chọn lọc này của virus được dùng làm chất cấy nhiễm ban đầu cho lần tinh chế vết tan thứ 6 bổ sung sử dụng MTT để hiện vết tan như đã mô tả trên đây. Vết tan được phân lập tốt chọn lọc sau lần thứ 6 này được gọi là G16X và được lan truyền ban đầu trong lớp đơn phân tử của tế bào MARC-145 trong đĩa nuôi cấy mô đường kính 35mm (G16X P1) và sau đó hai lần nữa trong bình dung tích cm^2 (G16X P2 và G16X P3) như đã mô tả trên đây trong quá trình tạo ra virus 794A61.

Tài liệu chuyên ngành đã cho biết rằng khả năng gây bệnh trong số các thể phân lập virus PRRS có thể thay đổi đáng kể. Hơn nữa, có chứng cứ cho rằng trong 25 năm sau khi bùng nổ dịch PRRS lần đầu tiên vào năm 1987-1988 ở Bắc Mỹ, độc lực của virus PRRS ở Mỹ và các vùng khác trên thế giới đã tăng đến cường độ đáng báo động. Sự bộc phát đáng chú ý đầu tiên về độc lực của virus PRRS xảy ra vào năm 1996 khi các bác sỹ thú y chữa và chẩn đoán bệnh cho lợn bắt đầu thông báo về sự bùng nổ dịch bệnh được mô tả là “hội chứng xảy thai và tử vong ở lợn” (swine abortion and mortality syndrome), “PRRS không điển hình”, hoặc “PRRS cấp tính”. Điều này được xác nhận trong một số nghiên cứu thực nghiệm, cho biết không chỉ các chủng lưu hành trong đàn lợn của Mỹ tại thời điểm bắt đầu bùng nổ dịch PRRS vào cuối những năm 80 của thế kỷ 20 có độc lực thấp hơn các chủng xuất hiện vào mùa hè năm 1996 mà cả những chủng xuất hiện sau cũng gây ra sự bùng nổ dịch PRRS với mức độ nghiêm trọng cao hơn. Nhưng, ngay cả vào đầu những năm 90, sự thay đổi của mức độ nghiêm trọng của bệnh trong các đợt bùng nổ dịch PRRS là hiển nhiên. Trong lúc chủ yếu lợn dưới 10 tuần tuổi bị ảnh hưởng bởi bệnh hô hấp mà được xếp loại cường độ từ nhẹ đến nặng khi không bị suy giảm sinh sản, các đợt dịch bùng nổ về bệnh hô hấp nặng ở lợn già hơn và suy giảm sinh sản xuất hiện, chủ yếu sảy thai ở giai đoạn muộn ở lợn cái mang bầu, cũng được quan sát thấy. Trong nỗ lực phân biệt mức độ khác biệt của độc tính virus PRRS, số đo cụ thể về khả năng gây bệnh hô hấp được phát triển. Điều này liên quan đến việc cho điểm phần trăm phổi bị ảnh hưởng bởi bệnh viêm phổi nhìn thấy được gây ra do sự nhiễm bệnh thực nghiệm ở lợn con bởi một trong số chín thể phân lập khác nhau của virus PRRS đã thông báo là có các mức độc lực khác nhau. Phương pháp này cho phép phân loại virus PRRS nhận được vào năm 1993 hoặc sớm hơn thành thể phân lập độc lực cao và thấp. Tuy nhiên, thu được các kết quả không thích hợp bằng phương pháp cho điểm này và đặc điểm bệnh khác được sử dụng để đánh giá độc tính virus. Trong trường hợp này, độc lực của hai thể phân lập, trước đây được phân loại thành độc lực cao (VR-2385) hoặc thấp (VR-2431), dựa trên bệnh lý chung của phổi ở lợn bị nhiễm bệnh, được thể hiện tương tự khi đánh giá về khả năng của virus gây suy giảm sinh sản giai đoạn muộn.

Thông số tin cậy hơn và thường được sử dụng hơn để xác định độc tính virus PRRS là theo dõi lượng virus nhiễm trong dòng máu (virus huyết) của lợn bị nhiễm bệnh. Ví dụ, việc cấy nhiễm lợn con bằng các thể phân lập virus PRRS được phân loại dưới dạng có độc lực trung bình hoặc cao tạo ra mức virus huyết cao xuất hiện trong vòng 3

ngày sau khi cấy nhiễm virus và có thể kéo dài trong hơn 28 ngày. Ngược lại, việc sử dụng liều tương đương của chủng virus PRRS đã giảm độc lực (vacxin) được tạo ra từ chủng virus bằng cách cấy chuyển liên tiếp trong tế bào khi tạo ra mức virus huyết thấp hơn đáng kể trong khoảng thời gian tương tự (>28 ngày). Đặc biệt là, virus huyết tạo ra từ sự nhiễm virus PRRS không liên quan đến sự phát triển của lợn và có liên quan tới mức độ nghiêm trọng của bệnh lâm sàng. Sự không thèm ăn cũng là một điểm đáng chú ý của bệnh nhiễm virus PRRS và ảnh hưởng bất lợi đến tốc độ tăng trọng của chúng và hiệu quả của thức ăn ở lợn con và lợn lớn nhanh. Tương tự, sự nhiễm thể phân lập virus PRRS độc lực trung bình hoặc cao làm giảm mạnh tốc độ tăng trọng của lợn đang tuổi lớn. Mặt khác, việc cấy nhiễm cho lợn bằng chủng virus PRRS giảm độc lực làm giảm rất ít sự phát triển của lợn hoặc không ảnh hưởng đến sự phát triển của lợn. Do đó, trong lúc virus PRRS có độc tính ức chế đáng kể tốc độ phát triển của lợn con và tạo ra virus huyết mạnh, thì chủng virus PRRS đã được làm cho không có độc tính (đã giảm độc lực) bằng cách cấy chuyển liên tiếp trong môi trường nuôi cấy tế bào lại không ảnh hưởng đến sự phát triển của lợn con và tạo ra virus huyết yếu hơn tương đối.

Ví dụ 2

Phân lập virus PRRS

Ví dụ này chứng minh việc phân lập virus PRRS đột biến. Thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 biểu hiện tự nhiên mức độc tính không đáng kể, gần giống với, nếu không thấp hơn, mức độc tính đã được mô tả đối với chủng virus PRRS đã giảm độc lực được tạo ra bằng cách cấy chuyển liên tiếp in vitro. Mức độc tính của thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 được xác định bằng cách đánh giá các thông số đã được sử dụng trước đây để xác định độc tính virus PRRS, bao gồm mức tăng trọng của lợn bị nhiễm virus, cường độ và khoảng thời gian tồn tại của virus huyết ở lợn bị nhiễm virus, và bệnh học chung của phổi lợn bị nhiễm virus. Các kết quả thu được đối với các phép đo của tất cả các thông số này hỗ trợ kết luận rằng độc lực của thể phân lập 89-46448-40 ở lợn là không đáng kể.

Để xác định mức độc lực được biểu hiện bởi thể phân lập virus 89-46448-40, các nhóm lợn 9-10 tuần tuổi từ đàn không bị nhiễm virus PRRS được cấy nhiễm hoặc bằng thể phân lập 89-46448-40 hoặc, dưới dạng so sánh, bằng thể phân lập virus “PRRS không điển hình” có độc lực cao NADC-20. Nhóm đối chứng bao gồm lợn được sử dụng chất cấy nhiễm giả. Trước khi cấy nhiễm virus và ở các thời điểm 4, 7, 10 và 14 ngày sau khi

cấy nhiễm, máu tĩnh mạch được thu hồi từ tĩnh mạch cảnh của mỗi con lợn và mức virus huyết được xác định định lượng bằng cách đo lượng virus nhiễm có mặt trong huyết thanh của mỗi động vật. Thể trọng được ghi lại đối với tất cả các con lợn vào các ngày nghiên cứu 0, 7 và 14 và sự thay đổi trọng lượng từ ngày kích thích được tính. Mức độ bệnh học chung của phổi lợn được cho điểm ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy nhiễm bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn ZMAC (Calzada-Nova et al., 2012), được nuôi cấy bằng cách sử dụng bình nuôi cấy mô dung tích 75cm² (Corning, Corning, NY) trong môi trường RPMI-1640 cùng với L-glutamin (Mediatec, Herndon, VA), được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (GIBCO®, Invitrogen, Grand Island, NY), 1mM natri pyruvat (Mediatec) và 1x axit amin không cơ bản (Mediatec), và giữ ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂. Do đại thực bào phế nang lợn là tế bào vật chủ tự nhiên đối với virus này, tế bào ZMAC hoàn toàn được chấp nhận đối với virus PRRS kiểu đại. Do đó, dòng tế bào này được sử dụng để thực hiện chuẩn độ virus PRRS từ mẫu lâm sàng (huyết thanh) và để chuẩn bị giống virus gốc để cấy nhiễm động vật. Dòng tế bào ZMAC không chứa các tác nhân ngẫu nhiên bao gồm bệnh tiêu chảy do virus ở bò, circovirus lợn, mycoplasma, virus PRRS, parvovirus lợn và adenovirus lợn.

Thể phân lập virus “PRRS cấp tính” NADC-20 được cấy chuyển một lần trong tế bào ZMAC trực tiếp từ huyết thanh của động vật bị nhiễm bệnh để tạo nguồn virus gốc để cấy nhiễm động vật. NADC-20 thể hiện là gây ra bệnh hô hấp đáng kể ở lợn con với điểm số tổn thương phổi toàn phần nằm trong khoảng từ 30-45% cũng như gây virus huyết đáng kể có cường độ tương tự với cường độ quan sát được đối với các thể phân lập virus PRRS có độc tính khác. Chất cấy nhiễm đối với virus 89-46448-40 được điều chế từ lần cấy chuyển thứ 7 trong tế bào ZMAC bắt đầu từ lọ gốc chứa virus 89-46448-40 được điều chế bởi NVSL (89-46448-40 MA104/2). Virus trong lọ nhận được từ NVSL là lần cấy chuyển thứ hai của virus 89-46448-40 trong tế bào MA-104 từ tiêu bản của trường hợp 89-46448. Để cấy nhiễm động vật, virus được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat (Mediatech) được bổ sung 0,05% huyết thanh lợn mới sinh (chất pha loãng) để thu được hiệu giá virus bằng 10⁴ TCID₅₀/ml. Chất cấy nhiễm giả chỉ chứa chất pha loãng. Hiệu giá kỳ vọng của virus nhiễm trong các chất cấy nhiễm được điều chế từ nguồn virus 89-46448-40 hoặc NADC-20 gốc được xác nhận sau này bằng cách chuẩn độ (TCID₅₀) trong tế bào ZMAC.

Việc xác định hiệu giá của virus nhiễm được thực hiện như sau. Mỗi chất cấy nhiễm virus được pha loãng liên tiếp mười lần đến độ pha loãng cuối cùng nằm trong khoảng từ 10^{-5} đến 10^{-8} , phụ thuộc vào dạng mẫu, trong ống nghiệm chứa 0,9ml môi trường RPMI-1640 (Mediatech) được bổ sung 5% huyết thanh bào thai bò (Gibco). Phần mẫu đại diện 0,1ml của mỗi mẫu đã pha loãng để thử nghiệm được chuyển một cách riêng rẽ vào các lỗ lập bốn trên đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ và chứa môi trường 0,1ml có $3-4 \times 10^4$ tế bào ZMAC/lỗ. Sau 96 giờ nuôi cấy ở 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO_2 , tế bào trong mỗi lỗ được kiểm tra sự có mặt của tác dụng bệnh học tế bào bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược. Các lỗ được cho điểm là dương đối với virus nhiễm khi $>90\%$ tế bào thể hiện sự chết tiền định và/hoặc phân giải. Số TCID_{50} mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Reed và Muench. Việc xác định hiệu giá tương tự của khả năng nhiễm virus được thực hiện trên mỗi mẫu huyết thanh và mẫu dịch súc rửa phế quản-phế nang (BAL: bronchoalveolar lavage) được thu hồi từ các con lợn riêng rẽ bị nhiễm virus hoặc không.

Thể trọng của mỗi con lợn được đo bằng cách sử dụng cân có màn hình hiện số. Cân được làm cân bằng bằng cách sử dụng trọng lượng hiệu chuẩn trước và sau mỗi lần sử dụng. Tất cả các con lợn được cân vào ngày thứ nhất của quá trình nghiên cứu (ngay trước khi nhiễm virus) và vào thời điểm 7 và 14 ngày sau đó. Mức tăng thể trọng đạt được ở các con lợn riêng rẽ ở thời điểm 7 và 14 ngày sau khi cấy nhiễm được tính tương đối với thể trọng tương đối của chúng vào ngày tiếp xúc với virus. Kết quả được thể hiện dưới dạng mức thay đổi thể trọng được điều chỉnh trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM: Standard Error of Mean) đối với mỗi nhóm điều trị.

Nhận được mẫu dịch súc rửa phế quản-phế nang (BAL). Mười bốn ngày sau khi kích thích virus, động vật được giết một cách nhân đạo và phổi của chúng được lấy ra nguyên vẹn từ khoang ngực. Mẫu dịch BAL nhận được từ mỗi phổi bằng cách ngâm chiết trong dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco vô khuẩn thùy giữa phải của nó (Mediatech) với một xy lanh nhựa dung tích 20cc nối vào bộ ống ngâm chiết (ống Butterfly 19 x 7/8 12", Abbott Laboratories, Chicago, IL) mà kim của nó bị cắt ra. Ống được đặt vào phế quản dẫn vào thùy giữa phải và cả ống và phế quản được kẹp lại cùng với dây để tránh dò rỉ. Sau đó, 10ml dung dịch đệm phosphat Dulbecco được đẩy từ từ vào thùy phổi. Sau khi massage nhẹ nhàng thùy phổi đã được truyền dịch, dịch được lấy ra bằng cách rút từ từ pittông. Thông thường, một nửa (5ml) dịch ngâm chiết được thu

hồi một cách dễ dàng. Sau đó, dịch BAL được chuyển vào ống Falcon polypropylen hình nón dung tích 15cc vô khuẩn (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) và giữ ở 4°C trong hơn 4 giờ nữa sau khi thu hồi. Sau đó, dịch BAL được làm sạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch tạo ra được chia thành các phần mẫu đại diện 1ml trong ống nghiệm Posi-Click 1,7ml vô khuẩn không chứa ARNaza và ADNaza và chất gây sốt, (Denville Scientific) và bảo quản ở -80°C cho tới khi kiểm tra lượng tải virus.

Việc cho điểm các tổn thương phổi chung được thực hiện như sau. Mười bốn ngày sau khi cấy nhiễm tất cả các động vật được giết một cách nhân đạo. Phổi của chúng được lấy ra từ khoang ngực và mức độ tổn thương chung trong cơ quan này được đánh giá dựa trên hệ thống cho điểm được mô tả bởi Halbur và các đồng tác giả (1995). Ngắn gọn thì mỗi thùy phổi được gán một số lượng nhất định các điểm để phản ánh phần trăm thể tích gần đúng của toàn bộ phổi thể hiện bởi thùy đó. Ví dụ, mười điểm (năm điểm ở mặt lưng và năm điểm ở mặt bụng) được gán cho thùy trước phải, thùy giữa phải, phần trước của thùy trước trái và phần đuôi của thùy trước trái. Thùy phụ được phân bổ 5 điểm và 27,5 điểm (15 đối với mặt lưng và 12,5 đối với mặt bụng) được đưa ra cho mỗi thùy đuôi phải và trái để đạt được tổng cộng 100 điểm. Dựa trên việc thử nghiệm đối với mỗi thùy về sự có mặt của các tổn thương phổi vĩ mô, mức độ viêm phổi ở mỗi thùy được đánh giá và phần trăm thời gian các điểm ở thùy đã được ấn định tương ứng, tạo ra giá trị mà khi được lấy tổng với các giá trị được xác định đối với tất cả các thùy phổi khác tạo ra điểm số chỉ thị phần trăm toàn phần của toàn bộ phổi bị nhiễm bệnh viêm phổi rõ rệt.

Lợn có nòi giống hỗn tạp (Yorkshire x Landrace x Duroc) từ trang trại không mang PRRS được chỉ định phân ngẫu nhiên vào các ngăn cách ly (3-4 lợn/ngăn) ở hai dãy riêng biệt (8 ngăn/dãy) có sự xử lý không khí riêng biệt ở Bộ phận an toàn sinh học của Đại học Illinois (Urbana, IL). Động vật được cung cấp chế độ ăn pha II dành cho lợn làm từ ngô không chứa thuốc (University of Illinois Feed Mill, Champaign, IL). Lợn được nhốt theo các quy trình mức y-sinh, duy trì chu kỳ 12 giờ sáng/tối, và được tùy ý sử dụng nước và thức ăn. Ở thời điểm 9-10 tuần tuổi, động vật được gây nhiễm qua đường trong mũi và trong cơ bằng 2ml (1ml mỗi đường với 10^4 TCID₅₀/ml) bởi một trong số hai virus (89-46448-40 hoặc NADC-20) hoặc bằng chất cấy nhiễm giả (chỉ chứa chất pha loãng). Sự lây nhiễm chéo của lợn trong quá trình nghiên cứu được tránh bằng cách gây nhiễm tất cả các động vật trong một ngăn bằng cùng một loại thể phân lập virus bằng

cách chỉ có lợn bị cấy nhiễm bằng một dạng thể phân lập virus trong mỗi dãy. Động vật được cấy nhiễm giả được giữ trong các ngăn ở cùng một dãy như dãy nhốt các con lợn bị nhiễm virus nhưng khác biệt về mặt địa lý. Các quy trình y-sinh nghiêm ngặt được tiếp theo là giữ lợn được cấy nhiễm giả không có virus PRRS và tránh lây nhiễm chéo giữa các dãy. Động vật được theo dõi hằng ngày về sự thay đổi sức sống và các dấu hiệu suy hô hấp đối với mỗi khoảng thời gian bắt đầu từ ngày tiếp xúc với virus và kéo dài suốt 14 ngày tiếp theo. Mẫu máu được thu hồi từ tĩnh mạch cánh bằng cách sử dụng ống nghiệm lưu trữ máu MONOJECT™ không chứa chất phụ gia (Tyco Healthcare Nhóm, Mansfield, MA) trước khi và tại các thời điểm 4, 7, 10 và 14 ngày sau khi cấy nhiễm. Huyết thanh được tách ra từ máu đông bằng cách ly tâm, thu hồi và bảo quản đông lạnh ở -80°C trong các phần mẫu đại diện nhỏ trong ống nghiệm vi ly tâm 1,5ml vô khuẩn cho tới khi thử nghiệm. Mức virus huyết ở lợn được xác định bằng cách đo lượng virus nhiễm trong mẫu huyết thanh đã chuẩn bị trong tế bào ZMAC như đã mô tả trên đây. Việc quan sát lâm sàng và phân tích mẫu huyết thanh xác nhận rằng không xảy ra lây nhiễm chéo của các thể phân lập virus PRRS giữa các dãy nhiễm bệnh và không xảy ra sự nhiễm virus PRRS ở lợn đối chứng được cấy nhiễm giả. Thể trọng của mỗi con lợn được xác định ngay trước khi nhiễm virus và vào các thời điểm 7 và 14 ngày sau đó. Mười bốn ngày sau khi tiếp xúc với virus, tất cả các động vật được giết một cách nhân đạo và phổi của chúng được lấy ra từ khoang ngực và cho điểm bệnh học chung như đã mô tả trên đây.

Các phân tích thống kê được thực hiện như đã mô tả. Quy trình mô hình tuyến tính tổng quát Univariate (General Linear Model Univariate) và thử nghiệm Fisher's LSD được áp dụng để đánh giá các khác biệt giữa các nhóm về mức virus huyết ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) và điểm số bệnh học phổi chung, phép phân tích cũng được chuyển đổi $\log_{10}$. Thử nghiệm Dunnett's t-test (2-phía) được sử dụng để so sánh tỷ lệ thay đổi trọng lượng của lợn từ thời điểm tiếp xúc virus đến thời điểm 7 và 14 ngày sau đó với thông số tương tự được đo trong nhóm tham chiếu (chủng ngừa giả). Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SAS® (Cary, NC). Giá trị $P < 0,01$ được cho là đáng kể về mặt thống kê.

Kết quả

Tác động của virus PRRS 89-46448-40 hoặc NADC-20 lên sự tăng trọng của lợn bị nhiễm bệnh. Lợn đang tuổi lớn được gây nhiễm bởi thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 (n=6) hoặc NADC-20 (n=10) hoặc được gây nhiễm giả (n=10) và phần trăm

tăng thể trọng của mỗi động vật riêng rẽ ở thời điểm 7 và 14 ngày sau đó được xác định và lấy trung bình đối với các thành viên của mỗi nhóm. (Fig.1). 7 ngày sau khi nhiễm virus, nhóm đối chứng được xử lý giả thể hiện mức tăng trọng trung bình bằng $24,8 \pm 1\%$ trong lúc đó thay đổi này là $18,6 \pm 2,2\%$ đối với nhóm được cấy nhiễm bằng virus 89-46448-40. Mức tăng trưởng trung bình đạt được ở lợn được gây nhiễm virus 89-46448-40 là $\frac{3}{4}$ mức tăng trưởng trung bình của động vật đối chứng và giá trị trung bình của mức tăng trọng lượng của hai nhóm này không khác biệt về mặt thống kê ($p > 0,09$). Ngược lại, trong cùng một khoảng thời gian, nhóm được cấy nhiễm virus NADC-20 đạt được mức tăng trọng trung bình trọng lượng chỉ bằng $6,4 \pm 2,4\%$, khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,001$) với mức tăng lớn hơn gần 4 lần tương ứng đạt được bởi động vật được xử lý giả. Cũng như vậy, sau khoảng thời gian 14 ngày sau cấy nhiễm virus, không có sự khác biệt về mặt thống kê ($p > 0,2$) giữa mức tăng trọng trung bình $45 \pm 2,5\%$ và $52 \pm 1,6\%$ ở lợn được cấy nhiễm virus 89-46448-40 và lợn được chủng ngừa giả, mà trong trường hợp này đạt được mức tăng trọng bằng $45 \pm 2,5\%$ và $52 \pm 1,6\%$, tương ứng. Một lần nữa, sự phát triển của nhóm được cấy nhiễm bằng virus NADC-20 bị suy giảm đáng kể so sánh với sự phát triển của động vật đối chứng ($p < 0,001$) do nhóm được cấy nhiễm bằng virus NADC-20 chỉ đạt được mức tăng trọng trung bình $26,5 \pm 3,6\%$.

Virus huyết và lượng tải virus ở phổi của lợn bị nhiễm thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 hoặc NADC-20 được xác định. Khi được lấy mẫu ngay trước khi cấy nhiễm, virus nhiễm không được phát hiện trong huyết thanh của động vật bất kỳ, xác nhận trạng thái không mang virus PRRS của chúng (Fig.2). Cũng như vậy, đối với nhóm được cấy nhiễm giả, virus có thể tồn tại và phát triển độc lập không được phát hiện trong bất kỳ mẫu nào được lấy sau khi cấy nhiễm virus các động vật khác, xác nhận rằng không xảy ra sự nhiễm vô tình của nhóm đối chứng. 4 ngày sau khi cấy nhiễm tất cả các động vật bị nhiễm hoặc bằng virus NADC-20 hoặc virus 89-46448-40 có virus huyết. Tuy nhiên, nhóm lợn bị nhiễm 89-46448-40 thể hiện mức virus huyết thấp đáng kể ($p < 0,001$), với giá trị trung bình của nhóm bằng $10^{2,9 \pm 0,19}$ TCID₅₀/ml, so với nhóm NADC-20 thể hiện giá trị trung bình của nhóm bằng $10^{4,1 \pm 0,12}$ TCID₅₀/ml. Mức virus huyết đạt giá trị cao nhất trong cả hai nhóm ở thời điểm 7 ngày sau khi nhiễm huyết thanh của lợn bị nhiễm virus NADC-20 thể hiện mức virus huyết trung bình $10^{4,6 \pm 0,27}$ TCID₅₀/ml, cao hơn trên 30 lần giá trị $10^{3,0 \pm 0,14}$ TCID₅₀/ml được phát hiện trong huyết thanh của lợn bị nhiễm virus 89-46448-40 ($p < 0,001$). Ở thời điểm 10 ngày sau nhiễm, cường độ của virus huyết bắt

đầu giảm trong cả hai nhóm, nhưng cũng như vậy ở tốc độ nhanh hơn ở lợn bị nhiễm thể phân lập 89-46448-40 như được chỉ ra bởi nồng độ trung bình thấp hơn trên 70 lần của virus trong huyết thanh của nhóm được cấy nhiễm virus 89-46448-40 ($10^{2,0\pm0,4}$ TCID₅₀/ml) so với mức virus huyết được phát hiện trong nhóm được cấy nhiễm thể phân lập NADC-20 ($10^{3,9\pm0,14}$ TCID₅₀/ml; $p < 0,001$). 4 ngày sau, mức virus huyết trung bình được phát hiện đối với hai nhóm vẫn duy trì sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,005$). Tuy nhiên tại thời điểm này chỉ 50% động vật nhiễm virus 89-46448-40 có virus huyết, trong lúc đó 90% động vật cấy nhiễm bằng virus NADC-20 vẫn có virus huyết. Tại thời điểm bị giết (14 ngày sau khi tiếp xúc với virus) virus nhiễm được phát hiện trong phổi của 90% lợn tiếp xúc với virus NADC-20 với giá trị trung bình hình học nhóm tạo ra bằng $10^{3,3}$ TCID₅₀/ml. Ngược lại, giá trị này chỉ bằng $10^{1,1}$ TCID₅₀/ml đối với nhóm cấy nhiễm bằng virus 89-46448-40 với chỉ một nửa các thành viên của nó có virus nhiễm phát hiện được trong phổi của chúng.

Ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy nhiễm virus bằng virus PRRS 89-46448-40 hoặc NADC-20, phổi của tất cả động vật trong nghiên cứu được cho điểm tổn thương chung để định lượng mức độ của bệnh viêm phổi. Một cách riêng rẽ, tất cả các con lợn trong nhóm được cấy nhiễm giả hoặc cấy nhiễm virus 89-46448-40- được đánh giá bằng điểm số tổn thương phổi chung $<25\%$. Ngược lại, 6 trong số 10 thành viên của nhóm bị nhiễm virus NADC-20 được thẩm định là có điểm số tổn thương phổi chung $\geq 25\%$, bao gồm hai con lợn có điểm số $>75\%$. Như kỳ vọng, động vật trong nhóm đối chứng được cấy nhiễm giả hầu hết có phổi bình thường với điểm số riêng nằm trong khoảng từ 0 đến 15% được lấy trung bình với điểm số trung bình nhóm $3,5\pm 2\%$ (Fig.3). Giá trị trung bình tăng đến $12,3\pm 3,3\%$ khi nhóm được cấy nhiễm virus 89-46448-40 được tính. Một cách riêng rẽ, phổi của chúng được cho điểm từ mức thấp bằng 0,7 đến mức cao bằng 24%. Các điểm số riêng rẽ này cũng cao hơn nhiều khi đánh giá phổi của lợn được cấy nhiễm virus NADC-20. Ở đây, các điểm số tổn thương phổi chung nằm trong khoảng từ 7 đến 78%, tạo ra điểm số trung bình nhóm $36,5\pm 7,7\%$. Do điểm số được đưa ra với các con lợn riêng rẽ trong mỗi nhóm điều trị khác nhau trên 10 lần, số liệu được chuyển thành giá trị log₁₀ để phân tích thống kê. Sau khi làm như vậy, xác định được rằng không có sự khác biệt thống kê giữa điểm số tổn thương phổi chung trung bình của nhóm được điều trị giả và nhóm được cấy nhiễm virus 89-48448-40. Tuy nhiên, sự khác biệt thống kê ($p < 0,001$) được quan sát khi so sánh này được áp dụng cho nhóm được xử lý giả và nhóm

được cấy nhiễm virus NADC-20.

Số liệu trong ví dụ này chứng minh rằng thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 biểu hiện tự nhiên mức độc tính không đáng kể. Ví dụ, lợn cấy nhiễm bằng thể phân lập 89-46448-40 duy trì tốc độ phát triển bằng tốc độ phát triển đạt được ở đàn được xử lý giả. Hơn nữa, virus huyết tạo ra từ việc cấy nhiễm lợn bằng thể phân lập virus 89-46448-40 có cường độ thấp hơn đáng kể so với virus huyết quan sát được ở đàn nhận thể phân lập virus PRRS NADC-20 có độc tính. Ngoài ra, mức virus huyết và sự có mặt của virus ở phổi sau khi gây nhiễm lợn con bằng thể phân lập virus 89-46448-40 có thời gian ngắn hơn những gì được báo cáo đối với động vật cùng tuổi sau khi nhiễm chủng virus PRRS kiểu đại hoặc đã giảm độc lực. Cuối cùng, mức độ của bệnh viêm phổi như được chỉ ra bởi điểm số tổn thương phổi chung trung bình không khác biệt thống kê khi xem xét nhóm được gây nhiễm giả và nhóm được cấy nhiễm virus 89-46448-40. Kết luận là, mức độc tính không đáng kể được biểu hiện tự nhiên bởi thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 là hơi giống nếu không thấp hơn những gì quan sát được với chủng virus PRRS đã giảm độc lực được tạo ra bằng cách cấy chuyển liên tiếp *in vitro*.

Ví dụ 3

Sự khác biệt về hệ gen và sinh học giữa chủng virus 89-46448-40 bố mẹ và chủng virus PRRS G16X, 794A61 và 111698

Ví dụ này chứng minh rằng nguồn dự trữ gốc ban đầu của thể phân lập virus PRRS 89-46448-40 được cấu thành bởi hỗn hợp riêng biệt bao gồm các virus có liên quan về mặt di truyền. Ba chủng virus PRRS được tạo ra và tinh chế đến đồng nhất từ nguồn virus 89-46448-40 gốc bằng cách sử dụng phép phân tích vết tan chuẩn (794A61 và G16X) hoặc phép pha loãng điểm cuối (111698). Hệ gen của các chủng virus 794A61, 111698 và G16X đã tinh chế khác biệt với quần thể virus có mặt trong nguồn virus 89-46448-40 gốc ban đầu bởi một số đột biến điểm nucleotit không đồng nghĩa và đồng nghĩa. Đột biến điểm nucleotit đồng nghĩa tạo ra 2, 3 hoặc 5 thay đổi axit amin, tương ứng, phân bố trong các protein virus cấu trúc và không cấu trúc của chủng virus 794A61, G16X và 111698, mà không được cho là được thể hiện trong hệ gen đã dịch mã của nguồn virus 89-46448-40 bố mẹ gốc. Các protein virus có sự thay đổi trình tự axit amin dự báo phân biệt ba chủng tạo ra từ virus trong nguồn 89-46448-40 bố mẹ gốc bao gồm protein không cấu trúc (Nsp)2, protein cấu trúc E và glycoprotein (GP)3 và GP4. Xem các Fig.4A-4D. Chủng virus 794A61, G16X và 111698 cũng khác biệt về mặt sinh

học với thể phân lập virus 89-46448-40 bố mẹ, như thể hiện bởi khả năng của chúng kích thích đáp ứng interferon alpha đáng kể bởi đại thực bào phế nang lợn. Ngoài ra, không giống thể phân lập virus 89-46448-40, chủng G16X không ức chế sự sản sinh interferon alpha bởi đại thực bào phế nang lợn, nhưng phần nào thúc đẩy sự tổng hợp interferon alpha đáp ứng với sự kích thích chúng bằng poly(I:C).

Bảng 1. Các axit amin trong chủng virus PRRS 794A61, 111698 và G16X liên quan đến virus 89-46448-40 tổ tiên

Chủng virus PRRS	Vị trí và sự thay đổi axit amin mới dự báo trong chủng virus PRRS tương ứng				Tổng số lượng axit amin khác biệt từ 89-46448-40
	NSP2	E	GP3	GP4	
794A61	495 (Leu)	-	94 (Val)	-	2
111698	338 (His) 495 (Leu)	-	94 (Val) 213 (Phe)	32 (Ser)	5
G16X	-	31 (Val) 60 (Ala)	94 (Val)	-	3

Như được thể hiện trong Bảng 1, virus có một hoặc nhiều đột biến về protein bao gồm NSP2, E, GP3, và/hoặc GP4, bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau: đối với NSP2 là 495 Leu và 338 His; đối với E là 31 Val và 60 Ala; đối với GP3 là 94 Val và 213 Phe; đối với GP4 là 32 Ser.

Các lớp đơn phân tử của dòng tế bào khỉ, MARC-145, được chuẩn bị trong bình nuôi cấy mô dung tích 75cm² chứa MEM đầy đủ bao gồm môi trường cơ bản tối thiểu Eagle (MEM) có độ pH được điều chỉnh đến giá trị 7,2 và được bổ sung 5% huyết thanh bào thai bò, 0,15% natri bicacbonat và kháng sinh. Bình chứa tế bào MARC-145 và 10ml môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO₂. Dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn ZMAC (soos ATCC PTA-8764), được nuôi cấy bằng cách sử dụng bình nuôi cấy mô 75cm² có độ bám dính cực thấp (Corning) trong môi trường RPMI-1640 chứa L- glutamin (Mediatec, Herndon, VA, USA), được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (GIBCO®, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 1mM natri pyruvat (Mediatec) và 1x axit amin không cơ bản (Mediatec), và giữ ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂. Dòng tế bào ZMAC không chứa các tác nhân ngẫu nhiên bao gồm bệnh tiêu chảy

do virus ở bò, circovirus ở lợn, mycoplasma, virus PRRS, parvovirus ở lợn và adenovirus ở lợn.

Toàn bộ các thể phân lập virus PRRS được sử dụng trong nghiên cứu này được lan truyền trong các lớp đơn phân tử tế bào MARC-145 như được mô tả bởi Kim và các đồng tác giả (1993). Với mục đích này, các lớp đơn phân tử nhập dòng của tế bào MARC-145 được cấy nhiễm bằng 1ml huyền phù virus và ủ trong 1 giờ ở 37°C để cho phép hấp thu virus. Sau đó, chất cấy nhiễm virus được loại bỏ, và 10ml MEM đầy đủ sạch được thêm vào. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO₂ cho tới khi quan sát được tác dụng bệnh học tế bào (4 ngày). Khi >75% tế bào trong lớp đơn phân tử thể hiện tác dụng bệnh học tế bào, hỗn hợp trong bình được thu hồi và được tinh chế hoặc chia thành vài phần mẫu đại diện 1-2ml trong lọ thủy tinh hoặc nhựa vô khuẩn và bảo quản ở -80°C cho tới khi cần dùng. Việc tinh chế virus để sử dụng trong thử nghiệm sinh học bắt đầu bằng môi trường nuôi cấy tế bào đầu tiên được làm sạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút và 4°C trong 10 phút. Sau đó, phần nổi lên trên được phân lớp bao phủ phần trên của 3ml dung dịch đệm TE (10mM Tris, pH=8,0, 1mM EDTA) chứa 15% sucroza trong ống nghiệm quay SW28 (Beckman, Palo Alto, CA). Sau đó, ống nghiệm được ly tâm ở 20000 vòng/phút và 4°C trong 3 giờ. sau đó, hạt chứa virus được tạo huyền phù lại trong 1ml dung dịch đệm TE, cho đi qua bộ lọc xylanh 0,2µm (Nalgene, Rochester, NY) và bảo quản dưới dạng các phần mẫu đại diện ở - 80°C cho tới khi cần sử dụng.

Nguồn gốc của virus được sử dụng trong nghiên cứu này được mô tả trên đây. Các virus có hệ gen được sử dụng để phân tích trình tự nucleotit là: thể phân lập 89-46448-40 gốc được cung cấp bởi NVSL từ phòng thí nghiệm VDL của Đại học Illinois (89-46448-40 MA104/2); lần cấy chuyển thứ nhất của vết tan 6 lần của “nguồn 794 gốc” là lần cấy chuyển thứ hai của 89-46448-40 MA104/2 trong tế bào MARC-145 ở Đại học Illinois (794A61 P1); lần cấy chuyển dịch pha loãng điểm cuối (MOI=0,001) của nguồn “794” gốc trong tế bào MARC-145 (111698); và lần cấy chuyển thứ hai của vết tan được tạo ra từ hai chu kỳ tinh chế vết tan của virus thu được trong quá trình cấy chuyển tiếp theo đầu tiên của nguồn “794” gốc ở MOI cao (MOI = 1,0) trong tế bào MARC- 145 (G16X P2). Chế phẩm virus được sử dụng để đánh giá tác động của virus PRRS lên sự sản sinh interferon alpha bởi đại thực bào phế nang lợn là: i) lần cấy chuyển thứ ba của 89-46448-40 MA104/2 trong tế bào MARC-145 (89- 46448-40 P3); ii) lần cấy chuyển thứ ba của

vết tan cuối cùng 794A61 trong tế bào MARC-145 (794A61 P3); iii) lần cấy chuyển thứ ba của virus 111698 trong tế bào MARC-145 (111698 P3); iv) lần cấy chuyển thứ năm của vết tan cuối cùng G16X trong tế bào MARC-145 (G16X P5); v) lần cấy chuyển thứ hai của chế phẩm virus NADC-20 kiểu đại, mà được cấy chuyển ban đầu trực tiếp từ huyết thanh của lợn bị nhiễm vào tế bào ZMAC, và một lần trong tế bào MARC-145 (NADC-20 P2), và, vi) lần cấy chuyển thứ ba của virus FL-12 bắt đầu bằng chế phẩm virus được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tế bào ZMAC bằng dòng vô tính nhiễm của virus này và sau đó cấy chuyển hai lần trong tế bào MARC-145 (FL-12 P3).

Việc xác định hiệu giá của virus nhiễm được thực hiện như sau. Chế phẩm virus được pha loãng liên tiếp mười lần trong ống nghiệm chứa 0,9ml MEM đầy đủ. Phần mẫu đại diện 0,1ml của mỗi mẫu đã pha loãng để thử nghiệm được chuyển một cách riêng rẽ vào các lỗ lặp bốn trên đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ và chứa 0,1ml môi trường phủ lên lớp đơn phân tử gần như nhập dòng của tế bào MARC-145. Sau khi 5 ngày nuôi cấy ở 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO₂, tế bào trong mỗi lỗ được kiểm tra sự có mặt của tác dụng bệnh học tế bào bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược. Các lỗ được cho điểm là dương đối với nhiễm virus khi >90% tế bào thể hiện sự chết tế bào tiền định và/hoặc phân giải. Số TCID₅₀ mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Reed và Muench.

Để phân lập ARN hệ gen của virus PRRS, ARN được chiết ra từ mẫu của giống virus PRRS 89-46448-40 gốc MA104/2, G16X P2, 794A61 P1, và 111698 (mô tả trên đây) bằng cách sử dụng bộ minikit QIAamp viral RNA (Qiagen, Chatsworth, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất như được mô tả dưới đây. 140µl mỗi mẫu được kết hợp với 560µl dung dịch đệm AVL chứa 5,6µl ARN mang trong ống nghiệm Eppendorf 1,5ml, rung bằng sung trong 15 giây, và được ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 10 phút. 560µl 100% etanol được cho vào mỗi ống nghiệm và hỗn hợp được rung bằng sung trong 15 giây và ly tâm ở 6000 x g trong 10 giây. 630µl mỗi hỗn hợp được cho lên phía trên bề mặt của cột quay QIAamp Mini và ly tâm ở 8000 x g trong 1 phút. Dịch rửa giải được bỏ đi và quy trình này được lặp lại đối với phần còn lại của mỗi hỗn hợp. Sau đó, mỗi cột được rửa lần lượt bằng 500µl dung dịch đệm AW1 (8000 x g trong 1 phút), và 500µl dung dịch đệm AW2 (20000 x g trong 3 phút). Sau đó, cột khô được ly tâm ở 20000 x g trong 1 phút trước khi 60µl dung dịch đệm AVE được cho lên mỗi cột. Sau 1 phút ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, ARN được rửa giải vào ống nghiệm Eppendorf

1,5ml trong quá trình ly tâm 1 phút ở 6000 x g. ARN đã rửa giải được bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng.

Việc khuếch đại phiên mã ngược (RT: Reverse Transcription) và phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: Polymerase Chain Reaction) của ARN hệ gen virus PRRS được thực hiện như sau. ARN của virus PRRS 89-46448-40 MA104/2 và 794A61 P1 được phiên mã ngược với sự có mặt của 50µM hexame ngẫu nhiên (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50mM Tris (pH=8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 0,5mM mỗi chất dATP, dCTP, dGTP, và dTTP và 25 đơn vị transcriptaza ngược của virus bệnh bạch cầu chuột nhắt (Promega, Madison, WI)/µl hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng này được sử dụng để RT hệ gen của virus PRRS G16X P2 và 111698 là tương tự ngoại trừ là đoạn môi hexame ngẫu nhiên được thay thế bằng 0,5µM đoạn môi RT REV (CAACTGCAGAGCTCATATGCAT) (SEQ ID NO: 30) hoặc đoạn môi khác có trình tự bổ trợ với ARN hệ gen của virus. Sau khi làm biến tính ARN và đoạn môi trong ống nghiệm Eppendorf 0,5ml hoặc ống nghiệm PCR 0,2ml ở 70°C trong 10 phút và làm lạnh ở 4°C trong 2 phút, các thành phần khác được thêm vào. Toàn bộ hỗn hợp được trải qua một chu kỳ dài 10 phút ở 25°C, một chu kỳ dài 50 phút ở 45°C, và một chu kỳ dài 15 phút ở 70°C (đoạn môi hexame ngẫu nhiên) hoặc một chu kỳ dài 60 phút ở 42°C và một chu kỳ dài 15 phút ở 70°C. cADN tạo ra được bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng.

Khuếch đại PCR của cADN của PRRSV để thu được đơn vị siêu sao chép để xác định trình tự nucleotit được thực hiện trong 12,5 hoặc 25µl hỗn hợp phản ứng. Các chế phẩm của chúng là giống nhau và chứa 1µl cADN (được điều chế như đã mô tả trên đây) và 0,25 đơn vị polymeraza ADN độ tin cậy cao IPROOF™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) mỗi 12,5µl hỗn hợp phản ứng, 1 x dung dịch đệm IPROOF™ HF, và 0,2mM mỗi chất dATP, dCTP, dGTP, và dTTP. Hỗn hợp phản ứng PCR trong ống nghiệm PCR 0,2ml được giữ ở 70°C trong máy luân nhiệt hoặc ở 4°C trên đá trước khi thêm đoạn môi xuôi và đảo ngược đặc hiệu virus PRRS tới nồng độ cuối cùng bằng 0,45mM. Trong trường hợp sau, sau đó mẫu được chuyển ngay vào máy luân nhiệt đã gia nhiệt sơ bộ đến 70°C. Để khuếch đại, mẫu được trải qua một chu kỳ biến tính ở 98°C trong 30 giây, ba mươi bảy chu kỳ biến tính ở 98°C trong 10 giây, ủ đoạn môi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 56°C đến 58°C trong 30 giây, và kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 1-3 phút, và một chu kỳ dài 5 phút ở 72°C. Các đơn vị siêu sao chép tạo ra được bảo quản ở -20°C cho tới khi điện di trong 0,7% gel agarosa. Các dải nhuộm etidium bromua đại

diện đơn vị siêu sao chép có kích thước đoán trước được quan sát bằng cách sử dụng ánh sáng cực tím có bước sóng dài (366nm), cắt, tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit thu hồi Zymoclean Gel DNA (ZYMO Research, Orange, CA) và rửa giải mỗi mẫu từ cột Zymo-Spin I trong 10µl H₂O không chứa ARNza.

Trong quá trình chuẩn bị để phân tích trình tự nucleotit, 2,8µl phần mẫu đại diện của mỗi đơn vị siêu sao chép đã tinh chế được kết hợp với 5,2µl 12,5% glyxerol, 2,0µl 5X dung dịch đệm xác định trình tự (400mM Tris, pH=9,0, 10mM MgCl₂), và 1,0µl chất kết thúc BIGDYE® v3.0 hoặc v3.1 Cycle Sequencing RR-24 (Applied Biosystems, Austin, TX) trong ống nghiệm PCR 0,2ml và giữ ở 4°C. Khi bổ sung đoạn môi xác định trình tự riêng rẽ đến nồng độ cuối cùng 1,5mM, mỗi ống nghiệm được chuyển vào máy luân nhiệt đã gia nhiệt sơ bộ đến 70°C. Sau đó, hỗn hợp phản ứng trải qua một chu kỳ dài 1 phút ở 95°C và 35 chu kỳ dài 15 giây ở 95°C, 5 giây ở 50°C, và 4 phút ở 60°C. Phản ứng hoàn thành được xử lý bởi Đại học Illinois ở khoa xác định trình tự ADN nhân Urbana-Champaign (UIUC) (Core DNA Sequencing Facility), và sắc ký đồ tạo ra được kiểm tra bằng mắt thường và chỉnh sửa bởi chương trình SeqEd (Applied Biosystems).

Để đánh giá đáp ứng interferon alpha của đại thực bào phế nang lợn với virus PRRS, giống nuôi cấy dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn ZMAC (2,5 x 10⁵ tế bào mỗi ống) được điều chế vào ống nghiệm polystyren đáy tròn 12x75mm (BD Falcon, Bedford, MA) chứa 0,5ml RPMI-1640 cùng với L- glutamin và HEPES (Mediatec, Herndon, VA) và được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (GIBCO®, Invitrogen, Grand Island, NY), 1mM natri pyruvat (Mediatec) và 1x axit amin không cơ bản (Mediatech). Mỗi giống nuôi cấy được trộn với 0,1ml môi trường hoặc không chứa (xử lý giả) hoặc chứa một trong số các chủng virus PRRS sau: 89-46448-40, G16X, 111698, 794A61, FL- 12, hoặc NADC-20, ở nồng độ xác định để tạo ra độ bội nhiễm (MOI) nằm trong khoảng từ 0,04 đến 5. Giống nuôi cấy được đặt ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂, thu hồi sau 8 giờ, và ly tâm trong 10 phút ở 4°C và tốc độ 2000 vòng/phút. Môi trường nổi lên trên không chứa tế bào tạo ra được thu hồi và kiểm tra sự có mặt của interferon alpha bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đặc hiệu.

Để đánh giá tác động của virus PRRS lên đáp ứng interferon alpha của đại thực bào đối với axit polyinosinic:polyxytidylic [poly(I:C)], các giống nuôi cấy riêng rẽ chứa 2,5 x 10⁵ tế bào ZMAC trong ống nghiệm đáy tròn chứa 0,5ml môi trường RPMI-1640 đã bổ sung được trộn với môi trường hoặc không chứa (xử lý giả) hoặc chứa một trong số

các chủng virus PRRS sau: 89-46448-40, G16X, 111698, 794A61, FL-12, hoặc NADC-20, ở nồng độ xác định để tạo ra MOI bằng 5. Sau 2 giờ ủ ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂, môi trường nuôi cấy được tiếp xúc với 10µg/ml poly(I:C) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Piscataway, NJ) và cho trở lại nhiệt độ 37°C và môi trường khí quyển 5% CO₂. Sau 8 giờ nữa, giống nuôi cấy được thu hồi và ly tâm trong 10 phút ở 4°C và tốc độ 2000 vòng/phút. Môi trường nổi lên trên không chứa tế bào tạo ra được thu hồi và kiểm tra sự có mặt của interferon alpha bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đặc hiệu.

