



(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)



1-0042496

(51)<sup>2020.01</sup> A61K 39/12; C12Q 1/70; C07K 14/005 (13) B

(21) 1-2021-04211

(22) 15/12/2015

(62) 1-2017-02684

(86) PCT/US2015/065795 15/12/2015

(87) WO2016/100328 23/06/2016

(30) 62/091,824 15/12/2014 US

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/10/2021 403

(73) 1. THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK (US)

412 Low Memorial Library, 535 West 116th Street, New York, NY 10027, United States of America

2. RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (IL)

P.O. Box 39296, 6139201 Tel Aviv, Israel

3. KIMRON VETERINARY INSTITUTE (IL)

P.O. Box 12, 50250 Bet Dagan, Israel

(72) LIPKIN, W. Ian (US); BRIESE, Thomas (US); MISHRA, Nischay (US); BACHARACH, Eran (IL); ELDAR, Avi (IL).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) POLYPEPTIT PHÂN LẬP CỦA VIRUT TILAPIA LAKE VÀ CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA POLYPEPTIT NÀY

(21) 1-2021-04211

(57) Sáng chế đề cập đến virus Tilapia Lake hay TiLV được phân lập, trình tự axit nucleic được phân lập và polypeptit của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến các mẫu dò và đoạn mồi, và kháng thể chống lại kháng nguyên từ TiLV, và phương pháp sử dụng các chất phản ứng này để phát hiện sự có mặt hoặc không của TiLV ở động vật. Sáng chế cũng đề cập đến các iARN mà hướng đích đến các trình tự axit nucleic của TiLV. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm kháng thể và vaccin, để gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV ở động vật. Sáng chế còn đề cập đến cấu trúc gen và tế bào bao gồm TiLV và các trình tự axit nucleic được phân lập và polypeptit của chúng để sử dụng trong việc phát triển các tác nhân phòng bệnh và trị liệu.

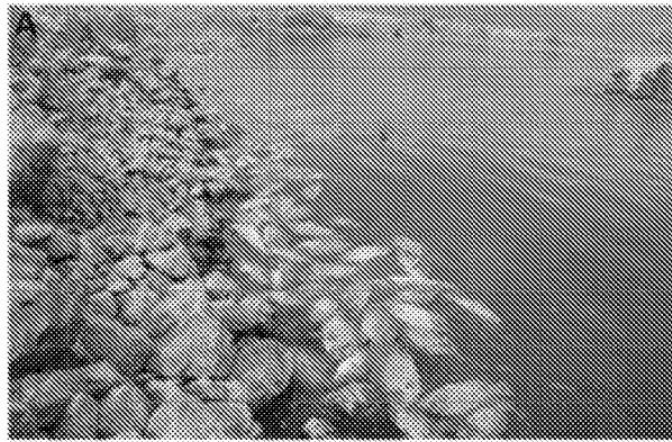


Fig.1A

## Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này thuộc lĩnh vực virus và liên quan đến một loại virus mới được tìm thấy ở cá rô phi, được gọi là virus Tilapia Lake (Tilapia Lake Virus-TiLV). Sáng chế bao gồm TiLV được phân lập, và các trình tự axit nucleic được phân lập và các polypeptit của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến các đoạn môi và mẫu dò. Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể chống lại các kháng nguyên từ TiLV. Sáng chế đề cập đến các phương pháp để phát hiện sự có mặt hoặc không của TiLV ở động vật bằng cách sử dụng các đoạn môi, mẫu dò, và kháng thể. Sáng chế cũng đề cập đến các iARN mà hướng đích đến các trình tự axit nucleic của TiLV. Sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm sinh miễn dịch để gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV ở động vật.

## Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tông cá rô phi là nhóm cá nuôi quan trọng thứ hai khắp thế giới, với sản lượng là 2,5 triệu tấn hàng năm (Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc 2010), và chúng đóng vai trò là nguồn protein chính ở các nước đang phát triển. Biển hồ Galilee (Hồ Kinneret) ở Israel là một nguồn chính của ngành đánh bắt cá thương mại. Trong những năm gần đây, số lượng cá đánh bắt đã chịu sự sụt giảm liên tục.

Mặc dù hồ này có khoảng 27 loài cá, bao quát các thành viên của các họ *Cichlidae*, *Cyprinidae*, *Mugillidae*, và *Clariidae*, nhưng chỉ có sự suy giảm về mức đánh bắt của tông cá rô phi (*Cichlidae*) là dễ nhận thấy. Cá ăn được chính của hồ này, *Sarotherodon* (cá rô phi) *galilaeus* (cá thánh Phê rô), đã thấy sản lượng hàng năm đã giảm từ 316 tấn trong năm 2005 xuống 51, 8, và 45 tấn lần lượt trong năm 2007, 2009, và 2010.

*S. galilaeus* góp phần vào việc duy trì sự cân bằng sinh thái của hồ này. Do đó, vượt ra ngoài ảnh hưởng kinh tế của nó, sự sụt giảm đáng kể của các quần thể cá thánh Phê rô, cũng như các tông cá rô phi khác của hồ (như *Tilapia zilli* [cá rô phi thông thường], *Oreochromis aureus* [cá rô phi Jordan], và *Tristramella simonis intermedia*) thể hiện sự đe dọa rõ ràng đối với toàn bộ hệ sinh thái.

Sự suy giảm về tổng cá rô phi hồ ở biển hồ Galilee này là do bệnh nghiêm trọng đang nổi lên ở các quần thể hoang dã của các loài thuộc tổng cá rô phi, bao gồm *S. galilaeus*, *T. zilli*, *O. aureus*, và *T. Simonis intermedia*, và cũng như ở cá rô phi lai được nuôi ở ao *O. niloticus* x *O. aureus* ở Israel. Sự gắn liền của các đợt bùng phát bệnh với tính theo mùa (tháng năm đến tháng mười, khi nước có nhiệt độ tương đối cao) còn cho thấy sự liên quan của tác nhân truyền nhiễm, vì nhiệt độ nước ảnh hưởng đến sự nổi lên của một loạt rất nhiều bệnh do ký sinh trùng, vi khuẩn, và virus của cá. Việc theo dõi thường kỳ các độc tố hoặc các mầm bệnh ký sinh trùng, vi khuẩn, virus đã biết đã không cho thấy sự bất bình thường bất kỳ, và đã không nhận diện được tác nhân căn nguyên nào.

Sự bùng phát tương tự của bệnh ở cá rô phi cũng được tìm thấy ở Ecuador.

Vì vậy, có nhu cầu nhận diện tác nhân căn nguyên của sự sụt giảm này ở các quần thể cá rô phi ở hai vị trí địa lý khác nhau, cũng như nhu cầu về các dụng cụ và phương pháp để phát hiện sự có mặt của tác nhân căn nguyên trong phạm vi các quần thể cá và để bảo vệ các quần thể cá khỏi tác nhân căn nguyên của sự sụt giảm này. Sáng chế này giải quyết các nhu cầu này.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến sự phát hiện rằng tác nhân căn nguyên của bệnh tổng cá rô phi là virus ARN virus Tilapia Lake (TiLV) mới. Sự phân bố rộng của virus này và sự tồn tại của các đặc tính lâm sàng khác nhau của bệnh gắn liền của nó làm cho các kết quả được mô tả trong bản mô tả này có tầm quan trọng đối với nghề nuôi cá và việc bảo tồn cuộc sống hoang dã.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các dụng cụ chẩn đoán hữu ích để sàng lọc mẫu để tìm TiLV.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế được mô tả trong bản mô tả này đề xuất các vaccin để bảo vệ cá khỏi các bệnh virus. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin để phòng ngừa bệnh do virus Tilapia Lake (TiLV) gây ra ở cá, cụ thể là tổng cá rô phi. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp sử dụng vaccin để bảo vệ tổng cá rô phi khỏi bệnh do TiLV gây ra.



Các khía cạnh cụ thể, sáng chế có đề xuất các trình tự axit nucleic của TiLV được phân lập (bao gồm các trình tự cADN tương ứng với trình tự ARN có nghĩa hoặc trình tự ARN đối nghĩa của TiLV) và các peptit của chúng. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể chống lại các kháng nguyên được tạo ra từ TiLV. Sáng chế cũng đề xuất các iARN mà hướng đích đến các trình tự axit nucleic của TiLV. Sáng chế đề xuất các phương pháp để phát hiện sự có mặt hoặc không của TiLV ở động vật (ví dụ, ở cá). Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm sinh miễn dịch để gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV ở động vật (ví dụ, ở cá).

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các đoạn và các biến thể của chúng. Theo các phương án nhất định, axit nucleic này là trình tự ADN, bao gồm cADN. Theo các phương án nhất định, axit nucleic này là trình tự ARN.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp bao gồm axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 1-10, các trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các biến thể của chúng. Các axit nucleic tổng hợp này bao gồm các đoạn nối và các mẫu dò.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất bộ đoạn nối để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, trong đó bộ đoạn nối này bao gồm ít nhất một trình tự axit nucleic tổng hợp được chọn từ nhóm gồm các axit nucleic tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm: a) cho axit nucleic từ mẫu sinh học tiếp xúc với ít nhất một đoạn nối là axit nucleic tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này, b) đưa axit nucleic và đoạn nối vào các điều kiện khuếch đại, và, c) xác định sự có mặt hoặc không của sản phẩm khuếch đại, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại chỉ ra sự có mặt của ARN gắn liền với TiLV trong mẫu.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các mẫu dò oligonucleotit để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phân tử iARN mà hướng đích đến các axit nucleic từ TiLV, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các biến thể của chúng, và việc làm bất hoạt (silence) gen đích.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để làm giảm các mức của protein TiLV ở động vật, ARN thông tin của virus ở động vật hoặc hiệu giá virus ở tế bào của động vật, phương pháp này bao gồm việc cho động vật dùng iARN được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập được mã hóa bởi axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các axit nucleic có các trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các đoạn và các biến thể của chúng.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12, và các đoạn và các biến thể của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương tiện đọc được bằng máy tính có lưu trữ trên đó: (i) trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm: trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, trình tự về cơ bản đồng nhất với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và biến thể trình tự của trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc (ii) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm: trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, trình tự về cơ bản đồng nhất với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và biến thể trình tự của trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với polypeptit theo sáng chế (ví dụ, polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến

SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung với chúng hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng).

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để xác định xem mẫu có chứa TiLV hay không, phương pháp này bao gồm: a) cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể mà liên kết đặc hiệu với polypeptit của polypeptit bất kỳ trong số polypeptit được phân lập (hoặc không được phân lập) nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung với chúng hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, và b) xác định xem liệu kháng thể có liên kết vào kháng nguyên trong mẫu sinh học hay không, trong đó sự liên kết chỉ ra rằng mẫu sinh học chứa TiLV. Theo các phương án nhất định, phương pháp xác định bao gồm việc sử dụng thử nghiệm dòng chảy ngang hoặc ELISA.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để xác định xem liệu mẫu sinh học đã bị lây nhiễm TiLV hay chưa, phương pháp này bao gồm: a) xác định xem liệu mẫu sinh học có chứa các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với polypeptit của polypeptit bất kỳ trong số polypeptit được phân lập (hoặc không được phân lập) nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung với chúng hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV bao gồm TiLV theo sáng chế bao gồm axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc bao gồm trình tự cADN bổ sung với sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc bao gồm polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự cADN bổ sung với sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc bao gồm polypeptit bao gồm SEQ ID NO: 12 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc bao gồm TiLV bị tiêu diệt hoặc TiLV được làm suy yếu.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở động vật, phương pháp này bao gồm việc cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp để phòng ngừa hoặc làm giảm mức lây nhiễm TiLV ở động vật, phương pháp này bao gồm việc cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch TiLV được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp để phòng ngừa hoặc làm giảm mức lây nhiễm TiLV ở động vật, phương pháp này bao gồm việc cho dùng kháng thể TiLV được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, phương pháp cho dùng này là phương pháp cho dùng qua đường miệng, phương pháp nhúng ngập hoặc phương pháp tiêm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này trong việc sản xuất vacxin để điều trị hoặc phòng ngừa sự lây nhiễm TiLV ở động vật.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất virut được phân lập bao gồm ít nhất 24 nucleotit liên tiếp từ axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất virut được phân lập bao gồm ít nhất 8 axit amin liên tiếp từ polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít

nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất tế bào được phân lập bao gồm axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các trình tự bổ sung với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và các đoạn và biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào bao gồm: a) gây nhiễm tế bào bằng TiLV, hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các trình tự bổ sung với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và các đoạn và biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này, và b) nuôi cấy tế bào.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm tra vaccin TiLV, bao gồm: a) cho tế bào tiếp xúc với vaccin TiLV; b) cho tế bào tiếp xúc với TiLV; và c) đo số lượng tế bào bị lây nhiễm TiLV.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm tra thuốc TiLV, bao gồm: a) cho tế bào tiếp xúc với thuốc TiLV; b) cho tế bào tiếp xúc với TiLV; và c) đo số lượng tế bào bị lây nhiễm TiLV.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm tra thuốc TiLV, bao gồm: a) cho tế bào tiếp xúc với TiLV; b) cho tế bào tiếp xúc với thuốc TiLV; và c) đo mức sao chép của TiLV.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp để nhận diện và/hoặc tạo ra các loại thuốc chống virus. Ví dụ, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp để nhận diện các loại thuốc mà liên kết vào và/hoặc ức chế chức năng của các protein được mã hóa bởi TiLV theo sáng chế, hoặc ức chế mức sao chép hoặc khả năng gây bệnh của TiLV theo sáng chế. Các phương pháp nhận diện các loại thuốc mà ảnh hưởng đến hoặc ức chế một đích thuốc cụ thể, như các phương pháp sàng lọc thuốc thông

lượng cao, là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể dễ dàng áp dụng được cho các protein và các virus theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp và dụng cụ để thiết kế thuốc, kiểm tra các tác nhân, và các dụng cụ dùng cho nghiên cứu cơ bản về nguyên nhân và bệnh nguyên học của TiLV.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Nhằm mục đích minh họa sáng chế, các phương án nhất định của sáng chế được minh họa trong các hình vẽ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở khả năng sử dụng công cụ và các dạng sắp xếp chính xác của các phương án được trình bày trong các hình vẽ.

