



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

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

(11)



1-0041669

(51)⁷ C12N 15/86; A61K 39/245; C12N 7/00; (13) B
A61K 39/00; C07K 14/005

(21) 1-2018-05713

(22) 11/05/2017

(86) PCT/SG2017/050246 11/05/2017

(87) WO 2017/200484 23/11/2017

(30) 62/338,939 19/05/2016 US

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/04/2019 373A

(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)

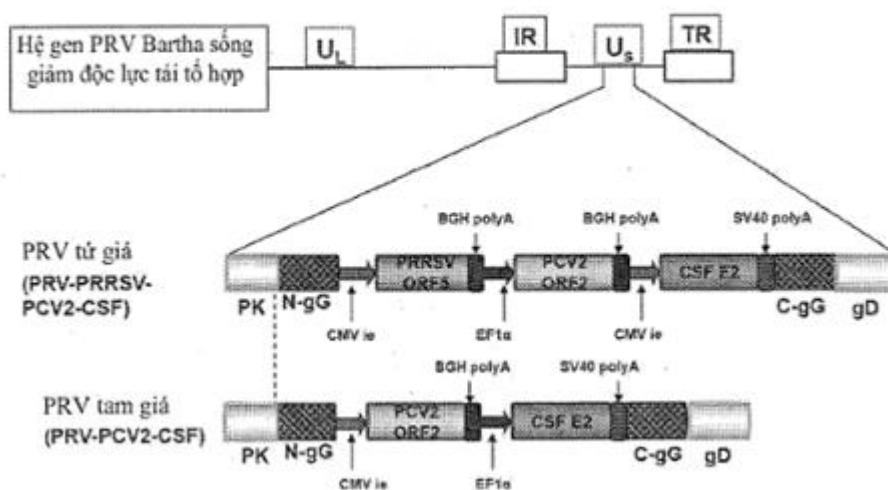
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore

(72) PRABAKARAN, Mookkan (SG); RUI, Tan Yun (SG).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) AXIT NUCLEIC CẤU TRÚC, VECTƠ VÀ DÒNG TẾ BÀO CỦA ĐỘNG VẬT CÓ VÚ

(57) Sáng chế đề cập đến axit nucleic cấu trúc, vectơ, dòng tế bào của động vật có vú, và vaccin đa giá phòng các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn. Theo một phương án, vaccin đa giá là vectơ virus giả đại tái tổ hợp chứa kháng nguyên có nguồn gốc từ virus circo ở lợn, virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển và, tùy ý, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin đa giá phòng các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn. Theo một phương án, vaccin đa giá là vector virus giả đại tái tổ hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các công bố và các tài liệu chuyên ngành khác dùng trong bản mô tả này để làm sáng tỏ tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc đưa ra chi tiết hơn liên quan đến thực tiễn, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn, và để thuận tiện, được tập hợp lại tương ứng trong danh mục tài liệu tham khảo.

Virus giả đại (Pseudorabies virus - PRV) thuộc phân họ *Alphaherpesvirinae* của họ *Herpesviridae*, là tác nhân gây ra bệnh Aujeszky. PRV thường thấy ở các nước đang phát triển và gây thiệt hại kinh tế lớn trong ngành chăn nuôi lợn. Các vaccin PRV sống giảm độc lực đóng vai trò then chốt để ngăn ngừa và tiêu diệt PRV (Pomeranz và các đồng tác giả, 2005). PRV Bartha-K61 là chủng vaccin PRV giảm độc lực với gE và một phần của gen gI đã được loại bỏ (Klupp và các đồng tác giả, 2012; Dong và các đồng tác giả, 2014). Ngoài ra, một số báo cáo trước đây đã mô tả PRV Bartha-K61 sống giảm độc lực là vector vaccin tuyệt vời để biểu hiện các gen có tính kháng nguyên khác loại (Nie và các đồng tác giả, 2011; Li và các đồng tác giả, 2008; Song và các đồng tác giả, 2007; Xu và các đồng tác giả, 2004; Jiang và các đồng tác giả, 2007). Vì vậy, các tác giả sáng chế đã sử dụng chủng vaccin PRV Bartha-K61 sống giảm độc lực làm vector để biểu hiện nhiều gen có tính kháng nguyên của các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn.

Circovirus ở lợn (Porcine circovirus - PCV), một thành viên thuộc họ *Circoviridae*, là hệ gen ADN vòng sợi đơn. PCV2 là nguyên nhân chính của hội chứng còi cọc của lợn con sau cai sữa (post-weaning multisystemic wasting syndrome - PMWS) mà phát triển ở lợn bị nhiễm. Sự nhiễm bệnh được đặc trưng bởi bệnh tiêu chảy, sự giảm mức độ tăng trọng, chết đột ngột, hạch bạch huyết phát triển, sự suy kiệt hô hấp và sự tạo thành tế bào không lồ đa nhân (Liu và các đồng tác giả, 2005). ORF2 là một trong số các khung đọc mở chủ yếu trong hệ gen PCV2. Nó mã hóa protein vỏ capsit (Cap) mà là

protein virus có tính trội miễn dịch mà có thể được dùng làm đích lý tưởng đối với sự phát triển vaccin dùng cho lợn.

Virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển (Classical swine fever - CSF) là bệnh do virus có tính lây nhiễm cao và quan trọng về mặt kinh tế mà ảnh hưởng đến lợn nhà và lợn rừng. Virus CSF (CSFV) là virus ARN sợi đơn có nghĩa dương và một thành viên thuộc giống Pestivirus trong họ Flaviviridae. Glycoprotein vỏ E2 chứa bốn miền có tính kháng nguyên và nó có thể gây ra sự miễn dịch bảo vệ phòng CSFV trong đàn lợn. Do đó, glycoprotein E2 là ứng viên tiềm năng để thiết kế vaccin CSFV (Zhang và các đồng tác giả, 2014). Các vaccin bất hoạt nguyên vẹn có bán trên thị trường trên cơ sở chủng C là có hiệu quả và tạo ra sự bảo vệ đầy đủ phòng ba nhóm CSFV nhưng không thể mang lại khả năng phân biệt động vật đã bị nhiễm so với các động vật đã được chủng ngừa (Zhang và các đồng tác giả, 2014).

Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV) được phân loại trong họ *Arteriviridae* thuộc bộ *Nidovirales*. Nó là virus ARN sợi dương, có vỏ mà dẫn đến sự phát triển hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS). Sự nhiễm PRRSV có thể gây sảy thai ở giai đoạn muộn ở lợn nái, suy sinh sản hàng loạt, và rối loạn hô hấp ở lợn con. Hệ gen PRRSV bao gồm chín khung đọc mở mã hóa 7 protein cấu trúc và 14 protein không cấu trúc. Trong số đó, glycoprotein (GP) 5 là protein vỏ chủ yếu được mã hóa bởi ORF5. Nó là một trong số các protein sinh miễn dịch quan trọng của PRRSV mà cần thiết cho sự lắp ráp virus, khả năng gây nhiễm và sự kích thích tạo ra kháng thể trung hòa. ORF5 là một trong số các vùng biến đổi nhất của hệ gen PRRSV và nó đã được sử dụng một cách rộng rãi để nghiên cứu dịch tễ học phân tử của PRRSV. GP5 còn là đích dẫn tới trong quá trình phát triển vaccin phòng nhiễm PRRSV (Li và các đồng tác giả, 2012).

Các vaccin và các chương trình chủng ngừa hiện có là phức tạp và khó để gây miễn dịch phòng tất cả bốn bệnh theo cách riêng rẽ, dẫn đến cần phải tiêm nhiều lần và nhắc lại nhiều lần. Vì vậy, việc phát triển của vaccin đa giá phòng bốn bệnh này sẽ cần nhiều thời gian và hữu hiệu về mặt chi phí, và cũng có thể dẫn đến vaccin có hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực vaccin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vaccin đa giá phòng các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn. Theo một phương án, vaccin đa giá là vector virus giả đại tái tổ hợp.

Sáng chế mô tả việc sử dụng chủng vaccin giả đại (PRV) sống giảm độc lực đã được thiết lập, như chủng Bartha-K61, làm vector vaccin để biểu hiện nhiều chất kháng nguyên từ các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn của PCV2, CSF và PRRSV. Hệ gen PRV xấp xỉ 140 kb và bao gồm vùng dài duy nhất (unique long - UL), vùng ngắn duy nhất (unique short - US), các trình tự lặp lại đảo chiều lớn, các đoạn lặp bên trong (internal repeat - IR), và các đoạn lặp tận cùng (terminal repeat - TR). Một nửa của hệ gen được coi là các vùng không thiết yếu như protein kinaza (protein kinase - PK), thymidin kinaza (thymidine kinase - TK), gE, gG và gI, do đó cho phép cải biến hoặc cài xen các gen ngoại lai mà không ảnh hưởng đến sự sao chép của virus. Ngoài ra, các đặc tính độ an toàn và hiệu quả bảo vệ đã được ghi nhận trong các tài liệu chuyên ngành của chủng vaccin PRV Bartha-K61 đã được sử dụng trong hàng thập kỷ để kiểm soát thành công bệnh Aujeszky. Theo sáng chế, vaccin PRV tứ giá phòng PRRSV, PCV2, CSF và PRV và vaccin PRV tam giá phòng PCV2, CSF và PRV đã được tạo ra.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vaccin PRV tứ giá phòng PRRSV, PCV2, CSF và PRV. Theo khía cạnh này, axit nucleic cấu trúc được tạo ra mà bao gồm gen của PRRSV, gen của PCV2 và gen của CSF. Theo một số phương án, gen PRRSV là gen PRRSV ORF5. Theo một số phương án, gen PRRSV ORF5 có nguồn gốc từ chủng Trung Quốc PRRSV có khả năng gây bệnh cao (HP-HRRSV-JXA1). Theo một số phương án, gen PCV2 là gen PCV2 ORF2. Theo một số phương án, gen PCV2 có nguồn gốc từ chủng In-đô-nê-xi-a PCV2 (kiểu gen 2B) (PCV2 TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130941). Theo một số phương án, gen CFS là gen CFS E2. Theo một số phương án, gen CFS E2 có nguồn gốc từ sự xuất hiện mới của dưới kiểu gen 2.1 của chủng In-đô-nê-xi-a CSF) (CSF TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130940).

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Trình tự khởi động thích hợp bất kỳ hoạt động trong các tế bào của động vật có vú có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, trình tự khởi động là trình tự khởi động của virus cự bào (cytomegalovirus - CMV). Theo một số phương án, trình tự khởi động CMV là trình tự khởi động CMV rất

sớm (CMV intermediate early - CMV ie) . Theo một số phương án, trình tự khởi động này là trình tự khởi động của yếu tố kéo dài 1 alpha (elongation factor 1 alpha - EF1 α).

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự kết thúc hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Trình tự kết thúc thích hợp bất kỳ hoạt động trong các tế bào của động vật có vú có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, trình tự kết thúc này là trình tự hormon sinh trưởng của loài bò được polyadenyl hóa (bovine growth hormone polyadenylation - BGH polyA). Theo một số phương án, trình tự kết thúc là trình tự virus SV40 được polyadenyl hóa (SV40 virus polyadenylation - SV40 polyA).

Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được đề xuất mà bao gồm gen PRRSV, gen PCV2 và gen CSF được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc này còn bao gồm trình tự khởi động và/hoặc trình tự kết thúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc còn bao gồm các trình tự gG của PRV. Theo một số phương án, PRV là chủng PRV Bartha-K61. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo một số phương án, chủng PRV được đề xuất trong đó chủng PRV này được cải biến để chứa axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, PRV được cải biến là chủng PRV Bartha-K61 được cải biến. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc trong chủng PRV được cải biến là ổn định mà không có các đột biến hoặc mất đoạn sau năm lần cấy truyền trong các tế bào thận lợn 15 (pig kidney 15 - PK-15) . Theo một số phương án, các tế bào PK-15 là các tế bào PK-15 ATCC® CCL-33™ thu được từ bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ.

Theo một số phương án, dòng tế bào được đề xuất mà được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này theo cách thích hợp để tạo ra virus hữu ích cho vaccin tứ giá. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được cài xen vào trong chủng PRV được mô tả trong bản mô tả này bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong dòng tế bào được chuyển nạp. Theo một số phương án, dòng tế bào này là tế bào PK-15 được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất vaccin PRV tam giá phòng PCV2, CSF và PRV. Theo khía cạnh này, axit nucleic cấu trúc được tạo ra mà bao gồm gen của

PCV2 và gen của CSF. Theo một số phương án, gen PCV2 và gen CSF là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, trình tự khởi động là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự kết thúc hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, trình tự kết thúc là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được đề xuất mà bao gồm gen PCV2 và gen CSF được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc này còn bao gồm trình tự khởi động và/hoặc trình tự kết thúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc còn bao gồm các trình tự gG của PRV. Theo một số phương án, PRV là chủng PRV Bartha-K61. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một số phương án, chủng PRV được đề xuất trong đó chủng PRV này được cải biến để chứa axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chủng PRV được cải biến là như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc trong chủng PRV được cải biến là ổn định mà không có các đột biến hoặc mất đoạn sau năm lần cấy truyền trong các tế bào thận lợn 15 (pig kidney 15 - PK-15) . Theo một số phương án, các tế bào PK-15 là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, dòng tế bào được đề xuất mà được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này theo cách thích hợp để tạo ra virus hữu ích cho vacxin tam giá. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được cài xen vào trong chủng PRV được mô tả trong bản mô tả này bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong dòng tế bào được chuyển nạp. Theo một số phương án, dòng tế bào này là tế bào PK-15 được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất kit để tạo miễn dịch cho đối tượng bằng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này. Kit này bao gồm PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này, chất mang được dụng, dụng cụ chuyên dùng, và tài liệu hướng dẫn để sử dụng nó.