Kết quả được thể hiện dưới dạng phần trăm lượng IFN alpha được phát hiện trong giống nuôi cấy tế bào ZMAC kích thích chỉ bằng poly(I:C), được đặt giá trị 100%. Lượng IFN alpha được phát hiện trong phần nổi lên trên của giống nuôi cấy tế bào ZMAC được xử lý bằng poly(I:C) ở nồng độ tế bào này nằm trong khoảng từ 11 đến 35ng/ml. Số liệu được thể hiện trên Fig.6 thể hiện giá trị trung bình ($\pm$ SEM) của ít nhất ba thử nghiệm độc lập.

Việc định lượng interferon alpha của lợn bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đặc hiệu được thực hiện như sau. Các lỗ riêng rẽ của đĩa Nunc Immulon II 96 lỗ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) được phủ trong 16 giờ ở 4°C bằng 50µl 5µg/ml interferon alpha kháng lợn mAb F17 (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA) trong 0,1M dung dịch đệm cacbonat (pH=9,6), rửa 3 lần bằng PBS chứa 0,05% Tween 20 (PBS-T), và sau đó ủ với 200µl dung dịch phong bế sữa (BioFix, Owings Mills, MD, USA) trong 1 giờ ở 25°C. Sau ba lần rửa bằng PBS-T, 50µl phần nổi lên trên của giống nuôi cấy tế bào hoặc chuẩn interferon alpha tái tổ hợp của lợn (PBL InterferonSource) đã pha loãng trong môi trường RPMI hoàn chỉnh được thêm vào các lỗ lặp hai và để trong 1,5 giờ ở 25°C. Sau khi rửa 5 lần bằng PBS-T, mỗi lỗ được ủ với 50µl of PBS-T chứa 0,3µg/ml interferon alpha kháng lợn mAb K9 đánh dấu bằng biotin (PBL InterferonSource) và 0,5% dung dịch phong bế sữa ở 25°C trong 1,5 giờ. Sau 5 lần rửa bằng PBS-T, mỗi lỗ được ủ với 50µl PBS-T chứa 20ng/ml streptavidin liên hợp với peroxidaza cây cải ngựa (BIOSOURCE™, Invitrogen) trong 20 phút ở 25°C và sau đó rửa 5 lần nữa bằng PBS-T. Sự phát triển màu được khơi mào ở 25°C bằng cách bổ sung 100µl cơ chất TMB (KPL, Gaithersburg, MD, USA) mỗi lỗ và kết thúc bằng 100µl 1M axit phosphoric. Mật độ quang được xác định ở 450nm bằng máy đọc đĩa SPECTRAMAX Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Kết quả được lấy trung bình và lượng interferon alpha được xác định bằng cách so sánh với đường cong chuẩn tạo ra

từ các giá trị thu được bằng các lượng đã biết của xytokin này.

Kết quả

Các khác biệt axit amin giữa protein của virus PRRS 89-46448-40 và ba chủng 794A61, 111698 và G16X đã tạo ra được xác định. Việc so sánh trình tự nucleotit chứa trên 99% toàn bộ hệ gen của ba chủng virus PRRS này (794A61, 111698, và G16X; Bảng 3-5), tương ứng với các phần dịch mã của hệ gen virus tạo ra các protein được biểu hiện đối với mỗi trong số ba chủng virus PRRS này (cũng xem các Bảng 1-2 và các Fig.4A-4D) được tạo ra từ thể phân lập virus 89-46448-40, bộc lộ 24 khác biệt nucleotit đơn trong số chúng. Ngoài ra, virus 794A61 có sự mất đoạn nucleotit 111 duy nhất trong gen Nsp2 (các vị trí axit amin 674-710). Trong số 13 vị trí thể nucleotit đơn mà trình tự axit amin bị ảnh hưởng, bảy vị trí tạo ra sự thay đổi axit amin không được thể hiện trong hệ gen của nguồn virus 89-46448-40 gốc. Bảy axit amin phân biệt ba virus này với thể phân lập 89-46448-40 tổ tiên của chúng, được phân bố trong các phần của Nsp2, protein E, GP3 và GP4 (được ký hiệu bởi các chữ cái in đậm trên các Fig.4A-4D). Hơn nữa, trong trường hợp của nguồn virus 89-46448-40 bố mẹ gốc, việc phân tích cho thấy rằng các vị trí axit amin 67 và 490 của Nsp2 và vị trí 96 của GP3 (được chỉ ra bởi các chữ cái đóng khung trên các Fig.4A và 4C), được phỏng đoán là đa hình dựa trên phạm vi ảnh hưởng của các đỉnh kép ở ba vị trí có liên quan trong sắc ký đồ trình tự hệ gen. Do đó, nguồn 89-46448-40 nguyên thủy gốc được tạo ra ở NVSL (89-46448-40 MA104/2) dường như là bao gồm các quần thể virus không đồng nhất nhưng có liên quan rất chặt chẽ. Về điều này, virus PRRS được biết là tồn tại dưới dạng phân bố chủng biến đổi của kiểu gen virus có liên quan. Do đó, tính đa dạng có giới hạn này trong nguồn virus 89-46448-40 MA104/2 gốc là phù hợp với những gì thường được quan sát đối với các nguồn virus PRRS gốc không tinh chế. Ngược lại, sự không chắc chắn như vậy về tính đồng nhất nucleotit không quan sát được trong quá trình xác định trình tự của hệ gen của các virus 794A61, 111698, và G16X, do đó cho biết tính đồng nhất hệ gen của chúng. Chứng cứ tiếp theo về tính đồng nhất hệ gen của ba chủng virus đã tinh chế này, chỉ một trong hai axit amin thay thế ở mỗi vị trí đa hình quan sát được trong nguồn virus 89-46448-40 gốc (chữ cái được đóng khung trên Fig.4) được phỏng đoán là có mặt trong protein tương ứng của chúng (thể hiện bằng chữ cái in nghiêng trên Fig.4) dựa trên trình tự hệ gen virus thể hiện đỉnh rõ ràng duy nhất ở các vị trí thích hợp trong sắc ký đồ trình tự hệ gen virus tương ứng. Quan trọng là cần lưu ý rằng một vài trong số bảy thay đổi axit amin là độc

nhất đối với một trong số các virus tạo ra. Ví dụ, chủng 111698 có các axit amin duy nhất ở các vị trí 338, 213, và 32 trong Nsp2, GP3, và GP4, tương ứng. Hơn nữa, chủng G16X là khác biệt về các vị trí axit amin 31 và 60 trong protein E (Fig.4B). Thú vị là, sự đột biến ở vị trí axit amin 94 trong GP3 là thông thường đối với toàn bộ ba chủng PRRSV, 794A61, 111698, và G16X.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin tưởng rằng sự đột biến để mã hóa alanin chứ không phải threonine ở axit amin 60 trong protein E chịu trách nhiệm hoặc góp phần vào kiểu hình gây miễn dịch có lợi của thể phân lập G16X, riêng rẽ hoặc phối hợp với isoleucine để thay đổi valine ở axit amin 31 trong protein E có thể góp phần tiếp vào kiểu hình này. Biết được rằng các axit amin đã thay đổi khác như thể hiện trên các Fig.4A-4D cũng có thể góp phần vào kiểu hình của thể phân lập G16X.

Các tác động của virus PRRS 89-46448-40 và ba chủng được tạo ra lên sự sản sinh interferon alpha bởi đại thực bào phẩy nang lợn được xác định. Các nghiên cứu trước đây cho rằng các lượng interferon alpha từ rất thấp đến không đáng kể được tạo ra bởi đại thực bào phẩy nang lợn khi tiếp xúc với virus PRRS, với sự thay đổi nhỏ giữa đáp ứng tạo ra bởi các thể phân lập virus PRRS khác nhau. Để xác định các khác biệt giữa thể phân lập 89-46448-40 bố mẹ và ba chủng tạo ra từ đó, đáp ứng interferon alpha của dòng tế bào ZMAC đại thực bào phẩy nang lợn với sự tiếp xúc của chúng với virus bất kỳ trong số bốn virus có liên quan này được nghiên cứu. Để so sánh, đáp ứng interferon alpha kích thích bởi NADC-20 và FL-12, hai thể phân lập virus PRRS kiểu đại, cũng được nghiên cứu. Việc tiếp xúc của tế bào ZMAC với thể phân lập virus 89-46448-40, FL-12 hoặc NADC-20 tạo ra đáp ứng interferon alpha yếu, tương tự về cường độ với đáp ứng được tạo ra bởi các thể phân lập virus PRRS kiểu đại khác từ đại thực bào phẩy nang lợn. Ngược lại, việc tiếp xúc của đại thực bào phẩy nang với chủng G16X ở độ bội nhiễm (MOI) cao nhất đã thử nghiệm (MOI=5) tạo ra đáp ứng có cường độ lớn gấp hai lần đáp ứng được tạo ra bởi thể phân lập tổ tiên của chúng (89-46448-40) ở cùng MOI (Fig.5). Đặc biệt là, việc gây nhiễm tế bào ZMAC bởi virus 111698 hoặc 794A61 gây tiết một lượng dồi dào interferon alpha lớn gấp 34 hoặc 40 lần, tương ứng, so với lượng được giải phóng đáp ứng với thể phân lập 89-46448-40 tổ tiên của chúng. Chứng cứ tiếp theo là chủng G16X khác biệt về mặt sinh học với thể phân lập virus 89-46448-40 thu được khi tế bào được tiếp xúc với virus PRRS trước khi được tiếp xúc với poly(I:C), kích thích mạnh sự sản sinh interferon alpha bởi đại thực bào phẩy nang lợn (Loving et al., 2006). Thông thường,

việc tiếp xúc của tế bào ZMAC với chỉ một mình poly(I:C) làm sinh ra từ 10-30ng/ml interferon alpha. Việc tiếp xúc của tế bào ZMAC với 89-46448-40, NADC-20 của virus FL-12 trong 2 giờ trước khi kích thích chúng bằng poly(I:C) đã ức chế mạnh (>25%) đáp ứng interferon alpha của tế bào ZMAC với poly(I:C). Ngược lại, khi không bị ức chế, việc tiết cytokin này bởi tế bào ZMAC đáp ứng với sự kích thích chúng bằng poly(I:C) được gia tăng khoảng 30% khi có mặt virus G16X (Fig.6).

Tóm lại, số liệu chứng minh rằng nguồn thể phân lập virus 89-46448-40 gốc có nguồn gốc từ NVSL (89-46448-40 MA104/2) là hỗn hợp các virus có kiểu gen có liên quan. Ví dụ này cũng cho biết rằng ba chủng virus PRRS đã tinh chế 794A61, 111698 và G16X khác với quần thể virus 89-46448-40 bố mẹ bởi một số thể đột biến điểm nucleotit đồng nghĩa và không đồng nghĩa. Thể đột biến điểm nucleotit không đồng nghĩa tạo ra 2, 3 hoặc 5 thay đổi axit amin phân bố trong Nsp2 và các protein cấu trúc protein E, GP3 và GP4, tương ứng, phân biệt chúng với virus bố mẹ. Ba chủng này cũng khác biệt về mặt sinh học với virus 89-46448-40 tổ tiên, như được thể hiện bởi khả năng duy nhất của chúng kích thích sự sản sinh interferon alpha bởi đại thực bào phế nang lợn.

Ví dụ 4

Vaccine virus PRRS

Ví dụ này chứng minh các khác biệt về hiệu lực vaccine của chủng virus PRRS 794A61, 111698 và G16X trong mô hình PRRS kích thích hô hấp thực nghiệm ở lợn đang tuổi lớn. Hiệu lực vaccine chú trọng đến các yếu tố cho biết khả năng phòng tránh các bệnh lâm sàng bao gồm tốc độ phát triển của lợn, cường độ và khoảng thời gian tồn tại của virus huyết ở lợn, và sự có mặt của virus trong phổi lợn. Các kết quả được tổng kết trong Bảng 2. Dựa trên các thông số này, hiệu lực bảo vệ chống lại cùng một virus kích thích khác loại đối với ba chủng virus PRRS gần như đẳng gen được đánh giá là kém (794A61), trung bình (111698) hoặc tốt (G16X).

Bảng 1. Kết quả của nghiên cứu kích thích chủng ngừa.

Chủng vaccine	Thông số hiệu lực vaccine			Đánh giá hiệu lực vaccine
	Giảm/loại trừ virus huyết	Giảm đến mức tối thiểu sự phát triển của lợn	Giảm/loại trừ virus liên quan đến phổi	

794A61	++ (1)	- (3)	- (3)	Kém
111698	+++ (1)	++ (1)	- (3)	Trung bình
G16X	+++ (1)	++ (1)	++ (2)	Tốt

Nguyên tắc: +++ cho biết tác động mạnh; ++ cho biết tác động tốt; + cho biết tác động trung bình; - cho biết không có tác động. (1),(2),(3): Mức đáng kể thống kê khi so sánh nhóm được chủng ngừa đã biết với nhóm đối chứng kích thích không được chủng ngừa. (1) $p \leq 0,001$; (2) $p < 0,005$; (3) $p > 0,4$ (không đáng kể).

Nguyên liệu và phương pháp

Các lớp đơn phân tử của dòng tế bào khí, MARC-145, được chuẩn bị trong bình nuôi cấy mô dung tích 75cm² chứa MEM đầy đủ bao gồm môi trường cơ bản tối thiểu Eagle (MEM) có độ pH được điều chỉnh đến giá trị 7,2 và được bổ sung 5% huyết thanh bào thai bò, 0,15% natri bicacbonat và kháng sinh. Bình chứa tế bào MARC-145 và 10ml môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO₂. Dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn ZMAC, được nuôi cấy bằng cách sử dụng bình nuôi cấy mô có độ bám dính cực thấp T75 (Corning, Corning, NY) trong môi trường RPMI-1640 cùng với L-glutamin (Mediatec, Herndon, VA), được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (GIBCO®, Invitrogen, Grand Island, NY), 1mM natri pyruvat (Mediatec) và 1x axit amin không cơ bản (Mediatec), và giữ ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂.

Ba thể phân lập virus PRRS (794A61, 111698, và G16X) được sử dụng làm vaccine tiềm tàng trong nghiên cứu này được lan truyền trong lớp đơn phân tử tế bào MARC-145 như đã mô tả trong tỉnh vực này. Các lớp đơn phân tử nhập dòng của tế bào MARC-145 được cấy nhiễm bằng 1ml huyền phù virus và ủ trong 1 giờ ở 37°C để cho phép hấp thu virus. Sau đó, chất cấy nhiễm virus được lấy ra và 10ml MEM đầy đủ sạch được thêm vào. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong khí quyển chứa 5% CO₂ cho tới khi nhận được tác dụng bệnh học tế bào (trong 4 ngày). Khi >75% tế bào trong lớp đơn phân tử thể hiện tác dụng bệnh học tế bào, hỗn hợp trong bình được thu hồi và tinh chế hoặc chia thành vài phần mẫu đại diện 1-2ml trong lọ thủy tinh hoặc nhựa vô khuẩn và bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng. Thể phân lập virus “PRRS cấp” NADC-20 được sử dụng làm virus kích thích được cấy chuyển một lần trong tế bào ZMAC trực tiếp từ huyết thanh của động vật bị nhiễm bệnh để tạo nguồn virus để cấy

nhiễm động vật. Virut NADC-20 đã được thể hiện để tạo ra bệnh hô hấp đáng kể ở lợn con, với điểm số tổn thương phổi chung tổng cộng nằm trong khoảng từ 30-45% và virut huyết đáng kể có cường độ tương tự với cường độ quan sát thấy đối với các thể phân lập virut PRRS có độc tính khác. Để cấy nhiễm động vật, virut được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat (Mediatech) đã bổ sung 0,05% huyết thanh lợn mới sinh (dịch loãng) để thu được hiệu giá virut bằng 10^4 TCID₅₀/ml. Chất cấy nhiễm giả chỉ chứa dịch loãng.

Nguồn gốc của ba loại virut vacxin được sử dụng trong nghiên cứu này được mô tả chi tiết trên đây. Nguồn virut được sử dụng để chủng ngừa là: lần cấy chuyển thứ hai của thể phân lập đã tinh chế vết tan 6 lần của “nguồn 794 gốc” là lần cấy chuyển thứ hai của 89-46448-40 MA104/2 (thể phân lập 89- 46448-40 gốc được tạo ra bởi NVSL của Đại học Illinois VDL) trong tế bào MARC-145 (794A61 P2); lần cấy chuyển pha loãng điểm cuối (MOI=0,001) của nguồn “794” gốc trong tế bào MARC-145 (111698); và lần cấy chuyển thứ ba của vết tan tạo ra từ hai chu kỳ tinh chế vết tan của virut thu được trong quá trình cấy chuyển thứ nhất sau đó của nguồn “794” gốc ở MOI cao (MOI = 1,0) trong tế bào MARC-145 (G16X P3).

Trước khi cấy nhiễm, vacxin và nguồn virut kích thích gốc được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat Dulbecco (Mediatech, Manassas, VA) được bổ sung 0,05% huyết thanh lợn mới sinh để thu được liều nhiễm bằng 104,1 hoặc 104,7 TCID₅₀/ml, tương ứng. Hiệu giá kỳ vọng của mỗi chất cấy nhiễm được thay đổi vào ngày sử dụng bằng cách chuẩn độ trong tế bào MARC- 145 (ba vacxin) hoặc tế bào ZMAC (virut kích thích NADC-20) như được mô tả dưới đây.

Để định lượng lượng virut nhiễm (hiệu giá của virut nhiễm) trong chế phẩm được sử dụng để chủng ngừa, nguồn virut gốc được pha loãng liên tiếp mười lần trong ống nghiệm chứa 0,9ml MEM đầy đủ. Phần mẫu đại diện 0,1ml của mỗi mẫu đã pha loãng để kiểm tra được chuyển riêng rẽ vào các lỗ lập bốn trên đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ và chứa 0,1ml môi trường phủ lên lớp đơn phân tử gần nhập dòng của tế bào MARC-145. Sau 5 ngày nuôi cấy ở 37°C trong môi trường ẩm chứa khí quyển 5% CO₂, tế bào trong mỗi lỗ được kiểm tra sự có mặt của tác dụng bệnh học tế bào bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược. Lỗ được cho là dương đối với nhiễm virut khi >90% tế bào trong đó thể hiện sự chết tiền định và/hoặc phân giải. Số TCID₅₀ mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Reed và Muench (Reed and Muench, 1938).

Để xác định lượng virut nhiễm trong chế phẩm virut kích thích, nguồn NADC-20

gốc được pha loãng liên tiếp mười lần trong ống nghiệm chứa 0,9ml môi trường RPMI-1640 (Mediatech) được bổ sung 5% huyết thanh bào thai bò (Gibco). Phần mẫu đại diện 0,1ml của mỗi mẫu đã pha loãng để kiểm tra được chuyển riêng rẽ vào các lỗ lập bốn trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ và chứa môi trường 0,1ml có $3-4 \times 10^4$ tế bào ZMAC/lỗ. Sau 96 giờ cấy nhiễm ở 37°C trong môi trường ẩm chứa khí quyển 5% CO_2 , tế bào trong mỗi lỗ được kiểm tra sự có mặt của tác dụng bệnh học tế bào bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược. Lỗ được cho điểm dương đối với nhiễm virus khi $>90\%$ tế bào trong đó thể hiện sự chết tiền định và/hoặc phân giải. Số TCID_{50} mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Reed và Muench. Việc chuẩn độ tương tự độ nhiễm virus bằng cách sử dụng tế bào ZMAC được thực hiện trên mỗi mẫu huyết thanh và dịch súc rửa phế quản-phế nang (BAL) được thu hồi từ các con lợn riêng rẽ bị nhiễm virus hoặc không. Thể trọng của mỗi con lợn được đo bằng cách sử dụng cân có màn hình hiện số. Cân được làm cân bằng bằng cách sử dụng trọng lượng hiệu chuẩn trước và sau mỗi lần sử dụng. Tất cả các con lợn được cân vào ngày kích thích virus (ngay trước khi cấy nhiễm) và ở thời điểm 7 ngày sau khi cấy nhiễm. Thể trọng tăng của các con lợn riêng rẽ ở thời điểm 7 ngày sau khi kích thích được tính tương đối với thể trọng tương ứng của chúng vào ngày cấy nhiễm virus NADC-20. Các kết quả được thể hiện dưới dạng mức thay đổi trọng lượng đã điều chỉnh trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) đối với mỗi nhóm xử lý.

Bảy ngày sau khi kích thích virus NADC-20, động vật được giết một cách nhân đạo và phổi của chúng được lấy ra nguyên vẹn từ khoang ngực. Mẫu dịch BAL nhận được từ mỗi phổi bằng cách ngâm chiết trong dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco vô khuẩn thùy giữa phải của nó (Mediatech) với một xy lanh nhựa dung tích 20cc nối vào bộ ống ngâm chiết (ống Butterfly 19 x 7/8 12", Abbott Laboratories, Chicago, IL) mà kim của nó bị cắt ra. Ống được đặt vào phế quản dẫn vào thùy giữa phải và cả ống và phế quản được kẹp lại cùng với dây để tránh rò rỉ. Sau đó, 10ml dung dịch đệm phosphat Dulbecco được đẩy từ từ vào thùy phổi. Sau khi massage nhẹ nhàng thùy phổi đã được truyền dịch, dịch được lấy ra bằng cách rút từ từ pittông. Thông thường, một nửa (5ml) dịch ngâm chiết được thu hồi một cách dễ dàng. Sau đó, dịch BAL được chuyển vào ống Falcon polypropylen hình nón dung tích 15ml vô khuẩn (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) và giữ ở 4°C trong hơn 4 giờ nữa sau khi thu hồi. Sau đó, dịch BAL được làm sạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch tạo ra được chia

thành các phần mẫu đại diện 1ml trong ống nghiệm Posi-Click 1,7ml vô khuẩn không chứa ARNaza và ADNaza và chất gây sốt, (Denville Scientific) và bảo quản ở -80°C cho tới khi được kiểm tra lượng tải virus.

Virus huyết được phát hiện và đo bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR định lượng, với đoạn mô tả như được mô tả dưới đây. ARN được chiết từ mẫu huyết thanh thu được từ lợn được chủng ngừa bằng virus PRRS và lợn không được chủng ngừa ở thời điểm 7 ngày sau khi kích thích bằng virus NADC-20 bằng cách sử dụng bộ kit mini QIAamp viral RNA (Qiagen, Chatsworth, CA) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và như được mô tả dưới đây. 140 μl mỗi mẫu được kết hợp với 560 μl dung dịch đệm AVL chứa 5,6 μl ARN mang trong ống nghiệm Eppendorf 1,5ml, rung bằng súng trong 15 giây, và ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 10 phút. 560 μl 100% etanol được thêm vào mỗi ống nghiệm và hỗn hợp này được rung bằng súng trong 15 giây và ly tâm ở 6000 x g trong 10 giây. 630 μl mỗi hỗn hợp được cho lên bề mặt phía trên của cột quay QIAamp Mini spin và ly tâm ở 8000 x g trong 1 phút. Dịch rửa giải được loại bỏ và quy trình này được lặp lại đối với phần còn lại của mỗi hỗn hợp. Sau đó, mỗi cột được rửa lần lượt bằng 500 μl dung dịch đệm AW1 (8000 x g trong 1 phút) và 500 μl dung dịch đệm AW2 (20000 x g trong 3 phút). Sau đó, cột khô được ly tâm ở 20000 x g trong 1 phút trước khi 60 μl dung dịch đệm AVE được cho lên mỗi cột. Sau 1 phút ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, ARN được rửa giải vào trong ống nghiệm Eppendorf 1,5ml trong thời gian ly tâm 1 phút ở 6000 x g. ARN đã rửa giải được bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng. Mẫu huyết thanh ARN được phiên mã ngược với sự có mặt của 0,5 μM đoạn môi hỗ trợ, đảo ngược (CACACGGTCGCCCTAATTG) (SEQ ID NO: 27), 50mM Tris (pH=8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl_2 , 10mM DTT, 0,5mM mỗi chất dATP, dCTP, dGTP, và dTTP và 25 đơn vị transcriptaza ngược của virus gây bệnh bạch cầu ở chuột nhắt (Promega, Madison, CA) / μl hỗn hợp phản ứng. Sau khi làm biến tính ARN và đoạn môi trong ống nghiệm Eppendorf 0,5ml hoặc ống nghiệm PCR 0,2ml ở 70°C trong 10 phút và làm lạnh ở 4°C trong 2 phút, các thành phần khác được thêm vào. Toàn bộ hỗn hợp được trải qua một chu kỳ dài 10 phút ở 25°C , một chu kỳ dài 50 phút ở 45°C , và một chu kỳ dài 15 phút ở 70°C (đoạn môi hexamer ngẫu nhiên) hoặc một chu kỳ dài 60 phút ở 42°C và một chu kỳ dài 15 phút ở 70°C . cADN tạo ra được bảo quản ở -80°C cho tới khi cần sử dụng.

Phản ứng PCR thời gian thực đối với việc khuếch đại/dò hệ gen PRRSV trong hỗn hợp phản ứng được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị TaqMan Universal PCR Master

Mix, ABI SDS 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA), đoạn mồi xuôi TGGTGAATGGCACTGATTGAC (SEQ ID NO: 28), đoạn mồi ngược nêu trên, và đoạn dò TaqMan, 6-FAM-TGTGCCTCTAAGTCACC (SEQ ID NO: 29). (trong đó FAM là 6-carboxyfluorescein). Đoạn mồi và đoạn dò được thiết kế bởi Primer Express, phần mềm phiên bản 2.0, (Applied Biosystems) và được mua từ Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT, Coralville, IA), và Applied Biosystems, tương ứng. Số lượng bản sao ARN của virus PRRS được xác định bằng cách so sánh giá trị chu kỳ ngưỡng đạt được (CT: Threshold Cycle) với đường cong chuẩn tạo ra bằng cách sử dụng các lượng bản sao ARN đã biết tương ứng với khoảng 9% vùng đầu tận cùng 3' của hệ gen của chủng virus PRRS G16X.

Ba mươi con lợn lai chéo (Yorkshire x Landrace) 35 ± 2 ngày tuổi nhận được từ đàn lợn không mang virus PRRS ở Đại học Illinois, Học viện thú y, Trung tâm nghiên cứu lợn (Urbana, IL). Lợn được phân ngẫu nhiên vào các ngăn cách ly ($n=3$ lợn/ngăn) ở Khoa an toàn sinh học của Đại học Illinois (Urbana, IL). Nhiệt độ nằm trong khoảng từ 24°C đến 28°C được duy trì trong các ngăn. Lợn được cho ăn chế độ ăn pha II làm từ ngô cung cấp nồng độ chất dinh dưỡng đáp ứng hoặc vượt nhu cầu ước lượng của lợn rất gầy. Lợn được nhốt 3 con thành một nhóm theo các quy trình mức y-sinh trong mười ngăn $180 \times 182 \text{ cm}$, duy trì chu kỳ 12 giờ sáng/tối, và được tùy ý sử dụng nước và thức ăn. Sau khoảng thời gian 5 ngày thích nghi với môi trường, động vật trong 6 ngăn được tiêm một lần trong cơ ở vùng mông bởi 2ml huyền phù chứa $10^{4,1}$ TCID₅₀/ml virus G16X-P3, 794A61-P2 hoặc 111698, tổng cộng 2 ngăn mỗi loại virus vaccine ($n=6$ lợn). Sáu động vật trong hai ngăn bổ sung được chủng ngừa giả bằng 2ml dịch pha loãng (PBS được bổ sung 0,5% huyết thanh lợn). Sáu lợn này vẫn ở trong hai ngăn không được gây miễn dịch và được sử dụng làm đối chứng tuyệt đối. Vào thời điểm $39,5 \pm 0,5$ ngày sau khi chủng ngừa, toàn bộ động vật đã gây miễn dịch cũng như sáu con được chủng ngừa giả được kích thích bằng $10^{5,3}$ TCID₅₀ thể phân lập virus PRRS NADC-20 có độc lực. Chất cấy nhiễm kích thích chứa 4ml virus NADC-20 ở nồng độ $10^{4,7}$ TCID₅₀/ml được sử dụng liều lượng 2ml trong mũi và trong cơ. Thể trọng của mỗi động vật được xác định ngay trước và ở thời điểm 7 ngày sau khi kích thích virus. Động vật được theo dõi hằng ngày các thay đổi về sức sống và dấu hiệu suy hô hấp đối với mỗi khoảng thời gian bắt đầu từ ngày kích thích và kéo dài suốt 7 ngày tiếp theo. Mẫu huyết thanh được thu hồi ngay trước và ở thời điểm 7 ngày sau khi kích thích, và mức virus huyết được xác định bằng

cách đo lượng hệ gen virus PRRS/ml huyết thanh bằng cách sử dụng phản ứng PCR thời gian thực định lượng. Bảy ngày sau khi kích thích, động vật được giết một cách nhân đạo và phổi của chúng được lấy ra nguyên vẹn từ ngực. Mẫu BAL được thu hồi từ thùy giữa phải và lượng virus nhiễm trong chúng được xác định bằng cách chuẩn độ trong tế bào ZMAC.

Các phân tích thống kê được thực hiện như sau. Phương pháp General Linear Model Univariate và kiểm định Fisher's LSD được áp dụng để đánh giá các khác biệt giữa các nhóm về mức độ của virus huyết (số lượng bản sao hệ gen virus /ml) và lượng virus nhiễm ở phổi ($TCID_{50}/ml$). Để phân tích, cả hai số đo này được chuyển thành giá trị $\log_{10}$ và so với giá trị trung bình của nhóm được kích thích bằng cách chủng ngừa giả. Kiểm định t Dunnett (2-phía) được sử dụng để so sánh sự thay đổi trọng lượng vi sai của lợn trước và sau khi kích thích virus với thông số tương tự được đo trong nhóm được kích thích bằng cách chủng ngừa giả tham chiếu. Phép phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SAS thống kê (Cary, NC). Giá trị $P < 0,01$ được cho là đáng kể về mặt thống kê.

Để đánh giá hiệu lực vaccine của chủng virus PRRS 794A61, 111698 và G16X, các nhóm lợn được gây miễn dịch bằng một trong số các virus hoặc được chủng ngừa giả và kích thích khoảng 5,5 tuần sau đó bằng chủng "PRRS cấp" NADC-20 có độc tính. Một nhóm lợn nữa được giữ không nhiễm virus PRRS và dùng làm đối chứng tuyệt đối. Vào ngày kích thích, thể trọng trung bình của toàn bộ 30 con lợn trong nghiên cứu là $49,9 \pm 3$ kg. Không phát hiện thấy sự khác biệt đáng kể giữa thể trọng trung bình được thiết lập đối với nhóm bất kỳ trong số ba nhóm được chủng ngừa này và của nhóm được chủng ngừa giả hoặc đối chứng tuyệt đối. Do đó, việc tiếp xúc với chủng bất kỳ trong số ba chủng vaccine này hiển nhiên là không ảnh hưởng đến sự phát triển của động vật. Ngược lại, việc cấy nhiễm động vật không được chủng ngừa bằng virus NADC- 20 đi kèm với sự giảm mạnh sự phát triển tiềm tàng của chúng trong 7 ngày tiếp theo như được chứng minh bởi sự thay đổi trọng lượng $3 \pm 1,6\%$, một phần sáu mức tăng của trọng lượng trung bình $18,5 \pm 1,54\%$ trong nhóm đối chứng tuyệt đối (Fig.7). Tương tự như vậy, việc gây miễn dịch lợn bằng vaccine 794A61 là không thành công về điều này do các động vật được kích thích bằng virus này có sự tăng trọng trung bình bằng $5,7 \pm 1,5\%$ là giá trị không khác biệt về mặt thống kê ($p > 0,4$) với giá trị ghi nhận được đối với nhóm được chủng ngừa giả, kích thích bằng virus. Tuy nhiên, khi so sánh với nhóm đối chứng này,

trước khi chủng ngừa động vật bằng virus G16X hoặc 111698 ($p \leq 0,001$) chống lại đáng kể tác động tiêu cực của việc kích thích bằng virus NADC-20 trong đó hai nhóm này tương ứng có mức tăng thể trọng trung bình bằng $9,8 \pm 0,54\%$ và $10,5 \pm 1,1\%$ (Fig.7).

Tác động của việc chủng ngừa virus PRRS lên mức virus huyết ở lợn được kích thích bằng virus NADC-20 được xác định. Như kỳ vọng, không có con lợn nào trong số các con lợn đối chứng tuyệt đối, mà không được trực tiếp tiếp xúc với virus PRRS, có lượng virus nhiễm đo được trong huyết thanh của chúng khi được lấy mẫu cùng với các động vật khác tại thời điểm 7 ngày sau khi kích thích virus NADC-20. Do đó, sự lây nhiễm chéo giữa các ngăn không xảy ra. Cũng giống như vậy, tại thời điểm này, virus nhiễm không rõ ràng trong huyết thanh của lợn bất kỳ trong số lợn được chủng ngừa bằng virus G16X. Mặt khác, virus PRRS nhiễm dễ dàng được phát hiện trong huyết thanh từ toàn bộ sáu động vật được chủng ngừa giả cũng như trong 3 và 4 trong số sáu thành viên của nhóm đã chủng ngừa hoặc bằng 794A61 hoặc 111698, tương ứng. Để đo một cách chính xác hơn mức virus huyết ở các động vật này, đặc biệt là các thành viên hiển nhiên âm tính với virus PRRS trong nhóm được chủng ngừa bằng G16X, thử nghiệm PCR thời gian thực định lượng được sử dụng (Fig.8). Như kỳ vọng, hệ gen virus PRRS không được phát hiện trong huyết thanh của lợn bất kỳ trong số các con lợn thuộc nhóm đối chứng tuyệt đối. Ngược lại, các động vật được chủng ngừa giả, kích thích bằng virus có lượng tải virus rất cao trong huyết thanh của chúng với giá trị trung bình nhóm bằng $10^{7,85}$ bản sao hệ gen virus /ml. Mức virus huyết thấp đáng kể ($p \leq 0,001$) đối với lợn được gây miễn dịch bằng virus 794A61, 111698 hoặc G16X như được chỉ ra bằng giá trị trung bình nhóm của chúng bằng $10^{6,3}$, $10^{5,0}$, và $10^{4,6}$ bản sao hệ gen virus/ml, tương ứng. Cần lưu ý rằng hệ gen virus PRRS không thể được thấy rõ trong huyết thanh từ 2 và 3 trong số 6 động vật được chủng ngừa bằng virus 111698 và G16X, tương ứng, bằng cách sử dụng thử nghiệm có độ nhạy rất cao này.

Tác động của việc chủng ngừa bằng virus PRRS lên lượng tải virus trong phổi của lợn được kích thích bằng virus NADC-20 được xác định. Vào thời điểm 7 ngày sau khi thử nghiệm bằng virus NADC-20, dịch BAL được thu hồi từ phổi của lợn trước đây đã chủng ngừa giả hoặc gây miễn dịch bằng virus 794A61 hoặc 111698, có lượng virus nhiễm tương tự, với giá trị trung bình nhóm tương tự về mặt thống kê là $10^{4,5}$, $10^{4,8}$, và $10^{4,1}$ TCID₅₀/ml, tương ứng (Fig.9). Ngược lại, mẫu dịch BAL từ nhóm chủng ngừa bằng virus G16X có hiệu giá trung bình bằng $10^{2,4}$ TCID₅₀/ml thấp hơn đáng kể (p

$<0,005$) so với giá trị được xác định đối với nhóm được chủng ngừa giả. Hơn nữa, một trong số lợn cấy nhiễm bằng virus nhiễm có thể phát hiện được thiếu virus G16X trong dịch BAL, cho thấy rằng virus kích thích đã được làm sạch ra khỏi cơ thể của nó.

Dựa trên các kết quả này xác định được rằng các chủng virus PRRS 794A61, 111698 và G16X gần như đẳng gen có thể được đánh giá về hiệu lực vacxin là kém, trung bình và tốt, tương ứng.

Ví dụ 5

Vacxin virus PRRS G16X

Ví dụ này chứng minh khả năng của virus G16X tạo ra tính miễn dịch bảo vệ khác loại cho lợn được chủng ngừa bằng virus này và kích thích bằng virus PRRS typ 2 có độc tính của dòng khác, đó là dòng 1. Trong nghiên cứu này, hiệu lực của hai virus vacxin PRRS được kiểm tra. Một nhóm động vật được chủng ngừa bằng vacxin G16X cạnh tranh. Nhóm lợn thứ hai của được chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV hiện đang được bán trên thị trường. Nghiên cứu này là nghiên cứu đối chứng giả được, mù. Để đạt được sự che chắn, toàn bộ các nhân viên liên quan đến việc quan sát hằng ngày, cho điểm lâm sàng, đánh giá bệnh học phổi chung và hiển vi và xử lý mẫu và giải thích các kết quả phòng thí nghiệm sử dụng mặt nạ trong suốt nghiên cứu pha thực nghiệm.

24 con lợn 6 tuần tuổi được mua từ trang trại nghiên cứu thú y của Đại học Illinois. Đàn lợn tại trang trại này được biết là không mang các tác nhân gây bệnh chủ yếu ở lợn bao gồm virus PRRS, cúm, mycoplasma và xircovirus. Tình trạng âm tính đối với kháng thể PRRS của động vật nghiên cứu được xác nhận bằng huyết thanh học trước thời điểm bắt đầu nghiên cứu. Toàn bộ 24 động vật được đeo thẻ ở tai và chỉ định ngẫu nhiên vào nhóm điều trị (bốn nhóm và 6 con mỗi nhóm) và sau đó được chuyển đến Khoa an toàn động vật BSL2. Toàn bộ lợn được chỉ định vào cùng một nhóm điều trị (6 con) được nhốt cùng với nhau. Sau khoảng thời gian 7 ngày làm quen với môi trường, mỗi nhóm lợn được chủng ngừa theo chỉ định điều trị chúng như sau:

Nhóm 1: Mỗi con lợn trong nhóm vacxin giả được tiêm trong cơ bằng 2ml dịch pha loãng vacxin.

Nhóm 2: Mỗi con lợn trong nhóm này được nhận một liều Ingelvac PRRS MLV (Số seri 245-D45). Vacxin này được hoàn nguyên và sử dụng trong cơ theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (chuẩn độ chất chủng ngừa cho biết rằng toàn bộ liều được sử dụng là 4×10^4 TCID₅₀).

Nhóm 3: Mỗi con lợn trong nhóm này được tiêm trong cơ 2ml chứa tổng cộng 4×10^4 TCID₅₀ vaccin virus PRRS G16X sống.

Nhóm 4 này được dùng làm đối chứng tuyệt đối (môi trường) và không được chủng ngừa. Hai tám ngày sau khi chủng ngừa, tất cả các động vật trong nhóm 1, 2 và 3 được kích thích bằng 4×10^4 TCID₅₀ thể phân lập virus PRRS LTX1 độc lực cao. Dựa trên phân tích phát sinh chủng loại của trình tự nucleotit của gen GP5, virus LTX1 được cho là thuộc dòng 1 của PRRSV typ 2 (kiểu Bắc Mỹ). GP5 của virus LTX1 có độ tương đồng <88% với hai vaccin được sử dụng. Virus LTX1 được phân lập năm 2012 từ trang trại lợn ở Illinois, bị một đợt bùng nổ nghiêm trọng của virus PRRS. Hội chứng quan sát được được đặc trưng bởi tỷ lệ thụ thai bằng 60%, sảy thai giai đoạn muộn và phôi thai chết. Ngoài ra, có khoảng thời gian 6 tuần có tỷ lệ chết 100% trước cai sữa, tiếp đó 2 tuần nữa có tỷ lệ chết 80% lợn con trước cai sữa. Đợt bùng nổ bệnh nghiêm trọng đến nỗi chủ trang trại và bác sỹ thú y chăm sóc quyết định giảm số lượng lợn của trang trại. Một nửa liều kích thích virus được sử dụng trong mũi bằng cách sử dụng bình phun thuốc mũi và một nửa còn lại được tiêm trong cơ. Sau đó, động vật được theo dõi các dấu hiệu lâm sàng hằng ngày trong 14 ngày tiếp theo. Mẫu máu được thu hồi ngay trước và ở các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích virus. Thẻ trọng được ghi lại vào ngày kích thích và ở các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích. Ở ngày thứ 14 sau khi kích thích, động vật được giết một cách nhân đạo và phôi được kiểm tra bệnh học chung. Mẫu được lấy mô bệnh học và việc súc rửa phế quản-phế nang được thực hiện. Tất cả các phương pháp đã sử dụng trước đây được mô tả trong lĩnh vực này, ngoại trừ dịch BAL được thu hồi để kiểm tra lượng tải virus nhiễm bằng cách sử dụng đại thực bào phế nang lợn dòng tế bào ZMAC.

a. Chủng ngừa bằng virus G16X kích thích đáp ứng interferon-alpha mạnh ở thời điểm 4 ngày sau chủng ngừa.

Trong nghiên cứu này, phát hiện thấy rằng virus G16X có tính chất sinh học duy nhất, đó là 4 ngày sau khi sử dụng trong cơ virus vaccin G16X ở lợn, đáp ứng interferon alpha mạnh toàn thân được phát hiện trong huyết thanh của chúng. Đáp ứng này bắt đầu giảm 4 ngày sau đó (ngày 8 sau chủng ngừa) và vẫn tồn tại ở thời điểm 14 ngày sau chủng ngừa (Fig.13). Ngược lại, lợn cấy nhiễm bằng vaccin Ingelvac PRRS MLV thể hiện đáp ứng thấp hơn nhiều (4-lần) ở đỉnh của đáp ứng (ngày 4 sau chủng ngừa) và không phát hiện được ở ngày 14. Các kết quả này xác định rằng virus G16X có kiểu sinh

học duy nhất về đáp ứng interferon alpha của lợn với sự tiếp xúc với virus này.

b. Hiệu lực của vaccin G16X đối với sự tăng trọng ở lợn kích thích bằng virus PRRS độc lực cao

Tại thời điểm kích thích, thể trọng trung bình của 24 lợn trong nghiên cứu là 51 ± 4 kg, và không có sự khác biệt về thể trọng trung bình giữa các nhóm. Cũng giống như vậy, không quan sát được các dấu hiệu lâm sàng ở động vật gây miễn dịch bằng vaccin PRRS MLV thương mại hoặc virus G16X. Các kết quả này cho biết rằng chỉ như vaccin MLV hiện đang bán sẵn trên thị trường, virus G16X, được tạo ra từ virus không có độc lực có trong tự nhiên, cũng là virus không có độc lực. Do đó, việc tiếp xúc của lợn với vaccin G16X hoặc Ingelvac PRRS MLV không ảnh hưởng rõ rệt lên sự phát triển hoặc sức khỏe của chúng.

Để đo tính miễn dịch bảo vệ tạo ra bởi hai vaccin đang được thử nghiệm đối với sự phát triển của lợn, % mức tăng thể trọng được tính đối với mỗi động vật từ ngày kích thích virus đến các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích virus. Lợn trong nhóm không được kích thích (đối chứng tuyệt đối) thể hiện tốc độ tăng trưởng đều đặn với mức tăng trung bình 32% trong 14 ngày (Fig.14). Khi được so sánh với nhóm đối chứng tuyệt đối, sự gây nhiễm ở lợn được chủng ngừa giả bằng virus PRRS LTX1 gây ra mức giảm đáng chú ý về tốc độ phát triển của chúng, và tạo ra sự mất thể trọng thực từ 7 đến 10 ngày sau khi kích thích. Sau đó, động vật bắt đầu tăng trọng trở lại, kết thúc bằng mức tăng trọng 14% tính từ thời điểm kích thích (Fig.14). Trước khi gây miễn dịch động vật bằng vaccin đã bị mất tác dụng âm tính trong quá trình kích thích bằng virus LTX1 trong đó các nhóm nhận vaccin sau khi tăng trọng trung bình khoảng 12%, 19% và 29% ở các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích, tương ứng.

c. Hiệu lực của vaccin G16X về việc kiểm soát virus huyết ở lợn bị nhiễm virus PRRS độc lực cao khác loại

Tại thời điểm thử nghiệm (28 ngày sau chủng ngừa), không có con lợn nào trong thử nghiệm phát hiện virus nhiễm trong huyết thanh của chúng. Tất cả các động vật được chủng ngừa giả và sau đó kích thích bằng virus LTX1 biểu hiện mức virus huyết cao ở các thời điểm 7, 10 và 14 ngày sau khi kích thích (Fig.15). Toàn bộ lợn trong hai nhóm được chủng ngừa có virus huyết không có sự khác biệt chính giữa hai nhóm này ở ngày 7 sau khi thử nghiệm. Tuy nhiên, ở thời điểm 10 ngày chỉ 1 trong số 5 động vật được chủng ngừa bằng virus G16X vẫn còn virus huyết. Ngược lại, 5 trong số 6 động vật được

chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV có virus huyết. 14 ngày sau khi chủng ngừa, tất cả các động vật trong cả hai nhóm được chủng ngừa đều không phát hiện thấy virus nhiễm trong máu của chúng.

d. Hiệu lực của vaccin G16X về việc kiểm soát lượng tải virus ở phổi của lợn bị nhiễm virus PRRS độc lực cao

Ở thời điểm 14 ngày sau khi kích thích bằng virus LTX1, không ngạc nhiên là lượng tải virus lớn nhất trong dịch BAL của lợn được phát hiện ở tất cả các thành viên của nhóm không được chủng ngừa (Fig.16, trung bình $10^{5,8}$ TCID₅₀/ml). Tại thời điểm này, chỉ ba trong số năm động vật được gây miễn dịch bằng G16X virus phát triển trong tế bào ZMAC vẫn có lượng virus PRRS có thể phát hiện được trong dịch BAL của chúng. Lượng tải trung bình ở ba động vật dương tính này là $10^{2,9}$ TCID₅₀/ml. Điều này thể hiện mức giảm >700 lần về lượng virus trung bình nhóm có mặt trong phổi của lợn không được chủng ngừa và lợn đối chứng được kích thích. Ngược lại, virus nhiễm vẫn được phát hiện trong dịch BAL của năm trong số 6 lợn được chủng ngừa bằng Ingelvac PRRS MLV. Hơn nữa, lượng tải virus trung bình của chúng trong năm động vật dương tính này là $10^{3,8}$ TCID₅₀/ml, khoảng lớn hơn 10 lần lượng đo được đối với nhóm đã gây miễn dịch bằng virus G16X.