Hình 1 thể hiện đặc điểm của bệnh cá rô phi và các phát hiện bệnh lý ở cá rô phi lai thương mại (thể lai *O. niloticus* x *O. aureus*) (Hình 1A và Hình 1C đến Hình 1E) và ở cá rô phi hoang dã (*S. galilaeus*) từ biển hồ Galilee (Hình 1B và Hình 1F đến Hình 1H). Hình 1A là bức ảnh thể hiện sự bùng phát bệnh cá rô phi trong ao thương mại đem lại mức tử vong hàng loạt (tháng tám 2013). Hình 1B là bức ảnh của cá rô phi mắc bệnh thể hiện hiện tượng teo của mắt và hiện tượng mất hoạt động chức năng mắt (chứng teo nhãn cầu). Hình 1C thể hiện bệnh học đại thể của da bao gồm hiện tượng ăn mòn da đa ổ đến hiện tượng ăn mòn da liên mạch và các vết loét được biểu thị bằng các mũi tên. Hình 1D thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của thận và mô kẽ. Các mũi tên đánh dấu tĩnh mạch bị giãn nở đầy con số lớn các hồng cầu (chứng sung huyết). Dạng nhuộm hematoxylin và eosin (H&E) x10. Hình 1E thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của não và vỏ não. Các mũi tên đánh dấu các mạch máu bị giãn nở đầy con số lớn các hồng cầu trong màng não mềm và chất xám và chất trắng. Dạng nhuộm H&E x 10 được sử dụng. Hình 1F thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của não và vỏ não. Các dải viền quanh mạch gồm các bạch huyết bào được khoanh tròn. Dạng nhuộm H&E x 40 được sử dụng. Hình 1Ga thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của thủy tinh thể. Các dạng thay đổi của bệnh đục thủy tinh thể là đặc trưng bởi hiện tượng hình thành các cấu trúc hình cầu ưa eosin (các hình cầu Morgagni) đi kèm với hiện tượng thoái hóa của các sợi tinh thể (được khoanh tròn). Dạng nhuộm H&E x 10 được sử dụng. Hình 1Gb thể hiện thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của thủy tinh thể đối chứng từ cá khỏe

mạnh. Dạng nhuộm H&E x 10 được sử dụng. Hình 1H thể hiện dạng nhuộm hematoxylin và eosin của mắt và giác mạc. Hiện tượng mất tính nguyên vẹn của biểu mô vảy nằm trên có các chất thâm nhiễm viêm (các đầu mũi tên) và nhiều mao mạch trong mô đệm (sự tân tạo mạch; được khoanh tròn). Các sợi collagen trong mô đệm ở bề mặt bị nhòe và được nhuộm ưa eosin nhạt nhợt (chúng phù giác mạc). Dạng nhuộm H&E x 10 được sử dụng.

Hình 2 thể hiện tác dụng gây bệnh tế bào hay dạng kích thích CPE trong các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm và phép phân tích soi hiển vi điện tử (electron microscopy-EM). Hình 2A thể hiện các hình ảnh của tế bào được gây nhiễm E-11 có CPE ở ngày 5 sau khi chủng ngừa. Hiện tượng hình thành mảng bám và tế bào chứa không bào được thể hiện ở các phần viền của các mảng bám. Các trung tâm của hai mảng bám được đánh dấu bằng dấu hoa thị. Hình 2B thể hiện các hình ảnh của tế bào não cá rô phi sơ cấp bị lây nhiễm có CPE ở ngày 10 sau khi chủng ngừa. Quá trình chuyển hóa tế bào thon dài thông thường thành tế bào có hạt, sung và tròn được đánh dấu bằng các mũi tên. Hình 2C và Hình 2D lần lượt là các hình ảnh của các đối chứng, E-11 được gây nhiễm đối tượng giả hoặc não cá rô phi sơ cấp. Hình 2E và Hình 2F là EM truyền qua của các lát mỏng của tế bào E-11 đã được gây nhiễm bằng các hạt có mật độ ngăn chặn điện tử xâm nhập (đường kính, 55 đến 60nm) được kết tụ và được ôm lấy trong màng trong bào tương (Hình 2E, được đánh dấu bằng mũi tên) hoặc trong bào tương (Hình 2F). Các thanh tỷ lệ, 200 và 500nm lần lượt của Hình 2E và Hình 2F. Hình 2G là hình ảnh EM của các virion được nhuộm âm tính, được tạo viên kết từ các dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy E11 được gây nhiễm. Thanh tỷ lệ, 100nm.

Hình 3 thể hiện phương pháp phát hiện PCR của TiLV. Hình 3A thể hiện sự phát hiện TiLV bằng PCR. Tổng số ARN được chiết từ não của cá bị nhiễm TiLV (các lần 1 đến 7) và cá khỏe mạnh (lần 10), cũng như từ môi trường nuôi cấy tế bào E-11 và môi trường nuôi cấy tế bào được gây nhiễm não cá rô phi sơ cấp (lần lượt là các lần 8 và 9), và được sử dụng làm khuôn mẫu cho việc tạo cADN. Đoạn 250bp được khuếch đại bằng đoạn mồi ME1 (SEQ ID NO: 23) và đoạn mồi dòng vô tính 7450/150R (SEQ ID NO: 16). Hình 3B thể hiện rằng quá trình phiên mã ngược là cần thiết cho quá trình khuếch đại PCR đối với TiLV. Tổng số ARN được chiết từ dịch nổi ở trên (các lần 1 và 2) hoặc từ các chất chiết tế bào (các lần 3 và 4) của môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm TiLV, hoặc từ môi trường nuôi cấy E-11 nguyên sơ (các lần 5 và 6). Các mẫu không

được điều trị bằng DNaza, và quá trình phiên mã ngược được thực hiện (+) hoặc không được thực hiện (-) trước bước PCR. Đối chứng âm tính “không có ARN” (làn 7) cũng được lấy vào. Đoạn 491bp được khuếch đại bằng các đoạn mồi Nested ext-1 (SEQ ID NO: 24) và Nested ext-2 (SEQ ID NO: 25). Hình 3C thể hiện các kết quả của các thử nghiệm tính nhạy cảm nucleaza. Các axit nucleic được bảo vệ khỏi nucleaza được chiết từ các virion được tinh chế và được điều trị (+) hoặc không được điều trị (-) bằng transcriptaza ngược và/hoặc RNaza I trước quá trình khuếch đại PCR bằng các đoạn mồi đặc hiệu với TiLV (Nested ext-1 (SEQ ID NO: 24) và Nested ext-2 (SEQ ID NO: 25) đem lại sản phẩm được khuếch đại, 491bp) hoặc các đoạn mồi đặc hiệu với SnRV (Snakehead gag-pol fw (SEQ ID NO: 26) và Snakehead gag-pol rev (SEQ ID NO: 27), đem lại sản phẩm được khuếch đại, 284bp). M là gen đánh dấu kích cỡ ADN.

Hình 4 thể hiện động lực học của mức tử vong do TiLV gây ra. Cá được chia thành nhóm gồm 30 con cá không có mầm bệnh cụ thể (specific pathogen-free-SPF). Các nhóm 1 (hình thoi đặc) và 2 (hình tam giác đặc) được gây nhiễm lần lượt bằng phương pháp tiêm trong màng bụng (i.p.) hoặc sống chung. Nhóm đối chứng (hình tròn đặc) được cấu thành bởi con số y hệt cá được chủng ngừa bằng các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy E-11 nguyên sơ. Độ biến đổi giữa ba nhóm thử nghiệm được xác định bằng các kiểm định chi bình phương, mà trong đó trị số P là 0,05 được xem là đáng kể. Các thanh thể hiện sai số chuẩn.

Hình 5 thể hiện phép phân tích thẩm tách Northern của các axit nucleic từ cá rô phi mắc bệnh ở Israel và Ecuador. Hình 5A thể hiện phép phân tích thẩm tách Northern của tổng số ARN được chiết từ gan cá rô phi Ecuador mắc bệnh và được phân tích bằng ba hỗn hợp mẫu dò thể hiện các đoạn 1, 4, 7, và 10 (Combo 1); 3, 6, và 9 (Combo 2); hoặc 2, 5, và 8 (Combo 3) để phòng ngừa sự chồng lấn tín hiệu từ các đoạn có kích cỡ tương tự (ba ô bên tay phải). ARN virus cúm A được lai với ba mẫu dò thể hiện các protein HA, NA, và protein nền đóng vai trò là phần tham chiếu kích cỡ (ô bên trái). Hình 5B thể hiện phép phân tích thẩm tách Northern của tổng số ARN được chiết từ tế bào nuôi cấy được gây nhiễm bằng TiLV được tạo ra từ não từ cá rô phi Israel hoặc từ dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy và được phân tích bằng ba hỗn hợp mẫu dò. Các làn 5, 8, và 11 thể hiện các kết quả từ các chất chiết từ tế bào nuôi cấy bị lây nhiễm (6 dpi); các làn 6, 9, và 12 thể hiện các kết quả từ các chất chiết từ dịch nổi ở trên môi trường nuôi



cây được gây nhiễm; các làn 4, 7, và 10 thể hiện các kết quả từ các chất chiết từ tế bào nuôi cấy không được gây nhiễm.

Hình 6 thể hiện các kết quả của PCR chẩn đoán thông thường bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại đoạn 3 của hệ gen TiLV. Hình này là hình ảnh của quá trình điện di trên gel agarosa của các sản phẩm khuếch đại thu được từ các chất chiết axit nucleic của dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy tế bào được gây nhiễm TiLV. Làn 1 và 12 là các gen đánh dấu kích cỡ. Các làn 2-10 là các dung dịch pha loãng 2 lần theo dãy của chất chiết axit nucleic. Làn 11 là đối chứng âm tính của dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy tế bào không được gây nhiễm.

Hình 7 thể hiện các kết quả của PCR thời gian thực. Hình 7A là đường chuẩn có sử dụng các tiêu chuẩn plasmit được định lượng thể hiện trình tự đích đoạn 1 của TiLV, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^1$  phân tử cho mỗi thử nghiệm. Hình 7B là đường chuẩn có sử dụng các tiêu chuẩn plasmit được định lượng thể hiện trình tự đích actin beta của cá rô phi, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^1$  phân tử cho mỗi thử nghiệm. Hình 7C thể hiện sự phát hiện TiLV đích thực ở các mẫu mô khác nhau của cá rô phi mắc bệnh từ Israel bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế từ và đặc hiệu đối với các trình tự axit nucleic của TiLV.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Tông cá rô phi là quan trọng đối với tính bền vững của các hệ thống sinh thái và đóng vai trò là nhóm cá nuôi quan trọng thứ hai khắp thế giới. Sáng chế được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến sự quan sát về mức tử vong đáng kể của cá rô phi hoang dã và cá rô phi được nuôi cả ở Israel và Ecuador.

Được báo cáo trong bản mô tả này là sự phân lập virus chưa được mô tả trước đây, virus Tilapia Lake hay TiLV được chỉ định, từ cá mắc bệnh một cách tự nhiên và sự kích thích bệnh ở cá rô phi bằng tác nhân này. Việc ủ các chất chiết từ tông cá rô phi mắc bệnh, mà không khỏe mạnh, với các môi trường nuôi cấy của tế bào cá (tế bào E-11 và tế bào não cá rô phi sơ cấp) đã đem lại sự xuất hiện tác dụng gây bệnh tế bào hay CPE trong các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm. Hơn nữa, quá trình chủng ngừa các dịch nổi ở trên, thu hoạch được từ các môi trường nuôi cấy như vậy, vào tông cá rô phi nguyên sơ đã đem lại sự xuất hiện bệnh. TiLV được tái phân lập trong môi trường nuôi cấy tế bào từ

cá được gây nhiễm bằng thử nghiệm, và tác nhân này đã kích thích một bệnh tương tự sau khi chủng ngừa cá nguyên sơ mới. Ngoài ra, đã đạt được bệnh được kích thích bằng thử nghiệm bằng TiLV được tinh chế thu được bằng các dung dịch pha loãng tới hạn. Đáng lưu ý, đã quan sát thấy các dấu hiệu của bệnh xảy ra một cách tự nhiên (sự thay đổi màu, đốm da, các dạng thay đổi ở mắt, và tính lơ phờ) ở bệnh được kích thích bằng thử nghiệm. Các trình tự TiLV được khuếch đại từ cá mắc bệnh và các môi trường nuôi cấy tế bào được gây nhiễm TiLV nhưng không phải từ cá nguyên sơ, các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm đối tượng giả, hoặc các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm bằng một tác nhân khác (VNN).

Một vài luồng bằng chứng đã chỉ ra rằng tác nhân truyền nhiễm này là virus. Thứ nhất là, tác nhân này đã đi qua bộ lọc 0,2 $\mu$ m trong khi giữ lại tính lây nhiễm của nó, loại trừ khả năng về sự lây nhiễm bởi các vi sinh vật lớn hơn kích cỡ bộ lọc này (như vi khuẩn và nấm mốc). Thứ hai là, sự xuất hiện CPE sau các lần cấy chuyển theo dây của tác nhân này ở các môi trường nuôi cấy tế bào loại trừ khả năng về CPE do độc tố có thể lọc được kích thích. Thứ ba là, các cấu trúc giống virion được hiển thị bằng EM trong tế bào được gây nhiễm và trong các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy của tế bào này. Thứ tư là, hoạt tính CPE đã được chứng minh đối với các phân tương đối dày đặc của các gradien sucroza, tương tự với các virion được lắp ráp đã biết. Thứ năm là, hệ gen TiLV có vỏ capsid được làm bằng ARN, như được chứng minh bằng sự việc thực tế là nó được khuếch đại chỉ bằng RT-PCR mà thôi (và không phải bằng PCR) từ các mẫu của cá ốm và từ các môi trường nuôi cấy tế bào mà được chủng ngừa bằng các chất chiết của cá như vậy, cũng như bằng sự việc thực tế là quá trình khuếch đại này thì nhạy cảm đối với sự phân hủy ban đầu bằng RNase I. Được biết là hệ gen ARN chỉ xảy ra đối với các virus. Các phân tích EM và tính nhạy cảm của TiLV đối với các dung môi hữu cơ (ete hoặc clorofom) còn chỉ ra rằng TiLV là virus có vỏ bọc.

Đã đạt được bệnh do TiLV gây ra ở tống cá rô phi bằng phương pháp tiêm trong màng bụng (i.p.) hoặc bằng phương pháp sống chung. Phương thức sống chung lan truyền chứng minh khả năng của TiLV trong việc lây lan bằng đường từ nước. Cần phải lưu ý rằng trong các thử nghiệm này, đã quan sát thấy tỷ lệ tử vong tương đối cao của cả đường i.p. và đường từ nước.

Sự tồn tại của cá mà đã sống sót qua bệnh do TiLV gây ra đã chỉ ra mạnh mẽ rằng đáp ứng miễn dịch hữu hiệu chống lại mầm bệnh này có thể được nâng cao. Điều này có ứng dụng quan trọng đối với các chiến lược ngăn chặn bệnh trong tương lai. Bên cạnh khả năng về việc phát triển vaccin, việc xác định tính miễn cảm của các loài cá rô phi khác nhau đối với TiLV cần được xem là một biện pháp của quá trình ngăn chặn bệnh. Ý niệm này là dựa trên những khác biệt được ghi nhận rõ trong tài liệu về khả năng chống chịu bệnh trong số các loài của cùng một chi.

Công trình này cũng đề xuất quá trình xác định đặc điểm phân tử của TiLV được phân lập từ cá mắc bệnh ở cả Israel và Ecuador. Mười đoạn của hệ gen TiLV được nhận diện từ virus ở cá từ cả hai nơi, đem lại các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. (SEQ ID NO: 1 là phiên bản ngắn hơn nêu trong SEQ ID NO: 9 – cả hai là đoạn 3 của hệ gen TiLV). Các lần tìm kiếm độ tương đồng trong cơ sở dữ liệu NCBI đã thu được một điểm so khớp đơn lẻ đối với đoạn 1 của hệ gen (SEQ ID NO: 7) mà chỉ ra độ tương đồng rất xa với ARN polymeraza phụ thuộc vào ARN của orthomyxovirus. Điều này còn chỉ ra rằng TiLV là mầm bệnh đang nổi lên mới đối với cá rô phi. Xét thấy sự sản xuất thương mại rộng rãi cá rô phi và sự việc thực tế là cá rô phi đóng vai trò là nguồn protein chính ở các nước đang phát triển, thật là quan trọng ở mức độ cao khi chẩn đoán mầm bệnh mới này. Quá trình khuếch đại các trình tự TiLV từ cá mắc bệnh và các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm TiLV, được mô tả trong công trình này, đem lại cơ sở cho sự chẩn đoán dựa trên PCR, cho phép có sự sàng lọc nhanh, sự giám sát, các nghiên cứu dịch tễ học, và sự ngăn chặn bệnh. Ngoài ra, các trình tự TiLV có thể được sử dụng cho vaccin, tức là, các chế phẩm miễn dịch học, để gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV ở các quần thể cá rô phi.