Sáng chế mô tả các phương pháp sử dụng. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng, ví dụ, lợn, bao gồm việc cho đối tượng này dùng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này với lượng có tác dụng dự phòng, điều trị, hoặc miễn dịch. Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa cho đối tượng khỏi bị nhiễm PRV, PRRSV, PCV và CSF hoặc PRV, PCV và CSF bao gồm việc đối tượng này dùng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này với lượng có tác dụng dự phòng, điều trị hoặc miễn dịch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện chiến lược tạo cấu trúc rPRV theo một phương án của sáng chế. Hệ gen virus giả dại (PRV): vùng dài duy nhất (U_L), đoạn lặp bên trong (IR), vùng ngắn duy nhất (U_S), và đoạn lặp tận cùng (TR). PRV tứ giá biểu hiện PRRSV-ORF5, PCV2-ORF2, CSF-E2; PRV tam giá biểu hiện PCV2-ORF2, CSF-E2. Các từ viết tắt: N-gG = Đầu N (amino) của glycoprotein G; C-gG = Đầu carboxyl của glycoprotein; PK = protein kinaza; CMV ie = trình tự khởi động rất sớm của virus cừu bào của người; trình tự khởi động EF1 α = trình tự khởi động của yếu tố kéo dài 1 alpha; trình tự kết thúc SV40 polyA, hormon sinh trưởng của loài bò được polyadenyl hóa (BGH polyA).

Fig.2A và Fig.2B thể hiện các thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch của các tế bào PK15 được làm nhiễm bằng vacxin đa giá. Fig.2A: Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang của các tế bào PK15 được làm nhiễm bằng PRV nhị giá (ORF2-PRV) hoặc PRV tam giá (ORF2-E2-PRV) hoặc PRV tứ giá (ORF5-ORF2-E2-PRV) trong 36 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO₂. Tín hiệu kháng ORF2 (huyết thanh tăng miễn dịch của chuột nhắt) được thấy trong tất cả các cấu trúc. Fig.2B: Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang của các tế bào PK15 được làm nhiễm bằng PRV tam giá (ORF2-E2-PRV) hoặc PRV tứ giá (ORF5-ORF2-E2-PRV) trong 36 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO₂. Tín hiệu kháng E2 (huyết thanh tăng miễn dịch của chuột nhắt) được thấy trong tất cả các cấu trúc.

Fig.3 thể hiện các nhóm chuột nhắt (n=8/nhóm) được gây miễn dịch bằng vacxin PRV tam giá hoặc tứ giá vào ngày 0 và 21. Huyết thanh được gom lại vào ngày 20 và 42. Các mức kháng thể IgG đặc hiệu PRV/CSF/PCV2/PRRSV trong huyết thanh vào ngày 20 & 42 bằng ELISA gián tiếp.

Fig.4 thể hiện các nhóm chuột nhắt (n=8/nhóm) được gây miễn dịch bằng vacxin PRV tam giá hoặc tứ giá vào ngày 0 và 21. Huyết thanh được gom lại vào ngày 20 và 42.

Các kết quả thể hiện hiệu giá kháng thể đặc hiệu PCV2-ORF2 hoặc CSF-E2 trong huyết thanh vào ngày 42 (21 ngày sau lần tạo miễn dịch thứ hai).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vaccin đa giá phòng các bệnh do virus nguy hiểm gây ra ở lợn. Theo một phương án, vaccin đa giá là vectơ virus giả đại tái tổ hợp.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế này.

Thuật ngữ “sự biểu hiện” đối với trình tự gen được dùng để chỉ sự phiên mã của gen và, khi thích hợp, sự dịch mã của sản phẩm phiên mã ARN thông tin thu được thành protein. Do đó, như sẽ rõ ràng trong ngữ cảnh, sự biểu hiện của trình tự mã hóa protein là do sự phiên mã và sự dịch mã của trình tự mã hóa.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “gen” chỉ trình tự axit nucleic mà bao gồm vùng mã hóa của sản phẩm gen.

“Được đưa vào” trong trường hợp cài xen mảnh axit nucleic (ví dụ, cấu trúc ADN tái tổ hợp) vào trong tế bào, có nghĩa là “sự chuyển nạp” hoặc “sự biến nạp” hoặc “sự tải nạp” và bao gồm việc đề cập đến sự kết hợp của mảnh axit nucleic vào trong tế bào nấm men hoặc nấm trong đó mảnh axit nucleic có thể được kết hợp vào trong hệ gen của tế bào (ví dụ, nhiễm sắc thể, plasmit hoặc ADN ty thể), được chuyển hóa thành đơn vị sao chép tự trị, hoặc được biểu hiện tạm thời (ví dụ, ARN thông tin được chuyển nạp).

“Liên kết có thể hoạt động được” hoặc “được liên kết hoạt động” hoặc “được liên kết về mặt hoạt động” được sử dụng trong bản mô tả này được hiểu với nghĩa là, ví dụ, sự sắp xếp lần lượt của trình tự khởi động và axit nucleic cần được biểu hiện và, nếu thích hợp, thêm các yếu tố điều hòa, như trình tự kết thúc, theo cách mà mỗi trong số các yếu tố điều hòa có thể hoàn thành chức năng của nó trong quá trình biểu hiện tái tổ hợp của axit nucleic để tạo ra sản phẩm mong muốn. Điều này không nhất thiết cần liên kết trực tiếp theo nghĩa hóa học. Các trình tự kiểm soát di truyền, ví dụ, trình tự tăng cường, cũng có thể thực hiện chức năng của chúng trên trình tự đích từ các vị trí mà xa một chút, hoặc quả thực từ các phân tử ADN khác (xác định vị trí cis hoặc trans). Sự sắp xếp được ưu tiên là kiểu sắp xếp trong đó trình tự axit nucleic cần được biểu hiện tái tổ hợp nằm sau

trình tự có vai trò làm trình tự khởi động, sao cho hai trình tự này được liên kết đồng hóa trị với nhau. Các trình tự điều hòa hoặc kiểm soát có thể nằm ở phía 5' của trình tự nucleotit hoặc ở phía 3' của trình tự nucleotit như đã biết trong lĩnh vực này.

Các thuật ngữ “polynucleotit,” “axit nucleic” và “phân tử axit nucleic” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này để chỉ polyme của các nucleotit mà có thể là một chuỗi các nucleotit và/hoặc các nucleosit tự nhiên hoặc tổng hợp, mạch thẳng và liên tục, bao gồm axit deoxyribonucleic, axit ribonucleic, và các dẫn xuất của chúng. Nó bao gồm ADN nhiễm sắc thể, plasmit tự sao chép, các polyme truyền nhiễm của ADN hoặc ARN và ADN hoặc ARN mà thực hiện vai trò cấu trúc chủ yếu. Trừ khi có chỉ dẫn khác, các axit nucleic hoặc polynucleotit được viết từ trái sang phải theo hướng 5' đến 3'. Các nucleotit được gọi bằng mã một chữ cái đã được chấp nhận phổ biến của chúng. Các khoảng số là gồm cả các số xác định khoảng này.

Các thuật ngữ “polypeptit,” “peptit,” và “protein” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này để chỉ polyme của các gốc axit amin. Các thuật ngữ này áp dụng cho các polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là chất tương tự hóa học nhân tạo của axit amin có trong tự nhiên tương ứng, cũng như cho các polyme axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin có thể được gọi bằng các ký hiệu ba chữ cái hoặc một chữ cái đã biết phổ biến của chúng. Các trình tự axit amin được viết từ trái sang phải theo hướng lần lượt từ amino đến carboxy. Các khoảng số là gồm cả các số xác định khoảng này.

“Trình tự khởi động” được dùng để chỉ mảnh axit nucleic có khả năng kiểm soát sự phiên mã của một mảnh axit nucleic khác.

“Trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú” là trình tự khởi động có khả năng kiểm soát sự phiên mã trong các tế bào của động vật có vú dù nguồn gốc của nó có từ tế bào của động vật có vú hay không.

“Tái tổ hợp” được dùng để chỉ sự kết hợp nhân tạo của hai đoạn trình tự riêng rẽ, ví dụ, bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách thao tác các đoạn axit nucleic đã được tách ra bằng các kỹ thuật di truyền. “Tái tổ hợp” còn bao gồm việc đề cập đến tế bào hoặc vector, mà đã được cải biến bằng cách đưa axit nucleic khác loại vào hoặc tế bào có nguồn gốc từ tế bào được cải biến như vậy, nhưng không bao gồm sự biến đổi của tế bào hoặc vector bằng các biến cố có trong tự nhiên (ví dụ, sự đột biến tự phát, sự biến nạp/ sự tải

nạp/sự chuyển vị tự nhiên) như các biến cố xảy ra mà không có sự can thiệp cố ý của người.

“Cấu trúc ADN tái tổ hợp” được dùng để chỉ sự kết hợp của các mảnh axit nucleic mà thông thường không cùng được tìm thấy trong tự nhiên. Do đó, cấu trúc ADN tái tổ hợp có thể bao gồm các trình tự điều hòa và các trình tự mã hóa mà có nguồn gốc từ các nguồn khác nhau, hoặc các trình tự điều hòa và các trình tự mã hóa có nguồn gốc từ nguồn giống nhau, nhưng được sắp xếp theo cách khác so với cách sắp xếp thông thường được thấy trong tự nhiên. Các thuật ngữ “cấu trúc ADN tái tổ hợp” và “cấu trúc tái tổ hợp” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này. Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, cấu trúc ADN tái tổ hợp cũng có thể được coi là “cấu trúc ADN biểu hiện quá mức.” Thuật ngữ “axit nucleic cấu trúc” cũng có thể được sử dụng thay thế cho “cấu trúc ADN tái tổ hợp.”

“Trình tự điều hòa” được dùng để chỉ trình tự nucleotit nằm phía trước (trình tự không mã hóa 5'), nằm trong, hoặc sau (trình tự không mã hóa 3') của trình tự mã hóa, và ảnh hưởng đến sự phiên mã, việc xử lý ARN hoặc tính ổn định, hoặc sự dịch mã của trình tự mã hóa liên quan. Các trình tự điều hòa có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu dịch mã, intron, và trình tự nhận biết sự polyadenyl hóa. Các thuật ngữ “trình tự điều hòa” và “yếu tố điều hòa” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này.

Sự bắt cặp trình tự và việc tính toán phần trăm đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiều phương pháp so sánh được thiết kế để phát hiện các trình tự tương đồng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chương trình Megalign® của LASERGENE® bioinformatics computing suite (DNASTAR® Inc., Madison, WI). Trừ khi có chỉ dẫn khác, sự bắt cặp đa trình tự được đề xuất trong bản mô tả này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bắt cặp Clustal V (Higgins and Sharp (1989) *CABIOS*. 5:151-153) với các thông số mặc định (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Các thông số mặc định để bắt cặp từng đôi và việc tính toán phần trăm đồng nhất của các trình tự protein sử dụng phương pháp Clustal V là KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 và DIAGONALS SAVED=5. Đối với các axit nucleic, các thông số này là KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 và DIAGONALS SAVED=4. Sau khi bắt cặp các trình tự, bằng cách sử dụng chương trình Clustal V, có thể thu được các trị số “phần trăm đồng nhất” và “sai biệt” bằng cách xem bảng “khoảng

cách trình tự” trên cùng một chương trình; trừ khi có chỉ dẫn khác, phần trăm đồng nhất và sai biệt được đề xuất và yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này được tính theo cách này.

Theo cách khác, phương pháp bắt cặp Clustal W có thể được sử dụng. Phương pháp bắt cặp Clustal W (được mô tả bởi Higgins and Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci. 8:189-191 (1992)) có thể được thấy trong chương trình MegAlign™ v6.1 của LASERGENE® bioinformatics computing suite (DNASTAR® Inc., Madison, Wis.). Các thông số mặc định để bắt cặp đa trình tự tương ứng với GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,2, Delay Divergent Sequences=30%, DNA Transition Weight=0,5, Protein Weight Matrix=Gonnet Series, DNA Weight Matrix=IUB. Để bắt cặp từng đôi, các thông số mặc định là Alignment=Slow-Accurate, Gap Penalty=10,0, Gap Length=0,10, Protein Weight Matrix=Gonnet 250 and DNA Weight Matrix=IUB. Sau khi bắt cặp các trình tự bằng cách sử dụng chương trình Clustal W, có thể thu được các trị số “phần trăm đồng nhất” và “sai biệt” bằng cách xem bảng “khoảng cách trình tự” trong cùng chương trình này.

Thuật ngữ “dưới các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là hai trình tự lai với nhau trong các điều kiện nghiêm ngặt trung bình hoặc cao. Cụ thể hơn, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, phụ thuộc vào chiều dài của ADN. Các điều kiện cơ bản được nêu bởi Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition, chapters 6 and 7, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 và bao gồm việc sử dụng dung dịch trước rửa cho các màng lọc nitrocellulose 5xSSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (độ pH=8,0), các điều kiện lai là khoảng 50% formamit, 2xSSC đến 6xSSC ở nhiệt độ khoảng 40-50°C (hoặc các dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch Stark, trong khoảng 50% formamit ở nhiệt độ khoảng 42°C) và các điều kiện rửa là, ví dụ, khoảng 40-60°C, 0,5-6xSSC, 0,1% SDS. Tốt hơn là, các điều kiện nghiêm ngặt trung bình bao gồm sự lai (và rửa) ở nhiệt độ khoảng 50°C và 6xSSC. Các điều kiện nghiêm ngặt cao cũng có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, phụ thuộc vào chiều dài của ADN.

Nói chung, các điều kiện này bao gồm sự lai và/hoặc rửa ở nhiệt độ cao hơn và/hoặc nồng độ muối thấp hơn (như sự lai ở khoảng 65°C, 6xSSC đến 0,2xSSC, tốt hơn là 6xSSC, tốt hơn nữa nếu là 2xSSC, tốt nhất là 0,2xSSC), so với các điều kiện nghiêm ngặt trung bình. Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt cao có thể bao gồm sự lai như được

xác định trên đây, và rửa ở khoảng 65-68°C, 0,2xSSC, 0,1% SDS. SSPE (1xSSPE là 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, và 1,25 mM EDTA, độ pH=7,4) có thể được thay thế cho SSC (1xSSC là 0,15 M NaCl và 15 mM natri xitrat) trong dung dịch đệm lai và rửa; việc rửa được thực hiện trong 15 phút sau khi quá trình lai hoàn thành.