Tóm lại, ví dụ này chứng minh rằng virus G16X, có họ với vaccin thương mại MLV không có độc tính, nhưng có hiệu lực tốt hơn nhiều vaccin MLV hiện đang được bán trên thị trường trong quá trình kích thích khác loại bằng virus PRRS typ 2 có độc tính của dòng khác.

Ví dụ 6

Thông tin trình tự

Các phương án theo sáng chế có thể liên quan tới một hoặc nhiều trình tự axit nucleic hoặc protein bao gồm các mục được mô tả ở đây. Thông tin trình tự bất kỳ, bao gồm thông tin được thể hiện riêng rẽ ở dạng điện tử, được cho là một phần của bản mô tả ở đây.

Bảng 3. SEQ ID NO:1

cattttgtgtt	gtcaggagct	gtgaccattg	gcacagccca	aaacttgctg	cacggaagcg	60
cccttctgtg	acagcctcct	tcaggggagc	ttgggggtct	ttccctagca	ccttgcttcc	120
ggagttgcac	tgctttacgg	tctctccacc	cctttaacca	tgtctgggat	acttgatcgg	180
tgcacgtgta	cccccaatgc	caggtgtgtt	atggcggagg	gccaagtcta	ctgcacacga	240
tgctcagtg	cacggtctct	ccttcctctg	aatctccaag	tttctgaact	cggggtgcta	300
ggcctattct	acaggcccga	agagccactc	cggtggacgt	tgccacgtgc	attccccact	360
gttgagtgtc	ccccgcgg	ggcctgctgg	ctttctgcaa	tttttccaat	tgacgaatg	420
accagtggaa	acctgaactt	ccaacaaaga	atggtacggg	tcgcagctga	actttacaga	480
gccggccagc	tcacccttac	agtcttaaag	actttacaag	tttatgaacg	gggttgccgc	540

tggtagccca	tcgttaggacc	tgtccctgga	gtggccggtt	tcgccaactc	cctacatgtg	600
agtataaaac	ctttcccggy	agcaactcac	gtgttaacca	acctgccgct	cccgcagaga	660
cccaagcctg	aagacttttg	cccccttgag	tgtgctatgg	ctaccgtcta	tgacattggt	720
catgacgccg	tcatgtatgt	ggccgaaggg	aaagtctcct	gggcccctcg	tggcggggat	780
gaagtgaat	ttgaaactgt	ccccggggag	ttggagttga	ttgcgaatcg	actccgcacc	840
tccttcccg	cccaccacac	agtggacatg	tctaagttcg	ccttcacagc	ccctgggcgt	900
ggtgtttcta	tgcgggtcga	acgccaacac	ggctgctccc	ccgctgacac	tgtccctgaa	960
ggcaactgct	ggtggagcct	gtttaacttg	ctcccactgg	aagttcagaa	caaagaaatt	1020
cgccatgcta	accaatttgg	ctaccagacc	aagcatggtg	tctctggcaa	gtacctacag	1080
cggaggctgc	aagttaaatg	tctccgagca	gtaactgacc	tgaatggacc	tatcgctgta	1140
cagtagctct	ccgttaagga	gagttggatc	cgccacttga	aactggcgga	agaaccacgc	1200
taccctgggt	ttgaggacct	cctcagaata	aggggttgagc	ccaacacgtc	gccattgggt	1260
gacaaggatg	aaaaaatttt	ccggttttggc	agtcacaagt	ggtacggcgc	tggaaagaga	1320
gcaaggaaaag	cacgctctag	tgcgactgct	acagtcgctg	gccgcgcttt	gtccgttctg	1380
gaaacccggc	aggccaagga	gcacgaggtt	gccggcgcca	acaaggctgg	gcacctcaaa	1440
cattactccc	cgcttgccga	agggaattgt	ggttggcact	gcatttccgc	catcgccaac	1500
cggatggtga	attccaaatt	tgaaccacac	cttcccga	gagtgagacc	ttcagatgac	1560
tgggtactag	acgaggatct	tgtgaatgcc	atccaaatcc	tcaggctccc	tgcggccttg	1620
aacaggaacg	gcgcttgtgc	tagcgccaag	tacgtactta	agctggaagg	tgagcattgg	1680
actgtcactg	tgaccctctg	gatgtcccct	tctttgctcc	ctcttgaatg	tgttcagggc	1740
tgttgtgagc	ataagggcag	tcttgggttcc	ccagatgcag	tcgaggtttt	cggatttgac	1800
cctgtcttgc	ttgaccggct	ggctgaggtg	atgcacctgc	ctagcagtgc	tatcccagcc	1860
gctctggccg	aaatgtccgg	cgattccgat	cgttccggtt	ccccggtcac	caccgtgtgg	1920
actgtttcgc	agttctttgc	ccgccacaat	ggagggaatc	accctgacca	agtgcgctta	1980
gggaaaatta	tcagcctttg	tcagggtgatt	gaggactgct	gctgttccca	gaacaaaacc	2040
aaccgggtca	ccccggagga	ggtcgcagca	aagattgacc	tgtaccttcg	tggcgcaaca	2100
aatcttgaag	aatgcttggc	caggcttgag	aaagcgcgcc	cgccacgcgt	aatggacacc	2160
tcctttgatt	gggatgttgt	gctccctggg	gttgaggcgg	caactcagac	gaccgaactg	2220
ccccagggtc	accagtgctc	cgctctggtc	cctgttgtaa	ctcaaaagtc	cttggaacaac	2280
aaactcggtc	ccctgaccgc	cttttcactg	gctaactact	actaccgtgc	gcaaggtagc	2340
gaagtctgct	accgtgaaag	actaacgcgc	gtgctctcca	agttggaagg	ggttgttcga	2400
gaagaatatg	ggctcatgcc	aaccgggcct	ggtccacggc	ccactactgc	acgcgggctc	2460
gacgaactca	aagaccagat	ggaggaggac	ttgctgaaac	tggctaacgc	ccagacgact	2520
tcggacatga	tggcctgggc	agtcgagcag	gttgacctaa	aaacttgggt	caagaactac	2580
ccgcggtgga	caccaccacc	ccctccgcga	aaagttcagc	ctcgaaaaac	gaagcctgtc	2640
aagagcttgc	cagagagaaa	gcctgtcccc	gccccgcgca	ggaagggttg	gtccgattgt	2700
ggcagcccg	tttcattggg	cgacgatgtc	cctaaccagt	gggaagattt	ggctgttggt	2760
agcccttttg	atctcccgac	cccacctgag	ccggcaacac	cttcaagtga	gctgggtgatt	2820
gtgtccgcac	cgcaatgcat	cttcaggccg	gcgacaccct	tgagttagcc	ggctccaatt	2880
cccgcacccc	gcggggttgt	gtctcgaccg	gtgacaccct	tgaatgagcc	gatacctgtg	2940
cccgcaccgc	ggcgtaagtt	tcagcagatg	agaagattga	gttcggcggc	ggtaatcccc	3000
ccgtaccagg	acgagccctc	agatttgtct	gcttccctac	agactgaata	tgaggcctct	3060
cccctagcac	cgccgcagag	cgagggtgtt	ctgggagtag	aggggcagga	agctgaggaa	3120
gccctaagtg	aaatctcgga	catgtcgggt	aacattaaac	ctgcgtccgt	atcatcaagc	3180
agctccttgt	ccagcgtgag	aatcactcgc	ccaaaatact	cagctcaagc	catcatcgac	3240
tcgggcgggc	cctgcagtgg	gcatctocaa	gaggtaaagg	aaacatgcct	cagtatcatg	3300
cgcgaggcat	gtgatgcgac	taagcttgat	gaccctgcta	cgcaggagtg	gctttctcgc	3360
atgtgggatc	gggtggacat	gtgacttgg	cgcaacacgt	ctgcttacca	ggcgtttcgc	3420
accttagatg	gcaggttaaa	gttcctocca	aaaatgatac	tcgagacacc	gccgccttat	3480
ccgtgtgagt	tttgtatgat	gcctcacacg	cctgcacctt	ccgtagggtc	ggagagcgac	3540
cttaccattg	gctcagtcgc	tactgaagat	gttccacgca	tcctcgagaa	aatagaaaat	3600
gtcggcgaga	tgaccaacca	gggacccttg	gccttctccg	aggataaacc	ggtagatgac	3660
caacttgcca	aagacccccg	gatatcgctg	cagaggtctg	acgagagcac	atcagctccg	3720
cccgcaggca	caggtggcgc	cggctcattt	accgatttgc	cgcttcggga	cggcggtgat	3780
gcgagcggag	gggggccggt	ttggacggta	aaaagaaaag	ctgaaagggt	ctttgaccaa	3840
ctgagccgtc	aggtttttga	cctcgtctcc	catctccctg	ttttcttctc	acgccttttc	3900
aaccttgggc	gtggttatcc	tccgggtgat	tggggttttg	cagctttttac	tctattgtgc	3960
ctctttttat	gttacagtta	cccagccttt	ggtattgtct	ccctcttggg	tgtgttttct	4020
gggtcttctc	ggcgcttctg	aatgggggtt	tttggtgctg	ggttggcttt	tgctgttggt	4080
ctgttcaagc	ctgtgtccga	cccagtcggc	gctgcttgtg	agtttgactc	gccagagtgt	4140
agaaatatcc	ttcattcttt	tgagcttctc	aaaccttggg	accctgttctg	cagccttggt	4200
gtgggccccg	tcggtctcgg	tcttgccatt	cttggcagg	tactgggcgg	ggcacgcagc	4260
atctggcact	ttttgcttag	gcttggcatt	gttgagact	gtgtcttggc	tggagcttat	4320
gtgctttctc	aaggttaggtg	taaaaagtgc	tggggtactt	gtataagaac	tgctccta	4380
gaggtcgctt	ttacgtgtt	tccttttaca	cgtgcgacca	ggtcgtcact	aatcgacctg	4440
tgcgatcgg	tttgtgcgcc	aaaaggcatg	gaccccat	ttctcgccac	tgggtggcgc	4500
gggtgctggg	ccggccgaag	ccccattgag	caacctctg	aaaaacccat	cgcgtttgcc	4560
cagttggatg	aaaagaagat	tacggctagg	actgtggtcg	cccagcctta	tgaccccaac	4620
caagccgtaa	agtgtctgcg	ggtattgcag	gcgggtgggg	tgatggtggc	taaggcagtc	4680
ccaaaagtgg	tcaaggtttc	cgctgttcca	ttccgagccc	ccttctttcc	caccggagtg	4740
aaagttgacc	ctgaatgcag	ggtcgtggtt	gaccccgaca	ctttcacccg	agctctccgg	4800

tctggctact	ccaccacaaa	cctcgtcctc	ggtgtagggg	atthttgccca	gctgaatgga	4860
ttaaaaaatca	ggcaaatthc	caagccttca	ggaggaggcc	cacacctcat	ggctgccctg	4920
catgttgctc	gctcgaatgg	tttgacatg	cttgctggga	tttatgtgac	tgcggtgggt	4980
tcttgccgga	cgggcaccaa	cgacccgtgg	tgcgctaacc	cgthttgccg	ccctggctac	5040
ggacctggct	ctctctgcac	gtccagattg	tgcattttccc	aacatggcct	taccttgccc	5100
ttgacagcac	togtggcggg	attcggattt	caagaaattg	ccttggtcgt	tttgattttt	5160
gtttccatcg	gaggcatggc	tcacagggtg	agttgtaagg	ctgatatgct	gtgtgttttg	5220
cttgcaattg	ccagctatgt	ttgggtacct	cttacctggg	tgcctttgtg	gtttccttgc	5280
tggttgcgct	gtttttcttt	gcaccccttc	accatcctat	ggttggtggt	tttcttgatt	5340
tctgtgaata	tgccttcagg	aatcttgggc	atgggtgtgt	tggtttctct	ttggcttctt	5400
ggtcgttata	ctaattgttg	tggctctgtc	acccctacg	acattcatca	ttacactagt	5460
ggcccccgcg	gtgttgccgc	cttggctacc	gcaccagatg	ggacctactt	ggccgctgtc	5520
cgcgcgctg	cggtgactgg	cgcacccatg	ctgtttaccc	cgtcccagct	tgggtctctt	5580
cttgagggtg	ctttcagaac	tcgaaaaccc	tcactgaaca	ccgtcaatgt	ggtcgggtcc	5640
tccatgggct	ctggcggggt	gttcaccatc	gacggaaaaa	ttaagtgcgt	aactgccgca	5700
catgtcctta	cgggcaattc	agctagggtt	tccggggctg	gcttcaatca	aatgcttgac	5760
tttgacgtaa	agggagattt	cgccatagct	gattgcccga	attggcaagg	ggctgcccc	5820
aagaccaat	tctgcaagga	tgggtggact	ggcctgtcct	attggctaac	atcctctggc	5880
gtcgaacccg	gcgtcatgtg	gaccttctgt	tcaccgcgtg	cggcgattcc	5940	
gggtccccag	tgatcaccca	ggccggtgag	cttatcgggc	ttcacacggg	atcaaataaa	6000
caaggaggag	gcacgtttac	gcgcccctca	ggccagtttt	gtaatgtggc	acccatcaag	6060
ctaagcgaat	taagtgaatt	ctttgctggg	cctaaggctc	cgtcgggtga	tgtgaagggt	6120
ggcagccaca	taattaaaga	cataggcgag	gtgccttcag	atctttgtgc	cttgcttgct	6180
gccaaacctg	aactggaagg	aggcctctcc	accgtccaac	ttctttgtgt	gtttttcttc	6240
ctgtggagaa	tgatgggaca	tgccctggacg	cccttggttg	ctgtgggttt	ctttatcttg	6300
aatgagggtt	tcccagccgt	cctgggtccg	agtgttttct	cctttggaat	gtttgtgcta	6360
tcctggctca	cgccatggtc	tgcgcaagtt	ctgatgatca	ggcttctaac	agcagccctt	6420
aaaggaaca	gatggctact	tgcccttttt	agcctcggtg	cagtgaaccg	ttttgtcgca	6480
gatcttgctg	ctactcaggg	gcacccgttg	caggcagtta	tgaatttgag	cacctatgca	6540
ttcctgcctc	ggatgatgtg	tgtgacctca	ccagtcctcg	tgattgcgtg	tgggtgtgtg	6600
cacctacttg	ccatcattht	gtactttgtt	aagtaccctg	gcctgcacca	aatccttggt	6660
ggtgatggag	tgthctctgc	ggctttcttc	ctgcgatact	ttgccgagg	aaagttgagg	6720
gaaggggtgt	cgcaatcctg	cggaatgaat	catgagtctc	tgactgggtg	cctcgctatg	6780
agactcaatg	acgaggactt	ggatttctct	acgaaatgga	ctgattttta	gtgctttgtt	6840
tctgcgtcca	acatgaggaa	tgacgcgggt	caatttatcg	aggctgccta	tgctaaagca	6900
cttagagtag	agcttgccca	gttggtgcag	gttgataaag	ttcgagggaac	tttgcccaaa	6960
cttgaagcct	ttgctgatac	cgtggcacc	caactctcgc	ccggtgacat	tgthgtcgct	7020
ctcggccata	cgctctttg	cagtatcttc	gacctaaagg	ttggtagcac	caagcatacc	7080
ctccaagcca	ttgagaccag	agtccttgct	gggtccaaaa	tgaccgtggc	gcgcgtcgct	7140
gacccgaccc	ccacgcccc	acccgcacct	gtgcccctcc	ccctccacc	gaaagttctg	7200
gagaatggcc	ccaacgcttg	gggggatgag	gaccgtttga	ataagaagaa	gaggcgag	7260
atggaagccc	tcggcatcta	tgthtatggc	gggaaaaagt	accagaaatt	ttgggataag	7320
aattccgggt	atgtgtttta	tgaggagggt	cataataaca	cagatgagtg	ggagtgtctc	7380
agagttggcg	accctgccga	ctttgacctg	gagaagggaa	ctctgtgtgg	acatgtcacc	7440
attgaagata	aggcttacc	tgthttacacc	tcacatctctg	gtaagaagtt	cttggtcccc	7500
gtcaatccag	agaatggaag	agtccaatgg	gaagctgcaa	agctttccgt	agagcaggcc	7560
cttggtatga	tgaacgtcga	cggcgaactg	actaccaaag	aactggagaa	actgaaaaga	7620
ataattgaca	aactccagg	cctgactaag	gagcagtggt	taaactgcta	gccgccagcg	7680
gcttgacccg	ctgtgggtgc	ggcggttg	ttgttactga	aacagcggta	aaaatagtca	7740
aatttcacaa	cggaccttc	accctgggac	ctgtgaattt	aaaagtggcc	agtgaggttg	7800
agctaaaaga	cgcggttgag	cacaaccaac	accggtttgc	gagacgggtc	gatgggtgtg	7860
ttgtgctcct	gcgttcggcg	gttccttcgc	ttatagacgt	cttgatctcc	ggtgctgatg	7920
catctcccaa	gttgcttgcc	catcacgggc	cgggaaacac	tgggatcgat	ggcacgctct	7980
gggattttga	gtccgaagcc	actaaagagg	aagtcgcact	tagtgcgcaa	ataatacagg	8040
cttggtgacat	taggcgcggc	gacgctcctg	aaattgggtc	cccttacaag	ctgtaccctg	8100
ttaggggtaa	ccctgagcgg	gtaaaaggag	ttctacagaa	tacaaggtht	ggagacatac	8160
cttacaaaaa	ccccagtgat	actggaaaac	cagtgcacgc	ggctgcctgc	cttacgccc	8220
acgccactcc	ggtgactgat	ggcgctccg	tcttgccac	gacctgccc	tccgggtttg	8280
agthgtatgt	accaaccata	ccagcgtctg	tccttgatta	ccttgattct	aggcctgact	8340
gccctaaaca	gttgacagag	cacggctgtg	aagatgcgcg	actgagagac	ctctccaaat	8400
atgacttgct	caccaaggc	ttgtttttac	ctggagtttt	tcgccttgta	cggaaatacc	8460
tgthtgccca	tgtaggtaag	tgcccacccg	ttcatcgggc	ttctacttac	cctgctaaga	8520
attctatggc	tggataaat	gggaataggt	tcccaacca	ggatattcag	agcgtccctg	8580
aaatcgacgt	tctgtgtgca	caggctgtgc	gggaaaactg	gcaaactgth	accccttgta	8640
ctcttaagaa	acagtattgc	gggaagaaga	agactaggac	catactcggc	accaataatt	8700
ttatcgcgct	agcccaccga	gcagcgttga	gtggtgtcac	ccaggccttc	atgaaaaagg	8760
cgtthtaact	gcccacgcc	ctcggaaaaa	acaagthtaa	ggagctacag	acccgggtcc	8820
taggcaggtg	ccttgaagct	gatcttgcat	cctgcgacgc	atccacacct	gcaattgtcc	8880
gctggtttgc	cgccaacctc	ctthtatgaac	ttgcctgcgc	tgaagagcat	ttaccgtcgt	8940
acgtgctgaa	ctgctgccac	gacttactgg	tcacgcaatc	cggcgacgtg	actaagagag	9000

gtggcctgtc	gtctggcgac	ccgatcacct	ctgtgtctaa	caccatttac	agtttgggtg	9060
tctatgcaca	gcatatggtg	ctcagttact	tcaaaagtgg	tcaccccat	ggcctcttgt	9120
tcttacaaga	ccagctaaaag	tttgaggaca	tgctcaaggt	tcaaccctg	atcgtctatt	9180
cggacgacct	cgtgctgtat	gccgagcttc	ccaccatgcc	aaactatcac	tgggtgggtg	9240
aacacctgaa	tctgatgctg	gggtttcaga	cggatccaaa	aaagacagcc	ataacagact	9300
cgccatcatt	tctaggtctg	agaataataa	atggacgcca	gctagtcccc	aaccgtgaca	9360
ggatttctgc	ggccctcgcc	taccacatga	aggcgagtaa	tgtttctgaa	tactacgcct	9420
cagcggctgc	aatactcatg	gacagctgtg	cttgtttgga	gtatgatcct	gaatggtttg	9480
aagaacttgt	agttggaata	gcgcaatgcg	cccgcaagga	cggttacagc	tttcccggca	9540
cgccgttctt	tatgtccatg	tgggaaaaac	tcaggtccaa	ttatgagggg	aagaagtcca	9600
gagtggtcgg	gtactgcggg	gccccggccc	cgtacgctac	tgctgtggc	ctcgacgtct	9660
gcattttacca	caccacttcc	caccagcatt	gtccagtcac	aatctggtgt	ggccatccag	9720
cgggttcttg	ttcttgtagt	gagtgcaaat	cccctgtagg	gaaaggcaca	agccctttag	9780
acgaggtgct	ggaacaagtc	ccgtacaagc	ccccacggac	cgttatcatg	cgtgtggagc	9840
agggtcttac	cccccttgac	ccaggtagat	accagactcg	ccgcggatta	gtctccgtca	9900
ggcgtggaat	caggggaaat	gaggttgaac	taccagacgg	tgattatgct	agtaccgcct	9960
tgctccctac	ctgtaaagag	atcaacatgg	tcgctgttgc	ttccaatgta	ttgcgcagca	10020
ggttcatcat	tgttccacc	ggtgctggga	aaacatactg	gctccttcaa	caggtccagg	10080
atgggtgatgt	tatttacaca	ccaaccacc	agaccatgct	tgacatgatt	agggctttgg	10140
ggacgtgccg	gttcaacgtc	ccggcaggca	caacgctgca	attccccgtc	ccctcccgtg	10200
ccggtccgtg	ggttcgcata	ctggccggcg	ggttggtgtcc	tggcaagaat	tccttccttg	10260
atgaagcagc	gtattgcaat	caccttgatg	tcttgaggct	tcttagcaaa	actaccctca	10320
cctgtctggg	agacttcaaa	caactccacc	cagtggtgtt	tgattctcat	tgctatgttt	10380
ttaacatcat	gcctcaaat	caactgaaga	ccatctggag	gtttggacag	aatatctgtg	10440
atgccatcca	ggcagattac	agggacaaac	tcagtgtccat	ggtcaacaca	accgtgtga	10500
cctacgtgga	aaagcctgtc	aggatatggc	aagtcctcac	cccctaccac	agggaccgag	10560
aggacgacgc	catcactatt	gactccagtc	aaggcgccac	attcgatgtg	gttactactg	10620
atttgcccac	aaaagattca	ctcaacaggc	agagagccct	tggtgctatc	accagggcaa	10680
gacatgctat	ctttgtgtat	gacccacaca	ggcagctgca	gagcctgttt	gatcttcctg	10740
caaaaggtag	acccgtcaac	cttgcaagtgc	accgcgacgg	gcagctgatc	gtgctagata	10800
gaaataacaa	agaattgcacg	gttgctcagg	ctctaggtaa	cggagataaa	tttagggcca	10860
cagacaaacg	cgttgtagat	tctctccgcg	ccatttgtgc	tgatctagaa	gggtcgagct	10920
ctccgctccc	caaggctcgca	cacaacttgg	gattttattt	ttcacctgat	ttaacacagt	10980
ttgctaaact	cccagcagaa	cttgcacctc	actggcctgt	ggtgacaacc	cagaacaatg	11040
aaaagtggcc	agatcggctg	gttaccagcc	ttcgccctat	ccataaatat	agccgcgcgt	11100
gcacggtg	cggtatatatg	gtgggcccct	cgggtgttct	aggcactcct	ggggttgtgt	11160
catactatct	cacaaaat	gttaagggcg	aggctcaagt	gcttcgggag	acggttttca	11220
gcaccggccg	aattgaggtg	gactgcccgg	aatatcttga	tgatcgggag	cgagaggttg	11280
ctgcgtccct	cccacatgcc	ttcattggcg	acgtcaaaag	cactaccgtt	ggaggatgcc	11340
accatgtcac	ctccagatac	ctcccgcgct	tccttcccaa	ggaatcgggt	gcggtagtcg	11400
gggtttcaag	tcccggaaaa	gccgcgaaag	cattgtgcac	actgacagat	gtgtacctcc	11460
cagaccttga	agcctat	cacccggaga	cccagtccaa	gtgctggaga	atgatgttgg	11520
acttcaagga	agttcgacta	atggtctgga	aagacaaaa	agcctat	caacttgaag	11580
gtcgctat	cacctggtat	cagcttgcta	gctatgcctc	gtacatccgt	gttctgtca	11640
actccaaggt	gtacttgagc	ccttgcatgg	gccccgccct	ttgcaacagg	aaagtcgtcg	11700
ggtccactca	ttggggagct	gacctcgctg	tcacccctta	tgattacggc	gctaaaatta	11760
tcctgtctag	cgctaccat	agtgaatgc	cccccgata	caagattctg	gcgtgcgcgg	11820
aattctcggt	ggatgaccca	gtcaagtaca	aacatacctg	ggggttgaa	tcggatacag	11880
cgtatctgta	tgagttcacc	ggaaacgggtg	aggactggga	ggattacaat	gatgcgtttc	11940
gtgcgcgcca	ggaagggaaa	atttataagg	ctactgccac	cagcatgaag	ttttat	12000
ccccgggccc	aatttgatga	ccaacttttag	gctgaattg	aaatgaaatg	gggtccatgc	12060
aaagcctttt	tgacaaaatt	ggccaacttt	ttgtggatgc	tttcaaggag	ttcttgggtg	12120
ccattgttga	tatcattgta	tttttgcca	ttttgtttgg	cttcaccatc	gccggttggg	12180
tggtggtctt	ttgcatcaga	ttggtttgct	ccgcgatact	ccgtgcgcgc	cctgccattc	12240
actctgagca	attacagaag	atcttatgaa	gcctttcttt	cccagtgcca	agtggacatt	12300
cccactggg	gaactaaaca	tcctttgggg	atgttttggc	accataaggt	gtcaaccctg	12360
attgatgaga	tggtgtcgcg	tcgaatgtac	cgcatcatgg	aaaaagcagg	acaggctgcc	12420
tggaaacagg	tggtgagcga	ggctacgctg	tctcgcatga	tgagtttggg	tgtggtggct	12480
cattttcagc	atcttgccgc	cattgaagcc	gagacctgta	aatatttggc	ctcccggtg	12540
cccatgctac	acaacctgcg	catgacaggg	tcaaatgtaa	ccatagtgtg	taatagtact	12600
ttgcatcagg	tgtttgcata	ttttccaacc	cctgggtccc	ggccaaagct	tcatgatttt	12660
cagcaatggg	taatagctgt	acattcctcc	atattttcct	ctgttgcagc	ttcttgact	12720
ctcttgttg	tgctgtgggt	gcgggttcca	atactacgta	ctgtttttgg	tttccgctgg	12780
ttaggggcaa	ttttcttttc	gaactcacag	tgaattacac	ggtgtgtcca	ccttgccctca	12840
cccggcaagc	agccgcagag	gcctacgaac	ccggtaggtc	tccttgggtg	aggatagggg	12900
atgaccgatg	tgggagagac	gatcatgacg	agctaggggt	tatggtaacc	tctggcctct	12960
ccagcgaagg	ccacttgacc	agtgtttacg	cctgggtggc	gttcttgtcc	ttcagctaca	13020
cggcccagtt	ccatcccag	atattcggga	tagggaatgt	gagtcgagtt	tatgttgaca	13080
tcgaacatca	actcatctgc	gccgaacatg	acgggcagaa	caccaccttg	cctcgtcatg	13140
acaacatttc	agccgtgttt	cagacctatt	accaacatca	agtcgacggc	ggcaattggg	13200

ttcacctaga	atggctgcgt	cccttctttt	cctcatgggt	ggttttaaat	gtctcttggt	13260
ttctcaggcg	ttgcctgca	aacctatggt	cagttcgagt	cttgacagca	ttaagaccaa	13320
caccaccgca	ggggcaagct	ttgctgtcct	ccaagacatc	agttgcctta	ggcatcgcaa	13380
ctcgccctct	gaggcgattc	gcaaaatccc	tcagtgccgt	acggcgatag	ggacacccgt	13440
gtatattacc	atcacagcca	atgttacaga	tgagaattat	ttacattctt	ctgatctcct	13500
catgctttct	tcttgccctt	tctatgcttc	tgagatgagt	gaaaagggat	ttaagggtgt	13560
atgttgcaat	gtgtcaggca	tcgtggctgt	gtgtgtcaat	tttaccagct	acgtccaaca	13620
tgtcagggag	tttacccaac	gctccttgat	ggtcgaccat	gtgcggctgc	tccatttcat	13680
gacacctgag	accatgaggt	gggcaactgt	tttagcctgt	ctttttgcca	ttctgttggc	13740
aatttgaatg	tttaagtatg	ttggggaaat	gcttgaccgc	gggctgttgc	tcgcgattgc	13800
tttctttgtg	gtgtatcgtg	ccgttctgtt	ttgctgtgct	cgtcaacgcc	aacagcaaca	13860
gcagctctca	tctacagttg	atttacaact	tgacgctatg	tgagctgaat	ggcacagatt	13920
ggctatctaa	taaatttgat	tgggcagtgg	agagttttgt	catctttccc	gttttgactc	13980
acattgtctc	ctatggtgcc	ctcactacca	gccatttctc	tgacacagtc	gcttttagtca	14040
ctgtgtctac	cgccgggttt	gttcacgggc	ggtatgtcct	gagcagcatc	tacgcggtct	14100
gtgcctggc	tgccttgact	tgcttcgtca	ttagtttgcc	aaagaattgc	atgtcctggc	14160
gctactcatg	taccagatat	actaaccttc	ttctggacac	taagggcaga	ctctatcgtt	14220
ggcggtcgcc	tgtcatcata	gagaaaagg	gcaaagttga	ggtcgaaggt	catctgatcg	14280
acctcaaaag	agttgtgctt	gatggttccg	tggcaacccc	tataaccaga	gtttcagcgg	14340
aacaatgggg	tcgtcccttag	atgacttttg	ttatgatagc	acggctccac	aaaaggtgct	14400
tttggcggtt	tctattacct	acacgccagt	gatgatatat	gccctaaaag	tgagtcgcgg	14460
ccgactgtta	gggcttctgc	accttttgat	cttctgtaac	tgtgctttca	ccttcgggta	14520
catgacattc	gcgcactttc	agagtacaaa	taaggtgcgc	ctcactatgg	gagcagtagt	14580
tgcactcctt	tggggggtgt	attcagccat	agaaacctgg	aaattcatca	cctccagatg	14640
ccgtttgtgc	ttgctaggcc	gcaagtacat	tctggcccct	gcccaccacg	ttgagagtgc	14700
cgcaggcttt	catccgattg	cggcaaatga	taaccacgca	tttgtcgtcc	ggcgtcccgg	14760
ctccactacg	gtcaacggca	cattggtgcc	cgggttgaaa	ggcctcgtgt	tgggtggcag	14820
aaaagctgtt	aaacagggag	tggtaaacct	tgtcaaatat	gccaaataac	aacggcaagc	14880
agcagaagag	aaagaagggg	gatggccagc	cagtaatca	gctgtgccag	atgctgggta	14940
agatcatcgc	ccagcaaaac	cagtcagagc	gcaagggacc	gggaaagaaa	aataagaaga	15000
aaaacccgga	gaagcccat	tttctcttag	cgactgaaga	tgatgtcaga	catcacttta	15060
cccctagtga	gcggcaattg	tgtctgtcgt	caatccagac	tgcctttaat	caaggcgctg	15120
ggacttgcac	cctgtcagat	tcaggggagga	taagttacac	tgtggagtgt	agtttgctca	15180
cgcatacatc	tgtgcgcctg	atccgcgtca	cagcatcacc	ctcagcatga	tgggctggca	15240
ttcttgaggc	atctcagtgt	ttgaattgga	agaatgtgtg	gtgaatggca	ctgattgaca	15300
ttgtgcctct	aagtcaccta	ttcaattagg	gogaccgtgt	gggggtaaga	tttaattggc	15360
gagaaccata	cggccgaaat	t				15381

Bảng 4. SEQ ID NO:2

N	(11766)..(11766)	<223>	A, G, T, hoặc C			
catttgtgtt	gtcaggagct	gtgaccattg	gcacagccca	aaacttgctg	cacggaagcg	60
cccttctgtg	acagccctcct	tcaggggagc	ttgggggtct	gtccctagca	ccttgcttcc	120
ggagttgcac	tgttttacgg	tctctccacc	cctttaacca	tgtctgggat	acttgatcgg	180
tgcacgtgta	cccccaatgc	caggggtgtt	atggcggagg	gccaaagtcta	ctgcacacga	240
tgcctcagtg	cacgggtctct	ccttctctctg	aatctccaag	tttctgaact	cggggtgcta	300
ggcctattct	acaggcccga	agagccactc	cgggtggacgt	tgccacgtgc	attccccact	360
gttgagtgtc	ccccgcggcg	ggcctgtctg	ctttctgcaa	tttttccaat	tgcacgaatg	420
accagtggaa	acctgaactt	ccaacaaaga	atggttacgg	tcgcagctga	actttacaga	480
gccggccagc	tcacccctac	agtcttaaag	actttacaag	tttatgaacg	gggttgccgc	540
tggtagccca	tcgtaggacc	tgtccctgga	gtggccgttt	tcgccaaactc	cctacatgtg	600
agtgataaac	ctttcccggg	agcaactcac	gtgttaacca	acctgccgct	cccgcagaga	660
cccaagcctg	aagacttttg	cccctttgag	tgtgctatgg	ctaccgtcta	tgacattggt	720
catgacgccg	tcagtgtatg	ggccgaagg	aaagtctcct	gggcccctcg	tggcggggat	780
gaagtgaaat	ttgaaactgt	ccccggggag	ttggagttag	ttgcgaatcg	actccgcacc	840
tccttcccg	cccaccacac	agtggacatg	tctaagttcg	ccttcacagc	ccttggcgct	900
ggtgtttcta	tgcgggtcga	acgccaacac	ggctgcctcc	ccgctgacac	tgtccctgaa	960
ggcaactgct	ggtggagctt	gttttaacttg	ctcccactgg	aagttcagaa	caaagaaatt	1020
cgccatgcta	accaattttg	ctaccagacc	aagcatgggt	tctctggcaa	gtacctacgg	1080
cggaggctgc	aagttaatgg	tctccgagca	gtaactgacc	tgaatggacc	tatcgtcgtg	1140
cagtacttct	ccgttaagga	gagttggatc	cgccacttga	aactggcgga	agaacccagc	1200
taccctgggt	ttgaggacct	cctcagaata	agggtttagc	ccaacacgtc	gccattggct	1260
gacaaggatg	aaaaaatttt	ccggttttgg	agtcacaagt	ggtacggcgc	tggaaagaga	1320
gcaaggaaag	cacgctctag	tgcgactgct	acagtcgctg	gccgcgcttt	gtccgttctg	1380
gaaacccggc	aggccaagga	gcacgaggtt	gccggcgcca	acaaggctgg	gcacctcaaa	1440
cattactccc	cgcctgccga	agggaattgt	ggttggcact	gcatttccgc	catcgccaac	1500
cggatggtga	attocaaatt	tgaaccacc	cttcccga	gagtgagacc	ttcagatgac	1560
tgggtacttg	acgaggatct	tgtgaatgcc	atccaaatcc	tcaggctccc	tgcggccttg	1620
aacaggaacg	gcgcttgtgc	tagcgccaag	tacgtactta	agctggaagg	tgagcattgg	1680

actgtcactg	tgacccctgg	gatgtccctt	tctttgtctc	ctcttgaatg	tgttcagggc	1740
tgttgtgagc	ataagggcag	tcttgggtcc	ccagatgcag	tcgaggtttt	cggatttgac	1800
cctgcctgcc	ttgaccggct	ggctgaggtg	atgcacctgc	ctagcagtgc	tatcccagcc	1860
gctctggccg	aaatgtccgg	cgattccgat	cgttcggctt	ccccggtcac	caccgtgtgg	1920
actgtttcgc	agttctttgc	cgcgccaat	ggagggaatc	accctgacca	agtgcgctta	1980
gggaaaatta	tcagcctttg	tcaggtgatt	gaggactgct	gctgttccca	gaacaaaacc	2040
aaccgggtca	ccccggagga	ggtcgcagca	aagattgacc	tgtaccttcg	tggcgcaaca	2100
aatcttgaag	aatgcttggc	caggcttgag	aaagcgcgcc	cgccacgcgt	aatggacacc	2160
tcctttgatt	gggatgttgt	gctccctggg	gttgaggcgg	caactcagac	gaccgaactg	2220
ccccaggtca	accagtgtcg	cgctctggtc	cctgttgtta	ctcaaaagtc	cttggaacac	2280
aactcgggtc	ccctgaccgc	cttttccactg	gctaactact	actaccgtgc	gcaaggtgac	2340
gaagttcgtc	accgtgaaag	actaaccgcc	gtgctctcca	agttggaagg	ggttgttcga	2400
gaagaatatg	ggctcatgcc	aaccgggcct	ggtccacggc	ccacactgcc	acgcgggctc	2460
gacgaactca	aagaccagat	ggaggaggac	ttgctgaaac	tggctaacgc	ccagacgact	2520
tcggacatga	tggcctgggc	agtcgagcag	gttgacctaa	aaacttgggt	caagaactac	2580
ccgcggtgga	caccaccacc	ccctccgccca	aaagttcagc	ctcgaaaaac	gaagcctgtc	2640
aagagcttgc	cagagagaaa	gcctgtcccc	gccccgcgca	ggaaggttgg	gtccgattgt	2700
ggcagcccga	tttcattggg	cgacgatgtc	cctaacagtt	gggaagattt	ggctgttggg	2760
agcccttttg	atctctcgac	cccacctgag	ctggcaacac	cttcaagtga	gctggtgatt	2820
gtgtccgcac	cgcaatgcat	cttcaggccg	gcgacaccct	tgagtgaagc	ggctccaatt	2880
cccgcaacctc	cgggggttgt	gtctcgaccg	gtgacaccct	tgaatgagcc	gatacctgtg	2940
cccgcaacctc	ggcgtaagtt	tcagcagatg	agaagattga	gttcggcggc	ggtaatcccg	3000
ccgtaccagg	acgagcccct	agatttgtct	gcttccctac	agactgaata	tgaggcctct	3060
cccctagcac	cgccgcagag	cgaggggtgt	ctgggagtag	aggggcagga	agctgaggaa	3120
gccctaagtg	aaatctcgga	catgtcgggt	aacattaaac	ctgcgtccgt	atcatcaagc	3180
agctccttgt	ccagcgtgag	aatcactcgc	ccaaaatact	cagctcaagc	catcatcgac	3240
tcggggcggg	ctgcagtggt	gcattctcaa	gaggttaaa	aaacatgcct	cagtatcatg	3300
cgcgagggcat	gtgatgcgac	taagcttaag	ttcctcccaa	aaatgatact	cgagacaccg	3360
ccgccctatc	cgtgtgagtt	tgtgatgatg	cctcacacgc	ctgcaccttc	cgtaggtgcg	3420
gagagcgacc	ttaccattgg	ctcagtcgct	actgaagatg	ttccacgcat	cctcgagaaa	3480
atagaaaatg	tcggcgagat	gaccaaccag	ggacccttgg	ccttctccga	ggataaaaccg	3540
gtagatgacc	aacttgccaa	agacccccgg	atatcgtcgc	agaggtctga	cgagagcaca	3600
tcagctccgc	ccgcaggcac	aggtggcgcc	ggctcattta	ccgatttgcc	gccttcggac	3660
ggcggtggatg	cgacgcgagg	ggggccggtt	tggacggtaa	aaagaaaagc	tgaagggctc	3720
tttgaccaac	tgagccgtca	gtgtttttgac	ctcgtctccc	atctccctgt	tttcttctca	3780
cgccctttca	accctggcgg	tggttattct	ccgggtgatt	gggggtttgc	agcttttact	3840
ctatttgtgc	tctttttatg	ttacagttac	ccagcccttg	gtattgctcc	cctcttgggt	3900
gtgttttctg	ggtcttctcg	gcgcgttcga	atgggggttt	ttggctgctg	ggttgctttt	3960
gctgttggtc	tgttcaagtc	tgtgtccgac	ccagtcggcg	ctgcttgatg	gtttgactcg	4020
ccagagtgtga	gaaatctctt	tcattctttt	gagcttctca	aaccttgga	ccctgttcgc	4080
agccttggtt	tgggccccgt	cggctctcgt	cttgccattc	ttggcaggtt	actggggcgg	4140
gcacgcagca	tctggcactt	tttgcttagg	cttggcattg	ttgcagactg	tgtcttggct	4200
ggagcttatg	tgttttctca	aggtaggtgt	aaaaagtgtc	ggggatcttg	tataagaact	4260
gctoctaatg	aggctcgctt	taacgtgttt	cctttttacac	gtgcgaccag	gtcgtcacta	4320
atcgacctgt	gcgatcggtt	ttgtgcgcca	aaaggcatgg	accccathtt	tctcgccact	4380
gggtggcgcg	ggtgtctggc	cgcccggaagc	cccatgtaga	aacctctga	aaaacccatc	4440
gcgttttgccc	agttggatga	aaagaagatt	acggctagga	ctgtggtcgc	ccagccttat	4500
gaccccaacc	aagccgtaaa	gtgcttgccg	gtattgcagg	cggttggggg	gatggtggct	4560
aaggcagtc	caaaagtggg	caaggtttcc	gctgttccat	tccgagcccc	cttctttccc	4620
accggagtga	aagttgacct	tgaatgcagg	gtcgtgggtg	accccgacac	tttcaccgca	4680
gctctccggt	ctggctactc	caccacaaac	ctcgtcctcg	gtgtagggga	ttttgcccaag	4740
ctgaatggat	taaaaatcag	gcaaatttcc	aagccttcag	gaggaggccc	acacctcatg	4800
gctgcccctgc	atgttgcctg	ctcgatggct	ttgcacatgc	ttgctgggat	ttatgtgact	4860
gcgttgggtt	cttgcggcac	cggcaccaac	gaccctgtgt	gcgctaacc	gtttgcccgtc	4920
cctggctacg	gacctggctc	tctctgcacg	tccagattgt	gcatttccca	acatggcctt	4980
accctgccct	tgacagcact	cgtggcgggg	ttcggtattc	aagaaattgc	cttggctcgtt	5040
ttgatttttg	tttccatcgg	aggcatggct	cacaggttga	gttgtaaggc	tgatatgctg	5100
tgtgttttgc	ttgcaattgc	cagctatgtt	tgggtacctc	ttacctggtt	gctttgtgtg	5160
tttcccttgt	ggttgcgctg	tttttctttg	catccctca	ccatccctatg	gttgggtgtt	5220
ttcttgaatt	ctgtgaatat	gccttcagga	atcttggcca	tgggtgttgt	ggtttctctt	5280
tggcttcttg	ctgtgttatac	taatgttgct	ggtcttctga	ccccctacga	cattcatcat	5340
tacactagtg	gccccgcggg	tgttgccgcc	ttggctaccg	caccagatgg	gacctacttg	5400
gccgctgtcc	gccgcgctgc	gttgactggc	cgcaccatgc	tgtttacccc	gtcccagctt	5460
gggtctcttc	ttgagggtgc	tttcagaact	cgaaaaccct	cactgaacac	cgtcaatgtg	5520
gtcgggtcct	ccatgggctc	tggcggggtg	ttcaccatcg	acggaaaaat	taagtgcgta	5580
actgccgcac	atgtccttac	gggcaattca	gctaggggtt	ccggggtcgg	cttcaatcaa	5640
atgcttgact	ttgacgtaaa	gggagatttc	gccatagctg	attgcccga	ttggcaaggg	5700
gctgccccca	agacccaatt	ctgcaaggat	gggtggactg	gccgtgccta	ttggctaaca	5760
tcctctggcg	tcgaacccgg	cgtcatttga	aaaggattcg	ccttctgctt	caccgcgtgc	5820
ggcgattccg	ggtccccagt	gatcaccgag	gccggtgagc	ttatcggcgt	tcacacggga	5880
tcaaataaac	aaggaggagg	catcgttacg	cgcacctcag	gccagttttg	taatgtggca	5940