TiLV được nhận diện trong bản mô tả này là virus ARN mới. Vì vậy, các trình tự axit nucleic cADN không tồn tại trong tự nhiên. Nói cách khác, các trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 là các chế phẩm không có trong tự nhiên mà khác biệt rõ rệt về cấu trúc so với các trình tự ARN của TiLV có trong tự nhiên. Ngoài ra, các phương án bất kỳ của sáng chế như các đoạn môi, các mẫu dò, các kháng thể, các chế phẩm sinh miễn dịch và tế bào và các dòng tế bào, bao gồm các axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 cũng thường không có trong tự nhiên.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng tác nhân bệnh nguyên của bệnh này là virus ARN mới. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp hữu ích cho việc phân lập và phát hiện virus này. Như được mô tả thêm trong bản mô tả này, virus này, được đặt tên là virus Tilapia Lake (TiLV), có thể được nhân lên ở tế bào não cá rô phi sơ cấp hoặc ở dòng tế bào E-11. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng virus này có thể kích thích tác dụng gây bệnh tế bào ở thời điểm 5 đến 10 ngày sau khi lây nhiễm. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phát hiện qua phương pháp soi hiển vi điện tử thể hiện sự có mặt của các hạt nhị thập diện đều có vỏ bọc là 55 đến 75nm. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng TiLV có mức cấy chuyển thấp, được tiêm trong màng bụng ở cá rô phi, đã kích thích bệnh giống với bệnh tự nhiên, bệnh này thường thể hiện với tính lơ phờ, các dạng thay đổi ở mắt, và các dạng ăn mòn da, với mức tử vong lớn hơn 80%.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng các dạng thay đổi mô học bao gồm chứng sung huyết của các cơ quan bên trong (thận và não) với các ổ tăng sinh thần kinh đệm và dải viêm quanh mạch gồm các bạch huyết bào ở vỏ não của não; viêm mắt bao gồm viêm nội nhãn và các dạng thay đổi của bệnh đục thủy tinh thể của thủy tinh thể. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng quá trình sống chung của cá khỏe mạnh và cá mắc bệnh đã chứng minh rằng bệnh này là có tính truyền nhiễm và rằng các mức tử vong (80 đến 100%) xảy ra trong vòng ít ngày. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng cá sống sót qua mức tử vong ban đầu thì miễn dịch đối với các lần lây nhiễm TiLV khác nữa, chỉ ra sự nâng cao của đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất sự phát hiện rằng quá trình sàng lọc các thư viện cADN đã nhận diện trình tự đặc hiệu với TiLV, cho phép thiết kế kiểm định chẩn đoán dựa trên PCR. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất việc thực hiện kiểm tra giúp thực hiện được việc nhận diện đặc hiệu của TiLV ở tổng cá rô phi. Việc thực hiện kiểm tra như vậy là có ích cho việc kiểm soát sự lây lan của virus này khắp thế giới.

Các định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này nhìn chung có các nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong ngữ cảnh của sáng chế và ngữ cảnh cụ thể trong đó mỗi thuật ngữ được sử dụng. Các thuật ngữ nhất định được bàn luận dưới đây, hoặc nơi khác trong bản mô tả này, để đem lại chỉ dẫn bổ sung với nhà thực hiện chuyên môn trong việc mô tả các phương pháp theo sáng chế và cách sử dụng chúng. Hơn nữa, sẽ được nhìn nhận rằng có thể trình bày cùng một điều theo nhiều cách. Vì vậy, ngôn ngữ và từ đồng nghĩa thay thế khác có thể được sử dụng cho một hoặc nhiều thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ được bàn luận trong bản mô tả này, cũng không đặt ý nghĩa đặc biệt bất kỳ cho việc một thuật ngữ nào đó có được bàn luận hoặc bàn thảo kỹ lưỡng trong bản mô tả này hay không. Các từ đồng nghĩa dùng cho các thuật ngữ nhất định được đề xuất. Việc liệt kê một hoặc nhiều từ đồng nghĩa không loại trừ việc sử dụng các từ đồng nghĩa khác. Việc sử dụng các ví dụ bất cứ nơi nào trong bản mô tả này, bao gồm các ví dụ về các thuật ngữ bất kỳ được bàn luận trong bản mô tả này, chỉ có tính minh họa mà thôi, và hoàn toàn không giới hạn phạm vi và ý nghĩa của sáng chế hoặc thuật ngữ được lấy làm ví dụ bất kỳ. Cũng vậy, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án được ưu tiên của nó.

Theo sáng chế, có thể có nhiều dụng cụ và kỹ thuật khác nhau trong phạm vi kỹ năng của lĩnh vực kỹ thuật này, như những loại thường được sử dụng trong miễn dịch học phân tử, miễn dịch học tế bào, dược lý học, và vi sinh vật học. Ví dụ, xem tài liệu: Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Bonifacino *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coico *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coligan *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; và Enna *et al.* eds. (2005) *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.

Hình thức số ít “một” bao gồm dạng đề cập số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định khác một cách rõ ràng.

Thuật ngữ “khoảng” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ ý nghĩa là xấp xỉ, trong khoảng xấp xỉ, phỏng chừng, hoặc khoảng chừng. Khi thuật ngữ “khoảng” được sử dụng chung với khoảng số, thì nó bỏ nghĩa cho khoảng đó bằng cách kéo dài các đường biên trên và dưới các trị số của số được nêu ra. Nhìn chung, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng trong bản mô tả này để bỏ nghĩa cho trị số của số trên và dưới trị số được nêu bằng số chênh lệch là 20%.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “TiLV” được dùng để chỉ các quần thể phân lập của virus Tilapia Lake được mô tả trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “gen TiLV” được dùng để chỉ một phần tử bất kỳ trong số các gen hoặc các đoạn gen như được mô tả trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, được nhận diện trong hệ gen TiLV.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “động vật” được dùng để chỉ động vật có xương sống, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cá, (ví dụ, cá rô phi).

“Về cơ bản đồng nhất”, trong ngữ cảnh về hai axit nucleic hoặc polypeptit, được dùng để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con mà có độ tương đồng gốc axit amin hoặc nucleotit ít nhất 98%, ít nhất 99% trở lên, khi được đem so sánh và được canh thẳng để có được mức tương ứng tối đa, như được đo bằng cách sử dụng một thuật toán trong số các thuật toán so sánh trình tự dưới đây hoặc bằng phương pháp kiểm tra bằng mắt.

“Độ tương đồng tính theo phần trăm” trong ngữ cảnh về hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc axit nucleic, được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc các axit amin mà hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con chứa chúng là giống nhau. Một tỷ lệ phần trăm được chỉ rõ của các nucleotit có thể được gọi là, như: độ tương đồng 60%, độ tương đồng 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn trên một vùng được chỉ rõ, khi được đem so sánh và được canh thẳng để có được mức tương ứng tối đa trên cửa sổ so sánh, hoặc vùng được chỉ định như được đo bằng cách sử dụng một thuật toán trong số các thuật toán so sánh trình tự dưới đây hoặc bằng dạng canh thẳng bằng tay và kiểm tra bằng mắt.

“Cửa sổ so sánh”, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm dạng đề cập đến đoạn có con số bất kỳ trong số con số các vị trí liên tiếp được chọn từ nhóm gồm từ 20 đến 600, thông thường khoảng 50 đến khoảng 200, thông thường hơn, khoảng 100 đến

khoảng 150 mà trong đó trình tự nào đó có thể được đem so sánh với trình tự tham chiếu có cùng con số các vị trí liên tiếp sau khi hai trình tự được canh thẳng một cách tối ưu. Các phương pháp canh thẳng các trình tự để so sánh là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dạng canh thẳng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ví dụ, bằng thuật toán độ tương đồng cục bộ của tài liệu: Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482, bằng thuật toán canh thẳng độ tương đồng của tài liệu: Kimman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, bằng phương pháp tìm kiếm độ tương đồng của tài liệu: Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, bằng các cách thực hiện được kiểm soát bằng máy vi tính của các thuật toán này (FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information), GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), hoặc bằng dạng canh thẳng bằng tay và kiểm tra bằng mắt (ví dụ, xem Ausubel).

Trong ngữ cảnh về các ký hiệu bazơ của các axit nucleic có thể được sử dụng để thể hiện vị trí trên trình tự axit nucleic mà có thể có nhiều lựa chọn thay thế khác có thể có. Ví dụ, “W” thể hiện A hoặc T; “S” thể hiện C hoặc G; “M” thể hiện A hoặc C; “K” thể hiện G hoặc T; “R” thể hiện A hoặc G; “Y” thể hiện C hoặc T; “B” thể hiện C, G, hoặc T; “D” thể hiện A, G, hoặc T; “H” thể hiện A, C, hoặc T; “V” thể hiện A, C, hoặc G.

Cần phải hiểu rằng, đối với các polypeptit của TiLV cụ thể được mô tả ở đây, các dạng thay đổi tự nhiên có thể tồn tại giữa các chủng TiLV riêng biệt. Các dạng thay đổi này có thể được chứng minh bằng (các) dạng chênh lệch axit amin trong toàn bộ trình tự hoặc bằng các dạng xóa bỏ, các dạng thay thế, các dạng chèn vào, các dạng đảo ngược hoặc các dạng thêm vào của (các) axit amin trong trình tự đã nêu. Các dạng thay thế axit amin mà về cơ bản không thay đổi hoạt tính sinh học và hoạt tính miễn dịch học, đã được mô tả, ví dụ, bởi Neurath *et al* trong “The Proteins” Academic Press New York (1979). Các dạng thay thế axit amin giữa 15 axit amin liên quan hoặc các dạng thay thế mà đã xảy ra một cách thường xuyên trong quá trình tiến hóa là, không kể những loại khác, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (xem tài liệu: Dayhof, M. D., Atlas of protein sequence and structure, *Nat. Biomed. Res. Found.*, Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Các dạng thay thế axit amin khác bao gồm Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr,

Ser/Asn, Ala/ Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val và Ala/ Glu. Dựa trên thông tin này, Lipman và Pearson đã phát triển một phương pháp để so sánh protein nhanh và nhạy (*Science* (1985) 227:1435) và xác định độ tương đồng chức năng giữa các protein tương đồng. Các dạng thay thế axit amin như vậy của các phương án làm ví dụ của sáng chế, cũng như các dạng thay đổi có các dạng xóa bỏ và/hoặc các dạng chèn vào là trong phạm vi của sáng chế với điều kiện là các protein thu được giữ lại tính phản ứng miễn dịch của chúng. Biết được rằng các trình tự polypeptit có một hoặc nhiều dạng thay đổi trình tự axit amin so với polypeptit tham chiếu vẫn có thể là hữu ích cho việc tạo ra các kháng thể mà liên kết polypeptit tham chiếu.

#### Các axit nucleic và cách sử dụng chúng

Sáng chế đề xuất các trình tự axit nucleic của TiLV. Các trình tự axit nucleic này có thể là hữu ích cho, không kể những loại khác, quá trình biểu hiện của các protein được mã hóa bởi TiLV hoặc các đoạn, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của chúng, quá trình tạo ra các kháng thể chống lại các protein TiLV, quá trình tạo ra các đoạn mồi và các mẫu dò để phát hiện TiLV và/hoặc để chẩn đoán sự lây nhiễm TiLV, tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch chống lại TiLV, và sàng lọc để có được các loại thuốc hữu hiệu chống lại TiLV như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, các trình tự axit nucleic của TiLV được đề xuất ở các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, tương ứng với các đoạn hệ gen TiLV (xem Bảng 2).

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập của TiLV như được nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các biến thể của trình tự axit nucleic của TiLV có độ tương đồng lớn hơn 60% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các biến thể trình tự axit nucleic được phân lập nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:



11 và các đoạn của chúng. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 50% đến khoảng 55% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 55,1% đến khoảng 60% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 60,1% đến khoảng 65% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 65,1% đến khoảng 70% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 70,1% đến khoảng 75% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 75,1% đến khoảng 80% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 80,1% đến khoảng 85% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 85,1% đến khoảng 90% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit

nucleic có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 90,1% đến khoảng 95% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic có độ tương đồng khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các chương trình và thuật toán để canh thẳng và so sánh trình tự về độ tương đồng và/hoặc độ tương đồng tính theo % giữa các trình tự axit nucleic là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm BLAST, dụng cụ canh thẳng SIM, v.v..

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập có trình tự về cơ bản đồng nhất với axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc một đoạn của chúng. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập có trình tự về cơ bản đồng nhất với axit nucleic bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc một đoạn của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 50 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 100 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 200 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 300 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương

án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 400 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 500 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 600 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 700 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 800 nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 900 hoặc nhiều hơn nucleotit liên tiếp từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 1000 nucleotit liên tiếp hoặc nhiều hơn từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 1200 nucleotit liên tiếp hoặc nhiều hơn từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit

nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 1400 nucleotit liên tiếp hoặc nhiều hơn từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 1640 nucleotit liên tiếp hoặc nhiều hơn từ một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với một SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó.