Cũng có thể sử dụng kit lai có bán trên thị trường mà sử dụng chất không có tính phóng xạ làm mẫu dò. Các ví dụ cụ thể bao gồm sự lai bằng hệ thống đánh dấu & phát hiện trực tiếp ECL (Amersham). Các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm, ví dụ, sự lai ở 42°C trong 4 giờ bằng cách sử dụng dung dịch đệm lai được bao gồm trong kit, mà được bổ sung 5% (khối lượng/thể tích) chất phong bế và 0,5 M NaCl, và rửa hai lần trong 0,4% SDS, 0,5xSSC ở 55°C trong 20 phút và một lần trong 2xSSC ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gần như tương đồng” hoặc “độ tương đồng đáng kể”, liên quan đến trình tự axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự SEQ ID NO. đối chiếu, hoặc một phần hoặc bộ thể của nó, là trình tự mà cho phép sự bắt cặp đối song diễn ra giữa hai trình tự, và hai trình tự này sau đó có thể, dưới các điều kiện nghiêm ngặt, tạo ra các liên kết hydro với các bazơ tương ứng trên sợi đối diện để tạo ra phân tử sợi kép mà đủ ổn định trong các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp, bao gồm điều kiện nghiêm ngặt cao, để có thể phát hiện được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các trình tự gần như tương đồng có thể có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 70% đến 80%, hoặc tốt hơn là có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 85%, hoặc ưu tiên nhất là có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 90% đến 95%, mức độ đồng nhất trình tự đến 99%, so với các trình tự nucleotit đối chiếu như được nêu trong phần danh mục trình tự, hoặc các bộ thể của chúng. Theo cách khác, các trình tự gần như tương đồng bao gồm các trình tự mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với các vùng đích của các intron của các gen của thực vật. Đối với các điều kiện nghiêm ngặt, xem phần mô tả trong bản mô tả này và cũng xem các patent Mỹ số 8,455,716 và 8,536,403.

“Gen PRRSV ORF5” hoặc “gen ORF5” được dùng để chỉ gen ORF5 có nguồn gốc từ chủng Trung Quốc PRRSV có khả năng gây bệnh cao (HP-HRRSV-JXA1). Theo một số phương án, gen ORF5 có trình tự nêu trong các nucleotit 1041-1643 của SEQ ID NO.1. Theo các phương án khác, gen ORF5 có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc

100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 1041-1643 của SEQ ID NO.1.

“Gen PCV ORF2” hoặc “gen ORF2” được dùng để chỉ gen ORF2 có nguồn gốc từ chủng In-đô-nê-xi-a PCV2 (kiểu gen 2B) (PCV2 TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130941). Theo một số phương án, gen ORF2 có trình tự nêu trong các nucleotit 3063-3767 của SEQ ID NO.1. Theo các phương án khác, gen ORF2 có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 3063-3767 của SEQ ID NO.1.

“Gen CSF E2” hoặc “gen E2” được dùng để chỉ gen E2 có nguồn gốc từ sự xuất hiện mới của dưới kiểu gen 2.1 của chủng In-đô-nê-xi-a CSF (CSF TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130940). Theo một số phương án, gen E2 có trình tự nêu trong các nucleotit 4729-5916 của SEQ ID NO.1. Theo các phương án khác, gen E2 có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 4729-5916 của SEQ ID NO.1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vacxin PRV từ giá phòng PRRSV, PCV2, CSF và PRV. Theo khía cạnh này, axit nucleic cấu trúc được tạo ra mà bao gồm gen của PRRSV, gen của PCV2 và gen của CSF. Theo một số phương án, gen PRRSV là gen PRRSV ORF5. Theo một số phương án, gen PRRSV ORF5 có nguồn gốc từ chủng Trung Quốc PRRSV có khả năng gây bệnh cao (HP-HRRSV-JXA1). Theo một số phương án, gen ORF5 có trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, gen PCV2 là gen PCV2 ORF2. Theo một số phương án, gen PCV2 có nguồn gốc từ chủng In-đô-nê-xi-a PCV2 (kiểu gen 2B). Theo một số phương án, gen ORF2 có trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, gen CFS là gen CFS E2. Theo một số phương án, gen CFS E2 có nguồn gốc từ sự xuất hiện mới của dưới kiểu gen 2.1 của chủng In-đô-nê-xi-a CSF. Theo một số phương án, gen E2 có trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Trình tự khởi động thích hợp bất kỳ hoạt động trong các tế bào của động vật có vú có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, trình tự khởi động là trình tự khởi động của virus cự bào (cytomegalovirus -

CMV). Theo một số phương án, trình tự khởi động CMV là trình tự khởi động CMV rất sớm (CMV intermediate early - CMV ie) . Theo một số phương án, trình tự khởi động CMV ie có trình tự nêu trong các nucleotit 445-1034 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự khởi động CMV có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 445-1034 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự khởi động này là trình tự khởi động của yếu tố kéo dài 1 alpha (elongation factor 1 alpha - EF1 α). Theo một số phương án, trình tự khởi động EF1 α có trình tự nêu trong các nucleotit 1869-3056 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự khởi động EF1 α có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 1869-3056 của SEQ ID NO.1.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự kết thúc hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Trình tự kết thúc thích hợp bất kỳ hoạt động trong các tế bào của động vật có vú có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, trình tự kết thúc này là trình tự hormon sinh trưởng của loài bò được polyadenyl hóa (bovine growth hormone polyadenylation - BGH polyA). Theo một số phương án, trình tự BGH polyA có trình tự nêu trong các nucleotit 1644-1868 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự BGH polyA có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 1644-1868 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự kết thúc là trình tự virus SV40 được polyadenyl hóa (SV40 virus polyadenylation - SV40 polyA). Theo một số phương án, trình tự SV40 polyA có trình tự nêu trong các nucleotit 5925-6192 của SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, trình tự SV40 polyA có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%, tính theo phương pháp bắt cặp Clustal V hoặc Clustal W, khi so với các nucleotit 5925-6192 của SEQ ID NO.1.

Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được đề xuất mà bao gồm gen PRRSV, gen PCV2 và gen CSF được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương

án, axit nucleic cấu trúc này còn bao gồm trình tự khởi động và/hoặc trình tự kết thúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc còn bao gồm các trình tự gG của PRV. Theo một số phương án, PRV là chủng PRV Bartha-K61. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo một số phương án, chủng PRV được đề xuất trong đó chủng PRV này được cải biến để chứa axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, PRV được cải biến là chủng PRV Bartha-K61 được cải biến. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc trong chủng PRV được cải biến là ổn định mà không có các đột biến hoặc mất đoạn sau năm lần cấy truyền trong các tế bào thận lợn 15 (pig kidney 15 - PK-15) . Theo một số phương án, các tế bào PK-15 là các tế bào PK-15 ATCC® CCL-33™ thu được từ bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ.

Theo một số phương án, dòng tế bào được đề xuất mà được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này theo cách thích hợp để tạo ra virus hữu ích cho vacxin tứ giá. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được cài xen vào trong chủng PRV được mô tả trong bản mô tả này bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong dòng tế bào được chuyển nạp. Theo một số phương án, dòng tế bào này là tế bào PK-15 được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất vacxin PRV tam giá phòng PCV2, CSF và PRV. Theo khía cạnh này, axit nucleic cấu trúc được tạo ra mà bao gồm gen của PCV2 và gen của CSF. Theo một số phương án, gen PCV2 và gen CSF là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, trình tự khởi động là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi gen được liên kết hoạt động với trình tự kết thúc hoạt động trong các tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, trình tự kết thúc là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được đề xuất mà bao gồm gen PCV2 và gen CSF được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu

trúc này còn bao gồm trình tự khởi động và/hoặc trình tự kết thúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc còn bao gồm các trình tự gG của PRV. Theo một số phương án, PRV là chủng PRV Bartha-K61. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một số phương án, chủng PRV được đề xuất trong đó chủng PRV này được cải biến để chứa axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chủng PRV được cải biến là như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc trong chủng PRV được cải biến là ổn định mà không có các đột biến hoặc mất đoạn sau năm lần cấy truyền trong các tế bào thận lợn 15 (pig kidney 15 - PK-15). Theo một số phương án, các tế bào PK-15 là như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, dòng tế bào được đề xuất mà được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này theo cách thích hợp để tạo ra virus hữu ích cho vaccine tam giá. Theo một số phương án, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được cài xen vào trong chủng PRV được mô tả trong bản mô tả này bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong dòng tế bào được chuyển nạp. Theo một số phương án, dòng tế bào này là tế bào PK-15 được mô tả trong bản mô tả này.

Trong quá trình tạo ra axit nucleic cấu trúc, các mảnh ADN khác nhau có thể được thao tác, sao cho đưa ra trình tự ADN theo hướng đúng và, khi thích hợp, trong khung đọc đúng. Đối với mục đích này, các đoạn thích ứng hoặc các cầu nối có thể được dùng để nối các mảnh ADN hoặc các thao tác khác có thể được bao gồm để đưa ra các vị trí cắt giới hạn thuận tiện, loại bỏ ADN thừa, loại bỏ các vị trí cắt giới hạn, hoặc các thao tác tương tự. Nhằm mục đích này, quá trình gây đột biến *in vitro*, hồi phục đoạn môi, cắt giới hạn, gắn môi, thay thế lại, ví dụ, đồng chuyển và đảo chuyển có thể được bao gồm.

Các axit nucleic theo sáng chế cũng có thể được tổng hợp, một cách hoàn toàn hoặc một phần, đặc biệt là trong đó mong muốn thu được các trình tự được ưu tiên bởi thực vật, bằng các phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Do đó, tất cả hoặc một phần của các axit nucleic theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các codon được ưu tiên bởi vật chủ được chọn. Các codon được ưu tiên theo loài có thể được xác định, ví dụ, từ các codon được sử dụng thường xuyên nhất trong các protein được

biểu hiện trong loài vật chủ cụ thể. Các cải biến khác của các trình tự nucleotit có thể dẫn đến tạo ra các thể đột biến có hoạt tính được biến đổi nhẹ.

PRV tái tổ hợp tứ giá hoặc TRV tái tổ hợp tam giá được tạo ra bằng cách chuyển nạp dòng tế bào thích hợp, như dòng tế bào PK-15 được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, dòng tế bào này được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này và bằng ADN capsit nhân của PRV. Theo một số phương án, ADN capsit nhân của PRV được cải biến để chứa axit nucleic cấu trúc để biểu hiện protein huỳnh quang màu đỏ (red fluorescent protein - RFP). PRV tái tổ hợp tứ giá hoặc TRV tái tổ hợp tam giá được cấy truyền trong các tế bào PK-15 trong một số lần cấy truyền để bảo đảm các virus tái tổ hợp ổn định không có đột biến hoặc mất đoạn trong axit nucleic của virus. Theo một số phương án, năm lần cấy truyền là đủ để tạo ra các virus tái tổ hợp ổn định.

Ngay khi được tạo ra, các virus TRV tái tổ hợp có thể được sao chép trong các dòng tế bào thích hợp. Theo một số phương án, dòng tế bào này là dòng tế bào (các tế bào) PK-15 như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, dòng tế bào (các tế bào) này là dòng tế bào thận của chuột hamster con 21 (baby hamster kidney 21 - BHK21). Theo một số phương án, dòng tế bào BHK21 là BHK21 (dòng vô tính 13). Theo một số phương án, dòng tế bào BHK21 (dòng vô tính 13) là ATCC® CCL-10™ và có sẵn ở bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ.

Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) và virus giả dại (PRV) là nguyên nhân chủ yếu gây thất bại sinh sản nhiễm trùng ở lợn và gây thiệt hại đáng kể cho ngành công nghiệp lợn trên toàn thế giới. Ngoài ra, PCV2 và virus sốt lợn cổ điển gây ra các bệnh tàn phá và có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của động vật và kinh tế của nhiều quốc gia châu Á. Sự phát triển của phương pháp vaccin đa giá có thể làm giảm tiềm tàng việc dùng vaccin xuống lịch trình một liều để bao trùm tất cả bốn virus, trợ giúp rất nhiều cho tình trạng hiện tại để bảo vệ lợn phòng bốn bệnh này. Các tác giả sáng chế đã chọn PRV Bartha-K61 sống giảm độc lực làm vector để phát triển vaccin đa giá. Cấu trúc hệ gen và cơ sở di truyền của chủng PRV Bartha-K61 là đã được xác định tương đối rõ và đã được báo cáo nhiều và sự biểu hiện ổn định của các gen ngoại lai không ảnh hưởng đến độ ổn định của chính virus (Boldogkoi, Nogradi, 2003).

Như được mô tả trong bản mô tả này, PRV tứ giá biểu hiện PCV2-ORF2, CSF-E2 và PRRSV-ORF5 và PRV tam giá biểu hiện PCV2-ORF2 và CSF-E2 được tạo ra bằng

cách tái tổ hợp tương đồng vào trong locut gG của chủng vacxin PRV Bartha K-61. Thử nghiệm sao chép và kiểm tra độ ổn định phát hiện ra rằng PRV tái tổ hợp dù là PRV tam giá hoặc tứ giá đều ổn định và sao chép in vitro một cách hiệu quả như PRV Bartha K-61, chứng tỏ rằng việc cài xen các gen ngoại lai trong locut PK và gG của PRV không ảnh hưởng đến sự sao chép của PRV. Hơn nữa, nghiên cứu khả năng sinh miễn dịch trong thử nghiệm trên chuột nhắt cho thấy rằng PRV tứ giá tạo ra mức kháng thể dịch thể đặc hiệu huyết thanh cao đối với các kháng nguyên PCV2-ORF2, CSF-E2 và PRRSV-ORF5, tương tự, PRV tam giá tạo ra kháng thể dịch thể đặc hiệu huyết thanh đối với PCV2-ORF2 và CSF-E2. Các kết quả này gợi ý rằng sự biểu hiện của các gen miễn dịch đa giá từ virus nguy hiểm gây ra ở lợn trong PRV Bartha K-61 là phương pháp tiếp cận mới giúp phát triển vacxin đa giá phòng PCV2, CSF hoặc PRRSV và kể cả bệnh giả dại.

Vector virus giả dại tái tổ hợp theo sáng chế chứa ORF2 của PCV2, E2 của CSF và ORF5 của PRRSV tạo ra một cách hiệu quả các kháng thể phòng tất cả bốn bệnh, điều này cho phép sản xuất có hiệu quả chi phí với lượng lớn trong một sản phẩm được sản xuất.

Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng cả hai vacxin tái tổ hợp tam giá và tứ giá là ổn định sau 5 lần cấy truyền liên tiếp trong các dòng tế bào PK15/BHK21. Việc cài xen hai hoặc ba gen vào một vị trí cài xen là rất ổn định và không thể hiện sự bất ổn định di truyền hay các cải biến trong quá trình phiên mã của các gen được cài xen.

Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng việc cài xen nhiều gen vào một vị trí cài xen của locut gG của PRV-Bartha không ảnh hưởng đến hàm lượng virus.

Sáng chế mô tả các phương pháp sử dụng. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng, ví dụ, lợn, bao gồm việc cho đối tượng này dùng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này với lượng có tác dụng dự phòng, điều trị, hoặc miễn dịch. Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa cho đối tượng khỏi bị nhiễm PRV, PRRSV, PCV và CSF hoặc PRV, PCV và CSF bao gồm việc đối tượng này dùng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này với lượng có tác dụng dự phòng, điều trị hoặc miễn dịch.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “việc dùng” có nghĩa là phân phối bằng cách sử dụng các phương pháp và các hệ phân phối khác nhau bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc dùng có thể được thực hiện, ví dụ, trong màng bụng, trong não, trong tĩnh mạch, qua đường miệng, qua niêm mạc, dưới da,

qua da, trong da, trong cơ, tại chỗ, ngoài đường tiêu hóa, thông qua cây dưới da, nội tủy mạc, trong mạch bạch huyết, trong thương tổn, ngoại tâm mạc, hoặc ngoài màng cứng. Chất hoặc chế phẩm cũng có thể được dùng ở dạng sol khí, như để phân phối trong phổi và/hoặc trong mũi. Việc dùng có thể được thực hiện, ví dụ, một lần, nhiều lần, và/hoặc trong một hoặc nhiều giai đoạn kéo dài.

Việc gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách dùng một liều cơ bản vaccin cho đối tượng, tiếp theo, sau một khoảng thời gian thích hợp, là một hoặc nhiều lần dùng vaccin tiếp theo. Khoảng thời gian thích hợp giữa các lần dùng vaccin có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và thường là khoảng vài tuần đến hàng tháng. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp, đường dùng hoặc tần suất dùng cụ thể bất kỳ.

“Liều có hiệu quả phòng bệnh” hoặc “liều có hiệu quả miễn dịch” là lượng vaccin bất kỳ mà, khi được dùng cho đối tượng dễ bị nhiễm virus hoặc dễ bị rối loạn liên quan đến virus, gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng giúp bảo vệ đối tượng này khỏi bị nhiễm virus hoặc khỏi bị rối loạn. “Việc bảo vệ” đối tượng có nghĩa là làm giảm khả năng bị nhiễm virus của đối tượng này, hoặc giảm nhẹ khả năng khởi phát rối loạn ở đối tượng này, xuống ít nhất hai lần, tốt hơn là ít nhất mười lần. Ví dụ, nếu đối tượng có 1% cơ hội bị nhiễm virus, thì mức giảm hai lần khả năng bị nhiễm virus của đối tượng này sẽ dẫn đến đối tượng này có 0,5% cơ hội bị nhiễm virus. Tốt nhất là, “liều có hiệu quả phòng bệnh” gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng giúp ngăn chặn hoàn toàn cho đối tượng khỏi bị nhiễm virus hoặc ngăn chặn sự khởi phát của rối loạn ở đối tượng một cách trọn vẹn.

Các phương án nhất định về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp tạo miễn dịch tức thì và trị liệu có thể còn bao gồm việc cho đối tượng dùng ít nhất một tá chất. “Tá chất” có nghĩa là chất bất kỳ thích hợp để tăng cường khả năng sinh miễn dịch của kháng nguyên và thúc đẩy đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Nhiều tá chất, bao gồm tá chất dạng hạt phân tán, thích hợp để sử dụng với các vaccin trên cơ sở cả protein và axit nucleic, và các phương pháp kết hợp các tá chất với các kháng nguyên, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình. Các tá chất thích hợp để sử dụng với sự tạo miễn dịch bằng protein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phèn, tá chất Freund đầy đủ (Freund's complete adjuvant - FCA), tá chất Freund không đầy đủ (Freund's incomplete adjuvant -

FIA), tá chất phèn, tá chất trên cơ sở saponin, như Quil A, và QS-21, và các tá chất tương tự.

Cần phải hiểu rằng chủng virus được mô tả trong bản mô tả này, trong đó được sử dụng để gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng hoặc để phòng ngừa cho đối tượng khỏi bị bệnh liên quan đến virus, được dùng cho đối tượng ở dạng chế phẩm mà còn chứa một hoặc nhiều chất mang được dùng hoặc tương hợp sinh lý. Các chất mang được dùng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều dung dịch đệm phosphat có nồng độ nằm trong khoảng 0,01 M - 0,1 M và tốt hơn là 0,05 M, dung dịch được đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS), hoặc nước muối 0,9%. Các chất mang như vậy còn bao gồm các dung dịch, huyền phù, và nhũ tương dạng nước hoặc không phải nước. Các chất mang dạng nước bao gồm nước, dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, nước muối và môi trường đệm. Ví dụ về các dung môi không phải nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và các este hữu cơ để tiêm như etyl oleat. Các chất dẫn dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer's dextroza, dextroza và natri clorua, Ringer lactat và các dầu không bay hơi. Các chất dẫn dùng trong tĩnh mạch bao gồm chất độn lỏng và chất độn dinh dưỡng, chất độn điện ly như các chất trên cơ sở Ringer's dextroza, và các chất tương tự. Chế phẩm rắn có thể chứa các chất mang rắn không độc, ví dụ, glucoza, sucroza, manitol, sorbitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, xenluloza hoặc các dẫn xuất của xenluloza, natri cacbonat và magie cacbonat. Để dùng ở dạng sol khí, như để phân phối trong phổi và/hoặc trong mũi, tốt hơn là chất hoặc chế phẩm được bào chế bằng chất hoạt động bề mặt không độc, ví dụ, este hoặc este một phần của các axit béo có 6 đến 22 nguyên tử cacbon hoặc các glyxerit tự nhiên, và chất đẩy. Các chất mang khác như lexitin có thể được bao gồm để tạo thuận lợi cho việc phân phối trong mũi. Các chất mang được dùng có thể còn bao gồm các chất hỗ trợ với lượng nhỏ như chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản và các chất phụ gia khác, như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa và chất tạo chelat, mà làm tăng thời hạn sử dụng và/hoặc hiệu quả của các hoạt chất. Chế phẩm dùng ngay có thể, như đã biết trong lĩnh vực này, được bào chế sao cho tạo ra sự giải phóng nhanh, được duy trì liên tục hoặc chậm của hoạt chất sau khi dùng cho đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất kit để tạo miễn dịch cho đối tượng bằng PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này. Kit này bao gồm PRV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả

này, chất mang được dùng, dụng cụ chuyên dùng, và tài liệu hướng dẫn để sử dụng nó. Sáng chế bao gồm các phương án khác về kit mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình. Hướng dẫn có thể cung cấp thông tin bất kỳ hữu ích để chỉ dẫn việc dùng chủng virut miễn cảm với nhiệt độ đã được làm lạnh ổn định được mô tả trong bản mô tả này, hoặc dạng bất hoạt của nó.

Sáng chế đưa ra công nghệ vaccin liên quan đến các chủng virut được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, các chủng virut được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong phương pháp bào chế vaccin. Theo một phương án khác, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong phương pháp bào chế vaccin. Theo một phương án bổ sung, các chủng virut được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng để phát triển vaccin. Theo một phương án khác, axit nucleic cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng để phát triển vaccin.

Việc thực hiện sáng chế sử dụng, trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật thông thường về hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, di truyền học, miễn dịch học, sinh học tế bào, sinh học nuôi cấy tế bào và chuyển gen, mà nằm trong phạm vi kỹ năng của lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel *et al.*, 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al.

eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bằng cách đưa ra các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này hoặc các kỹ thuật được mô tả cụ thể dưới đây được dùng.

Ví dụ 1

Phương pháp

Chọn lọc các chất kháng nguyên: Gen ORF2 từ chủng In-đô-nê-xi-a PCV2 (kiểu gen 2B) (PCV2 TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130941) được chọn dựa trên phân tích phát sinh loài với các chủng đang lưu hành. Ngoài ra, PCV2 kiểu gen 2B là kiểu gen chiếm ưu thế cao trong quần thể lợn (Opriessnig và các đồng tác giả, 2013). Gen E2 được chọn từ sự xuất hiện mới của dưới kiểu gen 2.1 của chủng In-đô-nê-xi-a CSF (CSF TLL-Indo, Ngân hàng gen số lưu giữ KX130940). Gen ORF5 được chọn từ chủng Trung Quốc HP-PRRSV (PRRSV-JXA1 có khả năng gây bệnh cao), mà có mức độ tương tự cao với các chủng PRRSV hiện đang lưu hành (Yin và các đồng tác giả, 2012; Jantafong và các đồng tác giả, 2015)).

Tạo cấu trúc của các plasmit chuyển tái tổ hợp và các gen tổng hợp: Gen ORF2 từ chủng PCV2 và E2 từ chủng CSF lần lượt được khuếch đại và được tách dòng riêng rẽ vào trong các vị trí cắt giới hạn XhoI/ApaI và HindIII/BamHI của vector pcDNA3.1+ trung gian (Invitrogen).

Các gen tổng hợp bao gồm tổ hợp trình tự của ORF5 của chủng *PRRSV*, trình tự hormon sinh trưởng của loài bò (BGH) và trình tự khởi động yếu tố kéo dài 1 α (EF1 α) (ORF5-BGH-EF1 α) được tổng hợp (Genscript, USA). Một gen tổng hợp như vậy có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3. Các vị trí cắt giới hạn BglII và AgeI được bao gồm.

Để tạo cấu trúc của vacxin rPRV tứ giá, mảnh ORF5-BGH-EF1 được tách dòng vào trong các vị trí cắt giới hạn BglII/AgeI của plasmit chuyển pUC-gG-MCS (Fig.1) (được cung cấp bởi Prof. Enquist, Princeton University, USA). pUC-gG-MCS là plasmit pUC57 có sự cài xen của cấu trúc tổng hợp chứa locut gG của PRV Bartha. Mảnh ORF2-BGH từ pcDNA3.1+ được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi AgeI-ORF2 F: 5'-CTGACCGGTATGACGTATCCAAGGAGGCG-3' (SEQ ID NO.4; vị trí AgeI được gạch chân) và ORF2-R-XhoI: 5'-CGGCTCGAGCCATAGAGCCCACCGCATC-3' (SEQ ID NO.5; vị trí XhoI được gạch chân) và được tách dòng vào trong các vị trí cắt giới hạn AgeI/XhoI của plasmit chuyển pUC-gG-MCS (Fig.1). Tương tự, mảnh CMV-E2 từ pcDNA3.1+ được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi SalI-CMV+E2-F: 5'-CGCGTCGACGTTGACATTGATTATTGAC-3' (SEQ ID NO.6; vị trí SalI được gạch chân) và NotI-E2-R: 5'-TAAAGCGGCCGCAACCAGCGGCGAGTG TTCTG-3' (SEQ ID NO.7; vị trí NotI được gạch chân) và được tách dòng vào trong các vị trí cắt giới hạn SalI/NotI của plasmit chuyển pUC-gG-MCS (Fig.1). Plasmit chuyển tái tổ hợp pUC-gG-ORF5-ORF2-E2 được kiểm tra bằng cách PCR và giải trình tự. Trình tự của axit nucleic bao gồm gG- CMV-ORF5-BGH-EF1-orf2-BGH-CMV-E2-SV40-gG được nêu trong SEQ ID NO.1.

Để tạo cấu trúc của vacxin rPRV tam giá, mảnh ORF2-BGH từ pcDNA3.1+ được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi AgeI-ORF2 F: 5'-CTGACCGGTATGACGTATCCA AGGAGGCG-3' (SEQ ID NO.4; vị trí AgeI được gạch chân) và ORF2-R-XhoI: 5'-CGGCTCGAG CCATAGAGCCCACCGCATC-3' (SEQ ID NO.5; vị trí XhoI được gạch chân) và được tách dòng vào trong các vị trí cắt giới hạn AgeI/XhoI của plasmit chuyển pUC-gG-MCS (Fig.1). Trình tự khởi động EF1 α tổng hợp và mảnh E2 đã được khuếch đại lần lượt được tách dòng vào trong các vị trí cắt giới hạn SalI/NotI của plasmit chuyển pUC-gG-MCS (Fig.1) bằng cách sử dụng các đoạn mồi SalI-EF1 F PCR: 5'-GCGTCG ACCGTGAGGCTCCGGT 3' (SEQ ID NO.8; vị trí SalI được gạch chân) và NotI-E2-R: 5'-TAAA GCGGCCGCAACCAGCGGCGAGTTGTTCTG 3' (SEQ ID NO.7; vị trí NotI được gạch

chân). Plasmid chuyển tái tổ hợp pUC-gG- ORF2-E2 được kiểm tra bằng cách PCR và giải trình tự. Trình tự của axit nucleic bao gồm gG-CMV-ORF2-BGH-EF1-E2-SV40-gG được nêu trong SEQ ID NO.2.

Tạo PRV tái tổ hợp tứ giá và tam giá: ADN capsit nhân của PRV Bartha biểu hiện protein huỳnh quang màu đỏ (RFP) (được cung cấp bởi Prof. Enquist, Princeton University, USA) được tạo mạch thẳng bằng enzym EcoRI để tái tổ hợp. Các plasmid chuyển pUC-gG-ORF5-ORF2-E2 hoặc pUC-gG-ORF2-E2 được phân cắt bằng HindIII để giải phóng cấu trúc cho việc kết hợp. Nói ngắn gọn, tế bào PK-15 được nuôi cấy trong đĩa 6 lỗ ở 1×10^6 tế bào mỗi lỗ. 3 μ g ADN cấu trúc đã được phân cắt gG-ORF5-ORF2-E2 (vaccine PRV tứ giá) hoặc gG-ORF2-E2 (vaccine PRV tam giá) được đồng chuyển nạp với 5 μ g ADN capsit nhân PRV-RFP đã được tạo mạch thẳng vào trong các tế bào PK-15 bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000. Sau khi xuất hiện tác dụng gây bệnh tế bào, các con cháu chuyển nạp được đưa vào trong các tế bào PK-15 để tinh chế màng.