cccatcaagc	taagcgaatt	aagtgaattc	tttgctgggc	ctaaggtccc	gctcggatg	6000
gtgaaggttg	gcagccacat	aattaaagac	ataggcgagg	tgccttcaga	tctttgtgcc	6060
ttgcttgctg	ccaaacctga	actggaagga	ggcctctcca	ccgtccaact	tctttgtgtg	6120
tttttctctc	tgtggagaat	gatgggacat	gcctggacgc	ccttggttgc	tgtgggtttc	6180
tttatcttga	atgaggttct	cccagccgtc	ctgggtccgga	gtgttttctc	ccttggaatg	6240
tttgtgctat	cctggctcac	gccatggtct	gcgcaagtcc	tgatgatcag	gcttctaaca	6300
gcagccctta	acaggaacag	atggtcactt	gcctttttca	gcctcgggtg	agtgaccggt	6360
tttgtcgcat	atcttgccgc	tactcagggg	catccgttgc	aggcagttat	gaatttgagc	6420
acctatgcat	tcctgcctcg	gatgatggtt	gtgacctcac	cagtcccagt	gattgcgtgt	6480
ggtgttgctg	acctacttgc	catcattttg	tacttgttta	agtaccgtgg	cctgcaccaa	6540
atccttggtg	gcgatggagt	gttctctgcg	gctttcttcc	tgcgatactt	tgccgaggga	6600
aagttgaggg	aaggggtgtc	gcaatcctgc	ggaatgaatc	atgagtctct	gactggtgcc	6660
ctcgctatga	gactcaatga	cgaggacttg	gatttcctta	cgaatgggac	tgattttaag	6720
tgtcttggtt	ctgcgtccaa	catgaggaat	gcagcgggtc	aatttatcga	ggctgcctat	6780
gctaaagcag	ttagagtaga	gcttgcccag	ttggtgcagg	ttgataaagt	tcgagggaact	6840
ttggccaaac	ttgaagcctt	tgtgataacc	gtggcacccc	aactctcgcc	cggtagacatt	6900
gttgtcgctc	tcggccatac	gcctgtttgg	agtatcttcg	acctaaaggt	tggtagcacc	6960
aagcataccc	tccaagccat	tgagaccaga	gtccttgctg	ggtccaaaat	gaccgtggcg	7020
cgcgtcgtcg	acccgacccc	cacgccccca	cccgcacctg	tgcctatccc	cctcccaccg	7080
aaagtctctg	agaatggccc	caacgcttgg	ggggatgagg	accgtttgaa	taagaagaag	7140
aggcgacaga	tggaagccct	cggcatctat	gttatgggag	ggaaaaagta	ccagaaattt	7200
tgggataaga	attccggtga	tgtgttttat	gaggagggtc	ataataacac	agatgagtgg	7260
gagtgtctca	gagttggcga	ccctgccgac	tttgaccctg	agaaggggaa	tctgtgtgga	7320
catgtcacca	ttgaagataa	ggcttaccat	gtttacacct	caccatctgg	taagaagttc	7380
ttggtccccc	tcaatccaga	gaatggaaga	gtccaatggg	aagctgcaaa	gctttccgta	7440
gagcaggccc	ttggtatgat	gaacgtcgac	ggcgaactga	ctaccaaaga	actggagaaa	7500
ctgaaaagaa	taattgacaa	actccagggc	ctgactaagg	agcagtgttt	aaactgctag	7560
ccgccagcgg	ccttgaccgc	tgtggtcgcg	gcggcttggt	tgttactgaa	acagcggtaa	7620
aaatagtcaa	atttcacaac	cggaccttca	ccctgggacc	tgtgaattta	aaagtggcca	7680
gtgaggttga	gctaaaagac	gcggttgagc	acaaccaaca	cccggttgcg	agaccggtcg	7740
atggtggtgt	tgtgctcctg	cgttccgcgg	ttccttcgct	tatagacgtc	ttgatctccg	7800
gtgctgatgc	atctcccaag	ttgcttgccc	atcacggggc	gggaaacact	gggatcgatg	7860
gcacgctctg	ggatttttag	tccgaagcca	ctaaagagga	agtgcgactt	agtgcgcaaa	7920
taatacaggc	ttgtgacatt	aggcgcggcg	acgctcctga	aattgggtctc	ccttacaagc	7980
tgtaccctgt	taggggtaac	cctgagcggg	taaaaggagt	tctacagaat	acaaggtttg	8040
gagacatacc	ttacaaaacc	cccagtgata	ctggaaaccc	agtgcacgcg	gctgcctgcc	8100
ttacgcccac	cgccactccg	gtgactgatg	ggcgtctcgt	cctggccacg	accatgccct	8160
ccgggtttga	gttgatgtga	ccaaccatac	cagcgtctgt	ccttgattac	cctgattcta	8220
ggcctgactg	ccctaaacag	ttgacagagc	acggctgtga	agatgccgca	ctgagagacc	8280
tctccaaata	tgactttgcc	acccaaggct	ttgtttttac	tggagttttt	cgccttgtag	8340
ggaaatacct	gtttggccat	gtaggttaagt	gcccattcgt	tcacgcgcct	tctacttacc	8400
ctgctaagaa	ttctatggct	ggaataaatg	ggaataggtt	cccaaccaag	gatattcaga	8460
gcgtccctga	aatcgacgtt	ctgtgtgcac	aggctgtgcg	ggaaaactgg	caaactgtta	8520
cccttggtac	tcttaagaaa	cagtatttgc	ggaagaagaa	gactaggacc	atactcggca	8580
ccaataatth	tatcgcgcta	gcccaccgag	cagcgttgag	tggtgtcacc	cagggcttca	8640
tgaaaaaggc	gttttaactcg	cccactgcgc	tcggaaaaaa	caagtttaag	gagctacaga	8700
cccgggtcct	aggcaggtgc	cttgaagctg	atcttgcatc	ctgogaccga	tccacacctg	8760
caattgtccg	ctgggttgcc	gccaacctcc	tttatgaact	tgcctgcgct	gaagagcatt	8820
taccgtcgta	cgtgctgaac	tgctgccacg	acttactggt	cacgcagtcc	ggcgcagtga	8880
ctaagagagg	tgccctgtcg	tctggcgacc	cgatcacctc	tgtgtctaac	accattttaca	8940
gtttggtgat	ctatgcacag	catatggtgc	tcagttactt	caaaagtggg	cacccccatg	9000
gcctcttggt	cttacaagac	cagctaaagt	ttgaggacat	gctcaagggt	caacccctga	9060
tcgtctattc	ggacgacctc	gtgctgtatg	ccgagttctc	caccatgcca	aactatcact	9120
ggtgggttga	acacctgaat	ttgatgctgg	ggtttcagac	ggatccaaaa	aagcagacca	9180
taacagactc	gccatcattt	ctagggtgta	gaataataaa	tggaagccag	ctagtcccca	9240
accgtgacag	gattctcgcg	gccctgcgct	accacatgaa	ggcgagtta	gtttctgaat	9300
actacgcctc	agcggtgca	atactcatgg	acagctgtgc	ttgtttggag	tatgatcctg	9360
aatgggttga	agaacttgta	gttggaaatg	cgcaatgcgc	ccgcaaggac	ggttacagct	9420
ttcccggcac	gccgttcttt	atgtccatgt	gggaaaaact	cagggtccaat	tatgagggga	9480
agaagtgcag	agtgtgcggg	tactgcgggg	ccccggccct	gtacgctact	gcctgtggcc	9540
tcgacgtctg	catttaccac	accactttcc	accagctatg	tccagtcaca	atctggtgtg	9600
gccatccagc	gggttctggt	tcttgtagtg	agtgcacaa	ccctgtaggg	aaaggcacia	9660
gccctttaga	cgaggtgctg	gaacaagtcc	cgtacaagcc	cccacggacc	gttatcatgc	9720
atgtggagca	gggtctcacc	ccccttgacc	caggtagata	ccagactcgc	cgcggattag	9780
tctccgtcag	gcgtggaatc	aggggaaatg	aggttgaact	accagacggg	gattatgcta	9840
gtaccgcctt	gctccctacc	tgtaaagaga	tcaacatggt	cgctgttgct	tccaatgtat	9900
tgcgacgacg	gttcatcatt	ggtccacccg	gtgctgggaa	aacatactgg	ctccttcaac	9960
aggtccagga	tggtgatggt	atttacacac	caaccaccca	gaccatgctt	gacatgatta	10020
gggctttggg	gacgtgcggg	ttcaacgtcc	cggcaggcac	aacgctgcaa	ttccccgtcc	10080
cctcccgtac	cggctccgtg	gttcgcatcc	tgcccgcgcg	ttggtgtcct	ggcaagaatt	10140
ccttctctgga	tgaagcagcg	tattgcaatc	accttgatgt	cttgaggctt	cttagcaaaa	10200

ctaccctcac	ctgtctgga	gacttcaaac	aactccaccc	agtgggtttt	gattctcatt	10260
gctatgtttt	taacatcatg	cctcaaaactc	aactgaagac	catctggagg	tttgacaga	10320
atatctgtga	tgccatccag	ccagattaca	gggacaaact	catgtccatg	gtcaacacaa	10380
cccgtgtgac	ctacgtggaa	aagcctgtca	ggtatgggca	agtcctcacc	ccctaccaca	10440
gggaccgaga	ggacgacgcc	atcactattg	actccagtca	aggcgccaca	ttcgatgtgg	10500
ttacactgca	tttgcccaca	aaagattcac	tcaacaggca	gagagccctt	gttgctatca	10560
ccagggcaag	acatgctatc	tttgtgtatg	acccacacag	gcagctgcag	agcctgtttg	10620
atcttcctgc	aaaaggtaca	cccgtcaacc	ttgcagtgtca	ccgcgacggg	cagctgatcg	10680
tgctagatag	aaataacaaa	gaatgcacgg	ttgctcaggc	tctaggtaac	ggagataaat	10740
ttagggccac	agacaaacgc	gttgtagatt	ctctccgcgc	catttgtgct	gatctagaag	10800
ggtcgagctc	tccgctcccc	aaggtcgcac	acaacttggg	attttatttc	tcacctgatt	10860
taacacagtt	tgctaaactc	ccagcagaac	ttgcacctca	ctggcccgtg	gtgacaaccc	10920
agaacaatga	aaagtggcca	gatcggctgg	ttaccagcct	tcgccctatc	cataaatata	10980
gcgcgcgctg	catcggtgcc	ggctatatgg	tgggcccttc	ggtgtttcta	ggcactcctg	11040
gggtcgtgtc	atactatctc	acaaaatttg	ttaaggcgca	ggctcaagtg	cttccggaga	11100
cggttttcag	caccggccga	attgaggtag	actgccggga	atatcttgat	gatcgggagc	11160
gagagggtgc	tgcgctccctc	ccacatgcct	tcattggcga	cgtcaaaggc	actaccgttg	11220
gaggatgccca	ccatgtcacc	tccagatacc	tcccgcgctt	ccttcccaag	gaatcggttg	11280
cggtagtcgg	ggtttcaagt	cccggaaaag	ccgcgaaaagc	attgtgcaca	ctgacagatg	11340
tgtacctccc	agaccttgaa	gcctattttc	accggagac	ccagtccaag	tgctggagaa	11400
tgatgtttga	cttcaaggaa	gttcgactaa	tggctctgaa	agacaaaaca	gcctatttcc	11460
aacttgaagg	tcgctatttc	acctggtatc	agcttgctag	ctatgcctcg	tacatccgtg	11520
ttcctgtcaa	ctccacggtg	tacttgacc	cctgcatggg	ccccgccctt	tgcaacagga	11580
aagtcgtcgg	gtccactcat	tggggagctg	acctcgctgt	cacccttat	gattacggcg	11640
ctaaaattat	cctgtctagc	gcgtaccata	gtgaaatgcc	ccccggatac	aagattctgg	11700
cgtgcgcgga	attctcgttg	gatgaccag	tcaagtacaa	acatacctgg	gggtttgaat	11760
cggatncagc	gatatctgat	gagttcaccc	gaaacgggtga	ggactgggag	gattacaatg	11820
atgcgttttc	tgcgcgccag	gaagggaaaa	tttataaggc	tactgccacc	agcatgaagt	11880
tttattttcc	cccgggccct	gtcattgaac	caacttttag	cctgaattga	aatgaaatgg	11940
ggtccatgca	aagccttttt	gacaaaattg	gccaaactttt	tgtggatgct	ttcacggagt	12000
tcttggtgtc	cattgttgat	atcattatat	ttttggccat	tttgtttggc	ttcaccatcg	12060
ccggttggtt	ggtggtcttt	tgcatcagat	tggtttgctc	cgcgatactc	cgtacgcgcc	12120
ctgccattca	ctctagcaa	ttacagaaga	tcttataagg	cctttctttc	ccagtgccaa	12180
gtggacattc	ccacctgggg	aactaaacat	cctttgggga	tgttttgcca	ccataaggctg	12240
tcaaccctga	ttgatgagat	ggtgtcgcgt	cgaatgtacc	gcatcatgga	aaaagcagga	12300
caggctgcct	ggaaacaggt	ggtgagcgag	gctacgctgt	ctcgcattag	tagtttggat	12360
gtggtggctc	attttcagca	tcttgccgcc	attgaagccg	agacctgtaa	atatttggcc	12420
tcccggctgc	ccatgctaca	caacctgcgc	atgacagggg	ctaattgtac	catagtgtat	12480
aatagtactt	tgcatcaggt	gtttgctatt	tttccaaccc	ctggttcccg	gccaaagctt	12540
catgattttc	agcaatggtt	aatagctgta	cattctccca	tattttcctc	tggtgcagct	12600
tcttgctactc	tctttgttgt	gctgtggttg	cgggttccaa	tactacgtac	tgtttttggt	12660
ttccgctggt	taggggcaat	ttttctttcg	aactcacagt	gaattacacg	gtgtgtccac	12720
cttgccctcac	ccggcaagca	gcgcgagagg	cctacgaacc	cggtaggtct	ccttggtgca	12780
ggatagggta	tgaccgatgt	ggggaggacg	atcatgacga	gctagggttt	atggtaccgt	12840
ctggcctctc	cagcgaaggc	cacttgacca	gtgtttacgc	ctggttggcg	ttcttgcctt	12900
tcagctacac	ggccacgttc	catcccagga	tattcgggat	agggaatgtg	agtcgagttt	12960
atgttgacat	ggaacatcaa	ctcatctgcg	cgaacatga	cgggcagaac	accacctgtc	13020
ctcgtcatga	caacatttca	gccgtgtttc	agacctatta	ccaacatcaa	gtcgacggcg	13080
gcaattggtt	tcacctagaa	tggctgcgtc	ccttcttttc	ctcatggttg	gttttaaatg	13140
tctcttggtt	tctcaggcgt	tcgcctgcaa	accatgtttc	agttcgagtc	ttgcagacat	13200
taagaccaac	accaccgcag	cggcaagcct	tgctgtcctc	caagacatca	gttgccttag	13260
gcatcgcaac	tcggcctctg	aggcgattcg	caaaatccct	cagtgccgta	cggcgatagg	13320
gacaccctg	tatatccaca	tcacagccaa	tgtgacagat	gagaattatt	tacattcttc	13380
tgatctcttc	atgctttctt	ccttgccctt	ctatgcttct	gagatgagtg	aaaagggatt	13440
taagggtgga	tttggaatg	tgtaggcctg	cgtggctgtg	tggtgtcaatt	ttaccagcta	13500
cgtccaacat	gtcagggagt	ttacccaacg	ctccttgatg	gtcgaccatg	tgcggtgct	13560
ccatttcatg	acacctgaga	ccatgaggtg	ggcaactgtt	ttagcctgtc	tttttgccat	13620
tctgttgga	atttgaatgt	ttaagtatgt	tggggaaatg	cctgaccgcg	ggctgttgct	13680
cgcgattgct	ttctttgttg	tgtatcgtgc	cgttctgttt	tgctgtgctc	gtcaacgcca	13740
acagcaacag	cagctctcat	ctacagttga	tttacaactt	gacgctatgt	gagctgaatg	13800
gcacggattg	gctatctaatt	aaatttgatt	gggcagtgga	gagttttgtc	atctttcccg	13860
ttttgactca	cattgtctcc	tatggtgccc	tcactaccag	ccatttccctt	gacacagtcg	13920
cttttagtcac	tgtgtctacc	gcggggtttg	ttcacgggcg	gtatgtcctg	agcagcatct	13980
acgcggtctg	tgccctggct	gcgttgactt	gcttcgtcat	caggtttgca	aagaattgca	14040
tgctctggcg	ctactcatgt	accagatata	ctaactttct	tctggacact	aagggcagac	14100
tctatcgttg	gcggtgcct	gtcatcatag	agaaaagggg	caaagttgag	gtcgaaggtc	14160
atctgatcga	cctcaaaaaga	gttggtgcttg	atggttccgt	ggcaaccctt	ataaccagag	14220
tttcagcgga	acaatggggg	cgtccttaga	tgacttttgt	tatgatagca	cggctccaca	14280
aaagggtgctt	ttggcggtttt	ctattaccta	cacgccagtg	atgatatatg	ccctaaaagt	14340
gagtcgcggc	cgactgttag	ggcttctgca	ccttttgatc	ttcctgaact	gtgctttcac	14400
cttcgggtac	atgacattcg	cgcactttca	gagtacaaat	aaggctcgcg	tcactatggg	14460

agcagtagtt	gcactccttt	ggggggtgta	ttcagccata	gaaacctgga	aattcatcac	14520
ctocagatgc	cgtttgtgct	tgctaggccg	caagtaacatt	ctggccctg	cccaccacgt	14580
tgagagtgcc	gcaggctttc	atccgattgc	ggcaaatgat	aaccacgcat	ttgtcgtccg	14640
gcgtcccggc	tccactacgg	tcaacggcac	attggtgccc	gggttgaaag	gcctcgtggt	14700
gggtggcaga	aaagctgtta	aacagggagt	ggtaaaccctt	gtcaaataatg	ccaaataaca	14760
acggcaagca	gcagaagaga	aagaaggggg	atggccagcc	agtcaatcag	ctgtgccaga	14820
tgctgggtaa	gatcatcgcc	cagcaaaacc	agtccagagg	caagggaccg	ggaaagaaaa	14880
ataagaagaa	aaacccggag	aagccccatt	ttcctctagc	gactgaagat	gatgtcagac	14940
atcactttac	ccctagttag	cggcaattgt	gtctgtcgtc	aatccagact	gcctttaatc	15000
aaggcgctgg	gacttgcacc	ctgtcagatt	cagggaggat	aagttacact	gtggagttaa	15060
gtttgcctac	gcatacact	gtgcgcctga	tccgcgtcac	agcatcaccc	tcagcatgat	15120
gggctggcat	tcttgaggca	tctcagtgtt	tgaattggaa	gaatgtgtgg	tgaatggcac	15180
tgattgacat	tgtgcctcta	agtcacctat	tcaattaggg	cgaccgtgtg	gggtaagat	15240
ttaattggcg	agaaccatac	ggccgaaatt				15270

Bảng 5. SEQ ID NO:3

catttgtgtt	gtcaggagct	gtgaccattg	gcacagccca	aaacttgctg	cacggaagcg	60
cccttctgtg	acagcctcct	tcaggggagc	ttgggggtct	gtccctagca	ccttgcttcc	120
ggagttgcac	tgcttttacg	tctctccacc	cctttaacca	tgtctgggat	acttgatcgg	180
tgcacgtgta	cccccaatgc	caggggtgtt	atggcggagg	gccaagtcta	ctgcacacga	240
tgctcagtg	cacggctctc	ccttccctcg	aatctccaag	tttctgaact	cggggtgcta	300
ggcctattct	acaggcccga	agagccactc	cgggtgcacgt	tgccacgtgc	attccccact	360
gttgagtgtc	ccccgcgg	ggcctgctgg	ccttctgcaa	tttttccaat	tgcacgaatg	420
accagtggaa	acctgaactt	ccaacaaaga	atggtacggg	tcgcagctga	actttacaga	480
gccggccagc	tcacccctac	agtcttaaag	actttacaag	tttatgaacg	gggttgccgc	540
tggtacccca	tcgtaggacc	tgtccctgga	gtggccggtt	tcgccaaactc	cctacatgtg	600
agtgataaac	ccttcccggg	agcaactcac	gtgttaacca	acctgccgct	cccgcagaga	660
cccaagcctg	aagacttttg	cccttttgag	tgtgctatgg	ctaccgtcta	tgacattggt	720
catgacgcgg	tcactgtatg	ggccgaagg	aaagtctcct	gggcccctcg	tggcggggat	780
gaagtgaat	ttgaaactgt	ccccggggag	ttggagtga	ttgcgaatcg	actccgcacc	840
tccttcccgc	cccaccacac	agtggacatg	tctaagttcg	ccttcacagc	ccctgggctg	900
ggtgtttcta	tgccgggtcga	acgccaaacac	ggctgcctcc	ccgctgacac	tgtccctgaa	960
ggcaactgct	ggtggagctt	gtttaacttg	ctcccactgg	aagttcagaa	caaagaaatt	1020
cgcatgcta	accaatttgg	ctaccagacc	aagcatgggt	tctctggcaa	gtacctacag	1080
cggaggctgc	aagttaatgg	tctccgagca	gtaactgacc	tgaatggacc	tatcgtcgta	1140
cagtacttct	ccgttaagga	gagttggatc	cgccacttga	aaactggcga	agaaccacgc	1200
taccctgggt	ttgaggacct	cctcagaata	agggttgagc	ccaacacgtc	gccattggct	1260
gacaaggatg	aaaaaatttt	ccggtttggc	agtcacaagt	ggtacggcgc	tggaaagaga	1320
gcaaggaaag	cacgctctag	tgcgactgct	acagtcgctg	gccgcgcttt	gtccgttcgt	1380
gaaacccggc	aggccaagga	gcacgaggtt	gccggcgcca	acaaggctgg	gcacctcaaa	1440
catctgctcc	cgcctgccga	agggaattgt	ggttggcact	gcatttccgc	catcgccaac	1500
cggatggtga	attccaaatt	tgaaccacc	cttcccga	gagtgagacc	ttcagatgac	1560
tgggctactg	acgaggatct	tgtgaatgcc	atccaaatcc	tcaggctccc	tgccggccttg	1620
aacaggaacg	gcgcttgtgc	tagcgccaag	tacgtactta	agctggaagg	tgagcattgg	1680
actgtcactg	tgaccocctg	gatgtcccct	tctttgctcc	ctcttgaatg	tgttcagggc	1740
tgttgtgagc	ataagggcag	tcttggttcc	ccagatgcag	tcgagggttt	cggatttgac	1800
cctgtcttgc	ttgaccggct	ggctgaggtg	atgcacctgc	ctagcagtgc	tatcccagcc	1860
gctctggccg	aaatgtcccg	cgattccgat	cgttcggctt	cccgggtcac	caccgtgtgg	1920
actgtttcgc	agttctttgc	ccgccacaat	ggagggaatc	accctgacca	agtgcgctta	1980
gggaaaatta	tcagcctttg	tcagggtgatt	gaggactgct	gctgttccca	gaacaaaacc	2040
aaccgggtca	ccccggagga	ggtcgcagca	aagattgacc	tgtaccttcg	tggcgcaaca	2100
aatcttgaag	aatgcttggc	caggcttgag	aaagcgcgcc	cgccacgcgt	aatggacacc	2160
tcctttgatt	gggatgttgt	gctccctggg	gttgaggcgg	caactcagac	gaccgaactg	2220
ccccagctca	accagtctcg	cgctctggtc	cctgttgtaa	ctcaaaagtc	cttggaacaac	2280
aactcgggtc	ccctgaccgc	cctttcactg	gctaactacc	actaccgtgc	gcaagggtgac	2340
gaagtctgtc	accgtgaaag	actaaccgcc	gtgctctcca	agttggaagg	ggttgttcga	2400
gaagaatatg	ggctcatgcc	aaccgggcct	ggtccaacgg	ccacactgcc	acgcgggctc	2460
gacgaactca	aagaccagat	ggaggaggac	ttgtgaaac	tggctaacgc	ccagacgact	2520
tcggacatga	tggcctgggc	agtgcagcag	gttgacctaa	aaacttgggt	caagaactac	2580
ccgcggtgga	caccaccacc	ccctccgcca	aaagttcagc	ctcgaaaaac	gaagcctgtc	2640
aagagcttgc	cagagagaaa	gcctgtcccc	gccccgcgca	ggaagggttg	gtccgattgt	2700
ggcagccgca	tttcattggg	cgacgatgtc	cctaacagtt	gggaagattt	ggctgttggt	2760
agcccccttg	atctctcgac	cccacctgag	ctggcaacac	cttcaagtga	gctgggtgatt	2820
gtgtccgcac	cgcaatgcat	cctcaggccg	gcgacaccct	tgagttagcc	ggctccaatt	2880
cccgaccccc	gcggggttgt	gtctcgaccg	gtgacaccct	tgaatgagcc	gatacctgtg	2940
cccgacccgc	ggcgtaagtt	tcagcagatg	agaagattga	gttcggcggc	ggtaatcccg	3000
ccgtaccagg	acgagcccct	agatttgtct	gcttctcac	agactgaata	tgaggcctct	3060
cccctagcac	cgccgcagag	cgagggtgtt	ctgggagtag	aggggcagga	agctgaggaa	3120
gccctaagtg	aaatctcgga	catgtcgggt	aacattaaac	ctgcgtccgt	atcatcaagc	3180
agctccttgt	ccagcgtgag	aatcactcgc	ccaaaatact	cagctcaagc	catcatcgac	3240

tcgggaggc	cctgcagtg	gcattctcaa	gaggtaaagg	aaacatgcct	cagtatcatg	3300
cgcgaggcat	gtgatgcgac	taagcctgat	gaccctgcta	cgcgaggagt	gctttctcgc	3360
atgtgggac	gggtggacat	gctgacttgg	cgcaacacgt	ctgcttacca	ggcgtttcgc	3420
accttagatg	gcagggtaaa	gttcctccca	aaaatgatac	tcgagacacc	gccgccctat	3480
ccgtgtgagt	ttgtgatgat	gcctcacacg	cctgcacctt	ccgtagggtg	ggagagcgac	3540
cttaccattg	gctcagtcgc	tactgaagat	gttcacacga	tcctcgagaa	aatagaaaat	3600
gtcggcgaga	tgaccaacca	gggacccttg	gccttctcgc	aggataaacc	ggtagatgac	3660
caacttgcca	aagacccccg	gatatcgctg	cagaggtctg	acgagagcac	atcagctcgc	3720
cccgaggcca	cagggtggcg	cggtcatttt	accgatttgc	cgccctcgga	cgcggtggat	3780
gcggacggag	gggggcccgt	ttggacggta	aaaagaaaag	ctgaaaggct	ctttgaccaa	3840
ctgagccgtc	aggtttttga	cctcgtctcc	catctccctg	ttttcttctc	acgccttttc	3900
aaccctggcg	gtggttattc	tccgggtgat	tggggttttg	cagcttttac	tctattgtgc	3960
ctctttttat	gttacagtta	cccagccttt	ggtattgctc	ccctcttggg	tgtgttttct	4020
gggtctttct	ggcgcggttc	aatgggggtt	tttggtgctt	ggttggtctt	tgtgtttggt	4080
ctgttcaagc	ctgtgtccga	cccagtcggc	gctgcttggt	agtttgactc	gccagagtgt	4140
agaaatatcc	ttcattcttt	tgagctttct	aaaccttggg	accctgttcg	cagccttggt	4200
gtgggccccg	tcggtctcgg	tttgccattt	cttgccaggt	tactgggcgg	ggcacgcagc	4260
atctggcact	ttttgcttag	gcttggcatt	gttgccagct	gtgtcttggc	tggagcttat	4320
gtgctttctc	aaggtagggt	taaaaagtgc	tggggatctt	gtataagaac	tgctcctaata	4380
gaggtcgctt	ttaacgtgtt	tcctttttaca	cgtgcgacca	ggtcgtcact	aatcgacctg	4440
tgcgatcggg	tttgtgcgcc	aaaaggcatg	gacccccatt	ttctcggcac	tgggtggcgc	4500
gggtgctggg	cgggcggaag	ccccattgag	caacctcttg	aaaaacccat	cgcgtttgcc	4560
cagtttggtg	aaaagaagat	tacggctagg	actgtggtcg	cccagcctta	tgaccccaac	4620
caagccgtaa	agtgccttgc	ggtattgcag	gcgggtgggg	tgatggtggc	taaggcagtc	4680
ccaaaagtgg	tcaaggtttc	cgctgtttca	ttccgagccc	ccttctttcc	caccggagtg	4740
aaagttgacc	ctgaatgcag	ggtcgtggtt	gaccccgaca	ctttcaccgc	agctctccgg	4800
tctggctact	ccaccacaaa	cctcgtcctc	ggtgtagggg	attttgccca	gctgaatgga	4860
ttaaaaatca	ggcaaatttc	caagccttca	ggaggaggcc	cacacctcat	ggctgccctg	4920
catgttgact	gctcgatggc	tttgacatg	cttgctggga	tttatgtgac	tgcggtgggt	4980
tcttgccgca	cgggcaccaa	cgacccgtgg	tgcgctaacc	cgtttgccgt	ccctggctac	5040
ggacctggct	ctctctgcac	gtccagattg	tgcatttccc	aacatggcct	tacctgccc	5100
ttgacagcac	tcgtggcggg	attcgggtat	caagaaattg	ccttggtcgt	tttgattttt	5160
gtttccatcg	gaggcatggc	tcacaggttg	agttgtaagg	ctgatatgct	gtgtgttttg	5220
cttgcaattg	ccagctatgt	ttgggtacct	cttacctggt	tgttttgtgt	gtttccttgc	5280
tggttgcgct	gtttttcttt	gcattccctc	accattctat	ggttggtggt	tttcttgatt	5340
tctgtgaata	gctgttcagg	aatctttggc	atggtgttgt	tggtttctct	ttggcttctt	5400
ggtcgttata	ctaattgttg	tggcttctgc	acccctacg	acattcatca	ttacactagt	5460
ggcccccgcg	gtgttgccgc	cttggtacc	gcaccagatg	ggacctactt	ggccgctgtc	5520
cgccgcgctg	cgttgactgg	cgcacccatg	ctgtttaccc	cgtcccagct	tgggtctctt	5580
cttgagggtg	ctttcagaac	tcgaaaaccc	tcactgaaca	ccgtcaatgt	ggtcgggtcc	5640
tccatgggct	ctggcggggt	gttcaccatc	gacggaaaaa	ttaagtgcgt	aactgccgca	5700
catgtccctt	cgggcaattc	agctagggtt	tcgggggtcg	gcttcaatca	aatgcttgac	5760
tttgacgtaa	aggagatttt	cgccatagct	gattgcccga	attggcaagg	ggctgcccc	5820
aagaccaaat	tctgcaagga	tgggtggact	ggcgtgcct	attggctaac	atcctctggc	5880
gtcgaaccgc	gcgtcattgg	aaaaggattc	gccttctgct	tcaccgcgtg	cggcgattcc	5940
gggtccccag	tgatcaccga	ggcgggtgag	cttatcggtg	ttcacacggg	atcaaataaa	6000
caaggaggag	gcattcgttac	gcgcccctca	ggccagtttt	gtaatgtggc	acctatcaag	6060
ctaagcgaat	taagtgaatt	ctttgctggg	cctaaggctc	cgtcgttgga	tgtgaaggtt	6120
ggcagccaca	taattaaaga	cataggcgag	gtgccttcag	atctttgtgc	cttgcttgct	6180
gccaacactg	aactggaagg	aggcctctcc	accgtccaac	ttctttgtgt	gtttttctct	6240
ctgtggagaa	tgatgggaca	tgccctggacg	cccttggttg	ctgtgggttt	ctttatcttg	6300
aatgaggttc	tccagccgtg	cctgggtccg	agtgttttct	cctttggaat	gtttgtgcta	6360
tcctggctca	cgccatggtc	tgcgcaagtt	ctgatgatca	ggcttctaac	agcagccctt	6420
aacaggaaca	gatggtcact	tgcctttttc	agcctcgggt	cagtgaccgg	ttttgtcgca	6480
gatcttgctg	ctactcaggg	gcattccgtt	caggcagttg	tgaatttgag	cacctatgca	6540
ttcctgcctc	ggatgatggt	tgtgacctca	ccagtcccag	tgattgcgtg	tgggtgtgtg	6600
cacctacttg	ccatcatttt	gtacttggtt	aagtaccgtg	gcctgcacca	aatccttggt	6660
ggcgatggag	tgttctctgc	ggctttcttc	ctgcgatact	ttgcccaggg	aaagttgagg	6720
gaaggggtgt	cgcaatcctg	cggaatgaat	catgagtctc	tgactgggtg	cctcgcctat	6780
agactcaatg	acgaggactt	ggatttcctt	acgaaatgga	ctgattttta	gtgctttggt	6840
tctgcgtcca	acatgaggaa	tgccagcggg	caatttatcg	aggctgccta	tgctaaagca	6900
cttagagtag	agcttgccca	gttggtgcag	gttgataaag	ttcgaggaa	tttgcccaaa	6960
cttgagccct	ttgctgatac	cgtggcacc	caactctcgc	cgggtgacat	tgttgtcgct	7020
ctcgcccata	cgcctgttg	cagtatcttc	gacctaaagg	ttggtagcac	caagcatacc	7080
ctccaagcca	ttgagaccag	agtccttgct	gggtccaaaa	tgaccgtggc	gcgcgtcgtc	7140
gaccgcaccc	ccaagccccc	accgcacctt	gtgcccattc	ccctcccacc	gaaagttctg	7200
gagaatggcc	ccaacgcttg	gggggatgag	gaccgtttga	ataagaagaa	gaggcgagag	7260
atggaagccc	tcggcatcta	tggtatgggc	gggaaaaagt	accagaaatt	ttgggataag	7320
aattccggtg	atgtgtttta	tgaggagggt	cataataaca	cagatgagtg	ggagtgtctc	7380
agagttggcg	accctgccga	ctttgaccct	gagaagggaa	ctctgtgtgg	acatgtcacc	7440
attgaagata	aggcttacca	tgtttacacc	tcaccatctg	gtaagaagtt	cttggtcccc	7500

gtcaatccag	agaatggaag	agtccaatgg	gaagctgcaa	agctttccgt	agagcaggcc	7560
cttggtatga	tgaacgtcga	cggcgaaactg	actaccaaaag	aactggagaa	actgaaaaga	7620
ataattgaca	aactccaggg	cctgactaag	gagcagtgtt	taaactgcta	gccgccagcg	7680
gcttgaccog	ctgtggctgc	ggcggcttgg	ttgttactga	aacagcggta	aaaatagtca	7740
aatttcacaa	ccggaccttc	accctgggac	ctgtgaattt	aaaagtggcc	agtgaagttg	7800
agctaaaaga	cgcggttgag	cacaaccaac	acccggttgc	gagaccggtc	gatggtgggtg	7860
ttgtgctcct	gcgttccgcg	gttccttcgc	ttatagaagt	cttgatctcc	ggtgctgatg	7920
catctcccaa	gttgcttgc	catcacgggc	cgggaacac	tgggatcgat	ggcacgctct	7980
gggattttga	gtccgaagcc	actaaagagg	aagtgcgact	tagtgcgcaa	ataatacagg	8040
cttgtgacat	taggcgcggc	gacgctcctg	aaatttgtct	cccttacaag	ctgtaccctg	8100
ttaggggtaa	ccctgagcgg	gtaaaaggag	ttctacagaa	tacaaggttt	ggagacatac	8160
cttacaanaac	cccagtgat	actggaaacc	cagtgcacgc	ggctgcctgc	cttacgcca	8220
acgccactcc	ggtgactgat	gggcgctccg	tcttgccac	gacctgccc	tccgggtttg	8280
agttgtatgt	accaaccata	ccagcgtctg	tccttgatta	ccttgattct	aggcctgact	8340
gccctaaaca	gttgacagag	cacggctgtg	aagatgccgc	actgagagac	ctctccaaat	8400
atgacttgct	cacccaagcg	tttgttttac	ctggagtttt	tcgccttgta	cggaaatacc	8460
tgtttgcccc	tgtaggtaag	tgccaccocg	ttcatcggcc	ttctacttac	cctgctaaga	8520
attctatggc	tggataaata	gggaataggt	tcccaaccaa	ggatattcag	agcgtccctg	8580
aaatcgacgt	tctgtgtgca	caggctgtgc	gggaaaactg	gcaaactgtt	accccttgta	8640
ctcttaagaa	acagtattgc	gggaagaaga	agactaggac	catactcggc	accaataatt	8700
ttatcgcgct	agcccaccga	gcagcgttga	gtggtgtcac	ccagggttc	atgaaaaagg	8760
cgcttaactc	cctgctcgcc	ctcggaaaaa	acaagtttaa	ggagctacag	accccggtcc	8820
taggcaggtg	ccctgaagct	gatcttgcac	cctgcgaccg	atccacacct	gcaattgtcc	8880
gctggtttgc	cgccaacctc	ctttatgaac	ttgcctgcgc	tgaagagcat	ttaccgtcgt	8940
acgtgctgaa	ctgctgccac	gacttactgg	tcacgcagtc	cggcgagtg	actaagagag	9000
gtggcctgtc	gtctggcgac	ccgatcacct	ctgtgtctaa	caccatttac	agtttggtga	9060
tctatgcaca	gcataatggtg	ctcagttact	tcaaaagtgg	tcaccccat	ggcctcttgt	9120
tcttacaaga	ccagctaaag	tttgaggaca	tgtctcaagt	tcaaccctg	atcgtctatt	9180
cggacgacct	ctgctgtgat	gccgagtcct	ccaccatgcc	aaactatcac	tggtgggttg	9240
aacacctgaa	tttgatgctg	gggtttcaga	cggatccaaa	aaagacagcc	ataacagact	9300
cgccatcatt	tctaggctgt	agaataataa	atggacgcca	gctagtcccc	aaccgtgaca	9360
ggattctcgc	ggccctcgcc	taccacatga	aggcgagtaa	tgtttctgaa	tactacgcct	9420
cagcggtctg	aatactcatg	gacagctgtg	cttggtttgga	gtatgatcct	gaatggtttg	9480
aagaacttgt	agttggaata	gcgcaatgcg	cccgaaggaa	cgggttacagc	tttcccggca	9540
cgccgttctt	tatgtccatg	tgggaaaaac	tcaggttcaa	ttatgagggg	aagaagtcca	9600
gagtgctcgg	gtactgcggg	gccccggccc	cgtacgctac	tgctgtggcg	ctcgcagctc	9660
gcattttacca	caccacttcc	caccagcatt	gtccagtcac	aatctggtgt	ggccatccag	9720
cgggttcttg	ttctttagtg	gagtgcaaat	ccctgttagg	gaaaggcaca	agccctttag	9780
acgaggtgct	ggaacaagtc	ccgtacaagc	ccccacggac	cgttatcatg	cgtgtggagc	9840
agggtcttac	cccccttgac	ccaggtagat	accagactcg	ccgcggtatta	gtctccgtca	9900
ggcgtggaat	caggggaaat	gaggttgaac	taccagacgc	tgattatgct	agtaccgcct	9960
tgtctcctac	ctgtaaaagag	atcaacatgg	tcgctgttgc	ttccaatgta	ttgcgcagca	10020
ggttcatcat	tgggtccacc	ggtgctggga	aaacatactg	gtctcttcaa	cagggtccagg	10080
atggtgatgt	tattttacaca	ccaaccacc	agaccatgct	tgacatgatt	agggcttttg	10140
ggacgtgccc	gttcaacgtc	ccggcaggca	caacgctgca	attccccgtc	ccctcccgtg	10200
ccggtccgtg	ggttcgcac	ctggccggcg	gttggtgtcc	tggcaagaat	tccttccctg	10260
atgaagcagc	gtattgcaat	caccttgatg	tcttgaggct	tcttagcaaa	actaccctca	10320
cctgtctcgg	agacttcaaa	caactccacc	cagtggtgtt	tgattctcat	tgctatgttt	10380
ttaacatcat	gcctcaaaact	caactgaaga	ccatctggag	gtttggacag	aatatctgtg	10440
atgccatcca	gccagattac	agggacaaac	tcagtgtccat	ggtcaacaca	acccgtgtga	10500
cctacgtgga	aaagcctgtc	aggatgggc	aagtcctcac	cccctaccac	agggaccgag	10560
aggacgacgc	catcactatt	gactccagtc	aaggcgccac	attcgatgtg	gttacactgc	10620
atttgcccac	aaaagattca	ctcaacaggc	agagagccct	tggtgctatc	accagggcaa	10680
gacatgctat	ctttgtgtat	gacccacaca	ggcagctgca	gagcctgttt	gatcttccctg	10740
caaaaggtag	accogtcaac	cttgagtgac	accgcgacgg	gcagctgatc	gtgctagata	10800
gaaataacaa	agaatgcacg	gttgctcagg	ctctaggtaa	cggagataaa	tttagggcca	10860
cagacaaacg	cggtgtgat	tctctccgcg	ccatttgtgc	tgatctagaa	gggtcgagct	10920
ctccgctccc	caaggtcgca	cacaacttgg	gattttatgt	ctcacctgat	ttaacacagt	10980
ttgctaaact	cccagcagaa	cttgacacct	actggcccgt	ggtgacaacc	cagaacaatg	11040
aaaagtggcc	agatcggctg	gttaccagcc	ttcgccctat	ccataaataat	agccgcgcgt	11100
gcatacgtgc	cggtctatatg	gtgggcccc	cggtgtttct	aggcactcct	ggggtcgtgt	11160
catactatct	cacaaaattt	gttaagggcg	aggtccaaagt	gcttccggag	acgggttttca	11220
gcaccggccg	aattgaggtg	gactgcggg	aatatcttga	tgatcgggag	cgagaggttg	11280
ctgcgtccct	cccacatgcc	ttcattggcg	acgtcaaaag	cactaccgtt	ggaggatgcc	11340
accatgtcac	ctccagatac	ctccgcgct	tccttcccaa	ggaatcgggt	gcggtagtcg	11400
gggtttcaag	tcccgaaaaa	gccgcgaaag	cattgtgcac	actgacagat	gtgtacctcc	11460
cagaccttga	agcctattttc	caccoggaga	cccagtccaa	gtgctggaga	atgatgttg	11520
acttcaagga	agttcgacta	atggtctgga	aagacaaaac	agcctattttc	caacttgaag	11580
gtcgtctatt	cacctggtat	cagcttgcta	gctatgcctc	gtacatccgt	gttccctgtca	11640
actccacggg	gtacttggac	ccctgcattg	gccccccct	ttgcaacagg	aaagtcgtcg	11700
ggtccactca	ttggggagct	gacctcgctg	tcacccttca	tgattacggc	gctaaaatta	11760

```

tctgtgctag cggtaccat agtgaaatgc ccccgata caagattctg gcggtgcgg 11820
aattctcggt ggatgacca gtcaagtaca aacatactg ggggttgaa tcggatacag 11880
cgtatctgta tgagttcacc ggaacggtg aggactggga ggattacaat gatgcgtttc 11940
gtgctgcgca ggaaggaaa atttataagg ctactgccac cagcatgaag ttttattttc 12000
ccccgggccc tgtcattgaa ccaactttag gcctgaattg aaatgaaatg ggggtccatgc 12060

aaagcctttt tgacaaaatt ggccaacttt ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt 12120
ccattgttga tatcattata tttttggcca ttttgtttgg cttcaccatc gccggttggt 12180
tggtggtctt ttgcatcaga ttggtttgct ccgcgatact ccgtacgcgc cctgccattc 12240
actctgagca attacagaag atcttatgaa gccttttctt cccagtgcc aagtggacatt 12300
cccacctggg gaactaaaca tccttttggg atgttttggc accataaggt gtcaaccctg 12360
attgatgaga tgggtgtcgcg tcgaatgtac cgcacatgag aaaaagcagg acaggctgcc 12420
tggaacagg tgggtgagcga ggctacgctg tctcgcatta gtagtttgga tgtggtggct 12480
cattttcagc atcttgccgc cattgaagcc gagacctgta aatatttggc ctcccggctg 12540
cccatgctac acaacctgcg catgacaggg tcaaagttaa ccatagtgtg taatagtact 12600
ttgcatcagg tgtttgctat ttttccaacc cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt 12660
cagcaatggt taatagctgt acatttctcc atattttctt ctggtgcagc ttcttgact 12720
ctctttgttg tgtgtggtt ggggtttcca atactacgta ctgttttgg tttccgctgg 12780
ttaggggcaa tttttcttcc gaactcacag tgaattacac ggtgtgtcca cttgcctca 12840
cccggaagc agcgcagag gcctacgaac ccggtaggtc tctttggtgc aggatagggt 12900
atgaccgatg tggggaggac gatcatgacg agctagggtt tatggtaccg tctggcctct 12960
ccagcgaagg ccacttgacc agtgtttacg cctggttggc gttcttgtcc ttcagctaca 13020
cggccagttt actcccag atattcggga taggggaatt gtagtcgagt tatgttgaca 13080
tcgcaacatca cctcatctgc gccgaacatg acgggcagaa caccacctg cctcgtcatg 13140
acaacatttc agcgtgttt cagacctatt accaactca agtcgacggc ggcaattggt 13200
ttcacctaga atggctgcgt ccttctttt cctcatggtt ggttttaaat gtctcttggt 13260
ttctcaggcg ttgcctgca aaccatgttt cagttcgagt ctttcagaca ttaagaccaa 13320
caccaccgca gggcaagct ttgctgtcct ccaagacatc agttgcctta ggcacgcaa 13380
ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc tcagtgcgt acggcgatag ggacaccgt 13440
gtatattacc atcacagcca atgtgacaga tgagaattat ttacattctt ctgatctcct 13500
catgctttct tcttgccttt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggt ttaagggtgt 13560
atltggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt gtgtgtcaat tttaccagct acgtccaaca 13620
tgtcaggag tttaccaaac gctccttgat ggtcgaccat gtgctggctgc tccatttcat 13680
gacacctgag accatgaggt gggcaactgt tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc 13740
aatttgaatg ttttaagtatg ttggggaaat gcttgaccgc gggctgttgc tcgcatgtgc 13800
tttctttgtg gtgtatcgtg ccgttctgtt ttgctgtgct cgtcaacgcc aacagcaaca 13860
gcagctctca tctacagttg atttacaact tgacgtatg tgagctgaat ggcacagatt 13920
ggctatctaa taaatttgat tgggcagtg agagttttgt catctttccc gttttgactc 13980
acattgtctc ctatggtgcc ctcactacca gccatttctt tgacacagtc gcttttagtca 14040
ctgtgtctac cgccgggttt gtacacgggc ggtatgtcct gagcagcatc tacgcggtct 14100
gtgccctggc tgcgttgact tgcttcgtca ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc 14160
gctactcatg taccagatat actaaactttc ttctggacac taagggcaga ctctatcgtt 14220
ggcggtcgca gtgtatcata gagaaaagg gcaaagttga ggtcgaaggt catctgatcg 14280
acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg 14340
aacaatgggg tcgtccttag atgacttttg ttatgatagc acggctccac aaaagggtgt 14400
tttggcggtt tctattacct acacgccagt gatgatatat gccctaaaag tgagtcgctg 14460
ccgactgtta gggtctctgc accttttgat ctctctgaac tgtgctttca ccttcgggta 14520
catgacattc gcgcactttc agagtacaaa taaggctcgc ctcactatgg gagcagtagt 14580
tgactcctt tggggggtgt attcagccat agaaacctgg aaattcatca cctccagatg 14640
ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat tctggccctt gccaccacg ttgagatgct 14700
cgaggcttt catccgattg cggcaaatga taaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg 14760
ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc cgggttgaaa ggctcgtgt tgggtggcag 14820
aaaagctgtt aaacaggag tggtaaacct tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc 14880
agcagaagag aaagaagggt gatggccagc cagtcaatca gctgtgccag atgctgggtg 14940
agatcatcgc ccagcaaaac cagtccagag gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga 15000
aaaacccgga gaagcccat tttcctctag cgactgcaga tgatgtcaga catcacttta 15060
cccctagtga gggcaattg tgtctgtcgt caatccagac tgcctttaat caaggcgtg 15120
ggacttgac cctgtcagat tcaggaggga taagttaacac tgtggagttt agtttgctta 15180
cgcatcatac tgtgcgctg atccgcgtca cagcatcacc ctcagcatga tgggtggca 15240
ttcttgaggc atctcagtg ttgaattgga agaattgtgt gtgaatggca ctgattgaca 15300
ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg gcgaccgtgt ggggtaaga ttttaattggc 15360
gagaaccata cgccgaaat t 15381

```

Bảng 6. SEQ ID tiếp theo: mục và một số thông tin trình tự.