Được bao quát bởi sáng chế là các trình tự polynucleotit mà có khả năng lai với các trình tự polynucleotit được yêu cầu bảo hộ, bao gồm trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic được bộc lộ trong bản mô tả này, và các đoạn của nó trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt khác nhau. Các polynucleotit tương đồng với các trình tự được minh họa ở các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, có thể được nhận diện, ví dụ, bằng quá trình lai với nhau trong điều kiện nghiêm ngặt hoặc trong điều kiện nghiêm ngặt ở mức cao. Thuật ngữ “lai axit nucleic” được dùng để chỉ sự liên kết hydro đối song song giữa hai axit nucleic sợi đơn, mà trong đó A ghép cặp với T (hoặc U nếu là axit nucleic ARN) và C ghép cặp với G. Phân tử axit nucleic là “có thể lai được” với nhau khi ít nhất một sợi của một phân tử axit nucleic có thể tạo liên kết hydro với các bazơ bổ sung của phân tử axit nucleic kia trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt đã được xác định. Độ nghiêm ngặt của quá trình lai phản ánh mức độ của độ tương đồng trình tự của các axit nucleic liên quan, sao cho độ nghiêm ngặt càng cao, thì hai sợi polynucleotit càng tương đồng. Độ nghiêm ngặt của quá trình lai được xác định, ví dụ, bằng (i) nhiệt độ mà ở đó quá trình lai và/hoặc quá trình rửa được thực hiện, và (ii) cường độ ion và (iii) nồng độ của các chất làm biến tính như formamit của dung dịch lai và dung dịch rửa, cũng như các thông số khác. Quá trình lai đòi hỏi rằng hai sợi này phải chứa các trình tự về cơ bản bổ sung với nhau. Tuy nhiên, tùy thuộc vào độ nghiêm ngặt của quá trình lai, một số mức độ sai bắt cặp có thể được dung chứa. Trong điều kiện “độ nghiêm ngặt thấp”, tỷ lệ phần trăm lớn hơn của các đoạn sai bắt cặp là có thể dung chứa được (tức là, sẽ không phòng ngừa hiện tượng hình thành dạng lai đối song song). Các điều kiện lai dùng cho các độ nghiêm ngặt khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bộc lộ chi tiết trong ít nhất Sambrook *et al.*

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp bao gồm các nucleotit của axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của trình tự có độ tương đồng ít nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của trình tự có độ tương đồng ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp gồm các nucleotit liên tiếp có trình tự là biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 có độ tương đồng ít nhất khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp gồm các nucleotit liên tiếp có trình tự là biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 có độ tương đồng ít nhất khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic mà bổ sung với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp mà bổ sung với axit nucleic gồm các nucleotit liên tiếp có trình tự là biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 có độ tương đồng ít nhất khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic mà bổ sung với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp mà bổ sung với axit nucleic gồm các nucleotit liên tiếp có trình tự là biến thể nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 có độ tương đồng ít nhất khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%,

khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các trình tự axit nucleic được phân lập như các đoạn môi và các mẫu dò, bao gồm các trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các đoạn môi và/hoặc các mẫu dò như vậy có thể là hữu ích để phát hiện sự có mặt của TiLV theo sáng chế, ví dụ, ở các mẫu của các dịch thể như máu, nước bọt, hoặc nước tiểu từ động vật, và vì vậy, có thể là hữu ích trong việc chẩn đoán sự lây nhiễm TiLV. Các mẫu dò như vậy có thể phát hiện các polynucleotit nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 ở các mẫu mà bao gồm TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các axit nucleic được phân lập mà có thể được sử dụng làm đoạn môi và các mẫu dò là có chiều dài đủ để cho phép lai với, tức là hình thành phức kép với trình tự axit nucleic đích tương ứng, các trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc một đoạn hoặc biến thể của chúng.

Axit nucleic được phân lập theo sáng chế mà có thể được sử dụng làm các đoạn môi và/hoặc các mẫu dò có thể bao gồm từ khoảng 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 và 100 nucleotit liên tiếp từ SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc các trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế cũng hướng đến đoạn môi và/hoặc các mẫu dò mà có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu và/hoặc phân tử thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thẻ huỳnh quang thích hợp để sử dụng trong Phương pháp khuếch đại PCR Thời gian Thực, ví dụ, các mẫu dò TaqMan, cybergreen, TAMRA và/hoặc FAM; các chất đánh dấu phóng xạ, v.v.. Theo các phương án nhất định, mẫu dò và/hoặc đoạn môi oligonucleotit còn bao gồm chất đánh dấu không đồng vị có thể phát hiện được được chọn từ nhóm gồm: phân tử huỳnh quang, phân tử phát quang hóa học, enzym, đồng yếu tố, cơ chất enzym, và hapten.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất mẫu dò oligonucleotit mà bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 50 nucleotit, trong đó ít nhất khoảng 10 nucleotit liên tiếp bổ sung

ít nhất 95% với vùng đích của axit nucleic trong trình tự axit nucleic của TiLV ở SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, trong đó mẫu dò oligonucleotit lai với vùng đích của axit nucleic trong các điều kiện nghiêm ngặt từ vừa đến cao để tạo đích axit nucleic có thể phát hiện được: phức kép mẫu dò oligonucleotit. Theo một phương án, mẫu dò oligonucleotit là bổ sung ít nhất khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Theo một phương án khác, mẫu dò oligonucleotit về cơ bản gồm từ khoảng 10 đến khoảng 50 nucleotit.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các bộ đoạn mỗi bao gồm các axit nucleic được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này, các bộ đoạn mỗi này là thích hợp cho quá trình khuếch đại các axit nucleic từ các mẫu mà bao gồm TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể của chúng. Các bộ đoạn mỗi có thể bao gồm dạng kết hợp thích hợp bất kỳ của các đoạn mỗi mà thường cho phép khuếch đại các trình tự axit nucleic đích ở mẫu mà bao gồm TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể của chúng. Có thể thực hiện quá trình khuếch đại bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, PCR, RT-PCR, quá trình khuếch đại qua trung gian phiên mã (transcription mediated amplification-TMA).

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất bộ đoạn mỗi để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, trong đó bộ đoạn mỗi này bao gồm ít nhất một trình tự axit nucleic tổng hợp được chọn từ nhóm gồm axit nucleic tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất bộ đoạn mỗi để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, trong đó bộ đoạn mỗi này bao gồm ít nhất một trình tự axit nucleic tổng hợp được chọn từ nhóm gồm: axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các biến thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này; hoặc axit nucleic tổng hợp mà có trình tự gồm từ khoảng 10 đến khoảng 30 nucleotit liên tiếp từ trình tự axit nucleic mà bổ sung



với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các biến thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này.

Các bộ đoạn mồi có thể được thiết kế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các ví dụ về các cặp đoạn mồi hữu ích cho các phương pháp phát hiện bằng cách sử dụng PCR là:

ME1 (SEQ ID NO: 23) và dòng vô tính 7450/150R (SEQ ID NO: 16);

Nested ext-1 (SEQ ID NO: 24) và nested ext-2 (SEQ ID NO: 25);

NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) và NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29);

TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) và TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31); và

CLU5-mRNA-qF1 (SEQ ID NO: 34) và CLU5-mRNA-qR1 (SEQ ID NO: 35),

với mẫu dò tùy ý, CLU5-mRNA-Probe (SEQ ID NO: 36).

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm: a) cho axit nucleic từ mẫu sinh học tiếp xúc với ít nhất một đoạn mồi là axit nucleic tổng hợp của axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của trình tự có độ tương đồng ít nhất khoảng

60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) mà bao gồm ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của trình tự có độ tương đồng ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, b) đưa axit nucleic và đoạn môi vào các điều kiện khuếch đại, và, c) xác định sự có mặt hoặc không của sản phẩm khuếch đại, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại chỉ ra sự có mặt của ARN gắn liền với TiLV trong mẫu.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV ở mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm: a) cho axit nucleic từ mẫu sinh học tiếp xúc với cặp đoạn môi được chọn từ nhóm gồm: ME1 (SEQ ID NO: 23) và dòng vô tính 7450/150R (SEQ ID NO: 16); Nested ext-1 (SEQ ID NO: 24) và nested ext-2 (SEQ ID NO: 25); NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) và NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29); TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) và TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31); và CLU5-mRNA-qF1 (SEQ ID NO: 34) và CLU5-mRNA-qR1 (SEQ ID NO: 35), b) đưa axit nucleic và cặp đoạn môi vào các điều kiện khuếch đại, và, c) xác định sự có mặt hoặc không của sản phẩm khuếch đại, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại chỉ ra sự có mặt của ARN gắn liền với TiLV trong mẫu.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các cấu trúc biểu hiện, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit và các vectơ mà bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các trình tự bổ sung của chúng, các đoạn và các biến thể của chúng. Các cấu trúc biểu hiện như vậy có thể được điều chế bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cấu trúc biểu hiện như vậy là thích hợp cho quá trình tinh chế và biểu hiện protein và/hoặc axit nucleic của virus.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phân tử ARN cản trở (interfering RNA-iARN) mà hướng đích đến các axit nucleic từ TiLV, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các biến thể của chúng, và việc làm bất hoạt gen đích.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất iARN bao gồm sợi có nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với sợi đối nghĩa của gen bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của các trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất iARN bao gồm sợi đối nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với sợi có nghĩa của gen bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của các trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất iARN bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp của axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11; hoặc axit nucleic được phân lập (hoặc không được phân lập) có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với axit nucleic bổ sung với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

“Tác nhân iARN” (chữ viết tắt của “tác nhân ARN cản trở”) như được sử dụng trong bản mô tả này, là tác nhân ARN, tác nhân này có thể điều hòa giảm quá trình biểu hiện của gen đích, ví dụ, gen TiLV. Tác nhân iARN có thể hoạt động bằng một hoặc nhiều cơ chế trong số một số cơ chế, bao gồm quá trình phân cắt sau phiên mã của ARN thông tin đích trong lĩnh vực kỹ thuật này đôi khi được gọi là RNAi, hoặc cơ chế trước phiên mã hoặc cơ chế trước dịch mã. Tác nhân iARN có thể là tác nhân iARN sợi kép (double stranded-ds).

“Tác nhân ds iARN” (chữ viết tắt của “tác nhân iARN sợi kép”), như được sử dụng trong bản mô tả này, là tác nhân iARN mà bao gồm nhiều hơn một sợi, và theo các phương án nhất định, hai sợi mà trong đó quá trình lai liên chuỗi có thể tạo một vùng của cấu trúc phức kép. “Sợi” trong bản mô tả này được để chỉ trình tự liên tiếp của các nucleotit (bao gồm nucleotit không có trong tự nhiên hoặc nucleotit được cải biến). Hai hoặc nhiều sợi có thể là, hoặc mỗi sợi tạo thành một phần của, các phân tử tách biệt, hoặc chúng có thể được kết nối với nhau bằng phương thức cộng hóa trị, ví dụ, bằng một gốc

liên kết, ví dụ, gốc liên kết polyetylenglycol, nhưng để tạo một phân tử. Ít nhất một sợi có thể bao gồm một vùng mà bổ sung đủ với ARN đích. Sợi như vậy được gọi là “sợi đối nghĩa”. Sợi thứ hai được chứa trong tác nhân dsARN mà bao gồm vùng bổ sung với sợi đối nghĩa được gọi là “sợi có nghĩa”. Tuy nhiên, tác nhân ds iARN cũng có thể được tạo ra từ một phân tử ARN đơn lẻ mà, ít nhất là phần nào đó; bổ sung với chính nó, tạo ra, ví dụ, cấu trúc kẹp tóc hoặc cấu trúc cán chảo, bao gồm vùng phức kẹp. Trong trường hợp như vậy, thuật ngữ “sợi” được dùng để chỉ một vùng trong số các vùng của phân tử ARN mà bổ sung với vùng kia của cùng một phân tử ARN.

Các tác nhân iARN như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các tác nhân ds iARN và các tác nhân siARN, có thể làm trung gian cho quá trình làm bất hoạt gen, ví dụ, bằng quá trình làm thoái hóa ARN. Vì sự thuận tiện, ARN như vậy trong bản mô tả này còn được gọi là ARN sẽ được làm bất hoạt. Gen như vậy còn được gọi là gen đích. Theo các phương án nhất định, ARN sẽ được làm bất hoạt là sản phẩm gen của gen TiLV.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “làm trung gian cho RNAi” được dùng để chỉ khả năng của một tác nhân trong việc làm bất hoạt, theo phương thức đặc hiệu trình tự, gen đích. “Làm bất hoạt gen đích” có nghĩa là quy trình nhờ đó tế bào chứa và/hoặc tiết một sản phẩm nhất định của gen đích khi không tiếp xúc với tác nhân này, sẽ chứa và/hoặc tiết ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% trở xuống của sản phẩm gen như vậy khi được tiếp xúc với tác nhân này, so với tế bào tương tự mà không được tiếp xúc với tác nhân này. Sản phẩm của gen đích như vậy, ví dụ, có thể là ARN thông tin (mARN), protein, hoặc yếu tố điều hòa.

Trong các cách dùng chống virus theo sáng chế, việc làm bất hoạt gen đích có thể đem lại sự giảm về “hiệu giá virus” ở tế bào hoặc ở động vật, trong đó “sự giảm về hiệu giá virus” được dùng để chỉ sự giảm về con số virus có thể sống được được tạo ra bằng tế bào hoặc được tìm thấy ở sinh vật trải qua quá trình làm bất hoạt gen đích của virus. Sự giảm về lượng virus tế bào được tạo ra có thể dẫn đến sự giảm về lượng virus có thể đo được được tạo ra ở mô của động vật trải qua quá trình điều trị và sự giảm về mức độ trầm trọng của các triệu chứng của sự lây nhiễm virus. Các tác nhân iARN theo sáng chế còn được gọi là “các tác nhân iARN chống virus”.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp để làm giảm hiệu giá virus ở động vật, bằng cách cho động vật dùng ít nhất một iARN mà ức chế quá trình biểu hiện của gen TiLV.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp để làm giảm các mức của protein virus, mRNA của virus, hoặc hiệu giá virus ở tế bào ở động vật bao gồm: cho động vật dùng tác nhân iARN, trong đó tác nhân iARN này bao gồm sợi có nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với đoạn hệ gen hoặc gen từ TiLV bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của các trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và sợi đối nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với sợi có nghĩa. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho động vật dùng đồng thời tác nhân iARN thứ hai, trong đó tác nhân iARN thứ hai bao gồm sợi có nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp hoặc nhiều hơn bổ sung với đoạn hệ gen hoặc gen thứ hai từ TiLV bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của các trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và sợi đối nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với sợi có nghĩa.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp để làm giảm các mức của protein virus từ ít nhất một gen của TiLV ở tế bào ở động vật bao gồm: cho động vật dùng tác nhân iARN, trong đó tác nhân iARN này bao gồm sợi có nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với gen từ TiLV bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm của các trình tự gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và sợi đối nghĩa có ít nhất 15 nucleotit liên tiếp bổ sung với sợi có nghĩa.

#### Các polypeptit được phân lập và các cách sử dụng chúng

Sáng chế cũng hướng đến các polypeptit được phân lập và các biến thể và các dẫn xuất của chúng. Các polypeptit này có thể là hữu ích cho nhiều ứng dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình tạo ra các kháng thể và quá trình tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch. Ví dụ, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Ví dụ, sáng chế cũng đề xuất polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng. Peptit có chiều dài ít nhất 8 gốc axit amin có thể được nhận biết bằng kháng thể MacKenzie *et al.* (1984) *Biochemistry* 23: 6544-6549). Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các đoạn của các polypeptit được

mô tả trong bản mô tả này, mà chất này, ví dụ, có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể.

Vì vậy, theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 80% với polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm ít nhất 8 axit amin liên tiếp của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm ít nhất 8 axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80% với trình tự của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các biến thể polypeptit của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của các polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 50% đến khoảng 55% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 55,1% đến khoảng 60% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 60,1% đến khoảng 65% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 65,1% đến khoảng 70% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 70,1% đến khoảng 75% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 75,1% đến khoảng 80% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 80,1% đến khoảng 85% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 85,1% đến khoảng 90% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 90,1% đến khoảng 95% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12. Các biến thể của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các biến thể polypeptit của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của một polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit được phân lập được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 50% đến khoảng 55% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 55,1% đến khoảng 60% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 60,1% đến khoảng 65% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương

đồng ít nhất từ khoảng 65,1% đến khoảng 70% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 70,1% đến khoảng 75% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 75,1% đến khoảng 80% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 80,1% đến khoảng 85% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 85,1% đến khoảng 90% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ khoảng 90,1% đến khoảng 95% với trình tự của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Các biến thể của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự polypeptit có độ tương đồng ít nhất từ



khoảng 95,1%, khoảng 95,5%, khoảng 96%, khoảng 96,5%, khoảng 97%, khoảng 97,5%, khoảng 98%, khoảng 98,5%, khoảng 99%, khoảng 99,5% hoặc khoảng 99,9% với trình tự nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Sáng chế cũng hướng đến polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic mà bổ sung với trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc một đoạn hoặc biến thể của chúng.

Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 50 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 100 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 150 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 200 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 250 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 300 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 350 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 400 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 420 axit amin liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các peptit được tinh chế và được phân lập.

Theo các phương án nhất định, các polypeptit theo sáng chế có thể là thích hợp cho cách sử dụng làm kháng nguyên để phát hiện các kháng thể chống lại SEQ ID NO: 12, và các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, các polypeptit theo sáng chế mà bao gồm các quyết định tổ kháng nguyên có thể được sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch khác nhau để nhận diện các động vật phơi nhiễm và/hoặc các mẫu mà bao gồm SEQ ID NO: 12, và các biến thể của chúng.

Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 50 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 100 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 150 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 200 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 250 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 300 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 350 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 400 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 450 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ

khoảng 10 đến khoảng 460 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 470 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 480 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 490 axit amin liên tiếp từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Sáng chế còn hướng đến polypeptit bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 550 axit amin liên tiếp hoặc nhiều hơn từ polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các trình tự bổ sung hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các peptit được tinh chế và được phân lập.

Theo các phương án nhất định, các polypeptit theo sáng chế có thể là thích hợp cho cách sử dụng làm kháng nguyên để phát hiện các kháng thể chống lại TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, các polypeptit theo sáng chế mà bao gồm các quyết định tổ kháng nguyên có thể được sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch khác nhau để nhận diện các động vật phơi nhiễm và/hoặc các mẫu mà bao gồm TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các biến thể của chúng.

#### Các kháng thể, phương pháp sản xuất và phương pháp sử dụng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu với các axit amin từ polypeptit của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, kháng thể này được tinh chế. Các kháng thể có thể là đa dòng hoặc đơn dòng. Các kháng

thể cũng có thể là thể khảm (tức là, dạng kết hợp của các trình tự từ nhiều loài, ví dụ, globulin miễn dịch người-chuột thể khảm), được nhân tính hóa hoặc hoàn toàn của người. Các kháng thể đặc hiệu với loài tránh được một số vấn đề gắn liền với các kháng thể mà sở hữu vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định từ loài khác. Sự có mặt của các trình tự protein như vậy từ loài khác có thể dẫn đến quá trình thanh thải nhanh các kháng thể hoặc có thể dẫn đến quá trình tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng thể bởi kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu với các axit amin từ polypeptit của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, kháng thể này được tinh chế. Các kháng thể có thể là đa dòng hoặc đơn dòng. Các kháng thể cũng có thể là thể khảm (tức là, dạng kết hợp của các trình tự từ nhiều loài, ví dụ, globulin miễn dịch người-chuột thể khảm), được nhân tính hóa hoặc hoàn toàn của người. Các kháng thể đặc hiệu với loài tránh được một số vấn đề gắn liền với các kháng thể mà sở hữu vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định từ loài khác. Sự có mặt của các trình tự protein như vậy từ loài khác có thể dẫn đến quá trình thanh thải nhanh các kháng thể hoặc có thể dẫn đến quá trình tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng thể bởi kháng thể.

Kháng thể được mô tả trong đơn này có thể bao gồm hoặc được tạo ra từ động vật có vú bất kỳ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chim, chó, người, chuột nhắt, thỏ, chuột cống, động vật gặm nhấm, động vật linh trưởng, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng và bao gồm các sản phẩm của quá trình phân cắt, các globulin miễn dịch, các kháng thể của chim, người, động vật linh trưởng, động vật gặm nhấm, động vật có vú, thể khảm, được nhân tính hóa và/hoặc được ghép CDR hoặc được làm thích ứng CDR được phân lập và các phần khác và các biến thể của chúng.

Phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra các kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Các phương pháp làm ví dụ bao gồm phương pháp chủng ngừa động vật, thể hiện thể thực khuẩn, công nghệ chuột chuyển gen và công nghệ tế bào lai.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều biến hoạt tính của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các biến thể hoặc các đoạn của chúng. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị động vật, phương pháp này bao gồm việc cho động vật dùng kháng thể mà liên kết đặc hiệu với các axit amin từ polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án nhất định, sự liên kết kháng thể vào polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này, có thể cản trở hoặc ức chế chức năng của polypeptit, vì vậy đem lại phương pháp ức chế quá trình nhân lên và lây lan của virus. Theo các phương án khác, kháng thể liên kết vào polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này, và không cản trở hoặc ức chế chức năng của polypeptit.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để tinh chế polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12, các biến thể hoặc các đoạn của chúng như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận diện quá trình biểu hiện và khoanh vùng của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12, các biến thể, các đoạn hoặc các miền của chúng. Phép phân tích quá trình biểu hiện và khoanh vùng của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12 có thể là hữu ích trong việc xác định vai trò tiềm tàng của polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để tinh chế các polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các biến thể hoặc các đoạn của chúng như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận diện quá trình biểu hiện và khoanh vùng của polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các biến

thể, các đoạn hoặc các miền của chúng. Phép phân tích quá trình biểu hiện và khoanh vùng của polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 có thể là hữu ích trong việc xác định vai trò tiềm tàng của polypeptit của polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và các đoạn và các biến thể của chúng.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch khác nhau để nhận diện các động vật phơi nhiễm và/hoặc các mẫu mà bao gồm các kháng nguyên từ TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO: 12, và các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch khác nhau để nhận diện các động vật phơi nhiễm và/hoặc các mẫu mà bao gồm các kháng nguyên từ TiLV được thể hiện bằng SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này.

Thử nghiệm miễn dịch thích hợp bất kỳ mà có thể dẫn đến hiện tượng hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể cũng có thể được sử dụng. Các dạng thay đổi và các dạng thức khác nhau của các thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, ELISA, thử nghiệm dòng chảy ngang dùng để phát hiện các chất phân tích ở các mẫu, quá trình kết tủa miễn dịch, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án khác nhau, kháng nguyên và/hoặc kháng thể có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu hoặc phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các thử nghiệm miễn dịch enzyme có thể sử dụng giá đỡ rắn, hoặc quá trình kết tủa miễn dịch. Các thử nghiệm miễn dịch mà khuếch đại tín hiệu từ phức hợp miễn dịch kháng nguyên-kháng thể cũng có thể được sử dụng với các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp để thử nghiệm mẫu để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV bao gồm SEQ ID NO: 12, và các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các phương pháp để thử nghiệm mẫu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các

phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các axit nucleic, các phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên, các phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các kháng thể chống lại các kháng nguyên từ polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12, hoặc polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 12, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp để thử nghiệm mẫu để xác định sự có mặt hoặc không của TiLV bao gồm SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, và các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các phương pháp để thử nghiệm mẫu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các axit nucleic, các phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các kháng nguyên, các phương pháp mà có thể phát hiện sự có mặt của các kháng thể chống lại các kháng nguyên từ các polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng, như được mô tả trong bản mô tả này.

### Kit

Cũng được đề xuất là kit để thực hiện một hoặc nhiều phương pháp trong số các phương pháp được mô tả trên đây.

Các chất phản ứng đối tượng và các kit của chúng có thể thay đổi một cách đáng kể. Các chất phản ứng đang được quan tâm bao gồm các chất phản ứng được thiết kế cách riêng để sử dụng trong việc xác định xem liệu động vật có TiLV hay không.

Một loại chất phản ứng mà được hiệu chỉnh cách riêng để phát hiện TiLV là ít nhất một đoạn mồi oligonucleotit đặc hiệu với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 để khuếch đại axit nucleic thu được từ mẫu sinh học, và, tùy ý, ít nhất một đoạn mồi thích hợp để giúp thực hiện được việc giải trình tự axit nucleic đã được khuếch đại và việc xác định sự có mặt của đột biến.

Các ví dụ về các đoạn mồi mà có thể được lấy vào làm chất phản ứng là:

ME1 (SEQ ID NO: 23) và dòng vô tính 7450/150R (SEQ ID NO: 16);

Nested ext-1 (SEQ ID NO: 24) và nested ext-2 (SEQ ID NO: 25);  
 NM-CLU7-SF1 (SEQ ID NO: 28) và NM-CLU7-SRI (SEQ ID NO: 29);  
 TiLV-CLU5-cF1 (SEQ ID NO: 30) và TiLV-CLU5-cR1 (SEQ ID NO: 31); và  
 CLU5-mRNA-qF1 (SEQ ID NO: 34) và CLU5-mRNA-qR1 (SEQ ID NO: 35),  
 với mẫu dò tùy ý, CLU5-mRNA-Probe (SEQ ID NO: 36).

Một loại chất phản ứng khác nữa là một hoặc nhiều mẫu dò axit nucleic bao gồm hoặc bổ sung với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, một hoặc nhiều mẫu dò là ở dạng tạo mảng. Một loạt dạng thức mảng khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này với một loạt rất nhiều cấu trúc mẫu dò, chế phẩm cơ chất, và công nghệ gắn kết khác nhau. Theo một số phương án, các mảng bao gồm ít nhất 2 mẫu dò axit nucleic, theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 5 mẫu dò axit nucleic, theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 10 mẫu dò axit nucleic, theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 15 mẫu dò axit nucleic, theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 25 mẫu dò axit nucleic, và theo một phương án được ưu tiên hơn cả, ít nhất 50 mẫu dò axit nucleic, các mẫu dò axit nucleic đã nêu bao gồm hoặc bổ sung với các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11.

Một loại chất phản ứng khác nữa là một hoặc nhiều kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này mà liên kết đặc hiệu với các axit amin từ polypeptit của polypeptit được phân lập nêu trong SEQ ID NO: 12, các đoạn và các biến thể của chúng, hoặc các axit amin từ polypeptit của polypeptit được phân lập bất kỳ được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn và các biến thể của chúng.

Kit theo sáng chế có thể bao gồm các đoạn môi, các mẫu dò, các mảng, và các kháng thể được mô tả trên đây cũng như các chất phản ứng bổ sung được sử dụng trong các phương pháp khác nhau, như: các chất phản ứng đánh dấu; các enzym như transcriptaza ngược, ADN polymeraza và ARN polymeraza, và các chất tương tự; các dung dịch đệm khác nhau, như dung dịch đệm của quá trình lai và dung dịch đệm của quá trình rửa; chất phản ứng tạo tín hiệu và chất phản ứng phát hiện; và các chất phản ứng để phân lập axit nucleic khỏi mẫu. Ngoài ra, kit có thể bao gồm các hướng dẫn để thực hiện các phương pháp theo sáng chế.



Sáng chế cũng bao trùm các hệ thống để thực hiện một hoặc nhiều phương pháp trong số các phương pháp được mô tả trên đây. Các hệ thống đối tượng có thể thay đổi một cách đáng kể nhưng thông thường bao gồm ít nhất một yếu tố để phát hiện TiLV, tức là, một hoặc nhiều chất phản ứng được mô tả trên đây dùng để phát hiện TiLV, bao gồm các đoạn mồi, các mẫu dò, các mảng, các kháng thể, và các chất phản ứng bổ sung để thực hiện các phương pháp theo sáng chế.

Các chế phẩm sinh miễn dịch, phương pháp sản xuất và phương pháp sử dụng

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ chế phẩm sinh miễn dịch được dùng để chỉ chế phẩm có khả năng gây đáp ứng sinh miễn dịch ở động vật hoặc tế bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, phần đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch có thể bao gồm vacxin.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại TiLV bao gồm TiLV theo sáng chế bao gồm axit nucleic nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc bao gồm trình tự cADN bổ sung với sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng, hoặc bao gồm polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự cADN bổ sung với sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc bao gồm polypeptit bao gồm SEQ ID NO: 12 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng hoặc bao gồm TiLV bị tiêu diệt hoặc TiLV được làm suy yếu.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm polypeptit hoặc axit nucleic của TiLV bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các biến thể và các đoạn.

Theo một phương án, các chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng làm thuyên giảm các triệu chứng của sự lây nhiễm TiLV và/hoặc làm giảm khoảng thời gian kéo dài bệnh gắn liền với TiLV. Theo một phương án khác, các chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng kích thích tính miễn dịch bảo vệ chống lại bệnh gắn liền với TiLV. Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể là hữu hiệu chống lại các virus TiLV được bộc lộ trong

bản mô tả này, và cũng có thể là có tính phản ứng với, và hữu hiệu chống lại, nhiều chủng và nhánh khác nhau của TiLV, và chống lại các virus orthomyxovirus khác.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở động vật, phương pháp này bao gồm việc cho động vật dùng axit nucleic của TiLV, polypeptit của TiLV hoặc chế phẩm sinh miễn dịch TiLV. Các phương pháp cho động vật dùng các polypeptit và các phương pháp tạo ra các đáp ứng miễn dịch ở động vật bằng cách cho dùng các peptit sinh miễn dịch theo lượng hữu hiệu về mặt sinh miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các loại chế phẩm sinh miễn dịch được bao quát bởi sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chế phẩm sinh miễn dịch virus sống được làm suy yếu, các chế phẩm sinh miễn dịch virus được làm bất hoạt (bị tiêu diệt), và các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con.

Các virus TiLV theo sáng chế có thể được làm suy yếu bằng việc loại bỏ hoặc phá vỡ các trình tự virus mà các sản phẩm của chúng gây ra hoặc góp phần vào bệnh và các triệu chứng gắn liền với sự lây nhiễm TiLV, và để cho các trình tự cần thiết cho sự sao chép virus được nguyên vẹn. Bằng cách này, có thể tạo ra TiLV được làm suy yếu mà sao chép ở động vật, và gây đáp ứng miễn dịch ở động vật, nhưng chất này không kích thích bệnh và các triệu chứng có hại thường gắn liền với sự lây nhiễm TiLV. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các trình tự TiLV nào có thể hoặc nên được loại bỏ hoặc phá vỡ, và các trình tự nào nên được để nguyên vẹn, để tạo ra TiLV được làm suy yếu thích hợp cho cách sử dụng làm chế phẩm sinh miễn dịch.

TiLV mới theo sáng chế cũng có thể được làm bất hoạt, như bằng phương pháp xử lý hóa học, để “tiêu diệt” các virus sao cho chúng không còn có khả năng sao chép hoặc gây ra bệnh ở động vật, nhưng vẫn gây đáp ứng miễn dịch ở động vật. Có nhiều phương pháp làm bất hoạt virus thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng chọn lựa phương pháp thích hợp và tạo ra TiLV “bị tiêu diệt” được làm bất hoạt thích hợp cho cách sử dụng làm chế phẩm sinh miễn dịch.

Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể bao gồm các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con. Các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con bao gồm các chế phẩm

sinh miễn dịch axit nucleic như các chế phẩm sinh miễn dịch ADN, chế phẩm này chứa các axit nucleic mà mã hóa một hoặc nhiều protein virus hoặc đơn vị con, hoặc các phần của các protein hoặc đơn vị con đó. Khi sử dụng các chế phẩm sinh miễn dịch như vậy, thì cho động vật dùng axit nucleic, và các peptit hoặc protein sinh miễn dịch được mã hóa bởi axit nucleic được biểu hiện ở động vật, sao cho đáp ứng miễn dịch chống lại các protein hoặc peptit này được tạo ra ở động vật. Các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con cũng có thể là các chế phẩm sinh miễn dịch protein, chế phẩm này chứa các protein virus hoặc đơn vị con, hoặc các phần của các protein hoặc đơn vị con đó.