Thử nghiệm màng: Dịch nổi chuyển nạp (sau khi tan kết đông) chứa virus tái tổ hợp được chuẩn độ từ dịch pha loãng 10^{-1} đến 10^{-6} và được ủ bằng môi trường nuôi cấy tế bào PK-15 trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C được cung cấp 5% CO_2 . Dịch nổi được loại bỏ và được thay thế bằng lớp phủ agarosa 1%. Các màng virus mà không thể hiện tín hiệu huỳnh quang được chọn sau 48 giờ. Sau 3 đến 4 chu kỳ tinh chế màng, các màng được chọn được cấy truyền trên các tế bào PK-15 và các virus tái tổ hợp được giải trình tự để xác nhận sự có mặt của các gen được đưa vào (ORF2, E2 và ORF5) và sự không có các đột biến.

Phân tích sự biểu hiện bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch gián tiếp: Các tế bào bị nhiễm rPRV tam giá hoặc tứ giá được phân tích bằng cách nhuộm huỳnh quang miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể đa dòng đặc hiệu CSF-E2 hoặc đơn dòng đặc hiệu PCV2-ORF2. Nói ngắn gọn, các tế bào PK15 bị nhiễm rPRV tam giá hoặc tứ giá trong 36 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2 . Sau khi cố định, các tế bào được thấm bằng 0,1% Triton X-100 và được ủ bằng kháng thể đa dòng kháng E2 hoặc kháng ORF2 trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C . Sau đó, các tế bào được ủ bằng kháng thể thử kháng chuột nhất được tiếp hợp với FITC (DAKO Cytomation, Copenhagen, Đan Mạch). Tín hiệu huỳnh quang được phát hiện bằng kính hiển vi huỳnh quang đảo ngược (Olympus, Essex, UK) và các ảnh được chụp bằng hệ thống tạo ảnh kỹ thuật số (Nikon, Tokyo, Nhật Bản).

Động học sự sao chép của các vacxin PRV tái tổ hợp trong các dòng tế bào PK15 và BHK21: Để khảo sát sự sao chép của virus trong các dòng tế bào khác nhau, các tế bào PK15 hoặc BHK21 được gây nhiễm bằng PRV-Bartha hoặc rPRV tam giá hoặc rPRV tứ giá ở MOI là 5. Sau 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch muối đệm phosphat (PBS) và 1 ml môi trường chứa 2% FBS được bổ sung vào. Các đĩa môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ và 48 giờ. Ở các thời điểm này, các tế bào được dung giải bằng ba chu kỳ kết đông và rã đông và dịch nổi chứa các virus được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Việc chuẩn độ virus được thực hiện theo ba lần lặp lại trên các tế bào PK15 với mỗi loại tế bào và thời điểm được lặp lại ba lần. Hàm lượng virus được tính toán và được thể hiện dưới dạng liều gây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô trên thể tích (TCID₅₀/ml) bằng cách sử dụng phương pháp của Reed và Muench (Reed and Muench, 1938).

Độ ổn định di truyền của các cấu trúc vacxin PRV tái tổ hợp: Các cấu trúc vacxin PRV tái tổ hợp được cấy truyền theo chuỗi lên đến 5 lần trong các tế bào PK15. Sau 5 lần cấy truyền liên tiếp, các cấu trúc vacxin rPRV tam giá hoặc rPRV tứ giá được kiểm tra bằng cách PCR và giải trình tự để xác nhận sự không có các đột biến hoặc mất đoạn.

Nghiên cứu khả năng sinh miễn dịch trong mô hình chuột nhắt: Chuột nhắt BALB/c cái sáu đến bảy tuần tuổi (n=8/nhóm) được chủng ngừa trong cơ bằng 10⁶ TCID₅₀ PRV Bartha giảm độc lực (đối chứng âm tính), rPRV nhị giá (PRV & ORF2), rPRV tam giá (PRV, ORF2 & E2), tứ giá (PRV, ORF2, E2 & ORF5) và đối chứng PBS vào các ngày 0 và 21. Huyết thanh được gom lại vào các ngày 20 và 42. Khả năng sinh miễn dịch của các cấu trúc vacxin tái tổ hợp được đánh giá bằng hiệu giá kháng thể đặc hiệu PRV, các hiệu giá kháng thể đặc hiệu PCV2-ORF2, CSF-E2 và PRRSV-ORF5 trong huyết thanh bằng ELISA gián tiếp vào các ngày 20 và 42.

Phép đo hiệu giá kháng thể đặc hiệu bằng ELISA gián tiếp: Các hiệu giá kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh đối với các kháng nguyên PRV, PCV2-ORF2, CSF-E2 và PRRSV-ORF5 được thử nghiệm bằng ELISA gián tiếp. Nói ngắn gọn, các đĩa ELISA lỗ vi chuẩn được phủ bằng kháng nguyên virus PRV đã được tinh chế hoặc các kháng nguyên PCV2-ORF2 hoặc CSF-E2 hoặc PRRSV-ORF5 trong dung dịch đệm phủ (0,1 mol/lit cacbonat-bicacbonat, độ pH=9,6). Các mẫu huyết thanh (được pha loãng theo tỷ lệ 1:10) được pha 2 lần liên tiếp trong 3% sữa khô không béo trong PBS chứa 0,05% Tween 20 được bổ sung vào các đĩa theo ba bản sao. Sau ba lần rửa bằng PBS-T, globulin miễn

dịch dê kháng chuột nhất được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa (horseradish peroxidase - HRP) đã được pha loãng 1000 lần (DAKO) được bổ sung vào mỗi lỗ. Phản ứng được phát triển bằng 100 ml cơ chất TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) và sau đó, được làm kết thúc bằng 50 ml dung dịch H₂SO₄ 2 M. Các mật độ quang ở 450 nm được xác định bằng cách sử dụng máy đọc hệ số hấp thụ đĩa vi lỗ (Tecan, Thụy sĩ).

Ví dụ 2

Tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của các vacxin PRV tái tổ hợp

Vectơ PRV tam giá tái tổ hợp biểu hiện PCV2-ORF2 và CSF-E2 (PRV-ORF2-E2 tam giá) và vectơ PRV tứ giá biểu hiện PCV2-ORF2, CSF-E2 và PRRSV-ORF5 (PRV-ORF5-ORF2-E2 tứ giá) được tạo ra bởi cách hợp nhất các băng plasmit chuyển mạch thẳng (pUC-gG-tứ giá/pUC-gG-tam giá) vào trong ADN PRV Bartha bằng cách tái tổ hợp tương đồng (Fig.1). Sau khi chuyển nạp, các thể tái tổ hợp thu được được tinh chế mảng trên các tế bào PK15 bằng cách chọn các mảng không có huỳnh quang màu đỏ. Các thể tái tổ hợp dương tính được sàng lọc lại. Sau 3-4 lần tinh chế mảng, các thể tái tổ hợp dương tính được phân tích bằng cách giải trình tự và được chuẩn độ trong các tế bào PK15. Ngoài ra, thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch đối với các kháng thể đặc hiệu ORF2 hoặc E2 riêng chứng minh sự biểu hiện hiệu quả của các protein ORF2 hoặc E2 bởi vectơ PRV đơn (các Fig.2A và 2B). Ngược lại, không có các tế bào huỳnh quang thấy được đối với đối chứng âm tính PRV. Ngoài ra, việc kiểm tra độ ổn định phát hiện ra rằng các vacxin tái tổ hợp (rPRV tứ giá hoặc rPRV tam giá) là ổn định và không có các đột biến hoặc mất đoạn sau năm lần cấy truyền liên tiếp trong các tế bào PK15.

Ví dụ 3

Sự sao chép trong các tế bào PK15 và BHK21

Để khảo sát xem sự cài xen hoặc sự biểu hiện của các gen chuyển ngoại lai ở locut gG có tác dụng đến các đặc tính sao chép hay không, động học sự sinh trưởng một bước của các cấu trúc vacxin PRV tái tổ hợp rPRV tam giá, tứ giá và chủng PRV Bartha bố mẹ được so sánh trong các tế bào PK15 và BHK21. Các hàm lượng virus của cả hai cấu trúc vacxin PRV tam giá và tứ giá lần lượt là 10^8 TCID₅₀ và $10^{8,3}$ TCID₅₀ trong các tế bào PK15 và BHK21, và các hàm lượng sao chép là tương đương chủng bố mẹ PRV-Bartha (TCID₅₀ $10^{8,5-8,7}$).

Ví dụ 4

Nghiên cứu khả năng sinh miễn dịch trong mô hình chuột nhắt

Các kết quả cho thấy rằng chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vacxin PRV tứ giá thể hiện các mức kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh đối với PRV, E2, ORF2 và PRRSV. Ngoài ra, chuột nhắt được chủng ngừa bằng vacxin PRV tam giá tạo ra các mức kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh đối với các kháng nguyên PRV, ORF2 và E2 (Fig.3). Các kết quả hiệu giá kháng thể cho thấy rằng chuột nhắt được gây miễn dịch bằng rPRV nhị giá (ORF2) có hiệu giá kháng thể >260 đối với kháng nguyên PCV2-ORF2. Ngoài ra, chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vacxin PRV tam giá và PRV tứ giá có hiệu giá kháng thể lần lượt là 240 và 180 đối với kháng nguyên ORF2. Hơn nữa, cả hai vacxin PRV tam giá và tứ giá có hiệu giá kháng thể >256 đối với các glycoprotein E2 của bệnh sốt lợn cổ điển (Fig.4).

Việc sử dụng các từ “a” và “an” và “the” trong bản mô tả tiếng Anh và các thuật ngữ tương tự trong mô tả sáng chế (đặc biệt là trong yêu cầu bảo hộ sau đây) được hiểu là bao trùm cả dạng số ít và dạng số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc trái ngược rõ ràng trong ngữ cảnh. Các thuật ngữ “bao gồm,” “có,” “kể cả,” và “chứa” được hiểu là thuật ngữ mở (tức là nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,”) trừ khi có lưu ý khác. Việc trích dẫn các khoảng trị số trong bản mô tả này chỉ được dự định dùng như phương pháp tốc ký đề cập một cách riêng rẽ đến mỗi trị số riêng nằm trong khoảng này, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này, và mỗi trị số riêng được kết hợp vào trong bản mô tả như thể nó được trích dẫn riêng rẽ trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc nếu không trái ngược rõ ràng trong ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc cách diễn đạt làm ví dụ (ví dụ, “như”) được đưa ra trong bản mô tả này, chỉ được dự định để làm sáng tỏ hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi được bảo hộ khác. Không có cách diễn đạt nào trong bản mô tả được hiểu là chỉ ra yếu tố không được bảo hộ như yếu tố thiết yếu đối với việc thực hiện sáng chế.

Các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, kể cả phương án tối ưu đã biết đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các cải biến của các phương án đó có thể là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này

khi đọc phần mô tả trên đây. Các tác giả sáng chế mong đợi người có hiểu biết trung bình sử dụng các cải biến này khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định sáng chế được thực hiện khác so với khi được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm tất cả các cải biến và các phương án tương đương của đối tượng được trích dẫn trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây như được phép bởi luật ứng dụng. Hơn nữa, kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây trong tất cả các cải biến có thể của nó được bao gồm trong sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc nếu không trái ngược rõ ràng trong ngữ cảnh.

Tài liệu tham khảo

Dong B, Zarlenga DS, Ren X (2014). An overview of live attenuated recombinant pseudorabies viruses for use as novel vaccines. *J Immunol Res* 214:824630.

Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W et al., (2015). Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet Microbiol.* 176(3-4):229-38.

Jiang Y, Fang L, Xiao S. et al. (2007). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 25, no. 3, 547-560.

Klingbeil K, Lange E, Teifke JP, Mettenleiter TC, Fuchs W. (2014). Immunization of pigs with an attenuated pseudorabies virus recombinant expressing the hemagglutinin of pandemic swine origin H1N1 influenza A virus. *J Gen Virol*, vol. 95, 948-959.

Klupp BG, Lominiczi B, Visser N et al. (2012). Mutations affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha. *Virol* 212:466-473.

Li G, Shi N, Suo S, Cui J, Zarlenga D, Ren X.(2012). Vaccination of mice with ORF5 plasmid DNA of PRRSV; enhanced effects by co-immunizing with porcine IL-15. *Immunol Invest.* 41(3):231-48.

Li X, Liu R, Tang H, Jin M, Chen H, Qian P. (2008). Induction of protective immunity in swine by immunization with live attenuated recombinant pseudorabies virus expressing the capsid precursor encoding regions of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, vol. 26, no. 22, 2714-2722.

Liu, J., Chen, I. and Kwang, J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 79: 8262-8274.

Nie H, Fang R, Xiong BQ. et al. (2011). Immunogenicity and protective efficacy of two recombinant pseudorabies viruses expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 and MIC3 proteins. *Vet Parasitol*, vol. 181, no. 2-4, 215-221.

Opriessnig T, O'Neill K, Gerber PF, de Castro AM, et al., (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*. 31(3):487-94.

Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E. & Hengartner, C. J. (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 462-500.

Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, et al. (2005). Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 106, no. 3-4, 309-319.

Reed, LJ. Muench, H. A (1938). Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27,493-497.

Song Y, Jin M, Zhang S et al. (2007). Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, vol. 119, no. 2-4, 97-104.

Xu G, Xu X, Li Z et al. (2004). Construction of recombinant pseudorabies virus expressing NS1 protein of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and its safety and immunogenicity. *Vaccine*, vol. 22, no. 15-16, 1846-1853.