Số ID trình tự:	Trình tự
4	ANRMXNSKFE Xaa là Val hoặc Met
5	ANRMVNSKFE

6	LANYYYRAQG	
7	LANYHYRAQG	
8	DLXTPPEPAT	<223> Xaa là Pro hoặc Ser
9	DLSTPPELAT	
10	DLPTPPEPAT	
11	VDIIIFLAIL	
12	VDIIVFLAIL	
13	AILRTRPAIH	
14	AILRARPAIH	
15	LGMFIPXGLS	<223> Xaa là Pro hoặc Ser
16	LGMVPSGLS	
17	SVRVLQTLRP	
18	SVRVFQTLRP	
19	SSSLADIKTN	
20	SSSLSDIKTN	
21	MVNSCTFLHI FLCCSFLYSL CCAVVAGSNT TYCFWFPLVR GNFSFELTVN YTVCPPCLTR 60 QAAAEAYEPG RSLWCRIGYD RCGEDDHDEL GFMIPXGLSS EGHLTSVYAW LAFLSFSYTA 120 QFHPEIFGIG NVSRVYVDIE HQLICAHDG QNTTLPRHDN ISAVFQTYQ HQVDGGNWFH 180 LEWLRPFSS WLVLNVSWFL RRSPANHVS RVLQTLRPTP PQRQALLSSK TSVALGIATR 240 PLRRFAKSL AVRR 254 <222> (96)..(96) <223> Xaa là Pro hoặc Ser	
22	MVNSCTFLHI FLCCSFLYSL CCAVVAGSNT TYCFWFPLVR GNFSFELTVN YTVCPPCLTR 60 QAAAEAYEPG RSLWCRIGYD RCGEDDHDEL GFMVPSGLSS EGHLTSVYAW LAFLSFSYTA 120 QFHPEIFGIG NVSRVYVDIE HQLICAHDG QNTTLPRHDN ISAVFQTYQ HQVDGGNWFH 180 LEWLRPFSS WLVLNVSWFL RRSPANHVS RVLQTLRPTP PQRQALLSSK TSVALGIATR 240 PLRRFAKSL AVRR 254	
23	MAASLLFLMV GFKCLLVQA FACKPCFSSS LADIKTNTTA AASFAVLQDI SCLRHRNSAS 60 EAIKIPQCR TAIGTPVYIT ITANVTDENY LHSSDLLMLS SCLFYASEMS EKGFKVVFGN 120 VSGIVAVCVN FTSYVQHVRE FTQRSLMVDH VRLLFHMTPE TMRWATVLAC LFAILLAI 178	
24	MAASLLFLMV GFKCLLVQA FACKPCFSSS LADIKTNTTA AASFAVLQDI SCLRHRNSAS 60 EAIKIPQCR TAIGTPVYIT ITANVTDENY LHSSDLLMLS SCLFYASEMS EKGFKVVFGN 120 VSGIVAVCVN FTSYVQHVRE FTQRSLMVDH VRLLFHMTPE TMRWATVLAC LFAILLAI 178	
25	MGSMQSLFDK IGQLFVDAFT EFLVSIVDII IFLAILFGFT IAGWLVVFCI RLVCSAILRT 60 RPAIHSEQLQ KIL 73	
26	MGSMQSLFDK IGQLFVDAFT EFLVSIVDII VFLAILFGFT IAGWLVVFCI RLVCSAILRA 60 RPAIHSEQLQ KIL 73	
27	cacacggtcg ccctaattg	19
28	tggtgaatgg cactgattga c	21
29	tggtgcctcta agtcacc	17
30	caactgcaga gctcatatgc at	22
31	MKWGPCKAFL TKLANFLWML SRSSWCPLLI SLYFWPFCLA SPSPVGWWSF ASDWFAPRYS 60 VRALPFTLSN YRRSYEAFLS QCQVDIPTWG TKHPLGMFWH HKVSTLIDEM VSRMRIME 120 KAGQAAWKQV VSEATLSRIS SLDVVAHFQH LAAIEAETCK YLASRLPMLH NLRMTGSNVT 180 IVYNSTLHQV FAIFPTPGSR PKLHDFQQWL IAVHSSIFSS VAASCTLFVV LWLRVPILRT 240 VFGFRWLGA FLSNSQ 256	
32	MLGKCLTAGC CSRLSLWCI VPFCFAVLVN ANSNSSSHLQ LIYNLTLCLE NGTDWLSNKF 60 DWAVSEFVIF PVLTHIVSYG ALTTSFLDT VALVTVSTAG FVHGRYVLS IYAVCALAAL 120 TCFVIRFAKN CMSWRYSCTR YTNFLDLTKG RLYRWRSPVI IEKRGKVEVE GHLIDLKRVV 180 LDGSVATPIT RVSAEQWGRP 200	
33	MGSSLDDFCY DSTAPQVLL AFSITYTPVM IYALKVSRGR LLGLLHLLIF LNCAFTFGYM 60 TFAHFQSTNK VALTMGAVVA LLWGVYSAIE TWKFITSRCR LCLLGRKYIL APAHHVESAA 120 GFHPAANDN HAFVVRPGS TTVNGTLVPG LKGLVLGGRK AVKQGVVNLV KYAK 174	
34	MPNNNGKQK RKKGDGQPVN QLCQMLGKII AQONQSRGKG PGKKNKKKNP EKPHFPLATE 60 DDVRHHFTPS ERQLCLSSIQ TAFNQAGATC TLDSDGRISY TVEFSLPHTH TVRLIRVTAS 120 PSA 123	
35	MSGILDRCTC TPNARVFMAE GQVYCTRCLS ARSLPLNLQ VSELGVLGLF YRPEEPLRWT 60 LPRAFPTVEC SPAGACWLSA IFPIARMTSG NLNFQQRMMR VAAELYRAGQ LTPTVLKTLQ 120 VYERGCRWYP IVGPVPGVAV FANSLHVSDK PEPGATHVLT NLPLPQ 166	
36	RPKPEDFCPF ECAMATVYDI GHDAVMYVAE GKVSWAPRGG DEVKFETVPG ELELIANRLR 60 TSFPPHHTVD MSKFAFTAPG RGVSMRVERQ HGCLPADTVP EGNCWWSLFN LLPLEVQNK 120 IRHANQFGYQ TKHGVSGKYL QRRQLQVNGLR AVTDLNGPIV VQYFSVKESW IRHLKLAEEP 180 SYPGFEDLLR IRVEPNTSPL ADKDEKIFRF GSHKWY 216	
37	AGKRARKARS SATATVAGRA LSVRETROAK EHEVAGANKA GHLKHYSPPA EGNCGWHCIS 60 AIANRMVNSK FETTLPERV PSDDWATDED LVNAIQLRL PAALNRNGAC ASAKYVLKLE 120 GEHWTVTPT GMSPSLLPLE CVQGCCEHKG SLGSPDAVEV FGFDPACLDR LAEVMHLPSS 180 AIPAALAEMS GSDRSASPV TTVWTVSQFF ARHNGGNHPD QVRLGKIISL CQVIEDCCCS 240 QNKTNRVTPE EVAAKIDLIL RGATNLEECL ARLEKARPPR VMDTSFDWDV VLPGVEAATQ 300 TTELPQVNC RALVPVVTQK SLDNNSVPLT AFSLANYYYR AQGDEVHRH RLTAVLSKLE 360 GVVREYGLM PTGPGPRPTL PRGLDELKDQ MEEDLLKLAN AQTSDDMMAW AVEQVDLKTW 420	

	VKNYPRWTPP	PPPPKVQPRK	TKPVKSLPER	KPVPAARRKV	GSDCGSPISL	GDDVPNSWED	480
	LAVGSPFDLP	TPPEPATPSS	ELVIVSAPQC	IFRPATPLSE	PAPIPAPRGV	VSRPVTPLNE	540
	PIPVPAARRK	FQQMRLSSA	AVIPPYQDEF	LDLSASSQTE	YEASPLAPPQ	SEGVLGVEGQ	600
	EAEELALSEIS	DMSGNIKPAS	VSSSSSLSSV	RITRPKYSAQ	AIIDSGGPCS	GHLQEVKETC	660
	LSIMREACDA	TKLDDPATQE	WLSRMWDRVD	MLTWRNTSAY	QAFRTL DGRL	KFLPKMILET	720
	PPYPCEFVM	MPHTPAPSVG	AESDLTIGSV	ATEDVPRILE	KIENVGEMTN	QGFLAFSEDK	780
	PVDDQLAKDP	RISSQRSDES	TSAPPAGTGG	AGSFTDLPPS	DGVDADGGGP	FWTVKRKAER	840
	LFDQLSRQVF	DLVSHLPVFF	SRLFNPGGGY	SPGDWGFAAF	TLLCLFLCYS	YPAFGIAPLL	900
	GVFSGSSRRV	RMGVFGCWL	FAVGLFKPVS	DPVGAACEFD	SPECRNILHS	FELLKPWDPV	960
	RSLVVGVPVL	GLAILGRLLG					980
	GARSIWHFLL	RLGIVADCVL	AGAYVLSQGR	CKKCGWSCIR	TAPNEVAFNV	FPFTRATRSS	60
	LIDLCDRFCA	PKGMDPIFLA	TGWRGCWAGR	SPIEQPSEKP	IAFAQLDEKK	ITARTVVAQP	120
	YDPNQAVKCL	RVLQAGGVMV	AKAVPKVVKV	SAVPFRAPFF	PTGVKVDPEC	RVVVDPDFTT	180
	AALRSGYSTT	NLVLGVGDFA	QLNGLKIRQI	SKPSGGGPHL	MAALHVACSM	ALHMLAGIYV	240
	TAVGSCGTGT	NDPWCANPFA	VPGYGPGSLC	TSRLCISQHG	LTLPLTALVA	GFGIQEIALV	300
	VLIIFVSIGM	AHRLSCKADP	LCVLLAIASV	VWVPLTWLLC	VFPCWLRCSF	LHPLTILWL	360
	FFLISVNMP	GILAMVLLVS	LWLLGRYTNV	AGLVTPYDIH	HYTSGPRGVA	ALATAPDGT	420
	LAAVRRAALT	GRTMLFTFSQ	LGSLL				446
	GAFTRKPSL	NTVNVVGSSM	GSGGVFTIDG	KIKCVTAAHV	LTGNSARVSG	VGFNQMLDFD	60
	VKGDFAIADC	PNWQGAAPKT	QFCKDGWTGR	AYWLTSSGVE	PGVIGKGFAF	CFTACGDSGS	120
	PVITEAGELI	GVHTGSNKQG	GGIVTRPSGQ	FCNVAPIKLS	ELSEFFAGPK	VPLGDVKVGS	180
	HIKDIGEVP	SDLCALLAAK	PELE				204
	GGLSTVQLLC	VFFLLWRMMG	HAWTPLVAVG	FFILNEVLPA	VLVRSVFSFG	MFVLSWLTWP	60
	SAQVLMIRLL	TAALNRNRWS	LAFFSLGAVT	GEVADLAATQ	GHPLQAVMNL	STYAFLLPRM	120
	VVTSPVPVIA	CGVVHLLAI	LYLFKYRGLH	QILVGDGVFS	AAFFLLRYFAE		170
	GKLREGVSQS	CGMNHE					16
	SLTGALAMRL	NDEDLDFLTK	WTDKFCFVSA	SNMRNAAQGF	IEAAYAKALR	VELAQVLQVD	60
	KVRGTLAKLE	AFADTVAPQL	SPGDIVVALG	HTPVGSIIDL	KVGSTKHTLQ	AIETRVLAGS	120
	KMTVARVVD	TPTPPAPVP	IPLPPKVLEN	GPNAWGDEDR	LNKKKRRRME	ALGIYVMGGK	180
	KYQKFWDKNS	GDVFEYEEVHN	NTDEWECLRV	GDPADFDPEK	GTLCGHVTIE	DKAYHVTSS	240
	SGKKFLVPVN	PENGRVQWE					259
	AAKLSVEQAL	GMMNVDGELT	TKELEKLKRI	IDKLQGLTKE	QCLNC		45
	AAKLSVEQAL	GMMNVDGELT	TKELEKLKRI	IDKLQGLTKE	QCLNLLAASG	LTRCGRGGLV	60
	VTETAVKIVK	FHNRTFTLGP	VNLKVASEVE	LKDABEHNQH	PVARPVDGGV	VLLRSVAVPSL	120
	IDVLISGADA	SPKLLAHHGP	GNTGIDGTLW	DFESEATKEE	VALSAQIIQA	CDIRRGDAPE	180
	IGLPYKLYPV	RGNPERVKGV	LQNRFGDIP	YKTPSDTGNP	VHAAACLTNP	ATPVTDGSRV	240
	LATMPSPGFE	LYVPTIPASV	LDYLDSPDC	PKQLTEHGCE	DAALRDLSKY	DLSTQGFVLP	300
	GVFRLVRKYL	FAHVGKCPV	HRPSTYPAKN	SMAGINGNRF	PTKDIQSVPE	IDVLCQAQVR	360
	ENWQTVTPCT	LKKQYCGKKK	TRTILGTNNF	IALAHRAALS	GVTQGFMKKA	FNSPIALGKN	420
	KFKEQLTPVL	GRCLEADLAS	CDRSTPAIVR	WFAANLLYEL	ACAEHLPSPY	VLNCCDHLV	480
	TQSGAVTKRG	GLSSGDPITS	VSNTIYSLVI	YAQHMVLSYF	KSGHPHGLLF	LQDQLKFEDM	540
	LKVQPLIVYS	DDLVLVYAES	TMPNYHWWVE	HLNSMLGFQT	DPKKTAITDS	PSFLGCRIIN	600
	GRQLVFNDRD	ILAAALAYHMK	ASNVSSEYYAS	AAAILMDSCA	CLEYDPEWFE	ELVVGIAQCA	660
	RKDGYSFPGT	PFMMSMWEKL	RSNYE				685
	GKKSRCVGYC	GAPAPYATAC	GLDVCIIYTH	FHQHCPVTIW	CGHPAGSGSC	SECKSPVGKG	60
	TSPLDEVLEQ	VPYKPPRTVI	MRVEQGLTPL	DPGRYQTRRG	LVSRRRGIRG	NEVELPDGDY	120
	ASTALLPTCK	EINMVAVASN	VLSRFRFIIGP	PGAGKTYWLL	QQVQDGDVYI	TPTHQTM LDM	180
	IRALGTCTFRN	VPAGTTLQFP	VPSRTGPWVR	ILAGGWCPGK	NSFLDEAAVC	NHLDVLRLLS	240
	KTTLTCLGDF	KQLHPVGFDS	HCYVENIMPO	TQLKTIWREF	QNICDAIQPD	YRDKLMSMVN	300
	TTRVTYVEKP	VRYGQVLTYP	HRDREDDAIT	IDSSQGATFD	VVTLHLPTKD	SLNRQALVA	360
	ITRARHAIFV	YDPRQLQSL	FDLPAKGTPV	NLAVHRDGQL	IVLDRNNKEC	TVAQALNGND	420
	KFRATDKRVV	DSLRAICADL	E				441
	GSSSPLPKVA	HNLGFYFSPD	LTQFAKLPAE	LAPHWPVVT	QNEKWPDR	VTSLRPIHKY	60
	SRACIGAGYM	VGPSVFLGTP	GVVSYLTKF	VKGAEQVLPE	TVFSTGRIE	DCREYLDRE	120
	REVAASLPHA	FIGDVKGTTV	GGCHHVTSRY	LPRFLPKESV	AVVGVSPPGK	AAKALCTLTD	180
	VYLPDLEAYF	HPETQSKCWR	MMLDFKEVRL	MVWKDKTAYF	QLE		223
	GRYFTWYQLA	SYASYIRVPV	NSTVYLDPCM	GPALCNRKVV	GSTHWGADLA	VTPYDYGAKI	60
	ILSSAYHSEM	PPGYKILACA	EFSLDDPVKY	KHTWGFESDT	AYLYEFTNG	EDWEDYNDAF	120
	RARQEGKIYK	ATATSMKFYF	PPGPVIEPTL	GLN			153
	MVNSCTFLHI	FLCCSFLYSL	CCAVVAGSNT	TYCFWFPLVR	GNFSFELTVN	YTVCPCLTR	60
	QAAAAYEPG	RSLWCRIYD	RCGEDDHDEL	GFMVPSGLSS	EGHLTSVYAW	LAFLSFSYTA	120
	QFHPEIFGIG	NVSRVYVDIE	HQLICAHDG	QNTTLPRHDN	ISAVFQTYQ	HQVDGGNWFH	180
	LEWLRPFFSS	WLVLNVSWFL	RRSPANHVSV	RVFQTLRPTP	PQRQALLSSK	TSVALGIATR	240
	PLRRFAKSL	AVRR					254

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) được phân lập, trong đó virut này chứa trình tự axit nucleic có mức độ giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 95%, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin Protein E chứa SEQ ID NO: 12 và trình tự axit amin GP3 chứa SEQ ID NO:16.
2. Virut PRRS được phân lập theo điểm 1, trong đó virut này chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1.
3. Chế phẩm gây miễn dịch chứa virut theo điểm 1 và chất mang được dụng.
4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 3, trong đó chế phẩm này còn chứa chất bổ trợ miễn dịch.
5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 4, trong đó chất bổ trợ miễn dịch bao gồm ít nhất một trong số interferon α , interferon β , interleukin-12, interleukin-15, interleukin-18, axit nucleic mã hóa interferon α được biểu hiện ở tế bào lợn, axit nucleic mã hóa interleukin-12 được biểu hiện ở tế bào lợn, axit nucleic mã hóa interleukin-15 được biểu hiện ở tế bào lợn, axit nucleic mã hóa interleukin-18 được biểu hiện ở tế bào lợn, axit nucleic mã hóa interferon β được biểu hiện ở tế bào lợn, hoặc poly IC.
6. Virut PRRS được phân lập có trình tự protein E đặc trưng bởi SEQ ID NO:12, trình tự Nsp2 đặc trưng bởi SEQ ID NO:7, hoặc cả trình tự Protein E đặc trưng bởi SEQ ID NO:12 và trình tự Nsp2 đặc trưng bởi SEQ ID NO:7.
7. Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) được phân lập được lưu trữ bởi Cơ quan lưu trữ tế bào nuôi cấy Mỹ (ATCC: American Type Culture Collection) có số lưu trữ là ATCC Patent Deposit No.PTA-120658.
8. Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) được phân lập, trong đó virut này có trình tự axit nucleic có mức độ giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 95% và trong đó hệ gen của virut này mã hóa protein được chọn từ nhóm bao gồm protein E chứa valin ở vị trí 31 và alanin ở vị trí 60 so với SEQ ID NO: 25, hoặc protein GP3 chứa valin ở vị trí 94, serin ở vị trí 96 và phenylalanin ở vị trí 213 so với SEQ ID NO:21.

9. Virut PRRS được phân lập theo điểm 8, trong đó hệ gen của virut còn mã hóa một hoặc nhiều protein được chọn từ protein Nsp2 có histidin ở vị trí 338, và protein Nsp2 có leuxin ở vị trí 495.
10. Virut PRRS được phân lập theo điểm 8, trong đó hệ gen của virut còn mã hóa một hoặc nhiều protein được chọn từ protein Nsp2 có valin ở vị trí 67, và protein Nsp2 có prolin ở vị trí 490.
11. Virut PRRS được phân lập theo điểm 8, trong đó hệ gen của virut chứa trình tự SEQ ID NO:3 hoặc trình tự tương đương ARN của nó.

LIỆT KÊ TRÌNH TỰ

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS
Zuckermann, Federico

<120> VIRUT GÂY HỘI CHỨNG HỒ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN ĐƯỢC PHÂN LẬP VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VIRUT NÀY

<130> 552486:107-12 WO; 552809:107-12 US

<160> 48

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 15381
<212> ADN
<213> Virut PRRS

<400> 1
catttggtgtt gtcaggagct gtgaccattg gcacagccca aaacttgctg cacggaagcg 60
cccttctgtg acagcctcct tcaggggagc ttgggggtct ttccctagca ccttgcttcc 120
ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg 180
tgcacgtgta cccccaatgc caggggtgtt atggcggagg gccaagtcta ctgcacacga 240
tgccctcagt caggggtctct ccttcctctg aatctccaag tttctgaact cgggggtgcta 300
ggcctattct acaggcccga agagccactc cgggtggacgt tgccacgtgc attccccact 360
gttgagtgtc ccccgccggg ggcctgctgg ctttctgcaa tttttccaat tgcacgaatg 420
accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga atggtacggg tcgcagctga actttacaga 480
gccggccagc tcacccttac agtcttaaag actttacaag tttatgaacg gggttgccgc 540
tggtacccca tcgtaggacc tgtccctgga gtggccgttt tcgccaaactc cctacatgtg 600
agtgataaac ctttcccggy agcaactcac gtgttaacca acctgccgct cccgcagaga 660
cccaagcctg aagacttttg cccctttgag tgtgctatgg ctaccgtcta tgacattggt 720
catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaggg aaagtctcct gggcccctcg tggcggggat 780
gaagtgaaat ttgaaactgt ccccggggag ttggagttga ttgcgaatcg actccgcacc 840
tccttcccgc cccaccacac agtggacatg tctaagttcg ccttcacagc ccctgggcgt 900
ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac ggctgcctcc ccgctgacac tgtccctgaa 960
ggcaactgct ggtggagctt gtttaacttg ctccactgg aagttcagaa caaagaaatt 1020
cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag 1080
cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca gtaactgacc tgaatggacc tatcgtcgta 1140
cagtacttct ccgttaagga gagttggatc cgccacttga aactggcgga agaaccagc 1200
taccctgggt ttgaggacct cctcagaata agggttgagc ccaacacgtc gccattggct 1260
gacaaggatg aaaaaatttt ccggtttggc agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga 1320
gcaaggaaaag cacgctctag tgcgactgct acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt 1380
gaaacccggc agccaagga gcacgaggtt gccggcgcca acaaggctgg gcacctcaaa 1440
cattactccc cgctgccga agggaattgt ggttggcact gcatttccgc catcgccaac 1500
cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc cttcccgaag gagtgagacc ttcagatgac 1560

tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc atccaaatcc tcaggctccc tgcggccttg	1620
aacaggaacg gcgcttgtgc tagcgccaag tacgtactta agctggaagg tgagcattgg	1680
actgtcactg tgacccttgg gatgtcccct tctttgtctc ctcttgaatg tgttcagggc	1740
tgttgtgagc ataagggcag tcttggttcc ccagatgcag tgcaggtttt cggatttgac	1800
cctgcttgcc ttgaccggct ggctgaggtg atgcacctgc ctagcagtgc tatcccagcc	1860
gctctggccg aaatgtccgg cgattccgat cgttcggctt ccccggtcac caccgtgtgg	1920
actgtttcgc agttctttgc ccgccacaat ggagggaaac accctgacca agtgcgctta	1980
gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc	2040
aaccgggtca ccccgaggga ggctgcagca aagattgacc tgtaccttcg tggcgcaaca	2100
aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag aaagcgcgcc cgccacgcgt aatggacacc	2160
tcctttgatt gggatgttgt gctccctggg gttgaggcgg caactcagac gaccgaactg	2220
cccaggtca accagtgtcg cgctctggtc cctgttgtaa ctcaaaagtc cttggacaac	2280
aactcggctc ccctgaccgc cttttcactg gctaactact actaccgtgc gcaaggtgac	2340
gaagtctgac accgtgaaag actaaccgcc gtgctctcca agttggaagg ggttggtcga	2400
gaagaatatg ggctcatgcc aaccgggcct ggtccacggc ccacactgcc acgcgggctc	2460
gacgaactca aagaccgat ggaggaggac ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact	2520
tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag gttgacctaa aaacttgggt caagaactac	2580
ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca aaagttcagc ctcgaaaaac gaagcctgtc	2640
aagagcttgc cagagagaaa gcctgtcccc gccccgcgca ggaaggttgg gtccgattgt	2700
ggcagcccga tttcattggg cgacgatgtc cctaacagtt ggggaagattt ggctgttggt	2760
agcccccttg atctcccgac ccacactgag ccggcaacac cttcaagtga gctggtgatt	2820
gtgtccgcac cgcaatgcat cttcaggccg gcgacaccct tgagtgagcc ggctccaatt	2880
cccgaccccc gcggggttgt gtctcgaccg gtgacaccct tgaatgagcc gatacctgtg	2940
cccgacccgc ggcgtaagtt tcagcagatg agaagattga gttcggcggc ggtaatcccg	3000
ccgtaccagg acgagcccct agatttgtct gcttcctcac agactgaata tgaggcctct	3060
cccctagcac cgccgcagag cgagggtgtt ctgggagtag aggggcagga agctgaggaa	3120
gccctaagtg aaatctcgga catgtcgggt aacattaaac ctgcgtccgt atcatcaagc	3180
agctccttgt ccagcgtgag aatcactcgc ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac	3240
tcggggcggc cctgcagtgg gcatctccaa gaggtaaagg aaacatgcct cagtatcatg	3300
cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttgat gaccctgcta cgcaggagtg gctttctcgc	3360
atgtgggacg ggggtggacat gctgacttgg cgcaacacgt ctgcttacca ggcgtttcgc	3420
accttagatg gcagggtaaa gttcctccca aaaatgatac tcgagacacc gccgccctat	3480
ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg cctgcacctt ccgtaggtgc ggagagcgac	3540
cttaccattg gctcagtcgc tactgaagat gttccacgca tcctcgagaa aatagaaaat	3600
gtcggcgaga tgaccaacca gggacccttg gccttctccg aggataaacc ggtagatgac	3660

caacttgcca aagacccccg gatatcgctg cagaggtctg acgagagcac atcagctccg 3720
 cccgcaggca caggtggcgc cggctcattt accgatttgc cgccttcgga cggcgtggat 3780
 gcggacggag gggggccgtt ttggacggtg aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa 3840
 ctgagccgtc aggtttttga cctcgtctcc catctccctg ttttcttctc acgccttttc 3900
 aaccctggcg gtggttattc tccgggtgat tggggttttg cagcttttac tctattgtgc 3960
 ctctttttat gttacagtta cccagccttt ggtattgctc ccctcttggg tgtgttttct 4020
 gggctcttctc ggcgcgttcg aatgggggtt tttggctgct ggttggcttt tgctgttggg 4080
 ctgttcaagc ctgtgtccga cccagtcggc gctgcttgtg agtttgactc gccagagtgt 4140
 agaaatatcc ttcattcttt tgagcttctc aaaccttggg accctgttcg cagccttggt 4200
 gtgggccccg tcggtctcgg tcttgccatt cttggcaggt tactgggcgg ggcacgcagc 4260
 atctggcact ttttgcttag gcttggcatt gttgcagact gtgtcttggc tggagcttat 4320
 gtgctttctc aaggtaggtg taaaaagtgc tggggatctt gtataagaac tgctcctaat 4380
 gaggtcgctt ttaacgtgtt tccttttaca cgtgcgacca ggtcgtcact aatcgacctg 4440
 tgcgatcggg tttgtgcgcc aaaaggcatg gaccccatth ttctcgccac tgggtggcgc 4500
 ggggtgctggg ccggccgaag cccattgag caaccctctg aaaaacccat cgcgtttgcc 4560
 cagttggatg aaaagaagat tacggctagg actgtggtcg cccagcctta tgaccccaac 4620
 caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag gcgggtgggg tgatggtggc taaggcagtc 4680
 ccaaaagtgg tcaaggtttc cgtgtttcca ttccgagccc ccttctttcc caccggagtg 4740
 aaagttgacc ctgaatgcag ggtcgtggtt gaccccgaca ctttcaccgc agctctccgg 4800
 tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctc ggtgtagggg attttgcca gctgaatgga 4860
 ttaaaaatca ggcaatttc caagccttca ggaggaggcc cacacctcat ggtgccttg 4920
 catgttgctt gctcgatggc tttgcacatg cttgctggga tttatgtgac tgcgggtggg 4980
 tcttgccgca ccggcaccaa cgaccctggg tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac 5040
 ggacctggct ctctctgcac gtccagattg tgcattttcc aacatggcct taccctgccc 5100
 ttgacagcac tcgtggcggg attcggattt caagaaattg ccttggctcg tttgattttt 5160
 gtttccatcg gaggcattgg tcacagggtt agttgtaagg ctgatatgct gtgtgttttg 5220
 cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct cttacctggg tgctttgtgt gtttcttgc 5280
 tggttgcgct gtttttcttt gcatccctc accatcctat ggttgggtgt tttcttgatt 5340
 tctgtgaata tgccttcagg aatcttggcc atggtgttgt tggtttctct ttggcttctt 5400
 ggtcgttata ctaatgttgc tggctctgtc accccctacg acattcatca ttacactagt 5460
 ggcccccgcg gtgttgccgc cttggctacc gcaccagatg ggacctactt ggccgctgct 5520
 cgccgcgctg cgttgactgg ccgcaccatg ctgtttaccc cgtcccagct tgggtctctt 5580
 cttgaggggtg ctttcagaac tcgaaaaccc tcaactgaaca ccgtcaatgt ggtcgggtcc 5640
 tccatgggct ctggcggggg gttcaccatc gacggaaaaa ttaagtgcgt aactgccgca 5700
 catgtcctta cgggcaattc agctaggggt tccggggctg gcttcaatca aatgcttgac 5760
 tttgacgtaa agggagattt cgccatagct gattgcccga attggcaagg ggctgcccc 5820

aagaccaat tctgcaagga tgggtggact ggccgtgcct attggctaac atcctctggc 5880
gtcgaacccg gcgtcattgg aaaaggattc gccttctgct tcaccgcgtg cggcgattcc 5940
gggtccccag tgatcaccga ggccggtgag cttatcggcg ttcacacggg atcaaataaa 6000
caaggaggag gcatcggtac ggcacctca ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag 6060
ctaagcgaat taagtgaatt ctttgcgtgg cctaaggtcc cgctcgtgta tgtgaaggtt 6120
ggcagccaca taattaaaga cataggcgag gtgccttcag atctttgtgc cttgcttgct 6180
gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc accgtccaac ttctttgtgt gtttttcctc 6240
ctgtggagaa tgatgggaca tgcctggacg cccttggttg ctgtgggttt ctttatcttg 6300
aatgaggttc tcccagccgt cctgggtccg agtggtttct cctttggaat gtttgtgcta 6360
tctgggtca cgccatggtc tgcgcaagtt ctgatgatca ggcttctaac agcagccctt 6420
aacaggaaca gatggtcact tgcctttttc agcctcgtg cagtgaccgg ttttgtcgca 6480
gatcttgagg ctactcagg gcatccgttg caggcagtta tgaatttgag cacctatgca 6540
ttcctgcctc ggatgatggt tgtgacctca ccagtcccag tgattgcgtg tgggtgtgtg 6600
cacctacttg ccatcatttt gtacttggtt aagtaccgtg gcctgcacca aatccttggt 6660
ggtgatggag tgttctctgc ggctttcttc ctgcgatact ttgccgaggg aaagttgagg 6720
gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat catgagtctc tgactggtgc cctcgctatg 6780
agactcaatg acgaggactt ggatttcctt acgaaatgga ctgattttaa gtgctttgtt 6840
tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt caatttatcg aggctgccta tgctaaagca 6900
cttagagtag agcttgccca gttggtgcag gttgataaag ttcgaggaac tttggccaaa 6960
cttgaagcct ttgctgatac cgtggcacc ccaactctcg ccggtgacat tgttgtcgct 7020
ctcgccata cgctgttg cagtatcttc gacctaaagg ttggtagcac caagcatacc 7080
ctccaagcca ttgagaccag agtccttgct ggggtccaaa tgaccgtggc gcgcgtcgtc 7140
gacccgacct ccacgcccc acccgcacct gtgccatcc ccctcccacc gaaagttctg 7200
gagaatggcc ccaacgcttg gggggatgag gaccgtttga ataagaagaa gaggcgcagg 7260
atggaagccc tcggcatcta tgttatgggc gggaaaaagt accagaaatt ttgggataag 7320
aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc 7380
agagttggcg accctgccga ctttgacctt gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc 7440
attgaagata aggettacca tgtttacacc tcatcatctg gtaagaagtt cttggtcccc 7500
gtcaatccag agaatggaag agtccaatgg gaagctgcaa agctttccgt agagcaggcc 7560
cttggtatga tgaacgtcga cggcgaactg actaccaaag aactggagaa actgaaaaga 7620
ataattgaca aactccagg cctgactaag gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg 7680
gcttgacctg ctgtggctgc ggcggttg ttgttactga aacagcggta aaaatagtca 7740
aatttcacaa ccggaccttc accctgggac ctgtgaattt aaaagtggcc agtgagggtg 7800
agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac acccggttgc gagaccggtc gatggtggtg 7860
ttgtgctcct gcgttccggt gttccttcgc ttatagacgt cttgatctcc ggtgctgatg 7920

catctcccaa gttgcttgcc catcacgggc cgggaaacac tgggatcgat ggcacgctct	7980
gggattttga gtccgaagcc actaaagagg aagtcgcact tagtgcgcaa ataatacagg	8040
cttgtgacat taggcgcggc gacgctcctg aaattggtct cccttacaag ctgtaccctg	8100
ttaggggtaa ccctgagcgg gtaaaaggag ttctacagaa tacaaggttt ggagacatac	8160
cttacaaaac cccagtgat actggaaacc cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgccc	8220
acgccactcc ggtgactgat gggcgctccg tcttggccac gaccatgcc tccgggttg	8280
agttgtatgt accaaccata ccagcgtctg tccttgatta ccttgattct aggcctgact	8340
gccctaaaca gttgacagag cacggctgtg aagatgccgc actgagagac ctctccaaat	8400
atgacttgtc caccgaaggc tttgttttac ctggagtttt tcgccttgta cggaaatacc	8460
tgtttgccca tgtaggtaa tgcccaccgc ttcatcggcc ttctacttac cctgctaaga	8520
attctatggc tggaataaat gggaataggt tcccaaccaa ggatattcag agcgtccctg	8580
aaatcgacgt tctgtgtgca caggctgtgc gggaaaactg gcaaactgtt accccttgta	8640
ctcttaagaa acagtattgc gggaagaaga agactaggac catactcggc accaataatt	8700
ttatcgcgct agcccaccga gcagcgttga gtggtgtcac ccagggcttc atgaaaaagg	8760
cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaaaaa acaagtttaa ggagctacag acccgggtcc	8820
taggcaggtg ccttgaagct gatcttgcac cctgcgaccg atccacacct gcaattgtcc	8880
gctggtttgc cgccaacctc ctttatgaac ttgcctgcgc tgaagagcat ttaccgtcgt	8940
acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg tcacgcaatc cggcgagtg actaagagag	9000
gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct ctgtgtctaa caccatttac agtttggtga	9060
tctatgcaca gcatatggtg ctgagttact tcaaaagtgg tcacccccat ggcctcttgt	9120
tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca tgctcaagg tcaaccctg atcgtctatt	9180
cggacgacct cgtgctgtat gccgagtctc ccacatgcc aaactatcac tgggtgggtg	9240
aacacctgaa ttcgatgctg gggtttcaga cggatccaaa aaagacagcc ataacagact	9300
cgccatcatt tctaggctgt agaataataa atggacgcca gctagtcccc aaccgtgaca	9360
ggattctcgc ggccctcgcc taccacatga aggcgagtaa tgtttctgaa tactacgcct	9420
cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg cttgtttgga gtatgatcct gaatggtttg	9480
aagaacttgt agttggaata gcgcaatgcg cccgcaagga cggttacagc tttcccgga	9540
cgccgttctt tatgtccatg tgggaaaaac tcagggtcaa ttatgagggg aagaagtcga	9600
gagtgtgcgg gtactgcggg gccccggccc cgtacgctac tgctgtggc ctgcacgtct	9660
gcatttacca caccacttc caccagcatt gtccagtcac aatctggtgt ggccatccag	9720
cgggttcttg ttcttgtagt gagtgcaaat ccctgtagg gaaaggcaca agccctttag	9780
acgaggtgct ggaacaagtc ccgtacaagc cccacggac cgttatcatg cgtgtggagc	9840
agggtcttac ccccttgac ccaggtagat accagactcg ccgcggatta gtctccgtca	9900
ggcgtggaat caggggaaat gaggttgaac taccagacgg tgattatgct agtaccgcct	9960
tgctccctac ctgtaaagag atcaacatgg tcgctgttgc ttccaatgta ttgcgcagca	10020
ggttcatcat tgggtccacc ggtgctggga aaacatactg gtccttcaa caggtccagg	10080

atggtgatgt tatttacaca ccaaccacc agaccatgct tgacatgatt agggctttgg	10140
ggacgtgccg gttcaacgtc cggcaggca caacgtgca attccccgtc ccctcccgta	10200
ccggtccgtg ggttcgcatc ctggccggcg gttggtgtcc tggcaagaat tccttcctgg	10260
atgaagcagc gtattgcaat caccttgatg tcttgaggct tcttagcaaa actaccctca	10320
cctgtctggg agacttcaaa caactccacc cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt	10380
ttaacatcat gcctcaaact caactgaaga ccatctggag gtttggacag aatatctgtg	10440
atgccatcca gccagattac agggacaaac tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga	10500
cctacgtgga aaagcctgtc aggtatgggc aagtcctcac cccctaccac agggaccgag	10560
aggacgacgc catcactatt gactccagtc aaggcgccac attcgatgtg gttacactgc	10620
atttgcccac aaaagattca ctcaacaggc agagagccct tgttgctatc accagggcaa	10680
gacatgctat ctttgtgtat gaccacaca ggcagctgca gagcctgttt gatcttcctg	10740
caaaaggtac acccgtcaac cttgcagtgc accgcgacgg gcagctgac gtgctagata	10800
gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg ctctaggtaa cggagataaa tttagggcca	10860
cagacaaacg cgttgtagat tctctccgcg ccatttgtgc tgatctagaa gggtcgagct	10920
ctccgctccc caaggtcgca cacaacttgg gattttattt ttcacctgat ttaacacagt	10980
ttgctaaact ccagcagaa cttgcacctc actggcctgt ggtgacaacc cagaacaatg	11040
aaaagtggcc agatcggctg gttaccagcc ttcgccctat ccataaatat agccgcgcgt	11100
gcatcgggtg cggtatatg gtgggcccct cgggtgttct aggcactcct ggggttgtgt	11160
catactatct cacaaaatth gttaagggcg aggtcaagt gcttcggag acggttttca	11220
gcaccggccg aattgaggtg gactgccggg aatatcttga tgatcgggag cgagaggttg	11280
ctgcgtccct ccacatgcc ttcatggcg acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgcc	11340
accatgtcac ctccagatac ctccgcgct tccttcccaa ggaatcggtt gcggtagtgc	11400
gggtttcaag tcccgaaaa gccgcgaaag cattgtgcac actgacagat gtgtacctcc	11460
cagaccttga agcctattht caccggaga ccagtccaa gtgctggaga atgatgttgg	11520
acttcaagga agttcgacta atggtctgga aagacaaaac agcctattht caacttgaag	11580
gtcgtattht cacctggtat cagcttgcta gctatgcctc gtacatccgt gttcctgtca	11640
actccacggt gtacttgga ccttgcatgg gcccgcctt ttgcaacagg aaagtcgtcg	11700
ggtccactca ttggggagct gacctgctg tcaccctta tgattacggc gctaaaatta	11760
tcctgtctag cggtaccat agtgaaatgc ccccgata caagattctg gcgtgcgcgg	11820
aattctcggt ggatgacca gtcaagtaca aacatactg ggggtttgaa tcggatacag	11880
cgtatctgta tgagttcacc ggaaacggtg aggactggga ggattacaat gatgcgtttc	11940
gtgcgcgcca ggaaggaaa atttataagg ctactgccac cagcatgaag ttttattttc	12000
ccccggggcc tgtcattgaa ccaactttag gcctgaattg aaatgaaatg gggtcctatgc	12060
aaagcctttt tgacaaaatt ggccaacttt ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt	12120
ccattgttga tatcattgta tttttggcca ttttgtttg cttcaccatc gccggttgg	12180

tggtggtctt ttgcatcaga ttggtttgct ccgcgatact ccgtgcgcgc cctgccattc	12240
actctgagca attacagaag atcttatgaa gcctttcttt cccagtgcc aagtggacatt	12300
cccacctggg gaactaaaca tcctttgggg atgttttggc accataaggt gtcaaccctg	12360
attgatgaga tgggtgctgcg tcgaatgtac cgcacatcatgg aaaaagcagg acaggctgcc	12420
tggaacagg tggtagcgga ggctacgctg tctcgcatta gtagtttgga tgtggtggct	12480
cattttcagc atcttgccgc cattgaagcc gagacctgta aatatttggc ctcccggctg	12540
cccatgctac acaacctgcg catgacaggg tcaaagttaa ccatagtgtg taatagtact	12600
ttgcatcagg tgtttgctat ttttccaacc cctggttccc ggccaaagct tcatgatatt	12660
cagcaatggt taatagctgt acattcctcc atattttcct ctggtgcagc ttcttgact	12720
ctctttgttg tgctgtggtt gggggttcca atactacgta ctgtttttgg tttccgctgg	12780
ttaggggcaa tttttctttc gaactcacag tgaattacac ggtgtgtcca ccttgccca	12840
cccggcaagc agccgcagag gcctacgaac ccggtaggtc tctttggtgc aggatagggt	12900
atgaccgatg tggggaggac gatcatgacg agctagggtt tatggtaccg tctggcctct	12960
ccagcgaagg ccacttgacc agtgtttacg cctggttggc gttcttgctc ttcagctaca	13020
cggcccagtt ccatcccgag atattcggga tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca	13080
tcgaacatca actcatctgc gccgaacatg acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg	13140
acaacatttc agccgtgttt cagacctatt accaacaatca agtcgacggc ggcaattggt	13200
ttcacctaga atggctgcgt cccttctttt cctcatggtt ggttttaaat gtctcttggt	13260
ttctcaggcg ttgcctgca aaccatgttt cagttcgagt cttgcagaca ttaagaccaa	13320
caccaccgca gcggcaagct ttgctgtcct ccaagacatc agttgcctta ggcatcgcaa	13380
ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc tcagtgccgt acggcgatag ggacaccgt	13440
gtatattacc atcacagcca atgttacaga tgagaattat ttacattctt ctgatctcct	13500
catgctttct tcttgccctt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggat ttaagggtgt	13560
atttggaat gtgtcaggca tcgtggctgt gtgtgtcaat tttaccagct acgtccaaca	13620
tgtcagggag tttaccaaac gctccttgat ggtcgaccat gtgcggctgc tccatttcat	13680
gacacctgag accatgaggt gggcaactgt tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc	13740
aatttgaatg ttttaagtat ttggggaaat gcttgaccgc gggtgttgc tcgcgattgc	13800
tttctttgtg gtgtatcgtg ccgttctgtt ttgctgtgct cgtcaacgcc aacagcaaca	13860
gcagctctca tctacagttg atttacaact tgacgctatg tgagctgaat ggcacagatt	13920
ggctatctaa taaatttgat tgggcagtg agagtttgt catctttccc gttttgactc	13980
acattgtctc ctatggtgcc ctactacca gccatttcct tgacacagtc gcttttagtca	14040
ctgtgtctac cgccgggttt gttcacgggc ggtatgtcct gagcagcatc tacgcggtct	14100
gtgccctggc tgcgttgact tgcttcgtca ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc	14160
gctactcatg taccagatat actaactttc ttctggacac taagggcaga ctctatcgtt	14220
ggcggctgcc tgtcatcata gagaaaagg gcaaagttga ggtcgaagg catctgatcg	14280
acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg	14340

```

aacaatgggg tcgtccttag atgacttttg ttatgatagc acggctccac aaaaggtgct 14400
tttggcgttt tctattacct acacgccagt gatgatatat gccctaaaag tgagtcgogg 14460
ccgactgtta gggcttctgc accttttgat cttcctgaac tgtgctttca ccttcgggta 14520
catgacattc gcgcactttc agagtacaaa taaggtcgog ctactatgg gagcagtagt 14580
tgcactcctt tgggggggtg attcagccat agaaacctgg aaattcatca cctccagatg 14640
ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat tctggcccct gccaccacg ttgagagtgc 14700
cgcaggcttt catccgattg cggcaaata gaaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg 14760
ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc cgggttgaaa ggcctcgtgt tgggtggcag 14820
aaaagctggt aacagggag tggtaaact tgtcaaata gccaaataac aacggcaagc 14880
agcagaagag aaagaaggg gatggccagc cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta 14940
agatcatcgc ccagcaaac cagtccagag gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga 15000
aaaacccgga gaagcccat tttcctctag cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta 15060
cccctagtga gcggcaattg tgtctgtcgt caatccagac tgcctttaat caaggcgctg 15120
ggacttgcac cctgtcagat tcagggagga taagttacac tgtggagttt agtttgcta 15180
cgcatacatc tgtgcgcctg atccgcgtca cagcatcacc ctacagatga tgggctggca 15240
ttcttgaggc atctcagtgt ttgaattgga agaattgtgt gtgaatggca ctgattgaca 15300
ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg gcgaccgtgt gggggtaaga ttttaattggc 15360
gagaaccata cgcccgaaat t 15381

```

```

<210> 2
<211> 15270
<212> ADN
<213> Virut PRRS

```

```

<220>
<221> N
<222> (11766)..(11766)
<223> A, G, T, hoặc C

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (11766)..(11766)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