Để tạo ra axit nucleic và các chế phẩm sinh miễn dịch ADN theo sáng chế, các trình tự TiLV được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sát nhập vào plasmit hoặc vector biểu hiện chứa axit nucleic mà mã hóa peptit hoặc protein virus. Plasmit hoặc vector biểu hiện thích hợp bất kỳ có khả năng thúc đẩy quá trình biểu hiện của protein hoặc peptit ở động vật có thể được sử dụng. Các plasmit và vector biểu hiện như vậy cần phải bao gồm một gen khởi đầu thích hợp để dẫn dắt quá trình phiên mã của axit nucleic. (Các) trình tự axit nucleic mà mã hóa peptit hoặc protein TiLV cũng có thể được sát nhập vào virus tái tổ hợp thích hợp cho việc cho động vật dùng. Các ví dụ về virus thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus đậu mùa, retrovirus, adenovirus và virus gắn liền với adenovirus. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng chọn lựa plasmit, vector biểu hiện, hoặc virus tái tổ hợp thích hợp để phân phối các trình tự axit nucleic của TiLV theo sáng chế.

Để tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch protein theo sáng chế, các trình tự axit nucleic của TiLV theo sáng chế được phân phối đến tế bào được nuôi cấy, ví dụ, bằng cách chuyển nhiễm tế bào được nuôi cấy bằng các plasmit hoặc vector biểu hiện chứa các trình tự axit nucleic của TiLV, hoặc bằng cách gây nhiễm tế bào được nuôi cấy bằng các virus tái tổ hợp chứa các trình tự axit nucleic của TiLV. Sau đó, các peptit hoặc protein TiLV có thể được biểu hiện ở tế bào được nuôi cấy và được tinh chế. Sau đó, các protein được tinh chế có thể được sát nhập vào các chế phẩm thích hợp cho việc cho động vật dùng. Các phương pháp và kỹ thuật dùng cho quá trình biểu hiện và tinh chế các protein tái tổ hợp là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các phương pháp thích hợp như vậy bất kỳ có thể được sử dụng.

Các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con theo sáng chế có thể mã hóa hoặc chứa peptit hoặc protein bất kỳ trong số các peptit hoặc protein TiLV được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các phần, các đoạn, các dẫn xuất hoặc các thể đột biến bất kỳ của chúng, mà sinh miễn dịch ở động vật. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng kiểm tra tính sinh miễn dịch của các peptit và protein TiLV được mô tả trong bản mô tả này, và có thể chọn lựa các peptit hoặc protein thích hợp để sử dụng trong các chế phẩm sinh miễn dịch đơn vị con.

Việc sản xuất các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện tái tổ hợp mà biểu hiện TiLV, protein TiLV, đoạn của protein TiLV hoặc biến thể của protein virus TiLV. Hệ thống biểu hiện có thể bao gồm plasmit thích hợp bất kỳ hoặc cấu trúc biểu hiện tuyến tính đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo ra ở tế bào. Việc sản xuất các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được thực hiện trên phương tiện hữu ích bất kỳ và mô hoặc tế bào cho phép, phần này có thể được tạo ra từ các dòng tế bào cá hoặc các dòng tế bào động vật khác. Như được sử dụng trong bản mô tả này, tế bào hoặc mô có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào, mô, cơ quan, tế bào côn trùng, tế bào cá, tế bào động vật có vú, tế bào khối tế bào lai, tế bào sơ cấp, dòng tế bào liên tục, và/hoặc tế bào được xử lý bằng công nghệ về mặt gen riêng biệt, như tế bào tái tổ hợp biểu hiện virus. Ví dụ, việc sản xuất của các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch có thể là ở loại tế bào bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào cá rô phi. Các dòng tế bào thích hợp cho việc sản xuất các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Hệ thống nuôi cấy tế bào để sản xuất các virus TiLV và các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này có thể là môi trường nuôi cấy đơn lớp kết dính truyền thống. Theo cách khác, cũng có thể sử dụng các hệ thống nuôi cấy tế bào trên chất mang tế vi và huyền phù.

Các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm vacxin TiLV bị tiêu diệt hoặc được làm bất hoạt. Có thể tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch được làm bất hoạt bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, một khi TiLV được nhân lên đến hiệu giá cao, thì có thể thu được khối lượng kháng

nguyên TiLV bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, có thể thu được khối lượng kháng nguyên virus TiLV bằng quá trình pha loãng, cô, hoặc chiết. Tất cả các phương pháp này đã được sử dụng để thu được khối lượng kháng nguyên TiLV thích hợp để tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch. TiLV có thể được làm bất hoạt bằng quá trình xử lý bằng formalin (ví dụ, 0,1-10%), betapropriolacton (BPL) (ví dụ, 0,01-10%), hoặc bằng etylenimin hai thành phần (binary ethylenimine-BEI) (ví dụ, 1-10mM), hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Ngoài việc sản xuất TiLV bị tiêu diệt ra, các phương tiện làm suy yếu khác nhau thì cũng có thể có và đã biết rõ và được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quá trình làm suy yếu dẫn đến các chế phẩm sinh miễn dịch sống được cải biến cũng có thể được sử dụng chung với các chế phẩm và phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Các phương pháp làm suy yếu thích hợp cho việc sử dụng với các virus được mô tả trong bản mô tả này bao gồm cấy chuyển liên tục trong môi trường nuôi cấy tế bào, cấy chuyển liên tục ở động vật, các phương pháp khác nhau để tạo các dạng cải biến gen và quá trình gây đột biến bằng hóa chất hoặc ánh sáng cực tím.

Có thể đạt được mục đích làm suy yếu TiLV thông qua quá trình làm thích ứng lạnh chủng TiLV. Có thể tạo ra các chủng virus TiLV được làm thích ứng lạnh bằng các phương pháp mà bao gồm việc cấy chuyển virus TiLV loại hoang dại, sau đó là chọn lựa để có được TiLV mà tăng trưởng ở nhiệt độ giảm thấp. Có thể tạo ra TiLV được làm thích ứng lạnh, ví dụ, bằng cách cấy chuyển một cách liên tiếp TiLV loại hoang dại ở trứng gà hoặc tế bào có phôi ở nhiệt độ hạ thấp dần, nhờ đó chọn lựa để có được các thành viên nhất định của hỗn hợp TiLV mà sao chép một cách vững chắc ở nhiệt độ giảm thấp. Chủng TiLV được làm thích ứng lạnh có thể biểu hiện kiểu hình nhạy cảm với nhiệt độ. TiLV được làm thích ứng lạnh nhạy cảm với nhiệt độ sao chép ở nhiệt độ giảm thấp, nhưng không còn sao chép ở nhiệt độ tăng trưởng cao hơn nhất định mà ở đó TiLV loại hoang dại sẽ sao chép. Nhiệt độ mà ở đó TiLV nhạy cảm với nhiệt độ sẽ tăng trưởng trong bản mô tả này được gọi là nhiệt độ “cho phép” của TiLV nhạy cảm với nhiệt độ đó, và nhiệt độ cao hơn mà ở đó TiLV nhạy cảm với nhiệt độ sẽ không tăng trưởng, nhưng ở đó TiLV loại hoang dại tương ứng sẽ tăng trưởng, trong bản mô tả này được gọi là nhiệt độ “không cho phép” của TiLV nhạy cảm với nhiệt độ đó. Cũng có thể tạo ra TiLV được

làm thích ứng lạnh thông qua phương tiện tái tổ hợp. Theo phương pháp này, một hoặc nhiều đột biến cụ thể, gắn liền với quá trình làm thích ứng lạnh được nhận diện, quá trình làm suy yếu, tính nhạy cảm với nhiệt độ, hoặc kiểu hình cản trở trội, có thể được nhận diện và được đưa trở lại vào chủng TiLV loại hoang dại bằng cách sử dụng phương pháp di truyền học ngược. Có thể thực hiện phương pháp di truyền học ngược bằng cách sử dụng các phức hợp ARN polymeraza được phân lập từ tế bào bị nhiễm TiLV để phiên mã các đoạn hệ gen TiLV nhân tạo chứa (các) đột biến, sát nhập (các) đoạn ARN được tổng hợp vào các hạt virus bằng cách sử dụng virus hỗ trợ, và sau đó, chọn lựa để có được các virus chứa các dạng thay đổi mong muốn.

Có thể đạt được mục đích làm suy yếu TiLV bằng cách cấy chuyển theo dây chủng TiLV loại hoang dại trong môi trường nuôi cấy tế bào. Chủng TiLV có thể được cấy chuyển ở một loạt hệ thống tế bào cho đến khi khả năng của nó trong việc tạo ra bệnh bị mất trong khi đặc tính sinh miễn dịch của nó được giữ lại hoàn toàn. Một khi được chủng ngừa vào vật chủ, TiLV có thể có khả năng nhân lên đến một số mức độ. Ví dụ, các chế phẩm TiLV được làm suy yếu có thể được điều chế từ dòng tế bào mà đã được làm suy yếu bằng phương pháp cấy chuyển theo dây bao gồm phương pháp cấy chuyển theo dây ở các nhiệt độ dưới mức tối ưu đến trạng thái mà nó không còn có khả năng gây ra bệnh, nhưng vẫn có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Cũng có thể thu được các chủng TiLV được làm suy yếu thích hợp bằng phương pháp cấy chuyển theo dây để thu được chủng được làm suy yếu quá mức. “Làm suy yếu quá mức” có nghĩa là con số lần cấy chuyển cho quá trình làm suy yếu về cơ bản lớn hơn những gì bình thường là cần thiết cho quá trình loại bỏ khả năng gây bệnh. TiLV được làm suy yếu giữ lại tính kháng nguyên của nó sau nhiều lần cấy chuyển khác nhau này sao cho khả năng sinh miễn dịch của nó không bị suy yếu. Thực tế, các chủng như vậy không tạo ra triệu chứng hoặc tác dụng phụ nào khi được cho dùng, và vì vậy, là những vacxin an toàn và hiệu nghiệm.

Các phương pháp tinh chế virus được làm bất hoạt là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm một hoặc nhiều phương pháp trong số, ví dụ, quá trình ly tâm theo gradien, ly tâm siêu tốc, ly tâm siêu tốc dòng chảy liên tục và sắc ký, như sắc ký trao đổi ion, sắc ký đào thải theo kích cỡ, và sắc ký ái lực chất lỏng. Các phương pháp

tinh chế bổ sung bao gồm siêu lọc qua màng bằng áp suất thủy tĩnh và lọc pha loãng theo kích cỡ phân tử siêu nhỏ.

Các ví dụ khác về các phương pháp tinh chế thích hợp để sử dụng trong sàng chế bao gồm quá trình kết tủa amoni sulfat hoặc polyetylen glycol (xem tài liệu: Trepanier *et al.* (1981) *Journal of Virological Methods* 3:201-711; Hagen *et al.* (1996) *Biotechnology Progress* 12:406-412; và Carlsson *et al.* (1994) *Journal of Virological Methods* 47:27-36) cũng như siêu lọc qua màng bằng áp suất thủy tĩnh và vi lọc màng kích cỡ siêu nhỏ (xem tài liệu: Pay *et al.* (1985) *Developments in Biological Standardization* 60:171-174; Tsurumi *et al.* (1990) *Polymer Journal* 22:1085-1100; và Makino *et al.* (1994) *Archives of Virology* 139:87-96).

Có thể tinh chế các virus bằng cách sử dụng sắc ký, như sắc ký, trao đổi ion. Quá trình tinh chế theo màu sắc cho phép sản xuất được thể tích lớn huyền phù chứa virus. Sản phẩm virus đang được quan tâm có thể tương tác với môi trường màu sắc bằng cơ chế hấp phụ/giải hấp đơn giản, và thể tích lớn của mẫu có thể được xử lý trong một lần nạp đơn lẻ. Các chất gây bẩn mà không có ái lực đối với chất hấp phụ di chuyển qua cột. Sau đó, có thể rửa giải vật liệu virus này ở dạng đậm đặc.

Nhựa trao đổi anion mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DEAE, và EMD TMAE. Nhựa trao đổi cation có thể bao gồm bề mặt được cải biến bằng axit sulfonic. Có thể tinh chế các virus bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion bao gồm nhựa trao đổi anion mạnh (ví dụ, EMD TMAE) đối với bước thứ nhất và EMD-SO<sub>3</sub> (nhựa trao đổi cation) đối với bước thứ hai. Tùy ý, có thể đưa bước sắc ký ái lực liên kết kim loại vào cho quá trình tinh chế thêm. (ví dụ, xem WO 97/06243).

Cũng có thể sử dụng nhựa như Fractogel EMD. Nhựa trên cơ sở metacrylat tổng hợp này có các chuỗi polyme tuyến tính dài được gắn kết cộng hóa trị và cho phép có một lượng lớn của các phối tử có thể tiếp cận được về mặt không gian để liên kết phân tử sinh học mà không có sự cản trở không gian bất kỳ.

Sắc ký ái lực chất lỏng trên cơ sở cột là một phương pháp tinh chế khác mà có thể được sử dụng theo sàng chế. Một ví dụ về nhựa để sử dụng trong phương pháp tinh chế là Matrex Cellufine Sulfate (MCS). MCS gồm cơ chất xenluloza hình cầu cứng có giới hạn đào thải 3.000 Dalton (đường kính xấp xỉ 45-105 .mu.m) (cấu trúc lỗ của nó loại trừ đại

phân tử), có nồng độ thấp của nhóm chức este sulfat trên vị trí 6 của xenluloza. Vì phối tử chức năng (este sulfat) được phân tán tương đối cao, nên nó đem lại mật độ điện tích cation không đủ để cho phép có các protein tan nhiều nhất để hấp phụ lên trên bề mặt hạt. Do đó khối protein được tìm thấy ở các tập hợp virus điển hình (các dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy tế bào, ví dụ, chất sinh nhiệt và các protein gây bắn nhiều nhất, cũng như các axit nucleic và các nội độc tố) được rửa khỏi cột và đạt được mức độ tinh chế của virus đã được liên kết.

Các virus đã được làm bất hoạt có thể được tinh chế thêm bằng quá trình ly tâm theo gradien, hoặc quá trình ly tâm theo gradien mật độ. Đối với việc vận hành quy mô thương mại, quá trình ly tâm theo gradien sucroza dòng chảy liên tục sẽ là một lựa chọn. Phương pháp này được sử dụng một cách rộng rãi để tinh chế các chế phẩm sinh miễn dịch chống virus và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp tinh chế bổ sung mà có thể được sử dụng để tinh chế các virus theo sáng chế bao gồm việc sử dụng tác nhân phân hủy axit nucleic, enzym phân hủy axit nucleic, như nucleaza có hoạt tính RNaza và DNaza, hoặc endonucleaza, như từ trực khuẩn *Serratia marcescens*, các tác nhân hấp phụ màng với các nhóm chức anion hoặc các bước sắc ký bổ sung với các nhóm chức anion (ví dụ, DEAE hoặc TMAE). Bước siêu lọc qua màng bằng áp suất thủy tĩnh/lọc pha loãng theo kích cỡ phân tử siêu nhỏ và bước lọc vô trùng cuối cùng cũng có thể được bổ sung vào phương pháp tinh chế này.