Yin G, Gao L, Shu X, Yang G, Guo S, Li W. (2012). Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in southwest China from 2007 to 2009. *PLoS One*. 7(3):e33756

Zhang H, Li X, Peng G, Tang C, Zhu S, Qian S, Xu J, Qian P. (2014). GlycoproteinE2 of classical swine fever virus expressed by baculovirus induces the protective immune responses in rabbits. *Vaccine*. 32(49):6607-13.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Axit nucleic cấu trúc bao gồm:

gen gG của virus giả dại chứa yếu tố được cài xen vào trong đó,

theo chiều từ đầu 5' đến đầu 3', yếu tố được cài xen đặc hiệu vào sau vị trí nucleotit thứ 438 của SEQ ID NO.2:

(a) trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú, gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ được liên kết hoạt động với trình tự khởi động này, trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú được liên kết hoạt động với gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ này,

trong đó gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ này cấu thành từ trình tự nêu trong các nucleotit 1054-1764 của SEQ ID NO.2; và

(b) trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú, gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ được liên kết hoạt động với trình tự khởi động này, trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú được liên kết hoạt động với gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ này,

trong đó gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ này cấu thành từ trình tự nêu trong các nucleotit 3229-4416 của SEQ ID NO.2.

2. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 1, trong đó mỗi trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú độc lập là độc lập là trình tự khởi động của virus cự bào (CMV) rất sớm (ie) hoặc trình tự khởi động của yếu tố kéo dài 1 alpha (EF1 α).

3. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 1, trong đó mỗi trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú độc lập là trình tự hormon sinh trưởng của loài bò (BGH) được polyadenyl hóa (polyA) hoặc polyA của virus 40 ở khỉ (SV40).

4. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 1, trong đó axit nucleic cấu trúc này cấu thành từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.2.

5. Vector chứa axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

6. Dòng tế bào của động vật có vú được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và axit nucleic của capsit nhân của virus giả dại được tạo mạch thẳng.

7. Dòng tế bào của động vật có vú theo điểm 6, trong đó dòng tế bào này là dòng tế bào PK-15.

8. Dòng tế bào của động vật có vú theo điểm 6, trong đó virus giả dại này là virus giả dại Bartha-K61.

9. Virus giả dại tái tổ hợp tam giá chứa axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

10. Virus giả dại tái tổ hợp tam giá theo điểm 9, trong đó virus giả dại này là virus giả dại Bartha-K61.

11. Vacxin chứa virus giả dại tái tổ hợp tam giá theo điểm 9 và chất mang sinh lý dụng.

12. Phương pháp phát triển vacxin bằng cách sử dụng virus giả dại tái tổ hợp tam giá theo điểm 9.

13. Axit nucleic cấu trúc bao gồm:

gen gG của virus giả dại chứa yếu tố được cài xen vào trong đó,

theo chiều từ đầu 5' đến đầu 3', yếu tố được cài xen đặc hiệu vào sau vị trí nucleotit thứ 438 của SEQ ID NO.1:

(a) trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú, gen ORF5 của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn có chiều dài đầy đủ được liên kết hoạt động với trình tự khởi động này, trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú được liên kết hoạt động với gen ORF5 của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn có chiều dài đầy đủ này,

trong đó gen ORF5 của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn có chiều dài đầy đủ này cấu thành từ trình tự nêu trong các nucleotit 1041-1643 của SEQ ID NO.1;

(b) trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú, gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ được liên kết hoạt động với trình tự khởi động này, trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú được liên kết hoạt động với gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ này,

trong đó gen ORF2 của virus circo ở lợn 2 có chiều dài đầy đủ này cấu thành từ trình tự nêu trong các nucleotit 3063-3767 của SEQ ID NO.1; và

(c) trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú, gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ được liên kết hoạt động với trình tự khởi động này, trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú được liên kết hoạt động với gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ này,

trong đó gen E2 của virus gây bệnh sốt ở lợn cổ điển có chiều dài đầy đủ này cấu thành từ trình tự nêu trong các nucleotit 4729-5916 của SEQ ID NO.1.

14. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 13, trong đó mỗi trình tự khởi động hoạt động trong tế bào của động vật có vú độc lập là độc lập là trình tự khởi động của virus cự bào (CMV) rất sớm (ie) hoặc trình tự khởi động của yếu tố kéo dài 1 alpha (EF1 α).

15. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 13, trong đó mỗi trình tự kết thúc hoạt động trong tế bào của động vật có vú độc lập là trình tự hormon sinh trưởng của loài bò (BGH) được polyadenyl hóa (polyA) hoặc polyA của virus 40 ở khỉ (SV40).

16. Axit nucleic cấu trúc theo điểm 13, trong đó axit nucleic cấu trúc này cấu thành từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1.

17. Vector chứa axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16.

18. Dòng tế bào của động vật có vú được chuyển nạp bằng axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16 và axit nucleic của capsit nhân của virus giả dài được tạo mạch thẳng.