```

<400> 2
catttgtgtt gtcaggagct gtgaccattg gcacagccca aaacttgctg cacggaagcg 60
cccttctgtg acagcctcct tcaggggagc ttgggggtct gtccctagca ccttgettcc 120
ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc ctttaacca tgtctgggat acttgatcgg 180
tgcacgtgta cccccaatgc cagggtgttt atggcggagg gccaagtcta ctgcacagca 240
tgccctcagt caggtctct cttcctctg aatctccaag tttctgaact cggggtgcta 300
ggcctattct acaggccoga agagccactc cgggtggacgt tgccacgtgc attccccact 360
gttgagtget cccccgccgg ggcctgctgg ctttctgcaa tttttccaat tgcacgaatg 420
accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga atgggtacggg tcgcagctga actttacaga 480

```

gccggccagc tcaccctac agtcttaaag actttacaag tttatgaacg gggttgccgc 540
 tggtagccca tcgtaggacc tgtccctgga gtggccgttt tcgccaactc cctacatgtg 600
 agtgataaac ctttcccggg agcaactcac gtgttaacca acctgccgct cccgcagaga 660
 cccaagcctg aagacttttg cccctttgag tgtgctatgg ctaccgtcta tgacattggt 720
 catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaggg aaagtctcct gggcccctcg tggcggggat 780
 gaagtgaat ttgaaactgt ccccggggag ttggagtga ttgcgaatcg actccgcacc 840
 tccttcccgc cccaccacac agtggacatg tctaagttcg cttcacagc ccctgggcgt 900
 ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac ggctgcctcc cgcgtgacac tgtccctgaa 960
 ggcaactgct ggtggagctt gtttaacttg ctcccactgg aagttcagaa caaagaaatt 1020
 cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc aagcatgggt tctctggcaa gtacctacgg 1080
 cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca gtaactgacc tgaatggacc tatcgtcgta 1140
 cagtacttct cgtttaagga gagttggatc cgccacttga aactggcgga agaaccagc 1200
 taccctgggt ttgaggacct cctcagaata agggttgagc ccaacacgtc gccattggct 1260
 gacaaggatg aaaaaatttt cgggtttggc agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga 1320
 gcaaggaaag cacgctctag tgcgactgct acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt 1380
 gaaacccggc aggccaagga gcacgaggtt gccggcgcca acaaggctgg gcacctcaaa 1440
 cattactccc cgctgccga aggaattgt ggttggcact gcatttccgc catcgccaac 1500
 cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc cttcccgaag gagtgagacc ttcagatgac 1560
 tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc atccaaatcc tcaggctccc tgcggccttg 1620
 aacaggaacg gcgcttgtgc tagcgccaag tacgtactta agctggaagg tgagcattgg 1680
 actgtcactg tgaccctgg gatgtcccct tctttgctcc ctcttgaatg tgttcagggc 1740
 tgttgtgagc ataagggcag tcttgggtcc ccagatgcag tcgaggtttt cggatttgac 1800
 cctgcctgcc ttgaccggct ggctgaggtg atgcacctgc ctagcagtgc tatcccagcc 1860
 gctctggccg aaatgtccgg cgattccgat cgttcggctt ccccggtcac caccgtgtgg 1920
 actgtttcgc agttctttgc ccgccacaat ggagggaatc accctgacca agtgcgctta 1980
 gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc 2040
 aaccgggtca ccccgagga ggtcgcagca aagattgacc tgtaccttcg tggcgcaaca 2100
 aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag aaagcgcgcc cgccacgcgt aatggacacc 2160
 tcctttgatt gggatgttgt gctccctggg gttgaggcgg caactcagac gaccgaactg 2220
 cccaggtca accagtgtcg cgctctggtc cctgttgtaa ctcaaaagtc cttggacaac 2280
 aactcggctc ccctgaccgc cttttcactg gctaactact actaccgtgc gcaagggtgac 2340
 gaagttcgtc accgtgaaag actaaccgcc gtgctctcca agttggaagg ggtgttcga 2400
 gaagaatatg ggctcatgcc aaccgggctt ggtccacggc ccacactgcc acgcgggctc 2460
 gacgaactca aagaccagat ggaggaggac ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact 2520
 tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag gttgacctaa aaacttgggt caagaactac 2580
 ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca aaagttcagc ctcgaaaaac gaagcctgtc 2640

aagagcttgc cagagagaaa gcctgtcccc gccccgcgca ggaagggttg gtccgattgt 2700
ggcagccccga ttctattggg cgacgatgtc cctaacagtt gggaagattt ggctgttggt . 2760
agcccccttg atctctcgac cccacctgag ctggcaaac cttcaagtga gctggtgatt 2820
gtgtccgcac cgcaatgcat cttcaggccg gcgacaccct tgagtgaacc ggctccaatt 2880
cccgaccccc gcggggttg gtctcgaccg gtgacaccct tgaatgaacc gatacctgtg 2940
cccgacccgc ggcgtaagtt tcagcagatg agaagattga gttcggcggc ggtaatcccc 3000
ccgtaccagg acgagcccct agatttgtct gcttcctcac agactgaata tgaggcctct 3060
cccctagcac cgccgcagag cgagggtgtt ctgggagtag aggggcagga agctgaggaa 3120
gccctaagtg aaatctcgga catgtcgggt aacattaaac ctgcgtccgt atcatcaagc 3180
agctccttgt ccagcgtgag aatcactcgc ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac 3240
tcgggcgggc cctgcagtgg gcatctccaa gaggtaaaag aaacatgcct cagtatcatg 3300
cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttaag ttcctcccaa aaatgatact cgagacaccg 3360
ccgccctatc cgtgtgagtt tgtgatgatg cctcacacgc ctgcacctc cgtagggtcg 3420
gagagcgacc ttaccattgg ctcatcgct actgaagatg ttccacgcat cctcgagaaa 3480
atagaaaatg tcggcgagat gaccaaccag ggacccttg ctttctccga ggataaaccg 3540
gtagatgacc aacttgccaa agacccccg atatcgtcgc agaggctga cgagagcaca 3600
tcagctccgc ccgcaggcac aggtggcgcc ggctcattta ccgatttgcc gccttcggac 3660
ggcgtggatg cgacaggag ggggccgttt tgacggtaa aaagaaaagc tgaaaggctc 3720
tttgaccaac tgagccgtca ggtttttgac ctgctctccc atctccctgt tttcttctca 3780
cgccttttca accctggcgg tggttattct ccgggtgatt ggggttttgc agcttttact 3840
ctattgtgcc tctttttatg ttacagttac ccagcctttg gtattgctcc cctcttgggt 3900
gtgttttctg ggtcttctcg gcggttcga atgggggttt ttggctgctg gttggctttt 3960
gctgttggtc tgttcaagtc tgtgtccgac ccagtcggcg ctgcttga gtttgactcg . 4020
ccagagtgtg gaaatatcct tcattctttt gagcttctca aaccttgga ccctgttcgc 4080
agccttggtt tgggccccgt cggctcgggt cttgccattc ttggcaggt actgggcggg 4140
gcacgcagca tctggcactt tttgcttagg cttggcattg ttgcagactg tgtcttggt 4200
ggagcttatg tgctttctca aggtagggtg aaaaagtgc ggggatcttg tataagaact 4260
gtcctaatag aggtcgcttt taacgtgttt ctttttacac gtgcgaccag gtcgtcacta 4320
atcgacctgt gcgatcggtt ttgtgcgcca aaaggcatgg accccatttt tctcgccact 4380
gggtggcgcg ggtgctgggc cgccgaagc ccattgagc aaccctctga aaaaccatc 4440
gcgtttgccc agttggatga aaagaagatt acggctagga ctgtggtcgc ccagccttat 4500
gacccaacc aagccgtaaa gtgcttgagg gtattgcagg cgggtgggg gatggtggct 4560
aaggcagtcc caaaagtgg caaggtttcc gctgttccat tccgagcccc cttctttccc 4620
accggagtga aagttgacc tgaatgcagg gtcgtggtt accccgacac tttcaccgca 4680
gctctccggt ctggctactc caccacaaac ctcgctctcg gtgtagggga ttttgcccag 4740

ctgaatggat taaaaatcag gcaaatttcc aagccttcag gaggaggccc acacctcatg 4800
 gctgccctgc atgttgctg ctgatggct ttgcacatgc ttgctgggat ttatgtgact 4860
 gcggtgggtt cttgcggcac cggcaccaac gaccctgggt gcgctaacc gtttgccgtc 4920
 cctggctacg gacctggctc tctctgcacg tccagattgt gcatttccca acatggcctt 4980
 accctgccct tgacagcact cgtggcgagg ttcgggtattc aagaaattgc cttggtcgtt 5040
 ttgatttttg tttccatcgg aggcattggct cacaggttga gttgtaaggc tgatatgctg 5100
 tgtgttttgc ttgcaattgc cagctatgtt tgggtacctc ttacctgggt gctttgtgtg 5160
 tttccttgct ggttgcgctg tttttctttg catccctca ccatcctatg gttggtgttt 5220
 ttcttgattt ctgtgaatat gccttcagga atcttgcca tgggtgtgtt ggtttctctt 5280
 tggcttcttg gtcgttatac taatgttgct ggtcttgta cccctacga cattcatcat 5340
 tacactagtg gccccgcgg tgttgccgcc ttggctaccg caccagatgg gacctactg 5400
 gccgctgtcc gccgcgctgc gttgactggc cgcaccatgc tgtttacccc gtcccagctt 5460
 gggctctctc ttgaggggtc tttcagaact cgaaaaccct cactgaacac cgtcaatgtg 5520
 gtcgggtcct ccatgggctc tggcggggtg ttcaccatcg acggaaaaat taagtgcgta 5580
 actgccgcac atgtccttac gggcaattca gctagggttt cgggggtcgg cttcaatcaa 5640
 atgcttgact ttgacgtaaa gggagatttc gccatagctg attgcccga ttggcaaggg 5700
 gctgccccca agaccgaatt ctgcaaggat ggggtggactg gccgtgccta ttggctaaca 5760
 tcctctggcg tcgaaccggt cgtcattgga aaaggattcg ccttctgctt caccgcgtgc 5820
 ggcgattccg ggtccccagt gatcaccgag gccgggtgagc ttatcggcgt tcacacggga 5880
 tcaaataaac aaggaggagg catcgttacg cgccctcag gccagttttg taatgtggca 5940
 cccatcaagc taagcgaatt aagtgaattc tttgctgggc ctaaggctcc gctcggtgat 6000
 gtgaagggtt gcagccacat aattaaagac ataggcgagg tgccttcaga tctttgtgcc 6060
 ttgcttgctg ccaaacctga actggaagga ggcctctcca ccgtccaact tctttgtgtg 6120
 tttttctcc tgtggagaat gatgggacat gcctggacgc ccttggttgc tgtgggtttc 6180
 tttatcttga atgaggttct ccagccgtc ctggtccgga gtgttttctc ctttggaatg 6240
 tttgtgctat cctggctcac gccatggctc gcgcaagtgc tgatgatcag gcttctaaca 6300
 gcagccctta acaggaacag atggtcactt gcctttttca gcctcgggtc agtgaccggt 6360
 tttgtgcag atcttgcggt tactcagggg catccgttgc aggcagttat gaatttgagc 6420
 acctatgcat tcctgcctcg gatgatggtt gtgacctac cagtcccagt gattgcgtgt 6480
 ggtgtgtgtc acctacttgc catcattttg tacttgttta agtaccgtgg cctgcaccaa 6540
 atccttggtt gcgatggagt gttctctgcg gctttcttcc tgcgatactt tgccgaggga 6600
 aagttgaggg aaggggtgtc gcaatcctgc ggaatgaatc atgagtctct gactgggtgcc 6660
 ctgcctatga gactcaatga cgaggacttg gatttcctta cgaaatggac tgattttaag 6720
 tgctttgttt ctgcgtccaa catgaggaat gcagcgggtc aatttatcga ggctgcctat 6780
 gctaaagcac ttagagtaga gcttgcccag ttgggtgcagg ttgataaagt tcgaggaact 6840
 ttggccaaac ttgaagcctt tgctgatacc gtggcaccac aactctcgcc cggtgacatt 6900

gttgtcgcctc tcggccatac gcctgttggc agtatcttcg acctaaaggt tggtagcacc 6960
 aagcataccc tccaagccat tgagaccaga gtccttgctg ggtccaaat gaccgtggcg 7020
 cgcgtcgtcg acccgacccc cagccccca cccgcacctg tgcccatccc cctcccaccg 7080
 aaagttctgg agaatggccc caacgcttgg ggggatgagg accgtttgaa taagaagaag 7140
 aggcgcagga tggaagccct cggcatctat gttatggcg ggaagaaagta ccagaaattt 7200
 tgggataaga attccggtga tgtgttttat gaggaggctc ataataacac agatgagtgg 7260
 gagtgtctca gagttggcg ccctgccgac tttgaccctg agaagggaac tctgtgtgga 7320
 catgtcacca ttgaagataa ggcttaccat gtttacacct caccatctgg taagaagttc 7380
 ttggtccccg tcaatccaga gaatggaaga gtccaatggg aagctgcaaa gctttccgta 7440
 gagcaggccc ttggtatgat gaacgtcgac ggcgaactga ctaccaaaga actggagaaa 7500
 ctgaaaagaa taattgacaa actccagggc ctgactaagg agcagtgttt aaactgctag 7560
 ccgccagcgg cttgaccgcg tgtggctcgc gggccttggg tgttactgaa acagcggtaa 7620
 aaatagtcaa atttcacaac cggaccttca ccctgggacc tgtgaattta aaagtggcca 7680
 gtgaggttga gctaaaagac gcggttgagc acaaccaaca cccggttgcg agaccggtcg 7740
 atggtggtgt tgtgctcctg cgttccgcgg ttccttcgct tatagacgct ttgatctccg 7800
 gtgtgatgc atctcccaag ttgcttgccc atcacgggccc gggaaacact gggatcgatg 7860
 gcacgctctg ggattttgag tccgaagcca ctaaagagga agtcgcactt agtgcgcaaa 7920
 taatacaggc ttgtgacatt aggcgcggcg acgctcctga aattggcttc cttacaagc 7980
 tgtaccctgt taggggtaac cctgagcggg taaaaggagt tctacagaat acaaggtttg 8040
 gagacatacc ttacaaaacc ccagtgata ctggaaaccc agtgcacgcg gctgcctgcc 8100
 ttacgcccaa cgccactccg gtgactgatg ggcgctccgt cttggccacg accatgccct 8160
 ccgggtttga gttgtatgta ccaaccatac cagcgtctgt ccttgattac cttgattcta 8220
 ggcctgactg ccctaaacag ttgacagagc acggctgtga agatgccgca ctgagagacc 8280
 tctccaaata tgacttgtcc acccaaggct ttgttttacc tggagttttt cgccttgtag 8340
 ggaaatacct gtttgcccat gtaggtaagt gccacccgt tcatcgccct tctacttacc 8400
 ctgctaagaa ttctatggct ggaataaatg ggaatagggt cccaaccaag gatattcaga 8460
 gcgtccctga aatcgacgtt ctgtgtgcac aggctgtgcg ggaaaactgg caaactgtta 8520
 ccccttgtag tcttaagaaa cagtattgcg ggaagaagaa gactaggacc atactcggca 8580
 ccaataattt tatcgcgcta gccacccgag cagcgttgag tgggtgcacc cagggttca 8640
 tgaaaaaggc gtttaactcg cccatcgccc tcggaaaaaa caagtttaag gagctacaga 8700
 ccccggtcct aggcagggtc cttgaagctg atcttgcatc ctgcgaccga tccacacctg 8760
 caattgtccg ctggtttgcc gccaacctcc tttatgaact tgctgcgct gaagagcatt 8820
 tacgctcgta cgtgtgaac tgctgccag acttactggg cagcagctcc ggcgcagtga 8880
 ctaagagagg tggcctgtcg tctggcgacc cgatcacctc tgtgtctaac accatttaca 8940
 gtttggtgat ctatgcacag catatgggtc tcagttactt caaaagtggg ccccccatg 9000

gcctcttggtt cttacaagac cagctaaagt ttgaggacat gctcaagggt caaccctga 9060
tsgtctattc ggacgacctc gtgctgtatg cggagtctcc caccatgcc aactatcact 9120
ggtgggttga acacctgaat ttgatgctgg ggtttcagac ggatccaaaa aagacagcca 9180
taacagactc gccatcatth ctaggctgta gaataataaa tggacgccag ctagtcccca 9240
accgtgacag gattctcgcg gccctcgct accacatgaa ggcgagtaat gtttctgaat 9300
actacgctc agcggctgca atactcatgg acagctgtgc ttgtttggag tatgatcctg 9360
aatggtttga agaacttgta gttggaatag cgcaatgagc ccgcaaggac ggttacagct 9420
ttcccgccac gccgttcttt atgtccatgt gggaaaaact cagggtccaat tatgagggga 9480
agaagtcgag agtgtgcggg tactgcgggg ccccgccct gtacgctact gcctgtggcc 9540
tcgacgtctg catttaccac accacttcc accagcattg tccagtcaca atctggtgtg 9600
gccatccagc gggttctggt tcttgtagt agtgcaaat ccctgtagg aaaggcacia 9660
gccctttaga cgaggtgctg gaacaagtcc cgtacaagcc cccacggacc gttatcatgc 9720
atgtggagca ggggtctacc ccccttgacc caggtagata ccagactcgc cgcggttag 9780
tctccgtcag gcgtggaatc aggggaaatg aggttgaact accagacgt gattatgcta 9840
gtaccgcctt gctccctacc tgtaaagaga tcaacatggt cgctgttgct tccaatgtat 9900
tgcgagcag gttcatcatt ggtccaccog gtgctgggaa aacatactgg ctcttcaac 9960
aggtccagga tggatgatgt atttacacac caaccacca gaccatgctt gacatgatta 10020
gggctttggg gacgtgccgg ttcaacgtcc cggcaggcac aacgtgcaa ttccccgtcc 10080
cctcccgtac cgggtccgtg gttcgcatcc tggccggcgg ttggtgtcct ggcaagaatt 10140
ccttctgga tgaagcagcg tattgcaatc accttgatgt cttgaggctt cttagcaaaa 10200
ctaccctcac ctgtctggga gacttcaaac aactccacc agtgggtttt gattctcatt 10260
gctatgtttt taacatcatg cctcaaactc aactgaagac catctggagg tttggacaga 10320
atatctgtga tgccatccag ccagattaca gggacaaact catgtccatg gtcaacacia 10380
cccgtgtgac ctacgtggaa aagcctgtca ggtatgggca agtcctcacc ccctaccaca 10440
gggaccgaga ggacgagcc atcactattg actccagtca aggcgccaca ttgatgtgg 10500
ttacactgca tttgccaca aaagattcac tcaacaggca gagagccctt gttgctatca 10560
ccagggaag acatgctatc tttgtgtatg acccacacag gcagctgag agcctgtttg 10620
atcttctgc aaaaggtaca cccgtcaacc ttgcagtga ccgcgacggg cagctgatcg 10680
tgctagatag aaataaaaa gaatgcacgg ttgctcaggc tctaggtaac ggagataaat 10740
ttagggccac agacaaacgc gttgtagatt ctctccgcgc catttgtgt gatctagaag 10800
ggtcgagctc tccgtcccc aaggtgcac acaacttggg attttatttc tcacctgatt 10860
taacacagtt tgctaaactc ccagcagaac ttgcacctca ctggccctg gtgacaacc 10920
agaacaatga aaagtggcca gatcggctgg ttaccagcct tcgccctatc cataaatata 10980
gccgcgctg catcggtgcc ggctatatgg tggccctc ggtgtttcta ggcactcctg 11040
gggtcggtgc atactatctc aaaaaattt ttaaggcgga ggctcaagtg cttccggaga 11100
cggttttcag caccggccga attgaggtag actgccgga atatcttgat gatcgggagc 11160

gagaggttgc tgcgtccctc ccacatgcct tcattggcga cgtcaaaggc actaccgttg 11220
gaggatgcca ccatgtcacc tccagatacc tcccgcgctt ccttcccaag gaatcggttg 11280
cggtagtcgg ggtttcaagt cccggaaaag ccgcgaaaagc attgtgcaca ctgacagatg 11340
tgtacctccc agaccttgaa gcctatttcc acccggagac ccagtccaag tgctggagaa 11400
tgatgttggga cttcaaggaa gttcgactaa tgggtctggaa agacaaaaca gcctatttcc 11460
aacttgaagg tcgctatttc acctggtatc agcttgctag ctatgcctcg tacatccgtg 11520
ttcctgtcaa ctccacggtg tacttggacc cctgcatggg ccccgccctt tgcaacagga 11580
aagtcgtcgg gtccactcat tggggagctg acctcgctgt cacccttat gattacggcg 11640
ctaaaattat cctgtctagc gcgtaccata gtgaaatgcc ccccggtac aagattctgg 11700
cgtgcgcgga attctcgttg gatgaccag tcaagtacaa acatacctgg gggtttgaat 11760
cggatncagc gtatctgtat gagttcaccg gaaacggtga ggactgggag gattacaatg 11820
atgcgtttcg tgcgcgccag gaagggaaaa ttataaggc tactgccacc agcatgaagt 11880
tttattttcc cccgggccct gtcattgaac caactttagg cctgaattga aatgaaatgg 11940
ggtccatgca aagccttttt gacaaaattg gccaaactttt tgtggatgct ttcacggagt 12000
tcttggtgtc cattgttgat atcattatat ttttggccat tttgtttggc ttcaccatcg 12060
ccggttggtt ggtggtcttt tgcacagat tggtttgctc cgcgatactc cgtacgcgcc 12120
ctgccattca ctctgagcaa ttacagaaga tcttatgaag cctttctttc ccagtgccaa 12180
gtggacattc ccacctgggg aactaaacat cctttgggga tgttttggca ccataagggtg 12240
tcaaccctga ttgatgagat ggtgtcgcgt cgaatgtacc gcatcatgga aaaagcagga 12300
caggctgcct ggaaacaggt ggtgagcgag gctacgctgt ctgcattag tagtttggt 12360
gtggtggctc attttcagca tcttgccgcc attgaagccg agacctgtaa atatttggcc 12420
tcccggctgc ccatgctaca caacctgcgc atgacagggt ctaatgtaac catagtgtat 12480
aatagtactt tgcacaggt gtttgcattt tttccaacc ctggttcccg gccaaagctt 12540
catgattttc agcaatggtt aatagctgta cattcctcca tattttctc tgttgcagct 12600
tcttgctac tctttgttgt gctgtggttg cgggttccaa tactacgtac tgtttttggt 12660
ttccgctggt taggggcaat ttttctttcg aactcacagt gaattacacg gtgtgtccac 12720
cttgccctac ccggcaagca gccgcagagg cctacgaacc cggtaggtct ctttggtgca 12780
ggatagggta tgaccgatgt ggggaggacg atcatgacga gctagggttt atggtaccgt 12840
ctggcctctc cagcgaaggc cacttgacca gtgtttacgc ctggttggcg ttcttgcct 12900
tcagctacac ggcccagttc catcccgaga tattcgggat agggaatgtg agtcgagttt 12960
atgttgacat cgaacatcaa ctcatctgcg ccgaacatga cgggcagaac accaccttgc 13020
ctcgtcatga caacatttca gccgtgtttc agacctatta ccaacatcaa gtcgacggcg 13080
gcaattgggt tcacctagaa tggctgcgtc ctttcttttc ctcatgggtg gttttaaatg 13140
tctcttggtt tctcaggcgt tcgcctgcaa accatgtttc agttcgagtc ttgcagacat 13200
taagaccaac accaccgag cggcaagctt tgctgtcctc caagacatca gttgccttag 13260

gcatcgcaac tcggcctctg aggcgattcg caaaatccct cagtgcgta cggcgatagg 13320
 gacacccgtg tatattacca tcacagccaa tgtgacagat gagaattatt tacattcttc 13380
 tgatctcctc atgctttctt cttgcctttt ctatgcttct gagatgagtg aaaagggatt 13440
 taaggtggta tttggcaatg tgtcaggcat cgtggctgtg tgtgtcaatt ttaccagcta 13500
 cgtccaacat gtcagggagt ttaccaacg ctcccttgatg gtcgaccatg tgcggctgct 13560
 ccatttcatg acacctgaga ccatgagggtg ggcaactgtt ttagcctgtc tttttgccat 13620
 tctgttggca atttgaatgt ttaagtatgt tggggaaatg cttgaccgag ggctgttgc 13680
 cgcgattgct ttctttgtgg tgtatcgtgc cgttctgttt tgctgtgctc gtcaacgcca 13740
 acagcaacag cagctctcat ctacagttga tttaacaactt gacgctatgt gagctgaatg 13800
 gcacggattg gctatctaataa aaatttgatt gggcagtgga gagttttgtc atctttcccg 13860
 ttttgactca cattgtctcc tatgggtgcc tcactaccag ccatttcctt gacacagtcg 13920
 ctttagtcac tgtgtctacc gccgggtttg ttcacgggag gtatgtcctg agcagcatct 13980
 acgcggtctg tgccctggct gcgttgactt gcttcgtcat caggtttgca aagaattgca 14040
 tgtcctggcg ctactcatgt accagatata ctaactttct tctggacact aagggcagac 14100
 tctatcgttg gcggtgcct gtcacatag agaaaagggg caaagttgag gtcgaaggctc 14160
 atctgatcga cctcaaaaga gttgtgcttg atgggtccgt ggcaaccctt ataaccagag 14220
 tttcagcgga acaatggggg cgtccttaga tgacttttgt tatgatagca cggctccaca 14280
 aaaggtgctt ttggcgtttt ctattacctt caogccagtg atgatatatg ccctaaaagt 14340
 gagtcgcggc cgactgttag ggcttctgca ccttttgatc ttcctgaact gtgctttcac 14400
 cttcgggtac atgacattcg cgcactttca gagtacaaat aaggtcgcgc tcactatggg 14460
 agcagtagtt gcaactcctt ggggggtgta ttcagccata gaaacctgga aattcatcac 14520
 ctccagatgc cgtttgtgct tgctaggccg caagtacatt ctggcccctg cccaccagct 14580
 tgagagtgcc gcaggctttc atccgattgc ggcaaatgat aaccacgcat ttgtcgtccg 14640
 gcgtcccggc tccactacgg tcaacggcac attgggtgcc ggggtgaaag gcctcgtgtt 14700
 ggggtggcaga aaagctgtta aacagggagt ggtaaacctt gtcaaatatg ccaaataaca 14760
 acggcaagca gcagaagaga aagaagggg atggccagcc agtcaatcag ctgtgccaga 14820
 tgctgggtaa gatcatcgcc cagcaaaacc agtccagagg caagggaccg ggaaagaaaa 14880
 ataagaagaa aaaccgggag aagccccatt ttcctctagc gactgaagat gatgtcagac 14940
 atcactttac ccctagttag cggaattgt gtctgtcgtc aatccagact gcctttaatc 15000
 aaggcgctgg gacttgcacc ctgtcagatt caggaggat aagttacact gtggagttaa 15060
 gtttgcttac gcatcatact gtgcgctga tccgcgtcac agcatcacc tcagcatgat 15120
 gggctggcat tcttgaggca tctcagtggt tgaattggaa gaatgtgtgg tgaatggcac 15180
 tgattgacat tgtgcctcta agtcacctat tcaattaggg cgaccgtgtg ggggtaagat 15240
 ttaattggcg agaaccatac ggccgaaatt 15270

<210> 3

<211> 15381

<212> ADN
 <213> Virut PRRS

<400> 3

catttggtgtt gtcaggagct gtgaccattg gcacagccca aaacttgctg cacggaagcg	60
cccttctgtg acagcctcct tcaggggagc ttgggggtct gtccttagca ccttgcttcc	120
ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg	180
tgcacgtgta cccccaatgc caggggtgtt atggcggagg gccaaagtcta ctgcacacga	240
tgcctcagtg cacggctctct ccttcctctg aatctccaag tttctgaact cggggtgcta	300
ggcctattct acaggcccga agagccactc cgggtggacgt tgccacgtgc attccccact	360
gttgagtgtc ccccgccgg ggctgtctgg ctttctgcaa tttttccaat tgcacgaatg	420
accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga atggtacggg tcgcagctga actttacaga	480
gccggccagc tcacccttac agtcttaaag actttacaag tttatgaacg gggttgccgc	540
tggtagccca tcgtaggacc tgtccctgga gtggccgttt tcgccaaactc cctacatgtg	600
agtgataaac ctttcccggg agcaactcac gtgttaacca acctgccgt cccgcagaga	660
cccaagcctg aagacttttg cccctttgag tgtgctatgg ctaccgtcta tgacattggt	720
catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaggg aaagtctcct gggcccctcg tggcggggat	780
gaagtgaaat ttgaaactgt ccccggggag ttggagttga ttgcgaatcg actccgcacc	840
tccttcccgc cccaccacac agtggacatg tctaagttcg cttcacagc ccctgggcgt	900
ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac ggctgcctcc ccgctgacac tgtccctgaa	960
ggcaactgct ggtggagctt gtttaacttg ctccactgg aagttcagaa caaagaaatt	1020
cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag	1080
cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca gtaactgacc tgaatggacc tatcgtcgta	1140
cagtacttct ccgttaagga gagttggatc cgccacttga aactggcgga agaaccagc	1200
taccctgggt ttgaggacct cctcagaata agggttgagc ccaacacgtc gccattggct	1260
gacaaggatg aaaaaatttt ccggtttggc agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga	1320
gcaaggaaag cacgctctag tgcgactgct acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt	1380
gaaacccggc aggccaagga gcacgaggtt gccggcgcca acaaggctgg gcacctcaaa	1440
cattactccc cgctgccga agggaattgt ggttggcact gcatttccgc catcgccaac	1500
cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc cttcccgaag gagtgagacc ttcagatgac	1560
tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc atccaaatcc tcaggctccc tgcggccttg	1620
aacaggaacg gcgcttgtgc tagcgccaag tacgtactta agctggaagg tgagcattgg	1680
actgtcactg tgacccttgg gatgtcccct tctttgctcc ctcttgaatg tgttcagggc	1740
tgttgtgagc ataagggcag tcttgggtcc ccagatgcag tcgaggtttt cggtttgac	1800
cctgcttgcc ttgaccggct ggctgaggtg atgcacctgc ctagcagtg tatcccagcc	1860
gctctggccg aaatgtccgg cgattccgat cgttcggctt ccccggtcac caccgtgtgg	1920
actgtttcgc agttctttgc ccgccacaat ggagggaatc accctgacca agtgcgctta	1980
gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc	2040

aaccgggtca ccccgaggga ggtcgcagca aagattgacc tgtaccttcg tggcgcaaca	2100
aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag aaagcgcgcc cgccacgcgt aatggacacc	2160
tcctttgatt gggatgttgt gctccctggg gttgaggcgg caactcagac gaccgaactg	2220
cccaggtca accagtgtcg cgctctggtc cctgttgtaa ctcaaaagtc cttggacaac	2280
aactcgggtcc ccctgaccgc cttttcactg gctaactacc actaccgtgc gcaaggtgac	2340
gaagttcgtc accgtgaaaag actaaccgcc gtgctctcca agttggaagg ggttgttcga	2400
gaagaatatg ggctcatgcc aaccgggcct ggtccacggc ccacactgcc acgcgggctc	2460
gacgaactca aagaccagat ggaggaggac ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact	2520
tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag gttgacctaa aaacttggt caagaactac	2580
ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca aaagttcagc ctcgaaaaac gaagcctgtc	2640
aagagcttgc cagagagaaa gcctgtcccc gccccgcgca ggaaggttgg gtccgattgt	2700
ggcagcccg tttcattggg cgacgatgtc cctaacagtt gggaagattt ggctgttggt	2760
agcccccttg atctctcgac ccacactgag ctggcaacac cttcaagtga gctggtgatt	2820
gtgtccgcac cgcaatgcat cttcaggccg gcgacaccct tgagtgagcc ggctccaatt	2880
cccgaccccc gcggggttgt gtctcgaccg gtgacaccct tgaatgagcc gatacctgtg	2940
cccgacccgc ggcgtaagtt tcagcagatg agaagattga gttcggcggc ggtaatcccg	3000
ccgtaccagg acgagcccct agatttgtct gcttcctcac agactgaata tgaggcctct	3060
cccctagcac cgccgcagag cgagggtgtt ctgggagtag aggggcagga agctgaggaa	3120
gccctaagtg aaatctcgga catgtcgggt aacattaaac ctgcgtccgt atcatcaagc	3180
agctccttgt ccagcgtgag aatcactcgc ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac	3240
tcggggcggc cctgcagtgg gcatctccaa gaggtaaagg aaacatgcct cagtatcatg	3300
cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttgat gaccctgcta cgcaggagtg gctttctcgc	3360
atgtgggatc ggggtggacat gctgacttgg cgcaacacgt ctgcttacca ggcgtttcgc	3420
accttagatg gcaggttaaa gttcctccca aaaatgatac tcgagacacc gccgcctat	3480
ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg cctgcacctt ccgtaggtgc ggagagcgac	3540
cttaccattg gctcagtcgc tactgaagat gttccacgca tcctcgagaa aatagaaaat	3600
gtcggcgaga tgaccaacca gggacccttg gccttctccg aggataaacc ggtagatgac	3660
caacttgcca aagacccccg gatatcgctg cagagggtctg acgagagcac atcagctccg	3720
cccgcaggca cagggtggcg cggtcattt accgatttgc cgccttcgga cggcgtggat	3780
gcggacggag gggggccgtt ttggacggta aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa	3840
ctgagccgtc aggtttttga cctcgtctcc catctccctg ttttcttctc acgccttttc	3900
aaccctggcg gtggttattc tccgggtgat tggggttttg cagcttttac tctattgtgc	3960
ctctttttat gttacagtta cccagccttt ggtattgtc ccctcttggg tgtgttttct	4020
gggtcttctc ggcgcgttcg aatgggggtt tttggctgct ggttggttt tgctgttggt	4080
ctgttcaagc ctgtgtccga ccagtcggc gctgcttggt agtttgactc gccagagtgt	4140

agaaatatcc ttcattcttt tgagcttctc aaaccttggg accctgttcg cagccttggt 4200
 gtgggccccg togggtctcg tcttgccatt cttggcaggt tactgggagg ggcacgcagc 4260
 atctggcact ttttgcttag gcttggcatt gttgcagact gtgtcttggc tggagcttat 4320
 gtgctttctc aaggtagggtg taaaaagtgc tggggatctt gtataagaac tgctcctaata 4380
 gaggtcgctt ttaacgtgtt tccttttaca cgtgcgacca ggtcgtcact aatcgacctg 4440
 tgcgatcggg tttgtgcgcc aaaaggcatg gaccccatctt ttctcgccac tgggtggcgc 4500
 ggggtgctggg cgggccgaag cccattgag caaccctctg aaaaacccat cgcgtttgcc 4560
 cagttggatg aaaagaagat tacggctagg actgtggctg ccagcctta tgaccccaac 4620
 caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag gcgggtgggg tgatggtggc taaggcagtc 4680
 ccaaaagtgg tcaaggtttc cgtgtttcca ttccgagccc ccttctttcc caccggagtg 4740
 aaagttgacc ctgaatgcag ggtcgtggtt gaccccgaca ctttcaccgc agctctccgg 4800
 tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctc ggtgtagggg attttgccca gctgaatgga 4860
 ttaaaaatca ggcaaatttc caagccttca ggaggaggcc cacacctcat ggctgccctg 4920
 catgttgctt gctcgatggc tttgcacatg cttgctggga tttatgtgac tgcgggtggg 4980
 tcttgccgca cgggcaccaa cgaccgtgg tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac 5040
 ggacctggct ctctctgcac gtocagattg tgcatttccc aacatggcct taccctgccc 5100
 ttgacagcac tcgtggcggg attcgggtatt caagaaattg ccttggctgt tttgattttt 5160
 gtttccatcg gaggcattgg tcacagggtt agttgtaagg ctgatatgct gtgtgttttg 5220
 cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct cttacctggt tgctttgtgt gtttccttgc 5280
 tggttgcgct gtttttcttt gcatccctc accatcctat ggttgggtgt tttcttgatt 5340
 tctgtgaata tgccttcagg aatcttggcc atggtgttgt tggtttctct ttggcttctt 5400
 ggtcgttata ctaatgttgc tgggtctgtc accccctacg acattcatca ttacactagt 5460
 ggcccccgcg gtgttgccgc cttggctacc gcaccagatg ggacctactt ggccgctgtc 5520
 cgccgogctg cgttgactgg ccgcaccatg ctgtttaccc cgtccagct tgggtctctt 5580
 cttgaggggtg ctttcagaac tcgaaaaccc tactgaaca ccgtcaatgt ggtcgggtcc 5640
 tccatgggct ctggcggggt gttcaccatc gacggaaaaa ttaagtgcgt aactgccgca 5700
 catgtcctta cgggcaattc agctaggggt tccggggctg gcttcaatca aatgcttgac 5760
 tttgacgtaa agggagattt cgccatagct gattgccga attggcaagg ggctgcccc 5820
 aagaccaat tctgcaagga tgggtggact ggccgtgcct attggctaac atcctctggc 5880
 gtcgaaccg gcgtcattgg aaaaggattc gccttctgct tcaccgctg cggcgattcc 5940
 gggccccag tgatcaccga ggccggtgag cttatogcg ttcacacggg atcaataaaa 6000
 caaggaggag gcatcggtac gcgcccctca ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag 6060
 ctaagcgaat taagtgaatt ctttctggg cctaagggtc cgctcgggtg tgtgaagggt 6120
 ggcagccaca taattaaaga cataggcgag gtgccttcag atctttgtgc cttgcttgct 6180
 gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc accgtccaac ttctttgtgt gtttttctc 6240
 ctgtggagaa tgatgggaca tgctgggacg cccttgggtg ctgtgggttt cttatcttg 6300

aatgaggttc tcccagccgt cctgggccgg agtgttttct cctttggaat gtttgctga . 6360
tctgggtca cgccatggtc tgcgcaagtt ctgatgatca ggcttctaac agcagccctt 6420
aacaggaaca gatggtcact tgcctttttc agcctcgggtg cagtgaccgg ttttgctgca 6480
gatcttgctg ctactcaggg gcatccgttg caggcagtta tgaatttgag cacctatgca 6540
ttctgcctc ggatgatggt tgtgacctca ccagtcccag tgattgctg tgggtgtgtg 6600
cacctacttg ccatcatttt gtacttggtt aagtaccgtg gcctgcacca aatccttggt 6660
ggcgatggag tgttctctgc ggctttcttc ctgcgatact ttgccgaggg aaagttaggg 6720
gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat catgagtctc tgactggtgc cctcgctatg 6780
agactcaatg acgaggactt ggatttcctt acgaaatgga ctgattttaa gtgcttggtt 6840
tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt caatttatcg aggctgccta tgctaaagca 6900
cttagagtag agcttgccca gttggtgcag gttgataaag ttcgaggaac tttggccaaa 6960
cttgaagcct ttgctgatac cgtggcaccc caactctcgc ccggtgacat tgttgctgct 7020
ctcgcccata cgctgttg cagtatcttc gacctaaagg ttggtagcac caagcatacc 7080
ctccaagcca ttgagaccag agtccttgct ggggtccaaa tgaccgtggc gcgctcgtc 7140
gaccgaccc ccacgcccc acccgcacct gtgccatcc ccctcccacc gaaagttctg 7200
gagaatggcc ccaacgcttg gggggatgag gaccgtttga ataagaagaa gaggcgcagg 7260
atggaagccc tcggcatcta tgttatgggc gggaaaaagt accagaaatt ttgggataag 7320
aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc 7380
agagttggcg accctgccga ctttgaccct gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc 7440
attgaagata aggcttacca tgtttacacc tcaccatctg gtaagaagtt cttggtcccc 7500
gtcaatccag agaatggaag agtccaatgg gaagctgcaa agctttccgt agagcaggcc 7560
cttggtatga tgaacgtcga cggcgaactg actaccaaag aactggagaa actgaaaaga . 7620
ataattgaca aactccaggg cctgactaag gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg 7680
gcttgaccgg ctgtggctgc ggcggcttg tttgtactga aacagcggta aaaatagtca 7740
aatttcacaa ccggaccttc accctgggac ctgtgaattt aaaagtggcc agtgaggttg 7800
agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac acccggttg gagaccgtc gatggtggtg 7860
ttgtgctcct gcgttcgctg gttccttcgc ttatagacgt cttgatctcc ggtgctgatg 7920
catctcccaa gttgcttgcc catcacgggc cgggaaacac tgggatcgat ggcacgctct 7980
gggattttga gtccgaagcc actaaagagg aagtcgcact tagtgcgcaa ataatacagg 8040
cttgtgacat taggcgccc gacgctcctg aaattggtct cccttacaag ctgtaccctg 8100
ttaggggtaa ccctgagcgg gtaaaaggag ttctacagaa tacaaggttt ggagacatac 8160
cttacaaaac cccagtgat actggaaacc cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgcca 8220
acgccactcc ggtgactgat gggcgtccg tcttgccac gaccatgcc tccgggtttg 8280
agttgtatgt accaaccata ccagcgtctg tccttgatta cttgattct aggcctgact 8340
gccctaaaca gttgacagag cacggctgtg aagatgccgc actgagagac ctctccaaat 8400

atgacttgtc caccaaggc tttgttttac ctggagtttt tgccttgta cggaaatacc	8460
tgtttgccca tgtaggtaa tgcccacccg ttcacggcc ttctacttac cctgctaaga	8520
attctatggc tggaataaat gggaataggt tcccaaccaa ggatattcag agcgtccctg	8580
aatcgacgt tctgtgtgca caggctgtgc gggaaaactg gcaaactgtt accccttgta	8640
ctottaagaa acagtattgc gggaagaaga agactaggac catactcggc accaataatt	8700
ttatcgcgct agcccaccga gcagcgttga gtggtgtcac ccagggttc atgaaaaagg	8760
cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaaaaa acaagtttaa ggagctacag accccggtcc	8820
taggcagggtg ccttgaagct gatcttgcac cctgcgaccg atccacacct gcaattgtcc	8880
gctggtttgc cgccaacctc ctttatgaac ttgcctgcgc tgaagagcat ttaccgtcgt	8940
acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg tcacgcagtc cggcgagtg actaagagag	9000
gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct ctgtgtctaa caccatttac agtttggtga	9060
tctatgcaca gcatatggtg ctcatgtact tcaaaagtgg tcacccccat ggcctcttgt	9120
tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca tgctcaaggt tcaaccctg atcgtctatt	9180
cggacgacct cgtgctgtat gccgagtctc ccacatgcc aaactatcac tgggtgggtg	9240
aacacctgaa tttgatgctg gggtttcaga cggatccaaa aaagacagcc ataacagact	9300
cgccatcatt tctaggctgt agaataataa atggacgcca gctagtcccc aaccgtgaca	9360
ggattctcgc ggccctcgcc taccacatga aggcgagtaa tgtttctgaa tactacgcct	9420
cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg cttgtttgga gtatgatcct gaatggtttg	9480
aagaacttgt agttggaata gcgcaatgcg cccgcaagga cggttacagc tttcccgga	9540
cgccgttctt tatgtccatg tgggaaaaac tcaggtccaa ttatgagggg aagaagtcga	9600
gagtgtgcgg gtactgcggg gcccggccc cgtacgctac tgcctgtggc ctgcacgtct	9660
gcatttacca caccacttc caccagcatt gtccagtcac aatctggtgt ggccatccag	9720
cgggttcttg ttcttgtagt gagtgcaaat cccctgtagg gaaaggcaca agcccttag	9780
acgaggtgct ggaacaagtc ccgtacaagc cccacggac cgttatcatg cgtgtggagc	9840
agggtcttac ccccttgac ccaggtagat accagactcg ccgcggatta gtctccgtca	9900
ggcgtggaat caggggaaat gaggttgaac taccagacgg tgattatgct agtacgcct	9960
tgctccctac ctgtaaagag atcaacatgg tcgctgttgc ttccaatgta ttgcgcagca	10020
ggttcatcat tggtcacccc ggtgctggga aaacatactg gtccttcaa caggtccagg	10080
atggtgatgt tatttacaca ccaaccacc agaccatgct tgacatgatt agggctttgg	10140
ggacgtccg gttcaacgtc ccggcaggca caacgctgca attccccgtc ccctcccgt	10200
ccggtccgtg ggttcgcac ctggccggcg gttggtgtcc tggcaagaat tccttcctgg	10260
atgaagcagc gtattgcaat caccttgatg tcttgaggct tcttagcaaa actaccctca	10320
cctgtctggg agacttcaaa caactccacc cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt	10380
ttaacatcat gcctcaaact caactgaaga ccatctggag gtttggacag aatatctgtg	10440
atgccatcca gccagattac agggacaaac tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga	10500
cctacgtgga aaagcctgtc aggtatgggc aagtcctcac cccctaccac agggaccgag	10560

aggacgacgc catcactatt gactccagtc aaggcgccac attcgatgtg gttacactgc 10620
 atttgcccac aaaagattca ctcaacaggc agagagccct tgttgctatc accagggcaa 10680
 gacatgctat ctttgtgtat gaccacaca ggcagctgca gagcctgttt gatcttctg 10740
 caaaaggtac acccgtcaac cttgcagtgc accgcgacgg gcagctgacg gtgctagata 10800
 gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg ctctaggtaa cggagataaa tttagggcca 10860
 cagacaaacg cgttgtagat tctctccgcg ccatttgtgc tgatctagaa gggtcgagct 10920
 ctccgctccc caaggtcgca cacaacttgg gattttatct ctcacctgat ttaacacagt 10980
 ttgctaaact ccagcagaa cttgcacctc actggcccgt ggtgacaacc cagaacaatg 11040
 aaaagtggcc agatcggtg gttaccagcc ttgcacctat ccataaatat agccgcgctg 11100
 gcatcggtgc cggctatatg gtgggcccct cgggtgttct aggcactcct ggggtcgtgt 11160
 catactatct cacaaaattt gttaagggcg aggtcgaagt gcttccggag acggttttca 11220
 gcaccggccg aattgaggta gactgccggg aatatcttga tgatcgggag cgagaggttg 11280
 ctgctgccct ccacatgcc ttcatggcg acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgcc 11340
 accatgtcac ctccagatac ctccgcgct tccttcccaa ggaatcggtt gcggtagtcg 11400
 gggtttcaag tcccgaaaaa gccgcgaaag cattgtgcac actgacagat gtgtacctcc 11460
 cagacctga agcctatttc caccggaga ccagtccea gtgctggaga atgatgttg 11520
 acttcaagga agttcgacta atggtctgga aagacaaaac agcctatttc caactgaag 11580
 gtcgctatct cacctggtat cagcttgcta gctatgcctc gtacatccgt gttcctgtca 11640
 actccacggt gtacttgac ccctgcatgg gcccgcctc ttgcaacagg aaagtcgtcg 11700
 ggtccactca ttggggagct gacctcgctg tcaccctta tgattacggc gctaaaatta 11760
 tcctgtctag cgcgtaccat agtgaaatgc ccccgata caagattctg gcgtgcgcgg 11820
 aattctcggt ggatgacca gtcaagtaca aacatactg ggggtttgaa tcggatacag 11880
 cgtatctgta tgagttcacc ggaaacggtg aggactggga ggattacaat gatgcgtttc 11940
 gtgcgcgcca ggaaggaaa atttataagg ctactgccac cagcatgaag ttttattttc 12000
 ccccgggccc tgtcattgaa ccaactttag gcctgaattg aaatgaaatg gggtcacatg 12060
 aaagcctttt tgacaaaatt ggccaacttt ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt 12120
 ccattgttga tatcattata tttttggcca ttttgtttgg cttcaccatc gccggttggt 12180
 ttgtggtctt ttgcatcaga ttggtttgct ccgcgatact ccgtacgcgc cctgccattc 12240
 actctgagca attacagaag atcttatgaa gcctttcttt ccagtgcca agtggacatt 12300
 cccacctggg gaactaaaca tcctttgggg atgttttggc accataaggt gtcaaccctg 12360
 attgatgaga tgggtgctcg tcgaatgtac cgcacatgg aaaaagcagg acaggctgcc 12420
 tggaaacagg tgggtgagca ggctacgctg tctcgcatga gtagtttggg tgtggtggct 12480
 cattttcagc atcttgccgc cattgaagcc gagacctgta aatatttggc ctcccggctg 12540
 cccatgctac acaacctgcg catgacaggg tcaaagttaa ccatagtgtg taatagtact 12600
 ttgcatcagg tgtttgctat tttccaacc cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt 12660

cagcaatggt taatagctgt acattcctcc atattttcct ctgttgacgc ttcttgact 12720
ctctttgttg tgctgtggtt gcgggttcca atactacgta ctgtttttgg tttccgctgg 12780
ttaggggcaa tttttctttc gaactcacag tgaattacac ggtgtgtcca ccttgccctca 12840
cccggaagc agccgcagag gcctacgaac ccggtaggtc tctttggtgc aggataggg 12900
atgaccgatg tggggaggac gatcatgacg agctaggggt tatggtaccg tctggcctct 12960
ccagcgaagg cacttgacc agtgtttacg cctggttggc gttcttgcc ttcagctaca 13020
cggcccagtt ccatcccgag atattcgga tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca 13080
tcgaacatca actcatctgc gccgaacatg acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg 13140
acaacatttc agccgtgttt cagacctatt accaacaatca agtcgacggc ggcaattggt 13200
ttcacctaga atggctgctg cccttctttt cctcatgggt ggttttaaata gtctcttggt 13260
ttctcaggcg ttgcctgca aacctgttt cagttcgagt ctttcagaca ttaagaccaa 13320
caccaccgca gcggcaagct ttgctgtcct ccaagacatc agttgcctta ggcacgcaa 13380
ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc tcagtgccgt acggcgatag ggacaccgt 13440
gtatattacc atcacagcca atgtgacaga tgagaattat ttacattctt ctgatctcct 13500
catgctttct tcttgctttt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggat ttaagtggt 13560
at ttggcaat gtgtcaggca tegtggctgt gtgtgtcaat ttaccagct acgtccaaca 13620
tgtcaggag tttaccaac gctccttgat ggtcgaccat gtgcggctgc tccatttcat 13680
gacacctgag accatgaggt gggcaactgt tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc 13740
aatttgaatg ttaagtatg ttggggaaat gcttgaccgc gggctgttgc tcgcgattgc 13800
tttctttgtg gtgtatctg ccgttctgtt ttgctgtgct cgtcaacgcc aacagcaaca 13860
gcagctctca tctacagttg atttacaact tgacgctatg tgagctgaat ggcacagatt 13920
ggctatctaa taaatttgat tgggcagtg agagttttgt catctttccc gttttgactc 13980
acattgtctc ctatggtgcc ctactacca gccatttcct tgacacagtc gctttagtca 14040
ctgtgtctac cgcgggttt gtacgggc ggtatgtcct gagcagcatc tacgcgtct 14100
gtgccctggc tgcgttgact tgcttctca ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc 14160
gctactcatg taccagatat actaactttc ttctggacac taagggcaga ctctatcgtt 14220
ggcggctgcc tgcatcata gagaaaagg gcaaagtga ggtcgaagg catctgatcg 14280
acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg 14340
aacaatgggg tcgtccttag atgacttttg ttatgatagc acggctccac aaaagggtgct 14400
tttgcggttt tctattacct acacgccagt gatgatatat gccctaaaag tgagtcgcgg 14460
ccgactgtta gggcttctgc accttttgat ctctctgaac tgtgctttca ccttcgggta 14520
catgacattc gcgcactttc agagtacaaa taaggctcgc ctactatgg gagcagtagt 14580
tgactcctt tggggggtgt attcagccat agaaacctgg aaattcatca cctcagatg 14640
ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat tctggcccct gccaccacg ttgagagtgc 14700
cgcaggcttt catccgattg cggcaaatga taaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg 14760
ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc cgggttgaaa ggctcgtgt tgggtggcag 14820