Chế phẩm virus được tinh chế theo sáng chế về cơ bản là không có các protein gây bắn được tạo ra từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào và có thể bao gồm ít hơn khoảng 1000, 500, 250, 150, 100, hoặc 50pg axit nucleic tế bào/ $\mu$ g kháng nguyên virus, và ít hơn khoảng 1000, 500, 250, 150, 100, hoặc 50pg axit nucleic tế bào/liều lượng. Chế phẩm virus được tinh chế cũng có thể bao gồm ít hơn khoảng 20pg hoặc ít hơn khoảng 10pg. Các phương pháp đo các mức axit nucleic tế bào chủ ở mẫu virus là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể sử dụng các phương pháp đã được tiêu chuẩn hóa được phê duyệt hoặc được khuyến nghị bởi các cơ quan có thẩm quyền quy định như WHO hoặc FDA.



Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất một hợp phần sinh miễn dịch được tạo ra từ TiLV, như những loại được mô tả trong bản mô tả này. Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phụ gia bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chất mang, dung dịch đệm, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất làm tan, liposom hoặc tác nhân điều biến miễn dịch được dụng. Các tác nhân điều biến miễn dịch thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất phụ trợ, xytokin, polynucleotit mã hóa xytokin, và các tác nhân mà tạo thuận lợi cho quá trình hấp thụ vào tế bào của hợp phần sinh miễn dịch được tạo ra từ TiLV.

Như vậy, các chế phẩm sinh miễn dịch để sử dụng theo sáng chế có thể được tạo dạng chế phẩm theo phương thức thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý bao gồm các tá dược và các chất phụ trợ mà tạo thuận lợi cho quá trình xử lý các hợp chất có hoạt tính thành các chế phẩm mà có thể được sử dụng để gây đáp ứng sinh miễn dịch. Các chế phẩm sinh miễn dịch này có thể được sản xuất theo phương thức mà chính phương thức này đã biết, ví dụ, bằng phương tiện là các quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bao đường, nghiền mịn, nhũ hóa, đóng nang, kim giữ hoặc làm đông khô thông thường. Quá trình tạo dạng chế phẩm đúng đắn là phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Khi lượng hữu hiệu về mặt trị liệu của protein hoặc thành phần có hoạt tính khác theo sáng chế được cho dùng bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch, da hoặc dưới da, thì protein hoặc thành phần có hoạt tính khác theo sáng chế sẽ ở dạng dung dịch nước có thể chấp nhận được theo phương thức ngoài đường tiêu hóa, không có chất sinh nhiệt. Việc điều chế protein có thể chấp nhận được theo phương thức ngoài đường tiêu hóa như vậy hoặc các dung dịch thành phần có hoạt tính khác, có xem xét đến độ pH, tính đẳng trương, tính ổn định, và các thuộc tính tương tự, là trong phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất dẫn đẳng trương như Thuốc Tiêm Natri Clorua, Thuốc Tiêm Ringer, Thuốc Tiêm Dextroza, Thuốc Tiêm Natri Clorua và Dextroza, Thuốc Tiêm Ringer được Lactat hóa, Dung dịch Hanks, dung dịch đệm muối sinh lý, hoặc chất dẫn khác như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo dạng chế phẩm dung dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể còn chứa chất làm ổn định, chất bảo quản, dung dịch đệm, chất chống oxy hóa, hoặc các chất phụ gia khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Đối với phương thức cho dùng qua niêm

mạc, các chất xuyên qua thích hợp cho màng ngăn cần được thẩm qua được sử dụng trong dạng chế phẩm. Nhìn chung, các chất xuyên qua như vậy là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đối với phương thức cho dùng qua đường miệng, các hợp chất có thể được tạo dạng chế phẩm dễ dàng bằng cách kết hợp các hợp chất có hoạt tính với các chất mang sinh miễn dịch có thể chấp nhận được đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất mang như vậy giúp cho các hợp chất theo sáng chế được tạo dạng chế phẩm ở dạng bột, viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, chất lỏng, gel, xi rô, chất sền sệt, huyền phù, dung dịch, cồn ngọt, và các dạng tương tự, để động vật cần được điều trị ăn/uống vào qua đường miệng. Có thể thu được các chế phẩm sinh miễn dịch để sử dụng qua đường miệng bằng tá dược rắn, tùy ý, xay hỗn hợp thu được, và xử lý hỗn hợp các hạt, sau khi bổ sung các chất phụ trợ thích hợp, nếu mong muốn, để thu được lõi viên bao đường hoặc viên nén. Cụ thể, các tá dược thích hợp là các chất làm đầy như đường, bao gồm lactoza, sucroza, manitol, hoặc sorbitol; các chế phẩm xenluloza như, ví dụ, tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột lúa gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gồm tragacan, methyl xenluloza, hydroxypropylmethyl-xenluloza, natri carboxymethylxenluloza, và/hoặc polyvinylpyrrolidon (PVP). Nếu mong muốn, các chất gây rã có thể được bổ sung, như polyvinyl pyrrolidon được liên kết ngang, agar, hoặc axit alginic hoặc muối của nó như natri alginat. Lõi viên bao đường được bố trí các lớp phủ thích hợp. Vì mục đích này, có thể sử dụng các dung dịch đường đậm đặc, dung dịch này tùy ý chứa gồm arabic, talc, polyvinyl pyrrolidon, gel carbopol, polyetylen glycol, và/hoặc titan dioxit, dung dịch vecni, và các dung môi hữu cơ hoặc các hỗn hợp dung môi thích hợp. Khi được cho dùng ở dạng chất lỏng, chất mang lỏng như nước, dầu mỡ, dầu có nguồn gốc động vật hoặc thực vật như dầu lạc, dầu khoáng, dầu đậu nành, hoặc dầu vừng, hoặc các loại dầu tổng hợp có thể được bổ sung. Dạng lỏng của chế phẩm sinh miễn dịch còn có thể chứa dung dịch muối sinh lý, dextroza hoặc dung dịch sacarit khác, hoặc các glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol. Thuốc nhuộm hoặc sắc tố có thể được bổ sung vào các lớp phủ viên bao đường hoặc viên nén để nhận diện hoặc để xác định đặc điểm các dạng kết hợp khác nhau của các liều lượng hợp chất có hoạt tính.

Các chế phẩm sinh miễn dịch mà có thể được sử dụng bằng đường miệng bao gồm viên nang đẩy khí được làm bằng gelatin, cũng như viên nang được bịt kín mềm được

làm bằng gelatin và chất dẻo hóa, như glyxerol hoặc sorbitol. Viên nang đẩy khí có thể chứa các thành phần có hoạt tính ở dạng hỗn hợp với chất làm đầy như lactoza, các chất kết dính như tinh bột, và/hoặc các chất làm trơn như talc hoặc magie stearat và, tùy ý, chất làm ổn định. Trong viên nang mềm, các hợp chất có hoạt tính có thể được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong chất lỏng thích hợp, như dầu béo, parafin lỏng, hoặc polyetylen glycol lỏng. Ngoài ra, chất làm ổn định có thể được bổ sung. Tất cả các dạng chế phẩm đối với phương thức cho dùng qua đường miệng cần phải ở liều lượng thích hợp đối với phương thức cho dùng như vậy. Đối với phương thức cho dùng thấm qua niêm mạc má, các chế phẩm có thể có dạng viên nén hoặc viên thuốc ngậm hình thoi được tạo dạng chế phẩm theo phương thức thông thường.

Viên nang và hộp dễ nạp có thể được tạo dạng chế phẩm chứa hỗn hợp bột của hợp chất và chất nền bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột. Các hợp chất có thể được tạo dạng chế phẩm dùng cho phương thức cho dùng ngoài đường tiêu hóa bằng phương pháp tiêm, ví dụ, bằng phương pháp tiêm liều mạnh hoặc tiêm truyền liên tục. Các dạng chế phẩm dùng cho phương pháp tiêm có thể được trình bày ở dạng liều đơn vị, ví dụ, trong ống thuốc tiêm hoặc trong vật chứa đa liều, có chất bảo quản đã được bổ sung. Các chế phẩm có thể có dạng như huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong chất dẫn nước hoặc chất dẫn dầu, và có thể chứa các tác nhân tạo dạng chế phẩm như tác nhân tạo huyền phù, tác nhân làm ổn định và/hoặc tác nhân phân tán.

Các dạng chế phẩm sinh miễn dịch dùng cho phương thức cho dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước của các hợp chất có hoạt tính ở dạng tan được trong nước. Ngoài ra, huyền phù của các hợp chất có hoạt tính có thể được điều chế ở dạng huyền phù tiêm dầu thích hợp. Các chất dẫn hoặc dung môi ưa mỡ thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc các este của axit béo tổng hợp, như etyl oleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom. Huyền phù tiêm nước có thể chứa các chất mà làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Tùy ý, huyền phù có thể còn chứa chất làm ổn định thích hợp hoặc các tác nhân mà làm tăng độ hòa tan của các hợp chất để cho phép có được sự điều chế các dung dịch đậm đặc ở mức cao. Theo cách khác, thành phần có hoạt tính có thể ở dạng bột để hợp thành với chất dẫn thích hợp, ví dụ, nước không có chất sinh nhiệt vô trùng, trước khi sử dụng.

Chất mang dùng cho các hợp chất kỵ nước theo sáng chế có thể là hệ thống đồng dung môi bao gồm rượu benzyl, chất hoạt động bề mặt không cực, polyme hữu cơ có thể hòa lẫn được với nước, và pha nước. Hệ thống đồng dung môi có thể là hệ thống đồng dung môi VPD. VPD là dung dịch của 3% trọng lượng/thể tích rượu benzyl, 8% trọng lượng/thể tích của chất hoạt động bề mặt không cực polysorbat 80, và 65% trọng lượng/thể tích polyetylen glycol 300, được làm thành thể tích trong etanol tuyệt đối. Hệ thống đồng dung môi VPD (VPD:5W) gồm VPD được pha loãng 1:1 với dextroza 5% trong dung dịch nước. Hệ thống đồng dung môi này hòa tan tốt các hợp chất kỵ nước, và chính nó tạo ra độc tính thấp sau khi cho dùng toàn thân. Về mặt tự nhiên, tỷ lệ của hệ thống đồng dung môi có thể thay đổi một cách đáng kể mà không phá hủy độ hòa tan và đặc điểm độc tính của nó. Ngoài ra, độ tương đồng của các hợp phần đồng dung môi có thể thay đổi: ví dụ, các chất hoạt động bề mặt không cực có độc tính thấp khác có thể được sử dụng thay vì polysorbat 80; kích cỡ phân của polyetylen glycol có thể thay đổi; các polyme tương hợp sinh học khác có thể thay thế polyetylen glycol, ví dụ, polyvinyl pyrrolidon; và các đường khác hoặc các polysacarit có thể thay thế cho dextroza.

Theo cách khác, các hệ thống phân phối khác dùng cho các hợp chất sinh miễn dịch kỵ nước có thể được sử dụng. Liposom và nhũ tương là các ví dụ đã biết rõ về các chất mang hoặc các chất dẫn phân phối dùng cho các thuốc kỵ nước. Liposom bao gồm các tác nhân lưỡng tính như các lipid mà tồn tại ở dạng được kết tụ ở dạng mixen, các lớp đơn không tan, các tinh thể lỏng, hoặc lớp dạng tấm trong dung dịch nước. Các lipid thích hợp cho dạng chế phẩm liposom bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, monoglyxerit, diglyxerit, sulfatit, lysolexitin, phospholipit, saponin, axit mật, và các chất tương tự. Việc điều chế các dạng chế phẩm liposom như vậy là trong phạm vi trình độ kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngoài ra, các hợp chất có thể được phân phối bằng cách sử dụng hệ thống giải phóng kéo dài, như các cơ chất bán thấm của các polyme kỵ nước rắn chứa tác nhân trị liệu. Các loại chất liệu giải phóng kéo dài khác nhau đã được thiết lập và đã biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tùy thuộc vào bản chất hóa học của chúng, các viên nang giải phóng kéo dài có thể giải phóng các hợp chất trong một ít tuần lên đến hơn 100 ngày. Tùy thuộc vào bản chất hóa học và tính ổn định sinh

học của chất phản ứng trị liệu, các chiến lược bổ sung đối với protein hoặc quá trình làm ổn định thành phần có hoạt tính khác có thể được sử dụng.

Các chế phẩm sinh miễn dịch cũng có thể bao gồm các tá dược hoặc chất mang pha gel hoặc rắn thích hợp. Các ví dụ về tá dược hoặc chất mang như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, canxi carbonat, canxi phosphat, các loại đường khác nhau, tinh bột, xenluloza dẫn xuất, gelatin, và các polyme như polyetylen glycol. Nhiều thành phần trong số các thành phần có hoạt tính theo sáng chế có thể được bố trí ở dạng muối có các ion đối tương hợp về mặt sinh miễn dịch. Các muối cộng bazơ có thể chấp nhận được về mặt sinh miễn dịch như vậy là những muối mà giữ lại tính hữu hiệu sinh học và các thuộc tính của các axit tự do và chất này là thu được bằng phản ứng với các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ như natri hydroxit, magie hydroxit, amoniac, trialkylamin, dialkylamin, monoalkylamin, axit amin hai bazơ, natri axetat, kali benzoat, trietanol amin và các chất tương tự.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể ở dạng phức hợp của (các) protein hoặc thành phần có hoạt tính khác theo sáng chế cùng với các kháng nguyên peptit hoặc protein.

Các chế phẩm sinh miễn dịch và các vaccin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể là các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị mà còn bao gồm các polypeptit bổ sung hoặc các trình tự axit nucleic mã hóa các polypeptit bổ sung từ các virus khác.

Các chế phẩm sinh miễn dịch và các vaccin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể là các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị mà còn bao gồm các đoạn polypeptit bổ sung hoặc các trình tự axit nucleic mã hóa các đoạn polypeptit bổ sung từ các virus khác.

Các chế phẩm sinh miễn dịch và các vaccin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể là các chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị mà còn bao gồm các virus bổ sung (ví dụ, các virus mà được làm suy yếu, bị tiêu diệt hoặc được khử hoạt tính) hoặc các trình tự axit nucleic mã hóa các virus bổ sung (ví dụ, các virus mà được làm suy yếu, bị tiêu diệt hoặc được khử hoạt tính).

Các chế phẩm sinh miễn dịch và các vaccin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể bao gồm các protein dung hợp, hoặc các axit nucleic mã hóa các protein dung hợp

bao gồm polypeptit của TiLV, hoặc đoạn hoặc biến thể của nó, và ít nhất một polypeptit, hoặc đoạn polypeptit hoặc biến thể từ một virus khác.

Các polypeptit virus khác và trình tự axit nucleic thích hợp để sử dụng trong các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này được bàn luận trong tài liệu: Tucker *et al.* (2000) "Assessment of DNA vaccine potential for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, through the introduction of reporter genes by particle bombardment and histopathology" *Vaccine* 19(7-8):801; Corbeil *et al.* (1999) "Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV, G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines" *Dis. Aquat. Organ* 39(1):29; Nusbaum *et al.* (2002) "Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpes virus (IHV-1)" *Vet Immunol. Immunopathol.* 84:151; Clark *et al.* (1992) "Developmental expression of surface antigen genes in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(14):6363-6367; và Sato *et al.* (2000) "Expression of YAV proteins and vaccination against viral ascites among cultured juvenile yellowtail" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1494. Nhiều trình tự axit nucleic và trình tự axit amin khác nhau của các kháng nguyên mầm bệnh của cá là đã biết và có thể tiếp cận được thông qua cơ sở dữ liệu Genbank và các nguồn khác.