19. Dòng tế bào của động vật có vú theo điểm 18, trong đó dòng tế bào này là dòng tế bào PK-15.

20. Dòng tế bào của động vật có vú theo điểm 18, trong đó virus giả dài này là virus giả dài Bartha-K61.

21. Virus giả dài tái tổ hợp tứ giá chứa axit nucleic cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16.

22. Virus giả dài tái tổ hợp tứ giá theo điểm 21, trong đó virus giả dài này là virus giả dài Bartha-K61.

23. Vaccine chứa virus giả dài tái tổ hợp tứ giá theo điểm 21 và chất mang sinh lý dụng.

24. Phương pháp phát triển vaccine bằng cách sử dụng virus giả dài tái tổ hợp tứ giá theo điểm 21.

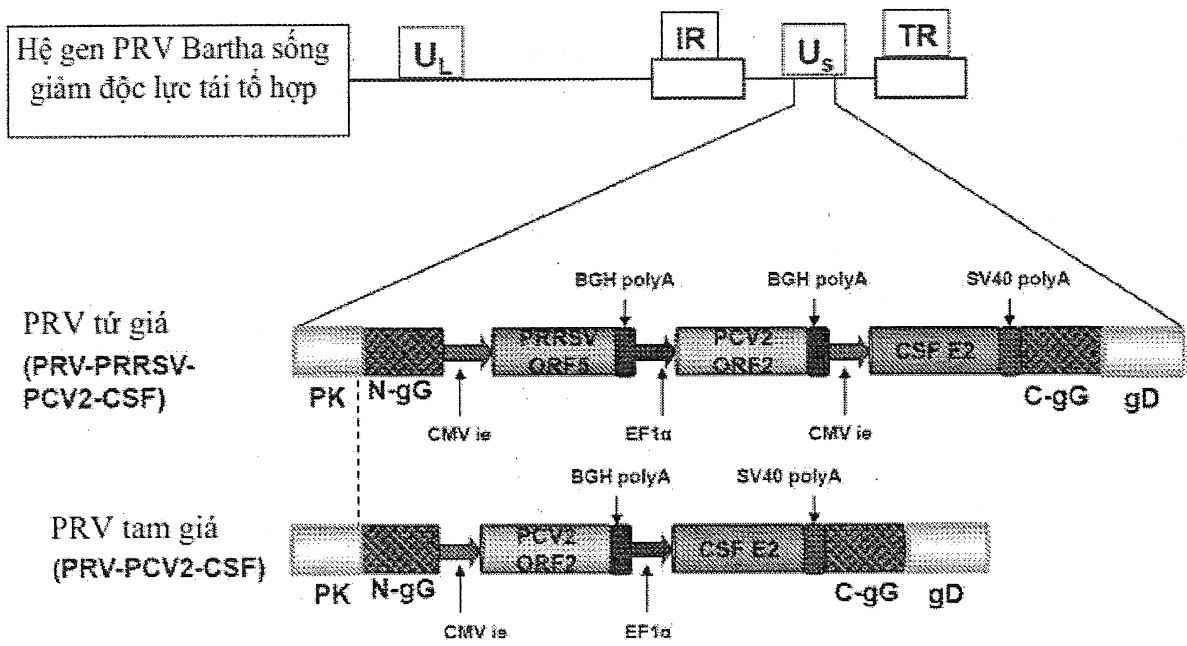


Fig.1

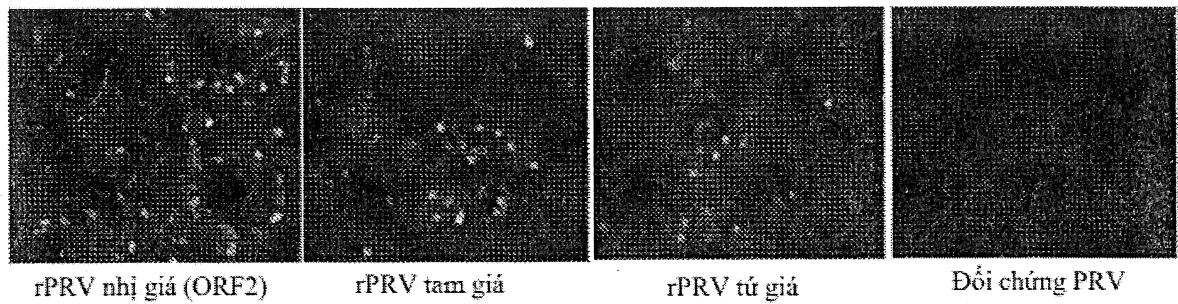


Fig.2A

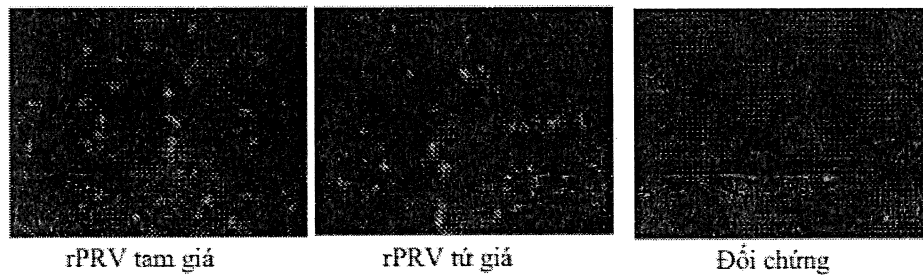


Fig.2B

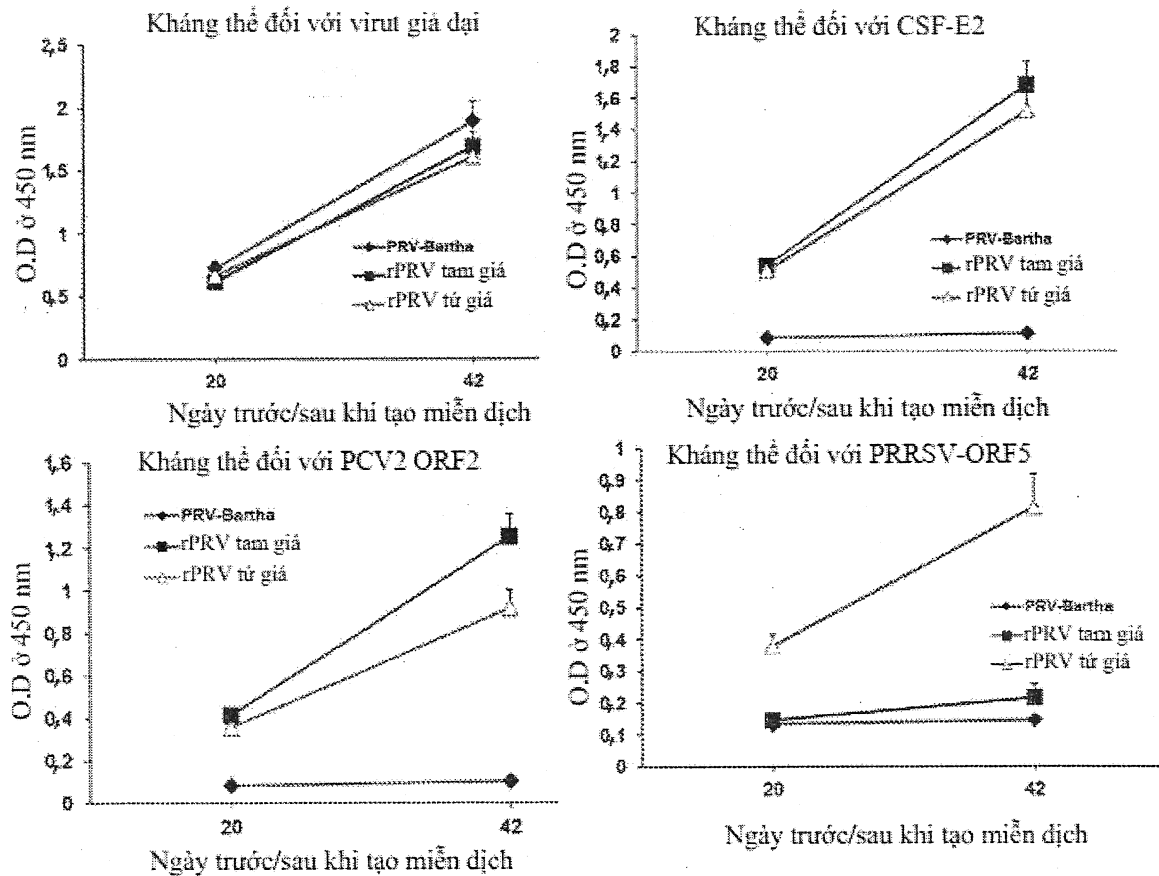


Fig.3

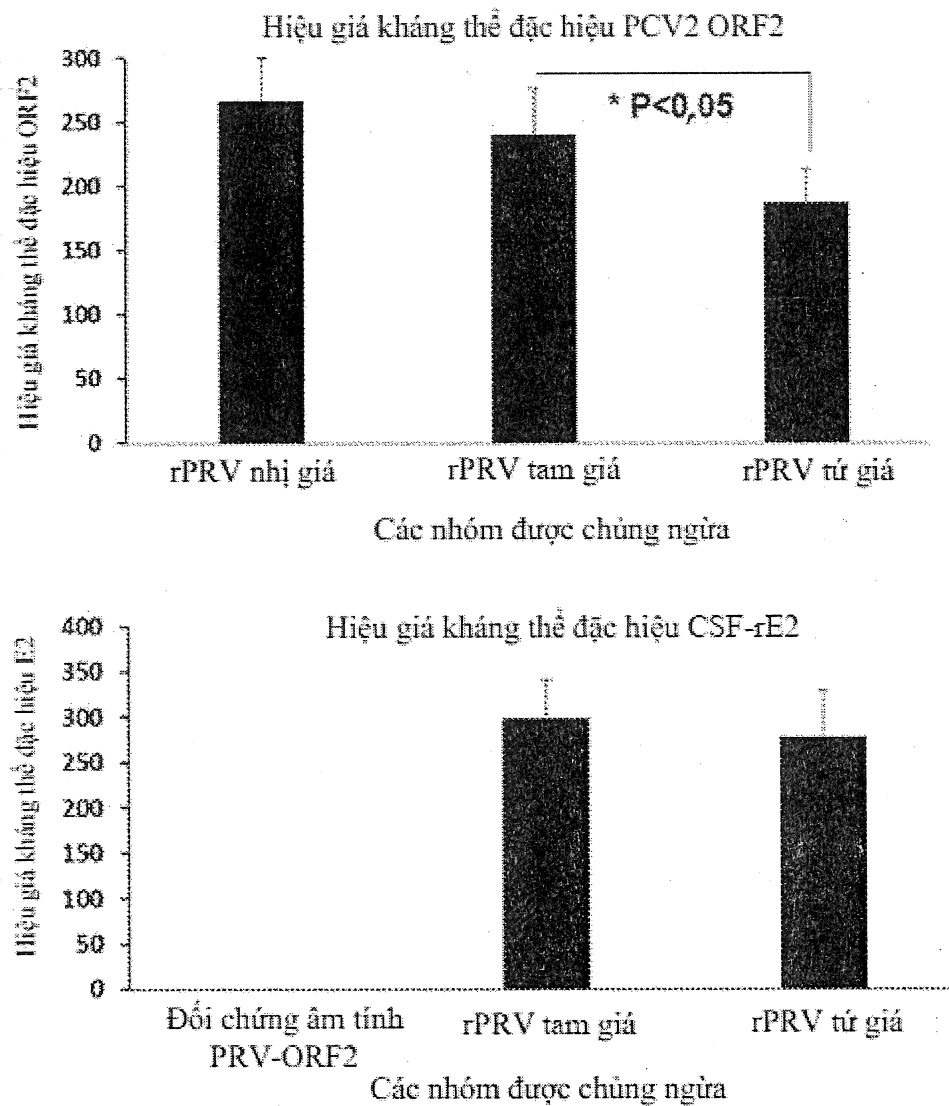


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED
 <120> AXIT NUCLEIC CẤU TRÚC, VECTO VÀ DÒNG TẾ BÀO CỦA ĐỘNG VẬT CÓ VÚ
 <130> 2577-254PCT
 <150> US 62/338,939
 <151> 2016-05-19
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6619
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Axit nucleic chứa trình tự của virus gây bệnh ở lợn
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1)..(6)
 <223> Vị trí cắt giới hạn HindIII
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (7)..(438)
 <223> Trình tự PRV gG
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (439)..(444)
 <223> Vị trí cắt giới hạn PstI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (445)..(1034)
 <223> Trình tự khởi động CMV ie
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1035)..(1040)
 <223> Vị trí cắt giới hạn BglI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1041)..(1643)
 <223> Trình tự PRRSV ORF5
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1644)..(1868)
 <223> Trình tự BGH polyA
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1869)..(3056)
 <223> Trình tự khởi động EF1-1alpha
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (3057)..(3062)
 <223> Vị trí cắt giới hạn AgeI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (3063)..(3767)
 <223> Trình tự PCV ORF2
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (3799)..(4023)
 <223> Trình tự BGH polyA
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4024)..(4029)
 <223> Vị trí cắt giới hạn XhoI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4038)..(4043)
 <223> Vị trí cắt giới hạn SalI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4044)..(4631)
 <223> Trình tự khởi động CMV ie
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4729)..(5916)
 <223> Trình tự CSF E2
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (5917)..(5924)

<223> Vị trí cắt giới hạn NotI

<220>

<221> Trình tự lõi

<222> (5925)..(6192)

<223> Trình tự SV40 polyA

<220>

<221> Trình tự lõi

<222> (6193)..(6613)

<223> Trình tự PRV gG

<220>

<221> Trình tự lõi

<222> (6614)..(6619)

<223> Vị trí cắt giới hạn HindIII

<400> 1

aagctttggg	caacgtggat	cctcgccctc	gggctcctcg	tgggtccgcac	cgctcgtggcc	60
agagaggccc	ctcgggagct	ctgctacggc	caccccgctc	acgacgaccg	gcgggcccgtc	120
gggcccgcga	ccgacgcca	gcccgtgaac	ccgctcgccc	ccgccaacgc	caccgggacg	180
gactactcte	gcggtcgca	gatgcgcctc	ctggatccgc	ctctcgacgt	atcgtcccgc	240
tccctcgacc	ccgtcaacgt	gaccgtcgcc	tggttccttg	acggcgccca	ctgcaagggtg	300
ccctcgtccc	accgcgagta	ctacgggtgc	cccggggacg	ccatgcccctc	cgctcgagacg	360
tgcaccggcg	ggtaactcgt	caccgcgacg	cgcacgcaca	ccctgatgga	gtacgcccctc	420
gtgaacgcca	gcctcgtgct	gcagtagtta	ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattagt	480
tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	gtaaatggcc	cgcctggctg	540
accgccaac	gaccccgccc	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttccca	tagtaacgcc	600
aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	cggtaaaactg	cccacttggc	660
agtaacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaaatg	720
gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	tttcctactt	ggcagtaacat	780
ctacgtatta	gtcactcgta	ttaccatggt	gatgcggttt	tggcagtaca	tcaatggggcg	840
tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	cccattgacg	tcaatggggag	900
tttgttttgg	cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaaatg	cgtaacaact	ccgccccatt	960
gacgcaaat	ggcggtaggc	gtgtacggtg	ggaggtctat	ataagcagag	ctggtttagt	1020
gaaccgtcag	atccagatct	atgttgggga	agtgcctgac	cgcgtgctgt	tgctcgcgat	1080
tgcttttttt	gtggtgtatc	gtgccgttct	atcttgcgtg	gctcgtcaac	gccagcaaca	1140
acaacagctc	tcatattcag	ttgatttata	acttaacgct	atgtgagctg	aatggcacag	1200
attggctggc	acaaaaaattt	gactgggcag	tggagacttt	tgctcatctt	cccggttga	1260
ctcacattgt	ttcctatggg	gcactcacca	ccagccattt	ccttgacaca	gttgggtctgg	1320
ccactgtgtc	caccgcggga	tattatcacg	ggcggtatgt	cttgagtagc	atttacgcag	1380
tctgtgctct	ggctgcgctg	atttgccttg	tcattagcgt	tgcgaagaac	tgcatgtcct	1440
ggcgctactc	ttgtaccaga	tataccaact	tccttctgga	cactaagggc	agactctatc	1500
gttgcggttc	gcccgtcatt	gtgagaaaag	gggtaagggt	tgaggtcgaa	ggtaacctga	1560
tcgacctcaa	gagagtgtgt	cttgatgggt	ccgcggcaac	ccctttaacc	agagtttcag	1620
cggaaactatg	gggtcgtctc	tagctgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttggcc	1680
ctcccccggt	ccttccttga	ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	1740
tgagaaattt	gctcgagtag	gtctcattct	attctggggg	gtggggtggg		1800
gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	1860
ctctatggcg	tgaggctccg	gtgcccgtca	gtgggcagag	cgcacatcgc	ccacagtcoc	1920
cgagaagttg	gggggggggg	tccgcaattg	agccggtgcc	tagagaagggt	ggcgcggggt	1980
aaactgggaa	agtgatgtcg	tgtactggct	ccgccttttt	cccgagggtg	ggggagaacc	2040
gtatataagt	gcagtagtcg	ccgtgaacgt	tctttttcgc	aacgggtttg	ccgccagAAC	2100
acaggttaagt	gcccgtgtgtg	gttcccgcgg	gcctggcctc	tttacgggtt	atggcccttg	2160
cgtgccttga	attactttcca	cgccccctgg	tgcatgacgt	gattcttgat	cccagcttcc	2220
gggttggaaag	tgggtgggag	agttcgaggc	cttgccgtta	aggagccctt	tcgctcgtg	2280
cttgagtgtga	ggcctggcctt	ggggcgtggg	gcgcgcgctg	gcgaatctgg	tggcaccttc	2340
gcgcctgtct	cgctgctttc	gataagtctc	tagccattta	aaatttttga	tgacctgctg	2400
cgacgctttt	tttctggcaa	gatagtcttg	taaatgcggg	ccaggatctg	cacactggta	2460
tttctggttt	tgggcccgcg	ggcgccgacg	ggcccccgtc	gtcccagcgc	acatgttcgg	2520
cgaggcgggg	cctgcgagcg	cggccaccga	gaatcggaag	ggggtagtct	caagctggcc	2580
ggcctgctct	gggtgcctgg	ctcgcgcgcg	cgtgtatcgc	ccgcctctgg	gcggcaaggc	2640
tggcccgctg	ggcaccagtt	gcgtgagcgg	aaagatggcc	gcttcccggc	cctgctgcag	2700
ggagctcaaaa	atggaggacg	cggcgctcgg	gagagcgggc	gggtgagtca	cccacacaaa	2760
ggaaaagggg	ctttccgtcc	tcagccgtcg	cttcatgtga	ctccacggag	taccggggcg	2820
cgtccaggca	cctcgattag	ttctcgagct	tttgagtagc	gtcgtcttta	ggttgggggg	2880
aggggtttta	tgcgatggag	tttccccaca	ctgagtgggt	ggagactgaa	gttaggccag	2940
cttggcactt	gatgtaatc	tccttggaat	ttgccctttt	tgagtttgga	tcttggttca	3000
ttctcaagcc	tcagacagtg	gttcaaaagt	ttttcttccc	atttcagggtg	tcgtgaaccg	3060
gtatgacgta	tccaaggagg	cgtttccgca	gacgaagaca	ccgccccccg	agccatcttg	3120
gccagatcct	ccgcgcgcgc	ccctggctcg	tccacccccg	ccaccgttac	cgctggagaa	3180
ggaaaaaatg	catcttcaac	accgcctctc	ccgcacctt	cggatatact	gtcaagaaaa	3240
ccacagtccg	aacgcctccc	tgggcggtgg	acatgatgag	atttaaatatt	aacgatttcc	3300
ttcccccagg	agggggctca	aacccccctc	ctgtgccctt	tgaatactac	agaataagaa	3360
agggttaagg	tgaattcttg	ccctgctccc	caatcaccca	gggtgacagg	ggagttggat	3420
ccactgctgt	tattctagat	gataactttg	taacaaaggc	cacagccctg	acttatgatc	3480
cctatgtaaa	ctactcctcc	cgcataacca	taaccagccc	cttctcctac	cactcccgggt	3540
actttacccc	caaacctgtt	cttgattcca	ctattgatta	cttccaacca	aataacaaaa	3600
ggaatcagct	ttggctgagg	ctacaaacca	ctgcaaatgt	ggaccacgta	ggcctcggca	3660
ctgcgttcga	aaacagtata	tacgaccagg	actacaatat	ccgtgtaacc	atgtatgtac	3720
aattcagaga	atttaactct	aaagaccccc	cacttcaccc	taagtggagg	ccggtttaaa	3780
cccgtgatc	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttggt	tgccccctcc	3840
cctgtgccttc	cttgacctcg	gaaggtgcca	ctcccactgt	cctttcctaa	taaaatgagg	3900

```

aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg 3960
acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgag gtgggctcta 4020
tggctcgagc ttctccagtc gacgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 4080
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 4140
aaatggcccc cctggtcgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta 4200
tgttcccatc gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtattttacg 4260
gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 4320
cgtcaatgac ggtaaatggc ccgctggcga ttatgccag tacatgacct tatgggactt 4380
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 4440
gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc 4500
cattgacgtc aatgggagtt tgttttgca ccaaatcaa cgggactttc caaatgtcg 4560
taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat 4620
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac 4680
gactcactat agggagaccc aagctggcta gcgtttaaac ttaacttat aaaagtatta 4740
agaggacaga tcgtgcaagg tgtggtatgg ctgttactag taactggggc acaaggccgg 4800
ctagcctgca aggaagatta caggtacgca atatcgtaa ccgatgagat agggctactt 4860
ggggccggag gtctcaccac cactggaag gaatacaacc acgatttgca actgaatgac 4920
gggacggtta aggccagttg cgtggcaggt tcctttaaag tcacagcact taatgtgggtc 4980
agtaggaggt aattggcatc attgcataag aaggctttac ccacttcgt gacattcgag 5040
ctcctgttgc acgggaccaa cccatcaact gagggaaatg gagatgactt caggtccggg 5100
ctgtgcccgt ttgatcagag tcctgttgtt aagggaagt acaatacgac cttgttgaac 5160
ggtagtgctt tctatcttgt ctgcccata ggggtgacgg gtgtcataga gtgcacagca 5220
gtgagcccaa caactctgag aacagaagtg gtaaaagcct tcaggagaga caagcccttt 5280
ccgcacagaa tggatttgtt gaccaccaca gtggaaaatg aagatttatt ctattgtaag 5340
ttgggggggca actggacatg tgtgaaaggc gagccagtgg tctacacagg ggggctagta 5400
aaacaatgta gatggtgtgg ctctgacttc gatgggcctg acggactccc gcattacccc 5460
ataggtaagt gcattttggc aaatgagaca ggttacgaa tagtagattc aacggactgt 5520
aacagagatg gcgttgtaat cagcacagag gggagtcatg agtgcttgat cggtaacacg 5580
actgtcaagg tgcatgcatc agatgaaaga ctgggcccta tgccatgcag acctaaagag 5640
attgtctcta gtgtcggacc tghtaatgaa acctcctgta cattcaacta cacaaaaact 5700
ttgaagaaca ggtactatga gcccagggac agctacttcc agcaatatat gcttaagggt 5760
gagtatcagt actggtttga cctggatgcg actgaccgcc actcagatta cttcgagaa 5820
tttgttgtct tgggtgttgt agcactgtta ggaggaagat atgtcctgtg gctgatagt 5880
acctacgtag ttctaacaga acaactcgcc gctgggtgcg ccgcctagct agctagaatt 5940
ctagctagct aggaactctg aagactctag atcataatca gccataccac attttagtag 6000
gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat 6060
gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 6120
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg tttgtccaaa 6180
ctcatcacta gtcccgggtt gtacgacgcc ggctctaca tcgtcgtgct cgtctttggc 6240
gacgacgcct acctcgccac cgtctccctg tcgggtggag ccaacctgga ctaccttgc 6300
ggcatgaagc acgggctcac gatcacccgc cccggggcca cctcccacc catcgcccc 6360
acggccggcg accaccagcg ctggcgcggg tgcttccctc cgaccgacga gggcgctgtg 6420
gagaacgtga ccgcccgcga gaagggcctg tccgacgact acgcccacta ctacgacgtg 6480
cacatcttcc gctcggagtc tgacgacgag gtctgccag gcgatgcccc cgaggcccc 6540
gagggcgagg aggtgaccga ggaggaggcc gagctgacct ccagcgacct cgacaacatc 6600
gagatcgagg tcgaagctt