```

aaaagctgtt aaacagggag tggtaaacct tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc 14880
agcagaagag aaagaagggg gatggccagc cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta 14940
agatcatcgc ccagcaaaac cagtccagag gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga 15000
aaaacccgga gaagcccat tttcctctag cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta 15060
cccctagtga ggggcaattg tgtctgtcgt caatccagac tgcctttaat caaggcgctg 15120
ggacttgcac cctgtcagat tcagggagga taagttacac tgtggagttt agtttgccta 15180
cgcatcatac tgtgcgctg atccgctca cagcatcacc ctgagcatga tgggctggca 15240
ttcttgaggc atctcagtgt ttgaattgga agaattgtgt gtgaatggca ctgattgaca 15300
ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg gcgaccgtgt gggggtaaga ttttaattggc 15360
gagaaccata cggccgaaat t 15381

```

```

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Virut PRRS

```

```

<220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Val hoặc Met

```

```

<400> 4

```

```

Ala Asn Arg Met Xaa Asn Ser Lys Phe Glu
1          5          10

```

```

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Virut PRRS

```

```

<400> 5

```

```

Ala Asn Arg Met Val Asn Ser Lys Phe Glu
1          5          10

```

```

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Virut PRRS

```

```

<400> 6

```

```

Leu Ala Asn Tyr Tyr Arg Ala Gln Gly
1          5          10

```

```

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Virut PRRS

```

```

<400> 7

```

```

Leu Ala Asn Tyr His Tyr Arg Ala Gln Gly
1          5          10

```

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa là Pro hoặc Ser

<400> 8

Asp Leu Xaa Thr Pro Pro Glu Pro Ala Thr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 9

Asp Leu Ser Thr Pro Pro Glu Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 10

Asp Leu Pro Thr Pro Pro Glu Pro Ala Thr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 11

Val Asp Ile Ile Ile Phe Leu Ala Ile Leu
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 12

Val Asp Ile Ile Val Phe Leu Ala Ile Leu
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 13

Ala Ile Leu Arg Thr Arg Pro Ala Ile His
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 14

Ala Ile Leu Arg Ala Arg Pro Ala Ile His
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa là Pro hoặc Ser

<400> 15

Leu Gly Phe Met Ile Pro Xaa Gly Leu Ser
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 16

Leu Gly Phe Met Val Pro Ser Gly Leu Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 17

Ser Val Arg Val Leu Gln Thr Leu Arg Pro
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 18

Ser Val Arg Val Phe Gln Thr Leu Arg Pro
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 19

Ser Ser Ser Leu Ala Asp Ile Lys Thr Asn

1 5 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 20

Ser Ser Ser Leu Ser Asp Ile Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 21
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<220>
 <221> Xaa
 <222> (96)..(96)
 <223> Xaa là Pro hoặc Ser

<400> 21

Met Val Asn Ser Cys Thr Phe Leu His Ile Phe Leu Cys Cys Ser Phe
 1 5 10 15

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

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Val Arg Gly Asn Phe Ser Phe Glu Leu Thr
 35 40 45

Val Asn Tyr Thr Val Cys Pro Pro Cys Leu Thr Arg Gln Ala Ala Ala
 50 55 60

Glu Ala Tyr Glu Pro Gly Arg Ser Leu Trp Cys Arg Ile Gly Tyr Asp
 65 70 75 80

Arg Cys Gly Glu Asp Asp His Asp Glu Leu Gly Phe Met Ile Pro Xaa
 85 90 95

Gly Leu Ser Ser Glu Gly His Leu Thr Ser Val Tyr Ala Trp Leu Ala
 100 105 110

Phe Leu Ser Phe Ser Tyr Thr Ala Gln Phe His Pro Glu Ile Phe Gly
 115 120 125

Ile Gly Asn Val Ser Arg Val Tyr Val Asp Ile Glu His Gln Leu Ile
 130 135 140

Cys Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Leu Pro Arg His Asp Asn
 145 150 155 160

Ile Ser Ala Val Phe Gln Thr Tyr Tyr Gln His Gln Val Asp Gly Gly
 165 170 175

Asn Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu
 180 185 190

Val Leu Asn Val Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Asn His Val
 195 200 205

Ser Val Arg Val Leu Gln Thr Leu Arg Pro Thr Pro Pro Gln Arg Gln
 210 215 220

Ala Leu Leu Ser Ser Lys Thr Ser Val Ala Leu Gly Ile Ala Thr Arg
 225 230 235 240

Pro Leu Arg Arg Phe Ala Lys Ser Leu Ser Ala Val Arg Arg
 245 250

<210> 22
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 22

Met Val Asn Ser Cys Thr Phe Leu His Ile Phe Leu Cys Cys Ser Phe
 1 5 10 15

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

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Val Arg Gly Asn Phe Ser Phe Glu Leu Thr
 35 40 45

Val Asn Tyr Thr Val Cys Pro Pro Cys Leu Thr Arg Gln Ala Ala Ala
 50 55 60

Glu Ala Tyr Glu Pro Gly Arg Ser Leu Trp Cys Arg Ile Gly Tyr Asp
 65 70 75 80

Arg Cys Gly Glu Asp Asp His Asp Glu Leu Gly Phe Met Val Pro Ser
 85 90 95

Gly Leu Ser Ser Glu Gly His Leu Thr Ser Val Tyr Ala Trp Leu Ala
 100 105 110

Phe Leu Ser Phe Ser Tyr Thr Ala Gln Phe His Pro Glu Ile Phe Gly
 115 120 125

Ile Gly Asn Val Ser Arg Val Tyr Val Asp Ile Glu His Gln Leu Ile
 130 135 140

Cys Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Leu Pro Arg His Asp Asn
 145 150 155 160

Ile Ser Ala Val Phe Gln Thr Tyr Tyr Gln His Gln Val Asp Gly Gly
 165 170 175

Asn Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu
 180 185 190

Val Leu Asn Val Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Asn His Val
 195 200 205

Ser Val Arg Val Leu Gln Thr Leu Arg Pro Thr Pro Pro Gln Arg Gln
 210 215 220

Ala Leu Leu Ser Ser Lys Thr Ser Val Ala Leu Gly Ile Ala Thr Arg
 225 230 235 240

Pro Leu Arg Arg Phe Ala Lys Ser Leu Ser Ala Val Arg Arg
 245 250

<210> 23
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 23

Met Ala Ala Ser Leu Leu Phe Leu Met Val Gly Phe Lys Cys Leu Leu
 1 5 10 15

Val Ser Gln Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

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

Asp Ile Ser Cys Leu Arg His Arg Asn Ser Ala Ser Glu Ala Ile Arg
 50 55 60

Lys Ile Pro Gln Cys Arg Thr Ala Ile Gly Thr Pro Val Tyr Ile Thr
 65 70 75 80

Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Asn Tyr Leu His Ser Ser Asp Leu
 85 90 95

Leu Met Leu Ser Ser Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu Met Ser Glu Lys
 100 105 110

Gly Phe Lys Val Val Phe Gly Asn Val Ser Gly Ile Val Ala Val Cys
 115 120 125

Val Asn Phe Thr Ser Tyr Val Gln His Val Arg Glu Phe Thr Gln Arg
 130 135 140

Ser Leu Met Val Asp His Val Arg Leu Leu His Phe Met Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Met Arg Trp Ala Thr Val Leu Ala Cys Leu Phe Ala Ile Leu Leu
 165 170 175

Ala Ile

<210> 24
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 24

Met Ala Ala Ser Leu Leu Phe Leu Met Val Gly Phe Lys Cys Leu Leu
 1 5 10 15

Val Ser Gln Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

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

Asp Ile Ser Cys Leu Arg His Arg Asn Ser Ala Ser Glu Ala Ile Arg
 50 55 60

Lys Ile Pro Gln Cys Arg Thr Ala Ile Gly Thr Pro Val Tyr Ile Thr
 65 70 75 80

Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Asn Tyr Leu His Ser Ser Asp Leu
 85 90 95

Leu Met Leu Ser Ser Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu Met Ser Glu Lys
 100 105 110

Gly Phe Lys Val Val Phe Gly Asn Val Ser Gly Ile Val Ala Val Cys
 115 120 125

Val Asn Phe Thr Ser Tyr Val Gln His Val Arg Glu Phe Thr Gln Arg
 130 135 140

Ser Leu Met Val Asp His Val Arg Leu Leu His Phe Met Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Met Arg Trp Ala Thr Val Leu Ala Cys Leu Phe Ala Ile Leu Leu
 165 170 175

Ala Ile

<210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 25

Met Gly Ser Met Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Ile Phe

20

25

30

Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
 35 40 45

Cys Ile Arg Leu Val Cys Ser Ala Ile Leu Arg Thr Arg Pro Ala Ile
 50 55 60

His Ser Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
 65 70

<210> 26
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 26

Met Gly Ser Met Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Val Phe
 20 25 30

Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
 35 40 45

Cys Ile Arg Leu Val Cys Ser Ala Ile Leu Arg Ala Arg Pro Ala Ile
 50 55 60

His Ser Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
 65 70

<210> 27
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 27
 cacacgggtcg ccctaattg

19

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 28
 tgggtgaatgg cactgattga c

21

<210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 29

tgtgcctcta agtcacc

17

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 30

caactgcaga gctcatatgc at

22

<210> 31

<211> 256

<212> PRT

<213> Virut PRRS

<400> 31

Met Lys Trp Gly Pro Cys Lys Ala Phe Leu Thr Lys Leu Ala Asn Phe
 1 5 10 15

Leu Trp Met Leu Ser Arg Ser Ser Trp Cys Pro Leu Leu Ile Ser Leu
 20 25 30

Tyr Phe Trp Pro Phe Cys Leu Ala Ser Pro Ser Pro Val Gly Trp Trp
 35 40 45

Ser Phe Ala Ser Asp Trp Phe Ala Pro Arg Tyr Ser Val Arg Ala Leu
 50 55 60

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

Gln Cys Gln Val Asp Ile Pro Thr Trp Gly Thr Lys His Pro Leu Gly
 85 90 95

Met Phe Trp His His Lys Val Ser Thr Leu Ile Asp Glu Met Val Ser
 100 105 110

Arg Arg Met Tyr Arg Ile Met Glu Lys Ala Gly Gln Ala Ala Trp Lys
 115 120 125

Gln Val Val Ser Glu Ala Thr Leu Ser Arg Ile Ser Ser Leu Asp Val
 130 135 140

Val Ala His Phe Gln His Leu Ala Ala Ile Glu Ala Glu Thr Cys Lys
 145 150 155 160

Tyr Leu Ala Ser Arg Leu Pro Met Leu His Asn Leu Arg Met Thr Gly
 165 170 175

Ser Asn Val Thr Ile Val Tyr Asn Ser Thr Leu His Gln Val Phe Ala

180 185 190
 Ile Phe Pro Thr Pro Gly Ser Arg Pro Lys Leu His Asp Phe Gln Gln
 195 200 205
 Trp Leu Ile Ala Val His Ser Ser Ile Phe Ser Ser Val Ala Ala Ser
 210 215 220
 Cys Thr Leu Phe Val Val Leu Trp Leu Arg Val Pro Ile Leu Arg Thr
 225 230 235 240
 Val Phe Gly Phe Arg Trp Leu Gly Ala Ile Phe Leu Ser Asn Ser Gln
 245 250 255
 <210> 32
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS
 <400> 32
 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Val Asn Ala Asn
 20 25 30
 Ser Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
 35 40 45
 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ser Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Ser Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Ala Leu Val Thr Val
 85 90 95
 Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Cys Phe Val Ile Arg Phe Ala
 115 120 125
 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
 130 135 140
 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
 165 170 175
 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val

180 185 190
 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 195 200

 <210> 33
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

 <400> 33

 Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys Tyr Asp Ser Thr Ala Pro Gln
 1 5 10 15

 Lys Val Leu Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Val Met Ile Tyr
 20 25 30

 Ala Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu His Leu Leu
 35 40 45

 Ile Phe Leu Asn Cys Ala Phe Thr Phe Gly Tyr Met Thr Phe Ala His
 50 55 60

 Phe Gln Ser Thr Asn Lys Val Ala Leu Thr Met Gly Ala Val Val Ala
 65 70 75 80

 Leu Leu Trp Gly Val Tyr Ser Ala Ile Glu Thr Trp Lys Phe Ile Thr
 85 90 95

 Ser Arg Cys Arg Leu Cys Leu Leu Gly Arg Lys Tyr Ile Leu Ala Pro
 100 105 110

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

 Asp Asn His Ala Phe Val Val Arg Arg Pro Gly Ser Thr Thr Val Asn
 130 135 140

 Gly Thr Leu Val Pro Gly Leu Lys Gly Leu Val Leu Gly Gly Arg Lys
 145 150 155 160

 Ala Val Lys Gln Gly Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Ala Lys
 165 170

 <210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

 <400> 34

 Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
 1 5 10 15

 Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
 20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
 35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
 50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
 65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
 85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
 100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
 115 120

<210> 35
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 35

Met Ser Gly Ile Leu Asp Arg Cys Thr Cys Thr Pro Asn Ala Arg Val
 1 5 10 15

Phe Met Ala Glu Gly Gln Val Tyr Cys Thr Arg Cys Leu Ser Ala Arg
 20 25 30

Ser Leu Leu Pro Leu Asn Leu Gln Val Ser Glu Leu Gly Val Leu Gly
 35 40 45

Leu Phe Tyr Arg Pro Glu Glu Pro Leu Arg Trp Thr Leu Pro Arg Ala
 50 55 60

Phe Pro Thr Val Glu Cys Ser Pro Ala Gly Ala Cys Trp Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Ile Phe Pro Ile Ala Arg Met Thr Ser Gly Asn Leu Asn Phe Gln Gln
 85 90 95

Arg Met Val Arg Val Ala Ala Glu Leu Tyr Arg Ala Gly Gln Leu Thr
 100 105 110

Pro Thr Val Leu Lys Thr Leu Gln Val Tyr Glu Arg Gly Cys Arg Trp
 115 120 125

Tyr Pro Ile Val Gly Pro Val Pro Gly Val Ala Val Phe Ala Asn Ser
 130 135 140

Leu His Val Ser Asp Lys Pro Phe Pro Gly Ala Thr His Val Leu Thr
 145 150 155 160

Asn Leu Pro Leu Pro Gln
165

<210> 36
<211> 216
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 36

Arg Pro Lys Pro Glu Asp Phe Cys Pro Phe Glu Cys Ala Met Ala Thr
1 5 10 15

Val Tyr Asp Ile Gly His Asp Ala Val Met Tyr Val Ala Glu Gly Lys
20 25 30

Val Ser Trp Ala Pro Arg Gly Gly Asp Glu Val Lys Phe Glu Thr Val
35 40 45

Pro Gly Glu Leu Glu Leu Ile Ala Asn Arg Leu Arg Thr Ser Phe Pro
50 55 60

Pro His His Thr Val Asp Met Ser Lys Phe Ala Phe Thr Ala Pro Gly
65 70 75 80

Arg Gly Val Ser Met Arg Val Glu Arg Gln His Gly Cys Leu Pro Ala
85 90 95

Asp Thr Val Pro Glu Gly Asn Cys Trp Trp Ser Leu Phe Asn Leu Leu
100 105 110

Pro Leu Glu Val Gln Asn Lys Glu Ile Arg His Ala Asn Gln Phe Gly
115 120 125

Tyr Gln Thr Lys His Gly Val Ser Gly Lys Tyr Leu Gln Arg Arg Leu
130 135 140

Gln Val Asn Gly Leu Arg Ala Val Thr Asp Leu Asn Gly Pro Ile Val
145 150 155 160

Val Gln Tyr Phe Ser Val Lys Glu Ser Trp Ile Arg His Leu Lys Leu
165 170 175

Ala Glu Glu Pro Ser Tyr Pro Gly Phe Glu Asp Leu Leu Arg Ile Arg
180 185 190

Val Glu Pro Asn Thr Ser Pro Leu Ala Asp Lys Asp Glu Lys Ile Phe
195 200 205

Arg Phe Gly Ser His Lys Trp Tyr
210 215

<210> 37
<211> 980

<212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 37

Ala Gly Lys Arg Ala Arg Lys Ala Arg Ser Ser Ala Thr Ala Thr Val
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Ala Leu Ser Val Arg Glu Thr Arg Gln Ala Lys Glu His
 20 25 30

Glu Val Ala Gly Ala Asn Lys Ala Gly His Leu Lys His Tyr Ser Pro
 35 40 45

Pro Ala Glu Gly Asn Cys Gly Trp His Cys Ile Ser Ala Ile Ala Asn
 50 55 60

Arg Met Val Asn Ser Lys Phe Glu Thr Thr Leu Pro Glu Arg Val Arg
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Asp Trp Ala Thr Asp Glu Asp Leu Val Asn Ala Ile Gln
 85 90 95

Ile Leu Arg Leu Pro Ala Ala Leu Asn Arg Asn Gly Ala Cys Ala Ser
 100 105 110

Ala Lys Tyr Val Leu Lys Leu Glu Gly Glu His Trp Thr Val Thr Val
 115 120 125

Thr Pro Gly Met Ser Pro Ser Leu Leu Pro Leu Glu Cys Val Gln Gly
 130 135 140

Cys Cys Glu His Lys Gly Ser Leu Gly Ser Pro Asp Ala Val Glu Val
 145 150 155 160

Phe Gly Phe Asp Pro Ala Cys Leu Asp Arg Leu Ala Glu Val Met His
 165 170 175

Leu Pro Ser Ser Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Glu Met Ser Gly Asp
 180 185 190

Ser Asp Arg Ser Ala Ser Pro Val Thr Thr Val Trp Thr Val Ser Gln
 195 200 205

Phe Phe Ala Arg His Asn Gly Gly Asn His Pro Asp Gln Val Arg Leu
 210 215 220

Gly Lys Ile Ile Ser Leu Cys Gln Val Ile Glu Asp Cys Cys Cys Ser
 225 230 235 240

Gln Asn Lys Thr Asn Arg Val Thr Pro Glu Glu Val Ala Ala Lys Ile
 245 250 255

Asp Leu Tyr Leu Arg Gly Ala Thr Asn Leu Glu Glu Cys Leu Ala Arg
 260 265 270

Leu Glu Lys Ala Arg Pro Pro Arg Val Met Asp Thr Ser Phe Asp Trp
 275 280 285

Asp Val Val Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Thr Gln Thr Thr Glu Leu
 290 295 300

Pro Gln Val Asn Gln Cys Arg Ala Leu Val Pro Val Val Thr Gln Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Asp Asn Asn Ser Val Pro Leu Thr Ala Phe Ser Leu Ala Asn
 325 330 335

Tyr Tyr Tyr Arg Ala Gln Gly Asp Glu Val Arg His Arg Glu Arg Leu
 340 345 350

Thr Ala Val Leu Ser Lys Leu Glu Gly Val Val Arg Glu Glu Tyr Gly
 355 360 365

Leu Met Pro Thr Gly Pro Gly Pro Arg Pro Thr Leu Pro Arg Gly Leu
 370 375 380

Asp Glu Leu Lys Asp Gln Met Glu Glu Asp Leu Leu Lys Leu Ala Asn
 385 390 395 400

Ala Gln Thr Thr Ser Asp Met Met Ala Trp Ala Val Glu Gln Val Asp
 405 410 415

Leu Lys Thr Trp Val Lys Asn Tyr Pro Arg Trp Thr Pro Pro Pro Pro
 420 425 430

Pro Pro Lys Val Gln Pro Arg Lys Thr Lys Pro Val Lys Ser Leu Pro
 435 440 445

Glu Arg Lys Pro Val Pro Ala Pro Arg Arg Lys Val Gly Ser Asp Cys
 450 455 460

Gly Ser Pro Ile Ser Leu Gly Asp Asp Val Pro Asn Ser Trp Glu Asp
 465 470 475 480

Leu Ala Val Gly Ser Pro Phe Asp Leu Pro Thr Pro Pro Glu Pro Ala
 485 490 495

Thr Pro Ser Ser Glu Leu Val Ile Val Ser Ala Pro Gln Cys Ile Phe
 500 505 510

Arg Pro Ala Thr Pro Leu Ser Glu Pro Ala Pro Ile Pro Ala Pro Arg
 515 520 525

Gly Val Val Ser Arg Pro Val Thr Pro Leu Asn Glu Pro Ile Pro Val
 530 535 540

Pro Ala Pro Arg Arg Lys Phe Gln Gln Met Arg Arg Leu Ser Ser Ala

545		550		555		560
Ala Val Ile Pro	Pro Tyr Gln Asp Glu	Pro Leu Asp Leu Ser	Ala Ser			
	565	570	575			
Ser Gln Thr Glu Tyr	Glu Ala Ser Pro Leu Ala Pro	Pro Gln Ser Glu				
	580	585	590			
Gly Val Leu Gly Val	Glu Gly Gln Glu Ala Glu Glu	Ala Leu Ser Glu				
	595	600	605			
Ile Ser Asp Met Ser	Gly Asn Ile Lys Pro Ala Ser	Val Ser Ser Ser				
	610	615	620			
Ser Ser Leu Ser Ser	Val Arg Ile Thr Arg Pro Lys Tyr	Ser Ala Gln				
	625	630	635	640		
Ala Ile Ile Asp Ser	Gly Gly Pro Cys Ser Gly His Leu	Gln Glu Val				
	645	650	655			
Lys Glu Thr Cys Leu	Ser Ile Met Arg Glu Ala Cys Asp	Ala Thr Lys				
	660	665	670			
Leu Asp Asp Pro Ala	Thr Gln Glu Trp Leu Ser Arg Met	Trp Asp Arg				
	675	680	685			
Val Asp Met Leu Thr	Trp Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Gln	Ala Phe Arg				
	690	695	700			
Thr Leu Asp Gly Arg	Leu Lys Phe Leu Pro Lys Met Ile	Leu Glu Thr				
	705	710	715	720		
Pro Pro Pro Tyr Pro	Cys Glu Phe Val Met Met Pro His Thr	Pro Ala				
	725	730	735			
Pro Ser Val Gly Ala	Glu Ser Asp Leu Thr Ile Gly Ser	Val Ala Thr				
	740	745	750			
Glu Asp Val Pro Arg	Ile Leu Glu Lys Ile Glu Asn Val Gly	Glu Met				
	755	760	765			
Thr Asn Gln Gly Pro	Leu Ala Phe Ser Glu Asp Lys Pro Val	Asp Asp				
	770	775	780			
Gln Leu Ala Lys Asp	Pro Arg Ile Ser Ser Gln Arg Ser Asp	Glu Ser				
	785	790	795	800		
Thr Ser Ala Pro Pro	Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ser Phe	Thr Asp				
	805	810	815			
Leu Pro Pro Ser Asp	Gly Val Asp Ala Asp Gly Gly Gly	Pro Phe Trp				
	820	825	830			

Thr Val Lys Arg Lys Ala Glu Arg Leu Phe Asp Gln Leu Ser Arg Gln
835 840 845

Val Phe Asp Leu Val Ser His Leu Pro Val Phe Phe Ser Arg Leu Phe
850 855 860

Asn Pro Gly Gly Gly Tyr Ser Pro Gly Asp Trp Gly Phe Ala Ala Phe
865 870 875 880

Thr Leu Leu Cys Leu Phe Leu Cys Tyr Ser Tyr Pro Ala Phe Gly Ile
885 890 895

Ala Pro Leu Leu Gly Val Phe Ser Gly Ser Ser Arg Arg Val Arg Met
900 905 910

Gly Val Phe Gly Cys Trp Leu Ala Phe Ala Val Gly Leu Phe Lys Pro
915 920 925

Val Ser Asp Pro Val Gly Ala Ala Cys Glu Phe Asp Ser Pro Glu Cys
930 935 940

Arg Asn Ile Leu His Ser Phe Glu Leu Leu Lys Pro Trp Asp Pro Val
945 950 955 960

Arg Ser Leu Val Val Gly Pro Val Gly Leu Gly Leu Ala Ile Leu Gly
965 970 975

Arg Leu Leu Gly
980

<210> 38
<211> 446
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 38

Gly Ala Arg Ser Ile Trp His Phe Leu Leu Arg Leu Gly Ile Val Ala
1 5 10 15

Asp Cys Val Leu Ala Gly Ala Tyr Val Leu Ser Gln Gly Arg Cys Lys
20 25 30

Lys Cys Trp Gly Ser Cys Ile Arg Thr Ala Pro Asn Glu Val Ala Phe
35 40 45

Asn Val Phe Pro Phe Thr Arg Ala Thr Arg Ser Ser Leu Ile Asp Leu
50 55 60

Cys Asp Arg Phe Cys Ala Pro Lys Gly Met Asp Pro Ile Phe Leu Ala
65 70 75 80

Thr Gly Trp Arg Gly Cys Trp Ala Gly Arg Ser Pro Ile Glu Gln Pro
85 90 95

Ser Glu Lys Pro Ile Ala Phe Ala Gln Leu Asp Glu Lys Lys Ile Thr
 100 105 110

Ala Arg Thr Val Val Ala Gln Pro Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Val Lys
 115 120 125

Cys Leu Arg Val Leu Gln Ala Gly Gly Val Met Val Ala Lys Ala Val
 130 135 140

Pro Lys Val Val Lys Val Ser Ala Val Pro Phe Arg Ala Pro Phe Phe
 145 150 155 160

Pro Thr Gly Val Lys Val Asp Pro Glu Cys Arg Val Val Val Asp Pro
 165 170 175

Asp Thr Phe Thr Ala Ala Leu Arg Ser Gly Tyr Ser Thr Thr Asn Leu
 180 185 190

Val Leu Gly Val Gly Asp Phe Ala Gln Leu Asn Gly Leu Lys Ile Arg
 195 200 205

Gln Ile Ser Lys Pro Ser Gly Gly Gly Pro His Leu Met Ala Ala Leu
 210 215 220

His Val Ala Cys Ser Met Ala Leu His Met Leu Ala Gly Ile Tyr Val
 225 230 235 240

Thr Ala Val Gly Ser Cys Gly Thr Gly Thr Asn Asp Pro Trp Cys Ala
 245 250 255

Asn Pro Phe Ala Val Pro Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Leu Cys Thr Ser
 260 265 270

Arg Leu Cys Ile Ser Gln His Gly Leu Thr Leu Pro Leu Thr Ala Leu
 275 280 285

Val Ala Gly Phe Gly Ile Gln Glu Ile Ala Leu Val Val Leu Ile Phe
 290 295 300

Val Ser Ile Gly Gly Met Ala His Arg Leu Ser Cys Lys Ala Asp Met
 305 310 315 320

Leu Cys Val Leu Leu Ala Ile Ala Ser Tyr Val Trp Val Pro Leu Thr
 325 330 335

Trp Leu Leu Cys Val Phe Pro Cys Trp Leu Arg Cys Phe Ser Leu His
 340 345 350

Pro Leu Thr Ile Leu Trp Leu Val Phe Phe Leu Ile Ser Val Asn Met
 355 360 365

Pro Ser Gly Ile Leu Ala Met Val Leu Leu Val Ser Leu Trp Leu Leu
 370 375 380

Gly Arg Tyr Thr Asn Val Ala Gly Leu Val Thr Pro Tyr Asp Ile His
385 390 395 400

His Tyr Thr Ser Gly Pro Arg Gly Val Ala Ala Leu Ala Thr Ala Pro
405 410 415

Asp Gly Thr Tyr Leu Ala Ala Val Arg Arg Ala Ala Leu Thr Gly Arg
420 425 430

Thr Met Leu Phe Thr Pro Ser Gln Leu Gly Ser Leu Leu Glu
435 440 445

<210> 39
<211> 204
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 39

Gly Ala Phe Arg Thr Arg Lys Pro Ser Leu Asn Thr Val Asn Val Val
1 5 10 15

Gly Ser Ser Met Gly Ser Gly Gly Val Phe Thr Ile Asp Gly Lys Ile
20 25 30

Lys Cys Val Thr Ala Ala His Val Leu Thr Gly Asn Ser Ala Arg Val
35 40 45

Ser Gly Val Gly Phe Asn Gln Met Leu Asp Phe Asp Val Lys Gly Asp
50 55 60

Phe Ala Ile Ala Asp Cys Pro Asn Trp Gln Gly Ala Ala Pro Lys Thr
65 70 75 80

Gln Phe Cys Lys Asp Gly Trp Thr Gly Arg Ala Tyr Trp Leu Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Val Glu Pro Gly Val Ile Gly Lys Gly Phe Ala Phe Cys Phe
100 105 110

Thr Ala Cys Gly Asp Ser Gly Ser Pro Val Ile Thr Glu Ala Gly Glu
115 120 125

Leu Ile Gly Val His Thr Gly Ser Asn Lys Gln Gly Gly Gly Ile Val
130 135 140

Thr Arg Pro Ser Gly Gln Phe Cys Asn Val Ala Pro Ile Lys Leu Ser
145 150 155 160

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

Lys Val Gly Ser His Ile Ile Lys Asp Ile Gly Glu Val Pro Ser Asp
180 185 190

Leu Cys Ala Leu Leu Ala Ala Lys Pro Glu Leu Glu
195 200

<210> 40
<211> 170
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 40

Gly Gly Leu Ser Thr Val Gln Leu Leu Cys Val Phe Phe Leu Leu Trp
1 5 10 15

Arg Met Met Gly His Ala Trp Thr Pro Leu Val Ala Val Gly Phe Phe
20 25 30

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

Phe Gly Met Phe Val Leu Ser Trp Leu Thr Pro Trp Ser Ala Gln Val
50 55 60

Leu Met Ile Arg Leu Leu Thr Ala Ala Leu Asn Arg Asn Arg Trp Ser
65 70 75 80

Leu Ala Phe Phe Ser Leu Gly Ala Val Thr Gly Phe Val Ala Asp Leu
85 90 95

Ala Ala Thr Gln Gly His Pro Leu Gln Ala Val Met Asn Leu Ser Thr
100 105 110

Tyr Ala Phe Leu Pro Arg Met Met Val Val Thr Ser Pro Val Pro Val
115 120 125

Ile Ala Cys Gly Val Val His Leu Leu Ala Ile Ile Leu Tyr Leu Phe
130 135 140

Lys Tyr Arg Gly Leu His Gln Ile Leu Val Gly Asp Gly Val Phe Ser
145 150 155 160

Ala Ala Phe Phe Leu Arg Tyr Phe Ala Glu
165 170

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 41

Gly Lys Leu Arg Glu Gly Val Ser Gln Ser Cys Gly Met Asn His Glu
1 5 10 15

<210> 42
<211> 259
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 42

Ser Leu Thr Gly Ala Leu Ala Met Arg Leu Asn Asp Glu Asp Leu Asp
 1 5 10 15

Phe Leu Thr Lys Trp Thr Asp Phe Lys Cys Phe Val Ser Ala Ser Asn
 20 25 30

Met Arg Asn Ala Ala Gly Gln Phe Ile Glu Ala Ala Tyr Ala Lys Ala
 35 40 45

Leu Arg Val Glu Leu Ala Gln Leu Val Gln Val Asp Lys Val Arg Gly
 50 55 60

Thr Leu Ala Lys Leu Glu Ala Phe Ala Asp Thr Val Ala Pro Gln Leu
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Asp Ile Val Val Ala Leu Gly His Thr Pro Val Gly Ser
 85 90 95

Ile Phe Asp Leu Lys Val Gly Ser Thr Lys His Thr Leu Gln Ala Ile
 100 105 110

Glu Thr Arg Val Leu Ala Gly Ser Lys Met Thr Val Ala Arg Val Val
 115 120 125

Asp Pro Thr Pro Thr Pro Pro Pro Ala Pro Val Pro Ile Pro Leu Pro
 130 135 140

Pro Lys Val Leu Glu Asn Gly Pro Asn Ala Trp Gly Asp Glu Asp Arg
 145 150 155 160

Leu Asn Lys Lys Lys Arg Arg Arg Met Glu Ala Leu Gly Ile Tyr Val
 165 170 175

Met Gly Gly Lys Lys Tyr Gln Lys Phe Trp Asp Lys Asn Ser Gly Asp
 180 185 190

Val Phe Tyr Glu Glu Val His Asn Asn Thr Asp Glu Trp Glu Cys Leu
 195 200 205

Arg Val Gly Asp Pro Ala Asp Phe Asp Pro Glu Lys Gly Thr Leu Cys
 210 215 220

Gly His Val Thr Ile Glu Asp Lys Ala Tyr His Val Tyr Thr Ser Ser
 225 230 235 240

Ser Gly Lys Lys Phe Leu Val Pro Val Asn Pro Glu Asn Gly Arg Val
 245 250 255

Gln Trp Glu

<210> 43
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 43

Ala Ala Lys Leu Ser Val Glu Gln Ala Leu Gly Met Met Asn Val Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Leu Thr Thr Lys Glu Leu Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Asp
 20 25 30

Lys Leu Gln Gly Leu Thr Lys Glu Gln Cys Leu Asn Cys
 35 40 45

<210> 44
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 44

Ala Ala Lys Leu Ser Val Glu Gln Ala Leu Gly Met Met Asn Val Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Leu Thr Thr Lys Glu Leu Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Asp
 20 25 30

Lys Leu Gln Gly Leu Thr Lys Glu Gln Cys Leu Asn Leu Leu Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Leu Thr Arg Cys Gly Arg Gly Gly Leu Val Val Thr Glu Thr
 50 55 60

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

Val Asn Leu Lys Val Ala Ser Glu Val Glu Leu Lys Asp Ala Val Glu
 85 90 95

His Asn Gln His Pro Val Ala Arg Pro Val Asp Gly Gly Val Val Leu
 100 105 110

Leu Arg Ser Ala Val Pro Ser Leu Ile Asp Val Leu Ile Ser Gly Ala
 115 120 125

Asp Ala Ser Pro Lys Leu Leu Ala His His Gly Pro Gly Asn Thr Gly
 130 135 140

Ile Asp Gly Thr Leu Trp Asp Phe Glu Ser Glu Ala Thr Lys Glu Glu
 145 150 155 160

Val Ala Leu Ser Ala Gln Ile Ile Gln Ala Cys Asp Ile Arg Arg Gly
 165 170 175

Asp Ala Pro Glu Ile Gly Leu Pro Tyr Lys Leu Tyr Pro Val Arg Gly

180	185	190
Asn Pro Glu Arg Val Lys Gly Val Leu Gln Asn Thr Arg Phe Gly Asp		
195	200	205
Ile Pro Tyr Lys Thr Pro Ser Asp Thr Gly Asn Pro Val His Ala Ala		
210	215	220
Ala Cys Leu Thr Pro Asn Ala Thr Pro Val Thr Asp Gly Arg Ser Val		
225	230	235
Leu Ala Thr Thr Met Pro Ser Gly Phe Glu Leu Tyr Val Pro Thr Ile		
	245	250
Pro Ala Ser Val Leu Asp Tyr Leu Asp Ser Arg Pro Asp Cys Pro Lys		
	260	265
Gln Leu Thr Glu His Gly Cys Glu Asp Ala Ala Leu Arg Asp Leu Ser		
	275	280
Lys Tyr Asp Leu Ser Thr Gln Gly Phe Val Leu Pro Gly Val Phe Arg		
	290	300
Leu Val Arg Lys Tyr Leu Phe Ala His Val Gly Lys Cys Pro Pro Val		
305	310	315
His Arg Pro Ser Thr Tyr Pro Ala Lys Asn Ser Met Ala Gly Ile Asn		
	325	330
Gly Asn Arg Phe Pro Thr Lys Asp Ile Gln Ser Val Pro Glu Ile Asp		
	340	345
Val Leu Cys Ala Gln Ala Val Arg Glu Asn Trp Gln Thr Val Thr Pro		
	355	360
Cys Thr Leu Lys Lys Gln Tyr Cys Gly Lys Lys Lys Thr Arg Thr Ile		
	370	375
Leu Gly Thr Asn Asn Phe Ile Ala Leu Ala His Arg Ala Ala Leu Ser		
385	390	395
Gly Val Thr Gln Gly Phe Met Lys Lys Ala Phe Asn Ser Pro Ile Ala		
	405	410
Leu Gly Lys Asn Lys Phe Lys Glu Leu Gln Thr Pro Val Leu Gly Arg		
	420	425
Cys Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser Cys Asp Arg Ser Thr Pro Ala Ile		
	435	440
Val Arg Trp Phe Ala Ala Asn Leu Leu Tyr Glu Leu Ala Cys Ala Glu		
	450	455

Glu His Leu Pro Ser Tyr Val Leu Asn Cys Cys His Asp Leu Leu Val
465 470 475 480

Thr Gln Ser Gly Ala Val Thr Lys Arg Gly Gly Leu Ser Ser Gly Asp
485 490 495

Pro Ile Thr Ser Val Ser Asn Thr Ile Tyr Ser Leu Val Ile Tyr Ala
500 505 510

Gln His Met Val Leu Ser Tyr Phe Lys Ser Gly His Pro His Gly Leu
515 520 525

Leu Phe Leu Gln Asp Gln Leu Lys Phe Glu Asp Met Leu Lys Val Gln
530 535 540

Pro Leu Ile Val Tyr Ser Asp Asp Leu Val Leu Tyr Ala Glu Ser Pro
545 550 555 560

Thr Met Pro Asn Tyr His Trp Trp Val Glu His Leu Asn Ser Met Leu
565 570 575

Gly Phe Gln Thr Asp Pro Lys Lys Thr Ala Ile Thr Asp Ser Pro Ser
580 585 590

Phe Leu Gly Cys Arg Ile Ile Asn Gly Arg Gln Leu Val Pro Asn Arg
595 600 605

Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala Tyr His Met Lys Ala Ser Asn Val
610 615 620

Ser Glu Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala Ala Ile Leu Met Asp Ser Cys Ala
625 630 635 640

Cys Leu Glu Tyr Asp Pro Glu Trp Phe Glu Glu Leu Val Val Gly Ile
645 650 655

Ala Gln Cys Ala Arg Lys Asp Gly Tyr Ser Phe Pro Gly Thr Pro Phe
660 665 670

Phe Met Ser Met Trp Glu Lys Leu Arg Ser Asn Tyr Glu
675 680 685

<210> 45
<211> 441
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 45

Gly Lys Lys Ser Arg Val Cys Gly Tyr Cys Gly Ala Pro Ala Pro Tyr
1 5 10 15

Ala Thr Ala Cys Gly Leu Asp Val Cys Ile Tyr His Thr His Phe His
20 25 30

Gln His Cys Pro Val Thr Ile Trp Cys Gly His Pro Ala Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Cys Ser Glu Cys Lys Ser Pro Val Gly Lys Gly Thr Ser Pro Leu
50 55 60

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

Met Arg Val Glu Gln Gly Leu Thr Pro Leu Asp Pro Gly Arg Tyr Gln
85 90 95

Thr Arg Arg Gly Leu Val Ser Val Arg Arg Gly Ile Arg Gly Asn Glu
100 105 110

Val Glu Leu Pro Asp Gly Asp Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Pro Thr
115 120 125

Cys Lys Glu Ile Asn Met Val Ala Val Ala Ser Asn Val Leu Arg Ser
130 135 140

Arg Phe Ile Ile Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Thr Tyr Trp Leu Leu
145 150 155 160

Gln Gln Val Gln Asp Gly Asp Val Ile Tyr Thr Pro Thr His Gln Thr
165 170 175

Met Leu Asp Met Ile Arg Ala Leu Gly Thr Cys Arg Phe Asn Val Pro
180 185 190

Ala Gly Thr Thr Leu Gln Phe Pro Val Pro Ser Arg Thr Gly Pro Trp
195 200 205

Val Arg Ile Leu Ala Gly Gly Trp Cys Pro Gly Lys Asn Ser Phe Leu
210 215 220

Asp Glu Ala Ala Tyr Cys Asn His Leu Asp Val Leu Arg Leu Leu Ser
225 230 235 240

Lys Thr Thr Leu Thr Cys Leu Gly Asp Phe Lys Gln Leu His Pro Val
245 250 255

Gly Phe Asp Ser His Cys Tyr Val Phe Asn Ile Met Pro Gln Thr Gln
260 265 270

Leu Lys Thr Ile Trp Arg Phe Gly Gln Asn Ile Cys Asp Ala Ile Gln
275 280 285

Pro Asp Tyr Arg Asp Lys Leu Met Ser Met Val Asn Thr Thr Arg Val
290 295 300

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

His Arg Asp Arg Glu Asp Asp Ala Ile Thr Ile Asp Ser Ser Gln Gly
325 330 335

Ala Thr Phe Asp Val Val Thr Leu His Leu Pro Thr Lys Asp Ser Leu
340 345 350

Asn Arg Gln Arg Ala Leu Val Ala Ile Thr Arg Ala Arg His Ala Ile
355 360 365

Phe Val Tyr Asp Pro His Arg Gln Leu Gln Ser Leu Phe Asp Leu Pro
370 375 380

Ala Lys Gly Thr Pro Val Asn Leu Ala Val His Arg Asp Gly Gln Leu
385 390 395 400

Ile Val Leu Asp Arg Asn Asn Lys Glu Cys Thr Val Ala Gln Ala Leu
405 410 415

Gly Asn Gly Asp Lys Phe Arg Ala Thr Asp Lys Arg Val Val Asp Ser
420 425 430

Leu Arg Ala Ile Cys Ala Asp Leu Glu
435 440

<210> 46
<211> 223
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 46

Gly Ser Ser Ser Pro Leu Pro Lys Val Ala His Asn Leu Gly Phe Tyr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Asp Leu Thr Gln Phe Ala Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala
20 25 30

Pro His Trp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Asn Glu Lys Trp Pro Asp
35 40 45

Arg Leu Val Thr Ser Leu Arg Pro Ile His Lys Tyr Ser Arg Ala Cys
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Tyr Met Val Gly Pro Ser Val Phe Leu Gly Thr Pro
65 70 75 80

Gly Val Val Ser Tyr Tyr Leu Thr Lys Phe Val Lys Gly Glu Ala Gln
85 90 95

Val Leu Pro Glu Thr Val Phe Ser Thr Gly Arg Ile Glu Val Asp Cys
100 105 110

Arg Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Glu Arg Glu Val Ala Ala Ser Leu Pro
115 120 125

His Ala Phe Ile Gly Asp Val Lys Gly Thr Thr Val Gly Gly Cys His
130 135 140

His Val Thr Ser Arg Tyr Leu Pro Arg Phe Leu Pro Lys Glu Ser Val
145 150 155 160

Ala Val Val Gly Val Ser Ser Pro Gly Lys Ala Ala Lys Ala Leu Cys
165 170 175

Thr Leu Thr Asp Val Tyr Leu Pro Asp Leu Glu Ala Tyr Phe His Pro
180 185 190

Glu Thr Gln Ser Lys Cys Trp Arg Met Met Leu Asp Phe Lys Glu Val
195 200 205

Arg Leu Met Val Trp Lys Asp Lys Thr Ala Tyr Phe Gln Leu Glu
210 215 220

<210> 47
<211> 153
<212> PRT
<213> Virut PRRS

<400> 47

Gly Arg Tyr Phe Thr Trp Tyr Gln Leu Ala Ser Tyr Ala Ser Tyr Ile
1 5 10 15

Arg Val Pro Val Asn Ser Thr Val Tyr Leu Asp Pro Cys Met Gly Pro
20 25 30

Ala Leu Cys Asn Arg Lys Val Val Gly Ser Thr His Trp Gly Ala Asp
35 40 45

Leu Ala Val Thr Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Lys Ile Ile Leu Ser Ser
50 55 60

Ala Tyr His Ser Glu Met Pro Pro Gly Tyr Lys Ile Leu Ala Cys Ala
65 70 75 80

Glu Phe Ser Leu Asp Asp Pro Val Lys Tyr Lys His Thr Trp Gly Phe
85 90 95

Glu Ser Asp Thr Ala Tyr Leu Tyr Glu Phe Thr Gly Asn Gly Glu Asp
100 105 110

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

Tyr Lys Ala Thr Ala Thr Ser Met Lys Phe Tyr Phe Pro Pro Gly Pro
130 135 140

Val Ile Glu Pro Thr Leu Gly Leu Asn
145 150

<210> 48
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Virut PRRS

<400> 48

Met Val Asn Ser Cys Thr Phe Leu His Ile Phe Leu Cys Cys Ser Phe
 1 5 10 15

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

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Val Arg Gly Asn Phe Ser Phe Glu Leu Thr
 35 40 45

Val Asn Tyr Thr Val Cys Pro Pro Cys Leu Thr Arg Gln Ala Ala Ala
 50 55 60

Glu Ala Tyr Glu Pro Gly Arg Ser Leu Trp Cys Arg Ile Gly Tyr Asp
 65 70 75 80

Arg Cys Gly Glu Asp Asp His Asp Glu Leu Gly Phe Met Val Pro Ser
 85 90 95

Gly Leu Ser Ser Glu Gly His Leu Thr Ser Val Tyr Ala Trp Leu Ala
 100 105 110

Phe Leu Ser Phe Ser Tyr Thr Ala Gln Phe His Pro Glu Ile Phe Gly
 115 120 125

Ile Gly Asn Val Ser Arg Val Tyr Val Asp Ile Glu His Gln Leu Ile
 130 135 140

Cys Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Leu Pro Arg His Asp Asn
 145 150 155 160

Ile Ser Ala Val Phe Gln Thr Tyr Tyr Gln His Gln Val Asp Gly Gly
 165 170 175

Asn Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu
 180 185 190

Val Leu Asn Val Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Asn His Val
 195 200 205

Ser Val Arg Val Phe Gln Thr Leu Arg Pro Thr Pro Pro Gln Arg Gln
 210 215 220

Ala Leu Leu Ser Ser Lys Thr Ser Val Ala Leu Gly Ile Ala Thr Arg
 225 230 235 240

Pro Leu Arg Arg Phe Ala Lys Ser Leu Ser Ala Val Arg Arg
 245 250

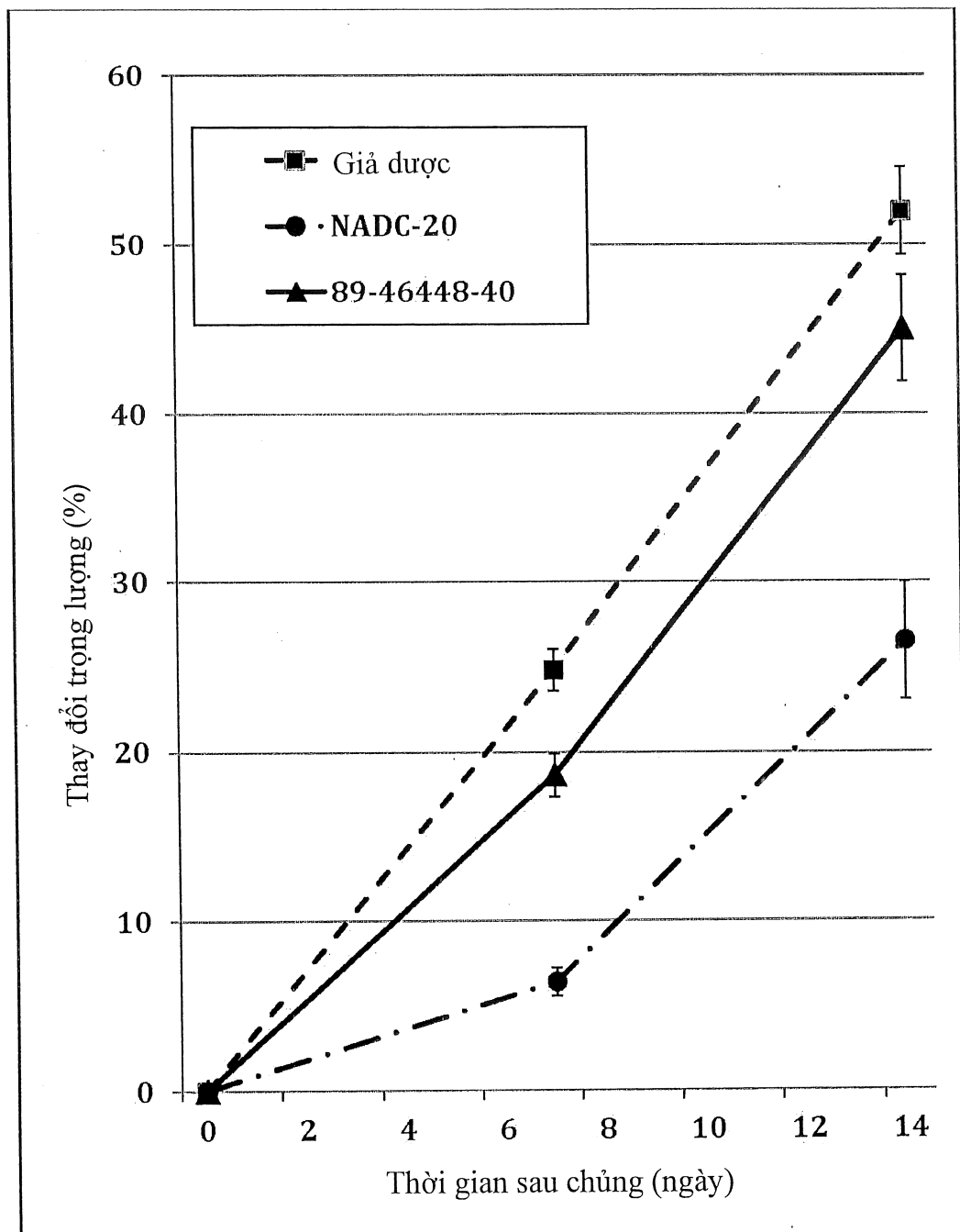


FIG.1

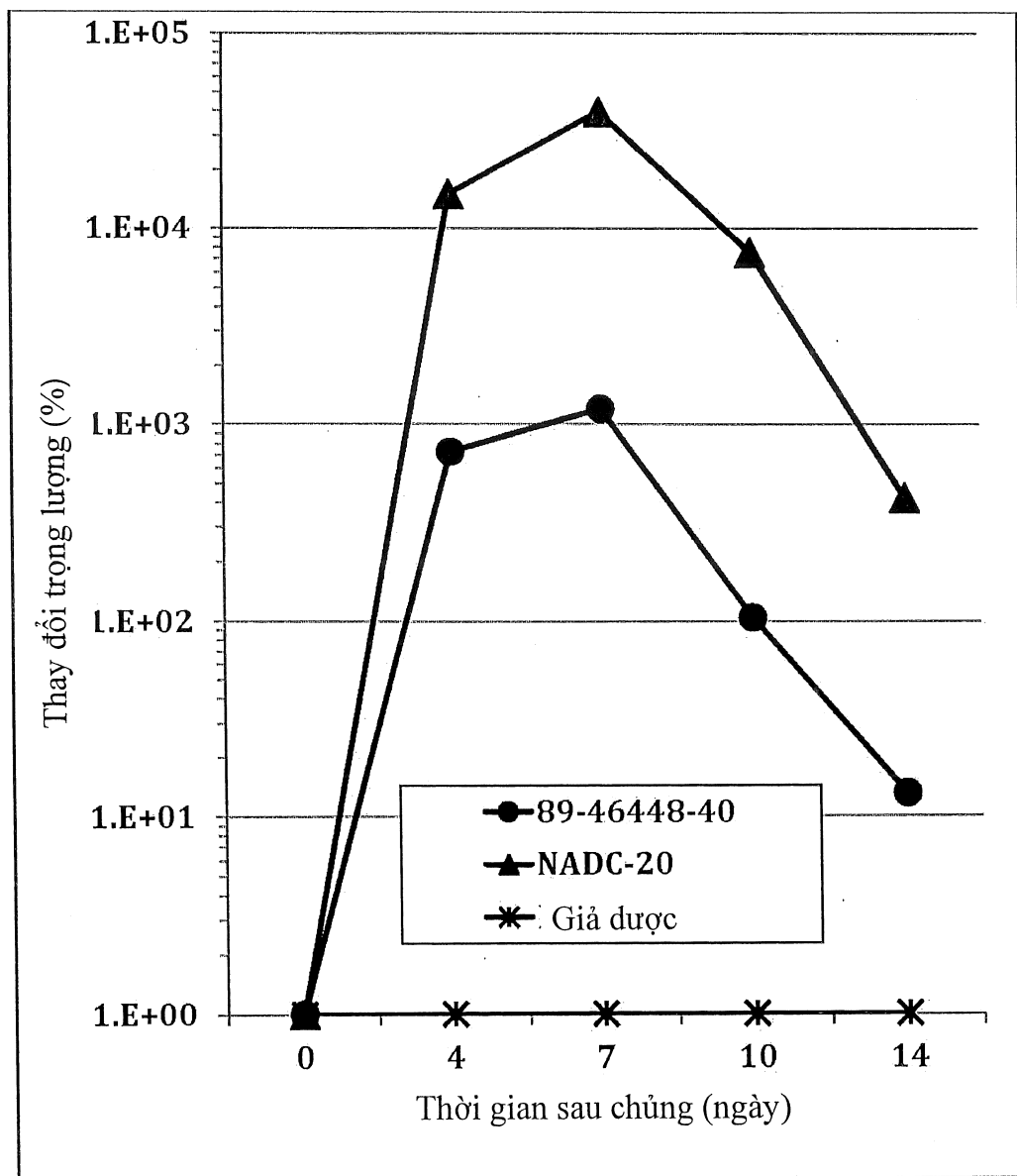


FIG.1

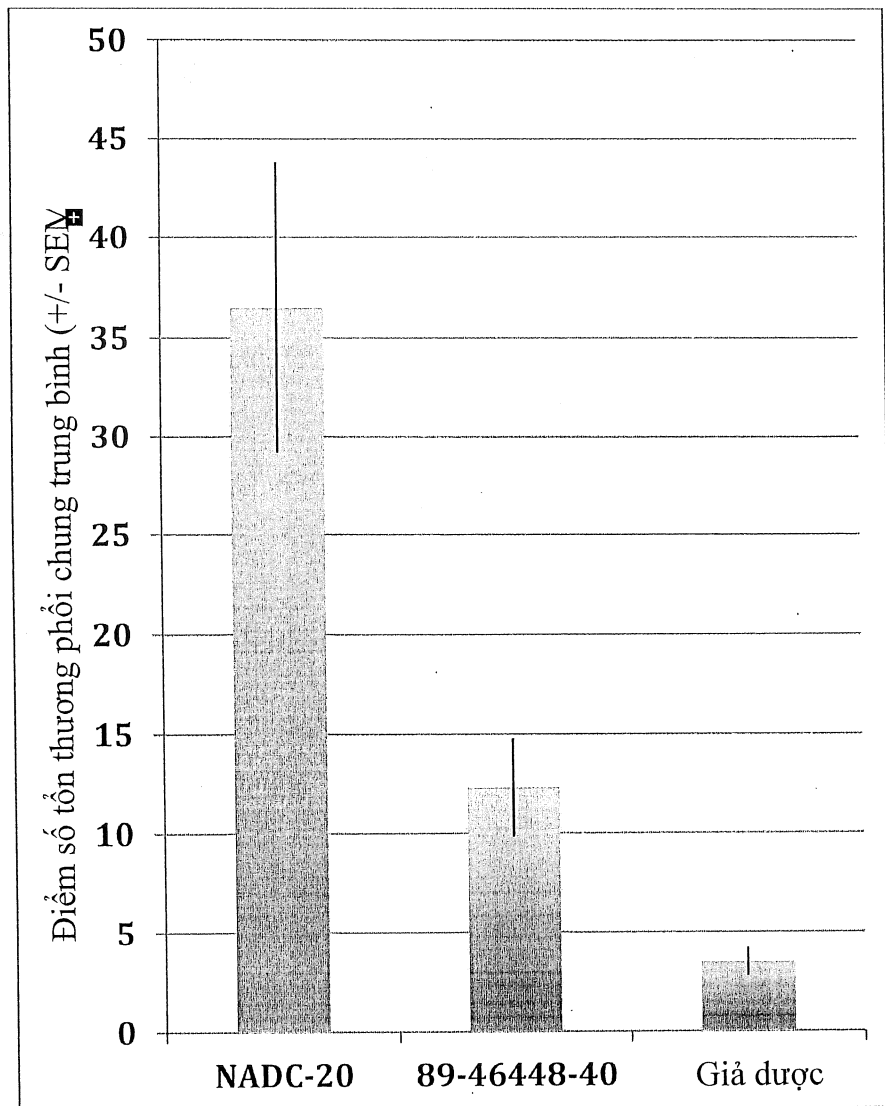


FIG.3

4/19

Nsp2 (amino axit 14 < > 523)

	63							72	
89-46448-40	A	N	R	M	V/M	N	S	K	F E (SEQ ID NO:4)
794A61	.	.	.	.	V	.	.	.	(SEQ ID NO:5)
111698	.	.	.	.	V	.	.	.	(SEQ ID NO:5)
G16X	.	.	.	.	V	.	.	.	(SEQ ID NO:5)
	334							343	
89-46448-40	L	A	N	Y	Y	Y	R	A	Q G (SEQ ID NO:6)
794A61	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:6)
111698	.	.	.	.	H	.	.	.	(SEQ ID NO:7)
G16X	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:6)
	488							497	
89-46448-40	D	L	E/S	T	P	P	E	P	A T (SEQ ID NO:8)
794A61	.	.	S	.	.	.	.	L	. (SEQ ID NO:9)
111698	.	.	S	.	.	.	.	L	. (SEQ ID NO:9)
G16X	.	.	P	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:10)

FIG.4A

Protein E (amino axit 1 - 73)

	27							36	
89-46448-40	V	D	I	I	I	F	L	A	I L (SEQ ID NO:11)
794A61	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:11)
111698	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:11)
G16X	.	.	.	.	V	.	.	.	(SEQ ID NO:12)
	56							65	
89-46448-40	A	I	L	R	T	R	P	A	I H (SEQ ID NO:13)
794A61	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:13)
111698	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:13)
G16X	.	.	.	.	A	.	.	.	(SEQ ID NO:14)

FIG.4B

5/19

GP3 (amino axit 1 - 254)

	90							99	
89-46448-40	L	G	F	M	I	P	<u>P/S</u>	G	L S (SEQ ID NO:15)
794A61	.	.	.	.	V	.	S	.	. (SEQ ID NO:16)
111698	.	.	.	.	V	.	S	.	. (SEQ ID NO:16)
G16X	.	.	.	.	V	.	S	.	. (SEQ ID NO:16)
	209							218	
89-46448-40	S	V	R	V	L	Q	T	L R P	(SEQ ID NO:17)
794A61	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:17)
111698	.	.	.	.	F	.	.	.	(SEQ ID NO:18)
G16X	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:17)

FIG.4C

GP4 (amino axit 1 > 126)

	28							37	
89-46448-40	S	S	S	L	A	D	I	K T N	(SEQ ID NO:19)
794A61	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:19)
111698	.	.	.	.	S	.	.	.	(SEQ ID NO:20)
G16X	.	.	.	.	.	.	.	.	(SEQ ID NO:19)

FIG.4D

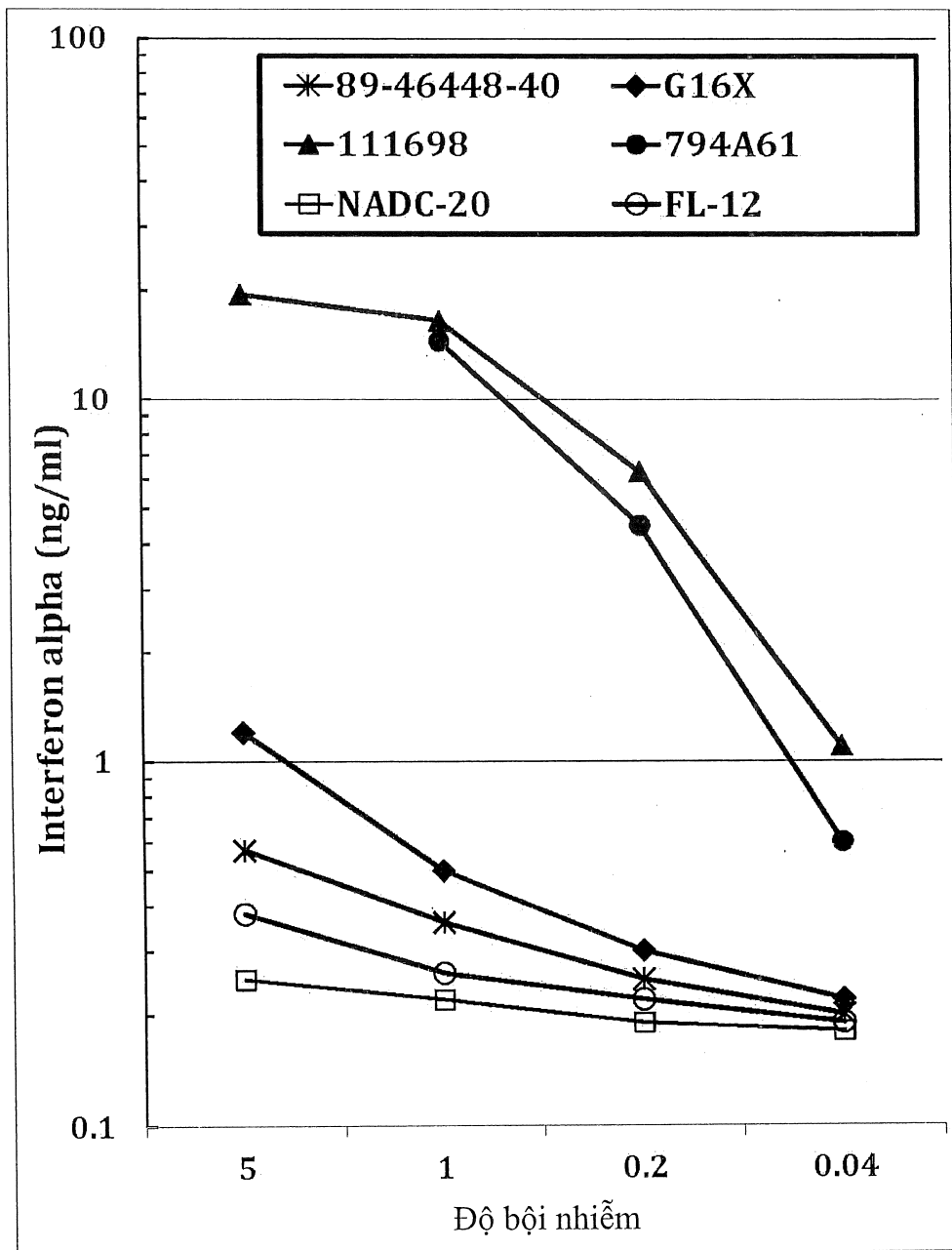


FIG.5

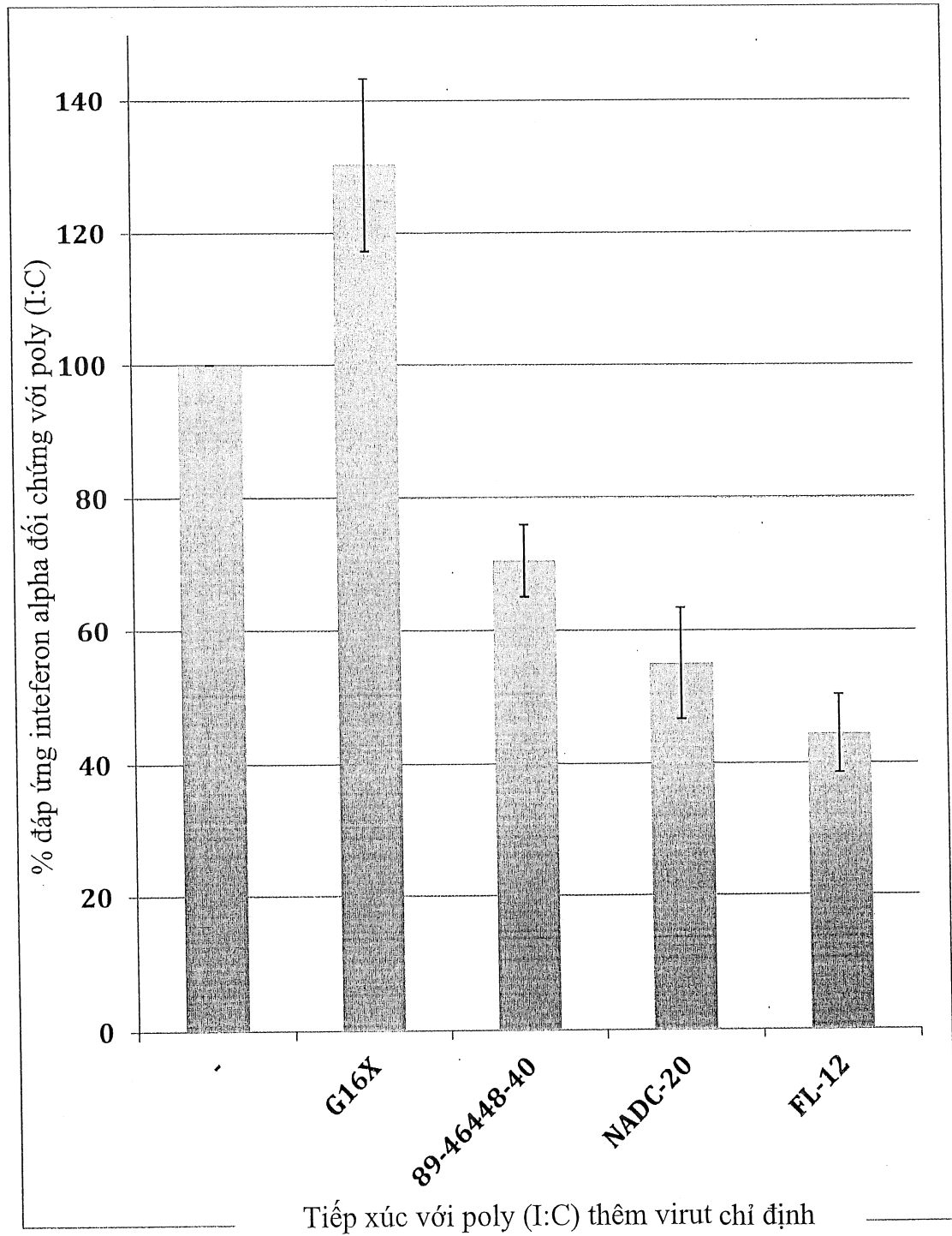


FIG.6

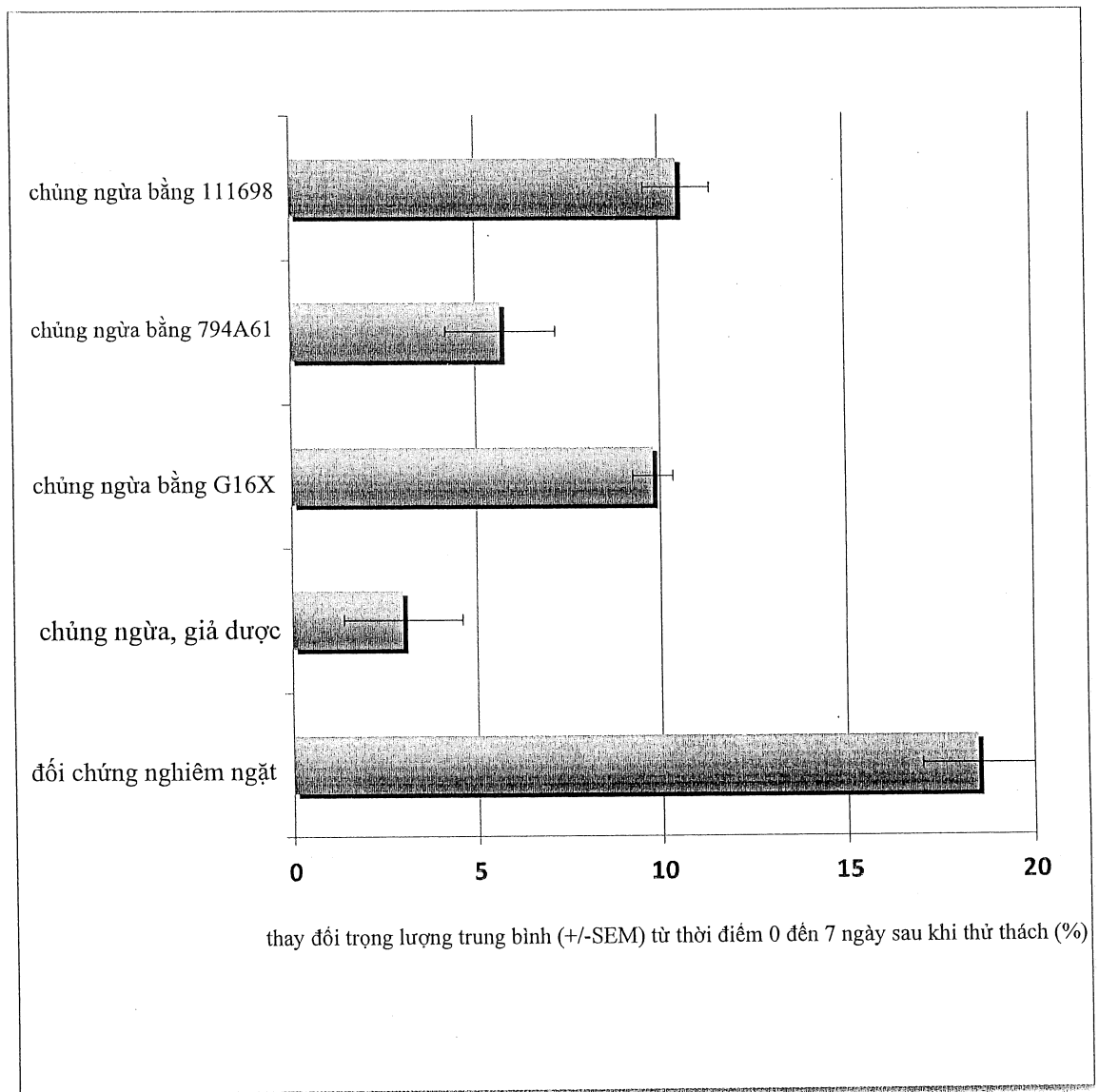


FIG.7

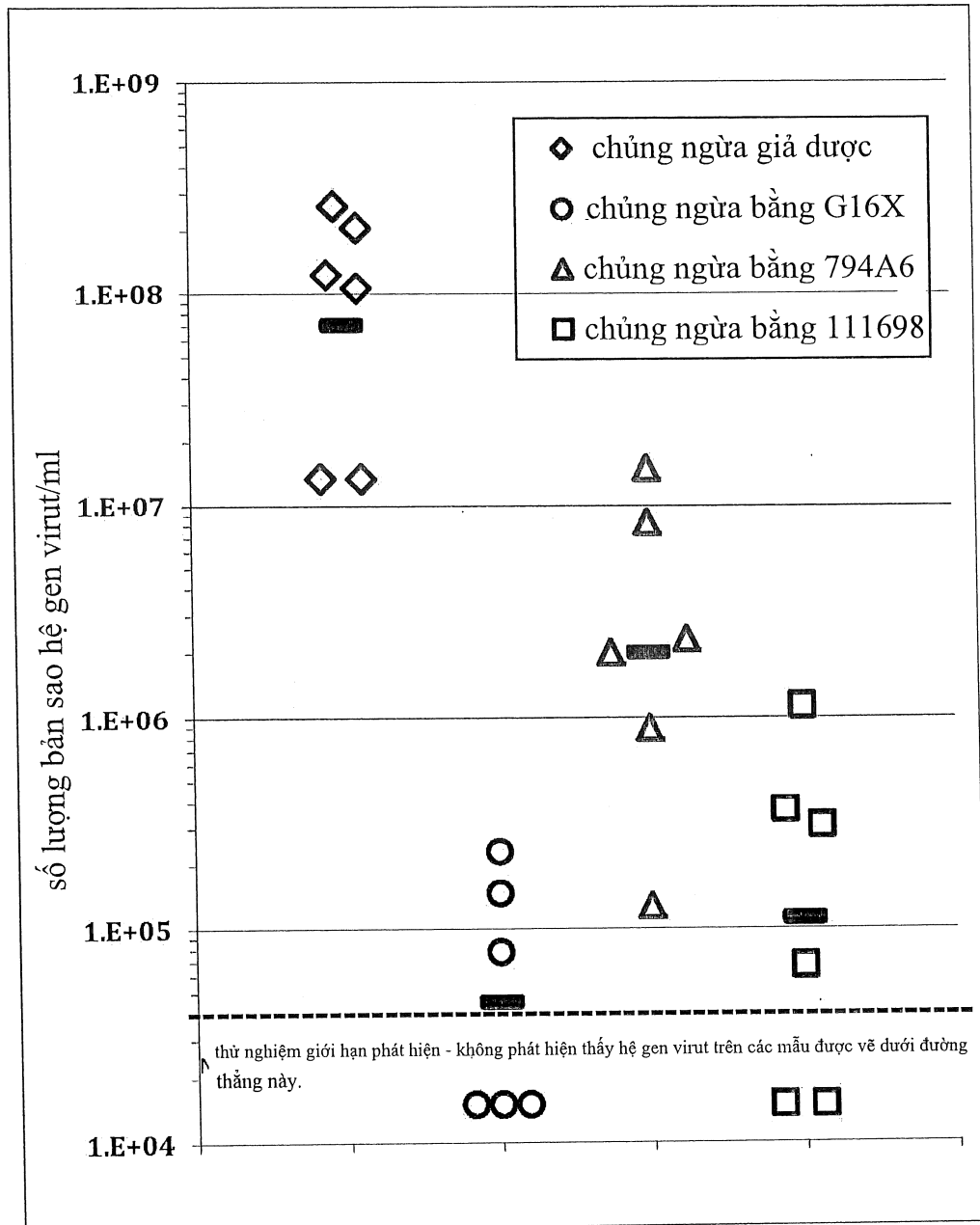


FIG.8

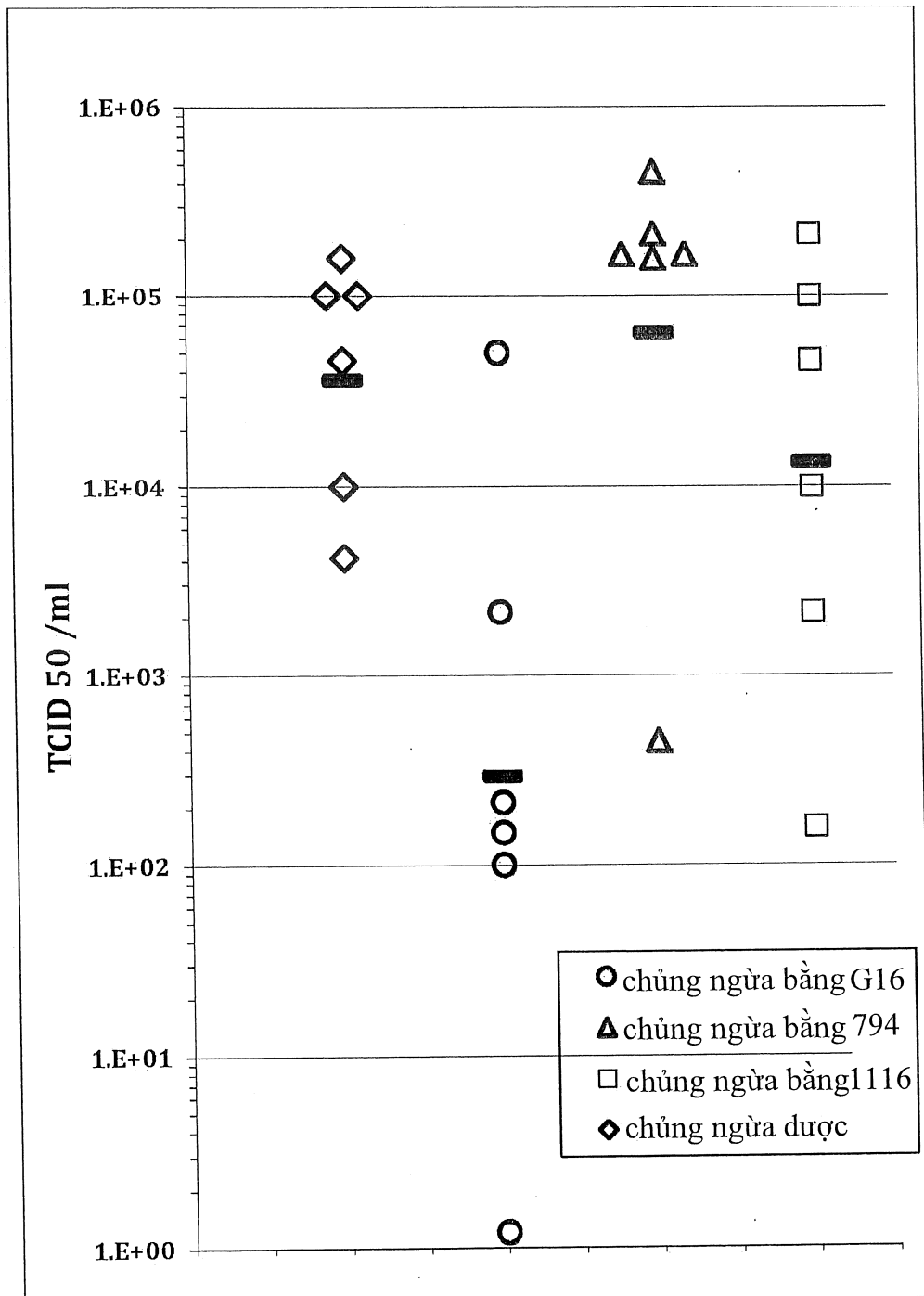


FIG.9

[illegible]

G16X: M G S M Q S L F D K I G Q L F V D A F T E F L V S I V D I I V F L A I L F G F T
 10 20 30 40
 G16X: I A G W L V V F C I R L V C S A I L R A R P A I H S E Q L Q K I L
 50 60 70 73

46448-40: M G S M Q S L F D K I G Q L F V D A F T E F L V S I V D I I I F L A I L F G F T
 46448-40: I A G W L V V F C I R L V C S A I L R F R P A I H S E Q L Q K I L

12/19

Fig. 11A. So sánh trình tự axit amin phỏng đoán của GP4 liên quan tới thể phân lập PRRSV G16X (SEQ ID: 23), 89-46448-40 (SEQ ID: 23), 794 A61 (SEQ ID: 23) và 111698 (SEQ ID: 24)

	10	20	30	40
G16X: M A A S L L F L M V G F K C L L V S Q A F A C K P C F S S S L A D I K T N T T A				
46448-40:				
794A61:				
111698:			S	
	50	60	70	80
G16X: A A S F A V L Q D I S C L R H R N S A S E A I R K I P Q C R T A I G T P V Y I T				
46448-40:				
794A61:				
111698:				
	90	100	110	120
G16X: I T A N V T D E N Y L H S S D L L M L S S C L F Y A S E M S E K G F K V V F G N				
46448-40:				
794A61:				
111698:				
	130	140	150	160
G16X: V S G I V A V C V N F T S Y V Q H V R E F T Q R S L M V D H V R L L H F M T P E				
46448-40:				
794A61:				
111698:				
	170	178		
G16X: T M R W A T V L A C L F A I L L A I				
46448-40:				
794A61:				
111698:				

Fig. 11B. SEQ ID 23: Trình tự axit amin phỏng đoán của GP4 liên quan tới thể phân lập PRRSV 89-46448-40

46448-40: M A A S L L F L M V G F K C L L V S Q A F A C K P C F S S L A D I K T N T T A 40
10 20 30
50 60 70 80
46448-40: A A S F A V L Q D I S C L R H R N S A S E A I R K I P Q C R T A I G T P V Y I T 120
90 100 110
46448-40: I T A N V T D E N Y L H S S D L L M L S S C L F Y A S E M S E K G F K V V F G N 160
130 140 150
46448-40: V S G I V A V C V N F T S Y V Q H V R E F T Q R S L M V D H V R L L H F M T P E 170
178
46448-40: T M R W A T V L A C L F A I L L A I 178

Fig. 11C. SEQ ID 24: Trình tự axit amin phỏng đoán của GP4 liên quan tới thể phân lập PRRSV 111698

111698: M A A S L L F L M V G F K C L L V S Q A F A C K P C F S S L S D I K T N T T A 40
10 20 30 40
50 60 70 80
111698: A A S F A V L Q D I S C L R H R N S A S E A I R K I P Q C R T A I G T P V Y I T 120
90 100 110
111698: I T A N V T D E N Y L H S S D L L M L S S C L F Y A S E M S E K G F K V V F G N 160
130 140 150
111698: V S G I V A V C V N F T S Y V Q H V R E F T Q R S L M V D H V R L L H F M T P E 170
178
111698: T M R W A T V L A C L F A I L L A I 178

14/19

Fig. 12A. So sánh trình tự axit amin phỏng đoán của GP3 liên quan tới thể phân lập PRRSV G16X, 89-46448-40, 794 A61 và 111698

	10	20	30	40
G16X: M V N S C T F L H I F L C C S F L Y S L C C A V V A G S N T T Y C F W F P L V R				
46448-40:				
794A61:				
111698:	50	60	70	80
G16X: G N F S F E L T V N Y T V C P P C L T R Q A A A E A Y E P G R S L W C R I G Y D				
46448-40:				
794A61:				
111698:	90	100	110	120
G16X: R C G E D D H D E L G F M V P S G L S S E G H L T S V Y A W L A F L S F S Y T A				
46448-40:				
794A61:				
111698:	130	140	150	160
G16X: Q F H P E I F G I G N V S R V Y V D I E H Q L I C A E H D G Q N T T L P R H D N				
46448-40:				
794A61:				
111698:	170	180	190	200
G16X: I S A V F Q T Y Y Q H Q V D G G N W F H L E W L R P F F S S W L V L N V S W F L				
46448-40:				
794A61:				
111698:	210	220	230	240
G16X: R R S P A N H V S V R V L Q T L R P T P P Q R Q A L L S S K T S V A L G I A T R				
46448-40:				
794A61:				
111698:	250	254		
G16X: P L R R F A K S L S A V R R				
46448-40:				
794A61:				
111698:				

Fig. 12B. SEQ ID 21: Trình tự axit amin phỏng đoán của GP3 liên quan tới thể phân lập PRRSV 89-46448-40