```

- <210> 2
 <211> 5119
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Axit nucleic chứa trình tự của virus gây bệnh ở lợn
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1)..(6)
 <223> Vị trí cắt giới hạn HindIII
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (7)..(438)
 <223> Trình tự PRV gG
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (439)..(444)
 <223> Vị trí cắt giới hạn PstI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (445)..(1047)
 <223> Trình tự khởi động CMV ie
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1048)..(1053)
 <223> Vị trí cắt giới hạn AgeI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1054)..(1764)
 <223> Trình tự PCV ORF2
 <220>
 <221> Trình tự lỗi

<222> (1790)..(2014)
 <223> Trình tự BGH polyA
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (2015)..(2020)
 <223> Vị trí cắt giới hạn XhoI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (2029)..(2034)
 <223> Vị trí cắt giới hạn SalI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (2035)..(3222)
 <223> Trình tự khởi động EF1-1alpha
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (3229)..(4416)
 <223> Trình tự CSF E2
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4417)..(4424)
 <223> Trình tự cắt giới hạn NotI
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4425)..(4692)
 <223> Trình tự SV40 polyA
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (4693)..(5113)
 <223> Trình tự PRV gG
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (5114)..(5119)
 <223> Vị trí cắt giới hạn HindIII
 <400> 2
 aagcttttgg caacgtggat cctcgccctc gggtctctcg tgggtccgcac cgtcgtggcc 60
 agagaggccc ctccggagct ctgctacggc caccocgtcc acgacgaccg gcggcccgtc 120
 gggcccgcga ccgacgcca gcccgtagac ccgctcgccc ccgccaacgc caccgggacg 180
 gactactctc gcggtcgca gatgcgcctc ctggatccgc ctctcgacgt atcgtcccgc 240
 toctcggacc ccgtcaacgt gacgctcgcc tggttctttg acggcggcca ctgcaagggtg 300
 cccctcgtcc accgcgagta ctacggctgc ccgggggacg ccatgcccctc cgtcgagacg 360
 tgcacggcgg ggtactcgta caccgcgacg cgcacgcaca ccctgatgga gtacgccctc 420
 gtgaacgcga gccctcgtgt gcagtagtta ttaattagtaa tcaattacgg ggtcattagt 480
 tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg 540
 accgccaac gcccccgcg cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc 600
 aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacctg cccacttggc 660
 agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt gacgtcaatg accgtaaatg 720
 gcccgctcgg cattatggcc agtacatgac cttatgggac ttctctactt ggcagtacat 780
 ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggag 840
 tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag 900
 tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt 960
 gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctggtttagt 1020
 gaaccgtcag atccagatct gctagcgacc ggtatgacgt atccaaggag gcgtttccgc 1080
 agacgaagac accgcccccg cagccatctt gccagatcc tccgcccgcg cccctggctc 1140
 gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga agaaaaatg gcattctcaa caccgcctc 1200
 tcccgcacct tcggatatat tgtcaagaaa accacagtoa gaacgcctc ctgggcggtg 1260
 gacatgatga gatttaatat taacgatttc cttccccag gagggggctc aaacccccctc 1320
 actgtgccct ttgaatacta cagaataaga aaggtttaagg ttgaattctg gccctgctcc 1380
 ccaatcacc accggtgacag gggagttgga tccactgctg ttattctaga tgataacttt 1440
 gtaacaaagg ccacagccct gacttatgat ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc 1500
 ataaccacgc ccttctccta cactcccg taactttacc ccaaacctgt tcttgattcc 1560
 actattgatt acttccaacc aaataacaaa aggaatcagc tttggctgag gctacaaacc 1620
 actgcaaatg tggaccacgt aggcctcgcc actgcgttcg aaaacagtat atacgaccag 1680
 gactacaata tccgtgtaac catgtatgta caattcagag aatttaactc taaagacccc 1740
 ccacttcacc ctaagttagg gcccgtttaa acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct 1800
 agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc ccgctgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 1860
 actccactg tcccttcccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 1920
 cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 1980
 agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggctcgag cttctccagt cgaccgtgag 2040
 gctccggtgc ccgtcagtg gacagcgca catcgccac agtccccgag aagttggggg 2100
 gaggggtcgg caattgagcc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggttaaac tgggaaagtg 2160
 atgtcgtgta ctggctccgc cttttcccg aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag 2220
 tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgcgcg cagaacacag gtaagtgcg 2280
 tgtgtggttc ccgcccgcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgctg ccttgaatta 2340
 cttccacgcc cctggtcgca gtacgtgatt cttgatcccg agcttcgggt tggaaagtgg 2400
 tgggagaggt cgaggccttg cgcttaagga gccctctcgc ctctgcttg agttgaggcc 2460
 tggcttgggc cttggggcgc ccgctgcga atctgggtgc accctcgcgc ctgtctcgct 2520
 gctttcgata agtctctagc catttaaaat ttttgatgac ctgctgcgac gcttttttcc 2580
 tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccag gatctgcaca ctgggtatttc ggtttttggg 2640

```

gcccgcgggcg ggcagcggggc ccgtgcgtcc cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg 2700
cgagcgcggcg caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg 2760
cctggcctcg cgccgcctg tatcgcccg cctggggcg caaggctggc ccggtcggca 2820
ccagttgctg gagcggaaag atggccgctt cccggccctg ctgcaggag ctcaaaatgg 2880
aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt gagtcaccca cacaaggaa aagggccttt 2940
ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc 3000
gattagttct cgagcctttg gagtacgtcg tctttagggtt ggggggagg gttttatgcg 3060
atggagtttc cccacactga gtgggtggag actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg 3120
taattctcct tggaaatttg cctttttgag tttggatctt gtttcattct caagcctcag 3180
acagtgggtc aaagtttttt tcttccattt caggtgtcgt gaaaacttat aaaagtatta 3240
agaggacaga tcgtgcaagg tgtggtatgg ctgttactag taactggggc acaaggccgg 3300
ctagcctgca aggaagatta caggtagcga atatcgtcaa ccgatgagat agggctactt 3360
ggggccggag gtctcaccac cacttggaag gaatacaacc acgatttgca actgaatgac 3420
gggaccgtta aggcagttg cgtggcaggt tccttttaag tcacagcact taatgtggtc 3480
agtaggaggt atttggcatt attgcataag aaggcctttac ccacttcgt gacattcgag 3540
ctcctgttct acgggaccaa cccatcaact gagggaaatg gagatgactt cagggtccggg 3600
ctgtgccctg ttgatacgag tctgtgtgtt aagggaagt acaatcgcac cttgttgaac 3660
ggtagtgtt tctatcttgt ctgcccaata ggggtggacg gtgtcataga gtgcacagca 3720
gtgagcccaa caactctgac aacagaatg gttaaagacct tcaggagaga caagcccttt 3780
ccgcacagaa tggattgtgt gaccaccaca gtggaaaatg aagatttatt ctattgtaag 3840
ttggggggca actggacatg tgtgaaaggc gagccagtgg tctacacagg ggggctagta 3900
aaacaatgta gatggtgtgt cttcgacttc gatgggcctg acggactccc gcattacccc 3960
ataggtgaat gcattttggc aaatgagaca ggttacagaa tagtagattc aacggactgt 4020
aacagagatg gcgttgtaat cagcacagag gggagtcagt agtgcttgat cggtaaacag 4080
actgtcaagg tgcatgcac agatgaaaga ctgggcccta tgccatgcag acctaaagag 4140
attgtctcta gtgtgggacc tgtaaatgaaa acctcctgta cattcaacta cacaanaact 4200
ttgaagaaca ggtactatga gccaggag agctacttcc agcaatatat gcttaagggt 4260
gagtatcagt actggtttga cctggatgag actgaccgcc actcagatta cttcgcagaa 4320
tttgttgtct tgggtgtgtt agcactgtta ggaggaagat atgtcctgtg gctgatagtg 4380
acctacgtag ttctaacaga acaactcgcc gctgggtcgg ccgcctagct agctagaatt 4440
ctagctagct aggactctag aagactctag atcataatca gccataccac attttagag 4500
gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat 4560
gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gttataatg gttacaaata aagcaatagc 4620
atcacaat tccacaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg tttgtccaaa 4680
ctcatcacta gtcccgggtt gtacgacgcc ggctctaca tgcctgtgct cgtctttggc 4740
gacgacgctt acctcgccac cgtctccctg tcgggtggag ccaacctgga ctacctctgc 4800
ggcatgaagc acgggctcac gatcacccgc cccggggcca cctcccacc catcgcccc 4860
acggccggcg accaccagcg ctggcgcggg tgcttccctt cgaccgacga gggcgcttg 4920
gagaacgtga ccgcccgcga gaagggctg tccgacgact acgcccacta ctacgacgtg 4980
cacatcttcc gctcggagtc tgacgacgag gtcgtccacg gcgatgcccc cgaggcccc 5040
gagggcgagg aggtgaccga ggaggaggcc gagctgacct ccagcgacct cgacaacatc 5100
gagatcgagg tcgaagctt

```

<210> 3

<211> 2028

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic chứa trình tự tổng hợp của virus gây bệnh ở lợn

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (1)..(6)

<223> Vị trí cắt giới hạn BglII

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (7)..(609)

<223> Trình tự PRRSV ORF5

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (610)..(834)

<223> Trình tự BGH poly A

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (835)..(2022)

<223> Trình tự khởi động EF1-1alpha

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (2023)..(2028)

<223> Vị trí cắt giới hạn AgeI

<400> 3

```

agatctatgt tggggaagtg cttgaccgcg tgctgttgct cgcgattgct ttttttgttg 60
tgtatcgtgc cgttctatct tgctgtgtgc gtcaacgcca gcaacaacaa cagctctcat 120
attcagttga tttataactt aacgctatgt gagctgaatg gcacagattg gctggcacia 180
aaatttgact gggcagtgga gactttgttc atcttccccg tgttgactca cattgtttcc 240
tatggggcac tcaccaccag ccatttccct gacacagttg gtctggccac tgtgtccacc 300
gccggatatt atcacgggag gtatgtcttg agtagcattt acgcagctcg tgctctggtt 360
gcgctgattt gctttgtcat taggcttgcc aagaactgca tgccttgccg ctactcttgt 420
accagatata ccaacttctt tctggacact aagggcagac tctatcgttg gcggtcgccc 480
gtcattgttg agaaaggggg taaggttgag gtcgaaggtc acctgatcga cctcaagaga 540
gttggtgctt atggttccgc ggcaaccctt ttaaccagag ttccagcgga actatggggg 600

```

```

cgtctctagc tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt 660
ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaatgag gaaattgcat 720
cgcaattgtct gaggtagtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg 780
gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcgtgag 840
gctccggtgc ccgtcagtg gtagagcgca catcgccac agtccccgag aagttggggg 900
gaggggtcgg caattgagcc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg 960
atgtcgtgta ctggctccgc ctttttccc aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag 1020
tagtcgcctg gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgccg 1080
tgtgtgggtc ccgcgggcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgctg ccttgaatta 1140
cttccacgcc cctgggtgca gtacgtgatt ctgatccc agcttcgggt tggagtgagg 1200
tgggagagtg cgagggcctg cgcttaagga gccccttcgc ctctgcttg agttgaggcc 1260
tggcttgggc gctggggccg ccgctgcca atctgggtgc accctcgccg ctgtctcgct 1320
gctttcgata agtctctagc catttaaaat ttttgatgac ctgctgcgac gctttttttc 1380
tggcaagata gtcttgtaa tgcggggccg gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg 1440
gccgcgggcg gcaacggggc ccgtgcgtcc cagcgacat ctctggcgag gcggggcctg 1500
cgagcgggcg caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg 1560
cctggcctcg cgccgcctg tatcgcccg ccctggcgcg caaggtctgc ccgttcggca 1620
ccagttgcgt gagcgaaaag atggccgctt cccggccctg ctgcaggag ctcaaaatgg 1680
aggacggcg gctcgggaga cgggcggggt gactcacc caaaaggaa aagggccttt 1740
ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc 1800
gattagttct cgagcttttg gactacgtcg tctttagggt ggggggaggg gttttatgag 1860
atggagtttc ccacactga gtgggtggag actgaagtta ggccagcttg gcaacttgatg 1920
taattctcct tggaaattgc ctttttgag tttgatctt ggttcattct caagcctcag 1980
acagtgggtc aaagtgtttt tcttccattt caggtgtcgt gaaccggt 2028

<210> 4
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi oligonucleotit
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (4)..(9)
<223> Vị trí cắt giới hạn AgeI
<400> 4
ctgaccggta tgacgtatcc aaggaggcg 29

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi oligonucleotit
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (4)..(9)
<223> Vị trí cắt giới hạn XhoI
<400> 5
cggctcgagc catagagccc accgcac 28

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi oligonucleotit
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (4)..(9)
<223> Vị trí cắt giới hạn Sall
<400> 6
cgctcgagc ttgacattga ttattgac 28

<210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi oligonucleotit
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (5)..(12)
<223> Vị trí cắt giới hạn NotI
<400> 7
taaagcggcc gcaccagcgg cgagttgttc tg 32

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi oligonucleotit
<220>

```

<221> Trình tự lỗi
<222> (3)..(8)
<223> Vị trí cắt giới hạn SaII
<400> 8
gcgtcgaccg tgaggctccg gt

22