```

46448-40: M V N S C T F L H I F L C C S F L Y S L C C A V V A G S N T T Y C F W F P L V R 40
           10      50      60      70
46448-40: G N F S F E L T V N Y T V C P P C L T R Q A A A E A Y E P G R S L W C R I G Y D 80
           90
46448-40: R C G E D D H D E L G F M I P r/s G L S S E G H L T S V Y A W L A F L S F S Y T A 120
           130
46448-40: Q F H P E I F G I G N V S R V Y V D I E H Q L I C A E H D G Q N T T L P R H D N 160
           170
46448-40: I S A V F Q T Y Y Q H Q V D G G N W F H L E W L R P F F S S W L V L N V S W F L 200
           210
46448-40: R R S P A N H V S V R V L Q T L R P T P P Q R Q A L L S S K T S V A L G I A T R 240
           250
46448-40: P L R R F A K S L S A V R R 254

```

Fig. 12C. SEQ ID 22: Trình tự axit amin phỏng đoán của GP3 liên quan tới thể phân lập PRRSV GP3

```

G16X      : M V N S C T F L H I F L C C S F L Y S L C C A V V A G S N T T Y C F W F P L V R 40
           10      50      60      70
G16X      : G N F S F E L T V N Y T V C P P C L T R Q A A A E A Y E P G R S L W C R I G Y D 80
           90
G16X      : R C G E D D H D E L G F M V P S G L S S E G H L T S V Y A W L A F L S F S Y T A 120
           130
G16X      : Q F H P E I F G I G N V S R V Y V D I E H Q L I C A E H D G Q N T T L P R H D N 160
           170
G16X      : I S A V F Q T Y Y Q H Q V D G G N W F H L E W L R P F F S S W L V L N V S W F L 200
           210
G16X      : R R S P A N H V S V R V L Q T L R P T P P Q R Q A L L S S K T S V A L G I A T R 240
           250
G16X      : P L R R F A K S L S A V R R 254

```

FIG.13

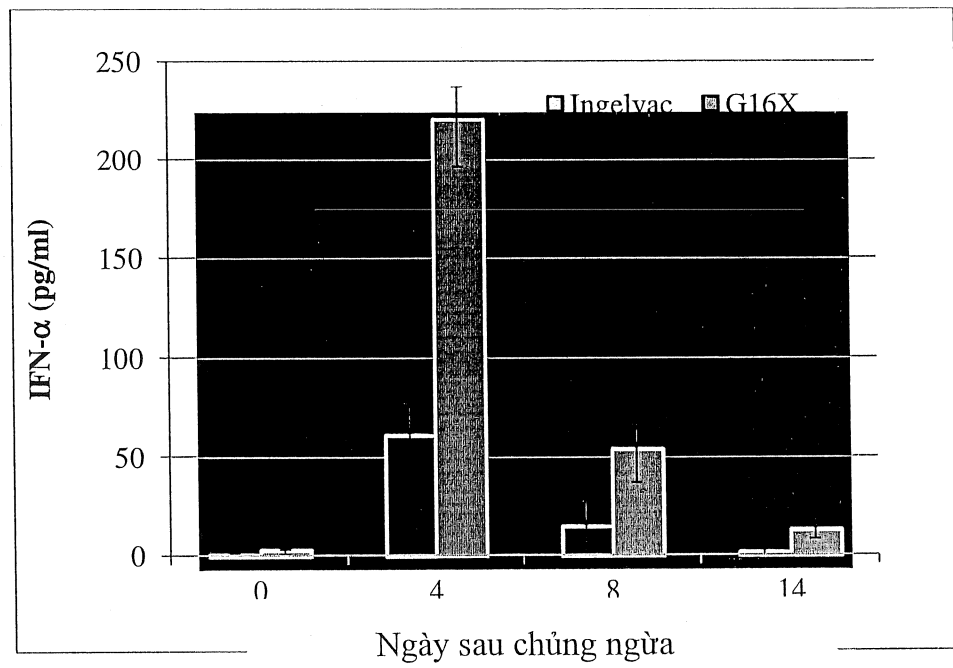


FIG. 14

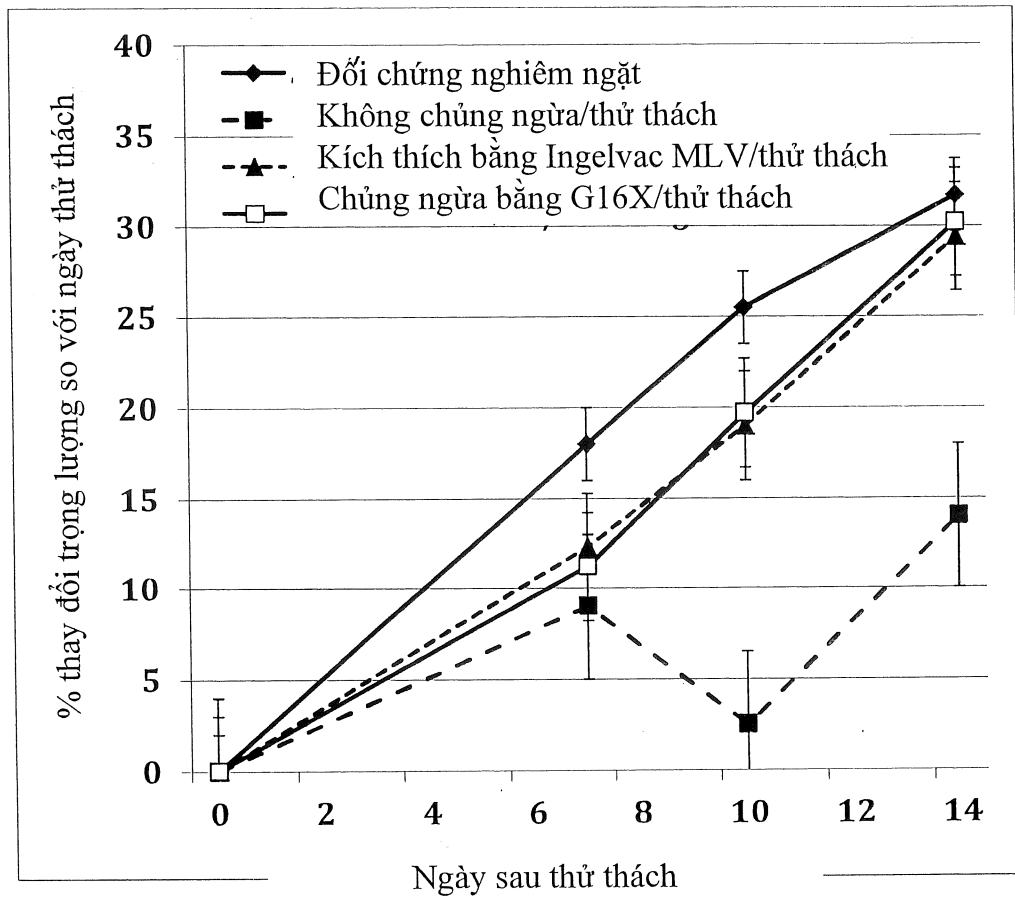


FIG. 15

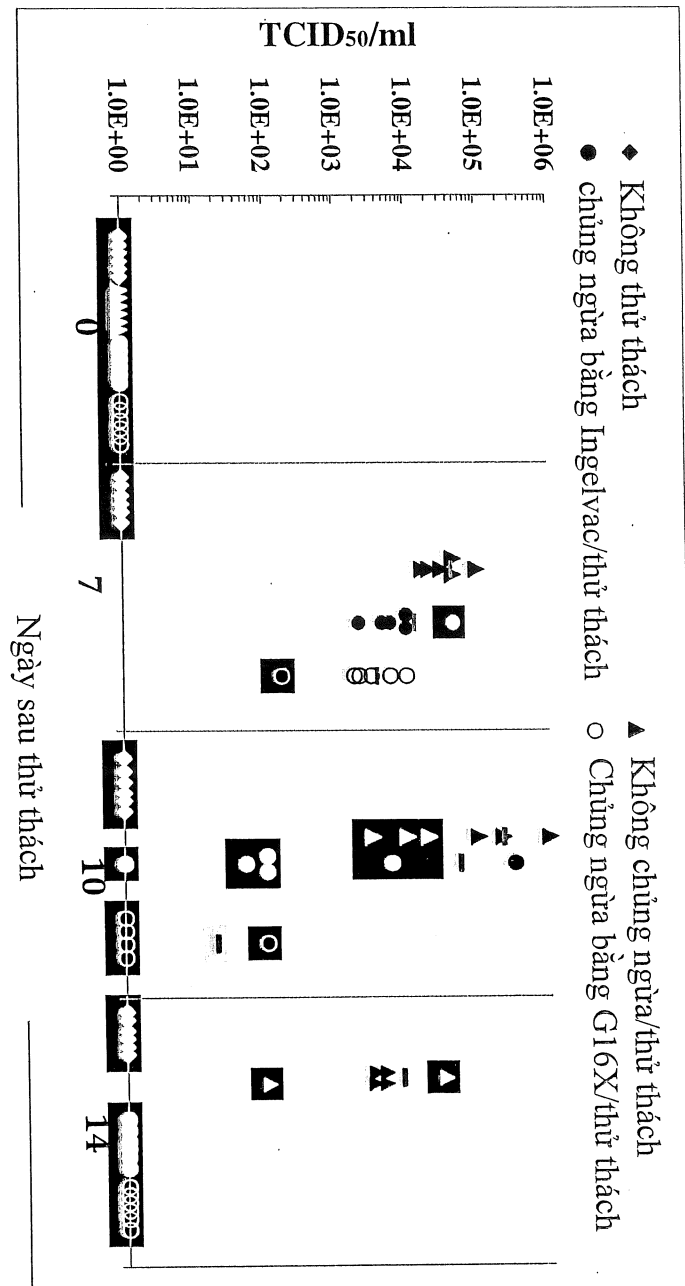


FIG.16