Các chất phụ gia khác mà hữu ích trong chế phẩm sinh miễn dịch và dạng chế phẩm vacxin là đã biết và sẽ sáng tỏ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, việc chủng ngừa các động vật có thể được thực hiện bằng cách tiêm một cách trực tiếp các polypeptit của TiLV, các đoạn hoặc các biến thể của chúng vào động vật để tạo ra đáp ứng sinh miễn dịch. Theo các phương án nhất định, polypeptit của TiLV có thể được tiêm bằng chính chất này, hoặc các chế phẩm TiLV sinh miễn dịch bao gồm các hợp phần khác, bao gồm, ví dụ, tá dược, chất phụ gia và chất phụ trợ.

Việc chủng ngừa cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp chủng ngừa trực tiếp bằng ADN mã hóa polypeptit của TiLV. Khi sử dụng vacxin như vậy, thì cho động vật dùng axit nucleic, và (các) polypeptit sinh miễn dịch được mã hóa bởi axit nucleic

được biểu hiện ở động vật, sao cho đáp ứng miễn dịch chống lại các protein hoặc peptit này được tạo ra ở động vật. Các vaccin đơn vị con cũng có thể là các vaccin protein, chế phẩm này chứa các protein virus hoặc chính các đơn vị con, hoặc các phần của các protein hoặc đơn vị con đó. Plasmid hoặc vector biểu hiện thích hợp bất kỳ có khả năng thúc đẩy quá trình biểu hiện của polypeptit có thể được sử dụng. Các plasmid và vector biểu hiện có thể bao gồm gen khởi đầu để dẫn dắt quá trình phiên mã của axit nucleic. Trình tự axit nucleic mã hóa các polypeptit của TiLV cũng có thể được sát nhập vào virus tái tổ hợp thích hợp cho việc cho động vật dùng. Các ví dụ về virus thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus đậu mùa, retrovirus, adenovirus và virus gắn liền với adenovirus. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể chọn lựa plasmid, vector biểu hiện, hoặc virus tái tổ hợp thích hợp để phân phối các trình tự axit nucleic của TiLV theo sáng chế. Việc chủng ngừa trực tiếp bằng ADN mã hóa các protein đã thành công đối với nhiều protein khác nhau. (Như được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Donnelly *et al.* (1993) *The Immunologist* 2: 20-26 (1993)).

Việc chủng ngừa bằng các polypeptit và các axit nucleic của TiLV được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các chất mang tái tổ hợp sống có khả năng biểu hiện các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này. Các chất mang tái tổ hợp sống là các vi sinh vật hoặc các virus mà trong đó thông tin di truyền bổ sung, ví dụ, trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit của TiLV, hoặc đoạn của nó đã được tạo dòng vô tính. Cá bị lây nhiễm các chất mang tái tổ hợp sống như vậy sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch học không những chống lại các chất sinh miễn dịch của chất mang, mà còn chống lại polypeptit của TiLV hoặc đoạn polypeptit của TiLV.

Theo cách khác, việc chủng ngừa thụ động có thể được thực hiện bằng cách nuôi các kháng thể TiLV ở loài động vật thứ nhất (ví dụ, thỏ), từ các dòng tế bào tạo ra kháng thể, hoặc từ các kỹ thuật *in vitro* trước khi cho loài động vật thứ hai dùng các kháng thể như vậy (ở dạng được tinh chế hoặc dạng không được tinh chế). Loại chủng ngừa thụ động này có thể được sử dụng khi động vật thứ hai đã bị lây nhiễm TiLV. Trong một số trường hợp, việc chủng ngừa thụ động có thể là hữu ích khi tình trạng lây nhiễm ở động vật thứ hai không thể, hoặc chưa có đủ thời gian để nâng cao đáp ứng miễn dịch đối với tình trạng lây nhiễm này.

Nhiều phương pháp để chủng ngừa cá là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, việc chủng ngừa bằng các polypeptit và các axit nucleic của TiLV được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện ở cá bằng phương pháp tiêm, nhúng ngáp, nhúng hoặc thông qua phương pháp cho dùng qua đường miệng. Quy trình cho dùng có thể được tối ưu hóa theo cách thực hiện chủng ngừa tiêu chuẩn

Đối với việc chủng ngừa qua đường miệng cá rô phi, các axit nucleic của TiLV, các polypeptit hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này có thể được trộn với thức ăn, được phủ trên thức ăn hoặc được cho dùng ở dạng được đóng nang. Theo các phương án nhất định, việc chủng ngừa có thể được thực hiện bằng cách ủ thức ăn sống trong huyền phù vaccin TiLV trước khi cho động vật ăn (ví dụ, cá rô phi) sao cho quá trình ăn/uống thức ăn sống sẽ làm cho vaccin TiLV tích tụ trong ống tiêu hóa của động vật trải qua quá trình chủng ngừa. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhìn nhận rằng các phương pháp cho dùng này có thể làm cho kháng nguyên tiếp xúc với quá trình phân hủy hoặc làm biến tính tiềm tàng và vì vậy, người có hiểu biết trung bình sẽ đảm bảo rằng phương pháp chủng ngừa sẽ thích hợp cho kháng nguyên được chọn. Trong trường hợp chủng ngừa qua đường miệng, vaccin cũng có thể được trộn với một hoặc nhiều chất mang. Các chất mang thích hợp để sử dụng trong việc chủng ngừa qua đường miệng bao gồm chất có thể chuyển hóa được và chất không thể chuyển hóa được.

Việc chủng ngừa cá rô phi cũng có thể được thực hiện bằng các quy trình nhúng ngáp. Biểu mô mang và da ở cá có các bề mặt niêm mạc mà góp phần vào việc nhận biết các mầm bệnh bằng cách hấp phụ các kháng nguyên. Quá trình hấp phụ lại tạo ra hiện tượng hoạt hóa tế bào tạo ra kháng thể trong vai trò là một phần của đáp ứng miễn dịch. Vì vậy, theo một phương án, việc chủng ngừa cá bằng các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện bằng cách nhúng ngáp cá trong nước chứa chế phẩm vaccin TiLV. Ít nhất hai loại chủng ngừa nhúng ngáp có thể được sử dụng chung với các polypeptit được mô tả trong bản mô tả này. Trong việc chủng ngừa nhúng, cá được nhúng ngáp vào nước trong khoảng thời gian ngắn (ví dụ, khoảng 30 giây) trong dung dịch vaccin đậm đặc (ví dụ, 1 phần vaccin, 9 phần nước). Trong việc chủng ngừa ngâm, quá trình nhúng ngáp xảy ra trong khoảng thời gian dài hơn (ví dụ, một vài giờ) trong nước chứa các nồng độ vaccin thấp hơn. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể



dễ dàng xác định được mức pha loãng của vacxin TiLV và khoảng thời gian kéo dài quá trình nhúng ngập đủ để kích thích phản ứng miễn dịch trong quy trình nhúng ngập.

Một phương pháp khác để chủng ngừa cá rô phi bằng các polypeptit và các axit nucleic của TiLV được mô tả trong bản mô tả này là bằng phương pháp chủng ngừa tiêm. Trong việc chủng ngừa tiêm, vacxin được tiêm vào khoang bụng của cá. Mặc dù người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định điểm tiêm đúng đắn, một vị trí thông thường cho việc đâm kim ở cá rô phi là đường giữa của bụng, một chiều dài vây vùng chậu phía trước phần gốc của các vây vùng chậu. Theo các phương án nhất định, các axit nucleic của TiLV, các polypeptit hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch có thể được phân phối vào khoang cơ thể của cá trong nhũ tương dầu, hoặc các chất phụ trợ hoặc chất phụ gia khác mà tăng cường và/hoặc kéo dài các đáp ứng miễn dịch. Ngoài phương pháp tiêm trong màng bụng ra, việc chủng ngừa tiêm cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp tiêm trong cơ. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhìn nhận rằng việc cầm nắm và đâm kim không đúng đắn có thể gây ra mức tử vong của cá và vì vậy, phương pháp gây tê nhẹ có thể được sử dụng trong suốt quy trình chủng ngừa để làm giảm căng thẳng và tổn thương cơ học cho các động vật. Người có hiểu biết trung bình cũng sẽ nhìn nhận rằng kim có chiều dài và độ dày đúng đắn có thể là quan trọng để đảm bảo việc chủng ngừa đúng đắn trong khi tránh các biến chứng thứ cấp do sự lây nhiễm, viêm hoặc sự hư hại mô.

Các axit nucleic TiLV, các polypeptit hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được phân phối ở dạng chế phẩm xịt sol khí từ các túi có áp suất cao hoặc thiết bị khí dung, với việc sử dụng khí đẩy thích hợp, ví dụ, diclodiflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, carbon dioxit hoặc khí thích hợp khác. Trong trường hợp sol khí có áp suất cao, đơn vị liều lượng có thể được xác định bằng cách bố trí van để phân phối lượng được định lượng. Viên nang và hộp dễ nạp có thể được tạo dạng chế phẩm chứa hỗn hợp bột của hợp chất và chất nền bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Có thể cho dùng các axit nucleic TiLV, các polypeptit hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này theo lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học bất kỳ đủ để kích hoạt đáp ứng miễn dịch ở động vật. Trong các trường hợp nhất định, lượng

này có thể là từ khoảng 0,01 đến khoảng 1000 microgam axit nucleic của TiLV, polypeptit hoặc chế phẩm sinh miễn dịch cho mỗi con vật.

Có thể cho động vật hoặc con người dùng “lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học” của các chế phẩm theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học” được để chỉ lượng có khả năng kích thích, hoặc tăng cường sự kích thích, đáp ứng miễn dịch mong muốn ở động vật hoặc con người. Đáp ứng mong muốn có thể bao gồm, không kể những loại khác, gây đáp ứng miễn dịch do tế bào hoặc kháng thể làm trung gian, hoặc cả hai. Đáp ứng mong muốn cũng có thể là sự gây đáp ứng miễn dịch đủ để làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh gắn liền với TiLV và/hoặc đem lại tính miễn dịch bảo vệ ở động vật hoặc con người chống lại thử thách kế tiếp bằng TiLV. Lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học có thể là lượng mà kích thích “quá trình bảo vệ” thực tế chống lại bệnh gắn liền với TiLV, có nghĩa là sự phòng ngừa triệu chứng hoặc tình trạng bất kỳ trong số các triệu chứng hoặc tình trạng là kết quả của bệnh gắn liền với TiLV ở động vật hoặc con người. Lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học cũng có thể là lượng đủ để trì hoãn sự khởi phát của các triệu chứng và tình trạng gắn liền với sự lây nhiễm, làm giảm mức độ hoặc tỷ lệ lây nhiễm, làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh hoặc triệu chứng bất kỳ là kết quả của sự lây nhiễm, và làm giảm tải lượng virus của động vật hoặc con người bị lây nhiễm.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định “lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học” của các chế phẩm theo sáng chế là gì mà không cần thực hiện việc thử nghiệm quá mức bất kỳ. Lượng hữu hiệu có thể được xác định bằng phương tiện thông thường, bắt đầu với liều lượng thấp và sau đó, tăng liều lượng trong khi theo dõi các tác dụng miễn dịch học. Có thể cân nhắc nhiều yếu tố khác nhau khi xác định lượng tối ưu để cho dùng, bao gồm kích cỡ, tuổi, và tình trạng tổng quát của động vật, sự có mặt của các loại thuốc khác ở động vật, độc tính của TiLV cụ thể mà động vật chống lại nó đang được chủng ngừa, và các yếu tố tương tự. Liều lượng thực tế có thể được chọn sau khi cân nhắc các kết quả từ các nghiên cứu động vật khác nhau.

Có thể cho dùng lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch học của chế phẩm sinh miễn dịch theo một liều lượng đơn lẻ, theo các liều lượng được chia ra, hoặc bằng cách sử dụng chế độ “mũi ban đầu-nhắc lại”. Có thể cho dùng các chế phẩm bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đường ngoài đường tiêu hóa, trong

da, qua da, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong mũi, qua đường miệng, hoặc trong mắt, hoặc bằng dạng kết hợp của các đường. Cũng có thể cho dùng các chế phẩm bằng cách sử dụng thiết bị “súng” mà bắn hạt, như hạt vàng, mà các chế phẩm theo sáng chế đã được phủ trên đó, vào da của động vật. Người có hiểu biết trung bình sẽ có thể tạo dạng chế phẩm chế phẩm sinh miễn dịch theo đường được chọn.

Kích cỡ liều lượng của các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này có thể nằm trong khoảng là khoảng 0,1 đến 2,0ml tùy thuộc vào đường dùng, nhưng kích cỡ liều lượng không bị giới hạn ở khoảng này. Đối với TiLV được làm bất hoạt, các chế phẩm có thể chứa các mức TCID<sub>50</sub> thích hợp của virus trước khi làm bất hoạt. Hàm lượng kháng nguyên trong chế phẩm TiLV có thể có, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiệu giá là từ 10 đến 10.000 đơn vị/ml trong vai trò là lượng được cho dùng cho mỗi liều lượng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có khả năng xác định dễ dàng hàm lượng kháng nguyên thích hợp đối với các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này.

Đối với các chế phẩm sinh miễn dịch chứa TiLV sống được cải biến hoặc TiLV được làm suy yếu, liều lượng hữu hiệu về mặt trị liệu có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với các chế phẩm sinh miễn dịch chứa các kháng nguyên đơn vị con của TiLV, liều lượng hữu hiệu về mặt trị liệu có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong khi lượng và nồng độ của chất phụ trợ và chất phụ gia hữu ích trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình.

Các tế bào bao gồm TiLV và các cách sử dụng chúng

TiLV có thể được sử dụng để gây nhiễm tế bào. Các tế bào có thể được nuôi cấy trong môi trường hữu ích bất kỳ và mô hoặc tế bào cho phép bất kỳ, phần này có thể là, hoặc có thể được tạo ra từ tế bào cá, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào cá rô phi, tế bào CHSE-214 *Oncorhynchus tshawytscha*, tế bào BF-2 *Lepomis macrochirus*; tế bào BB *Ictalurus nebulosus*, tế bào EPC *Cyprinus carpio*, tế bào KF-1 *Cyprinus carpio*, tế bào RTG-2 *Salmo gairdneri*, tế bào FHM *Pimephales promelas*, và tế bào E-11 *Ophicephalus striatus*. Như được sử dụng trong bản mô tả này, tế bào hoặc mô có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào, mô, cơ quan, tế bào côn trùng, tế bào động vật

gặm nhấm, tế bào chim, tế bào động vật có vú, tế bào khối tế bào lai, tế bào sơ cấp, dòng tế bào liên tục, và/hoặc tế bào được xử lý bằng công nghệ về mặt gen riêng biệt. Các dòng tế bào thích hợp để nhân lên, tăng trưởng, hoặc chứa trình tự axit nucleic của TiLV hoặc để biểu hiện polypeptit được tạo ra bởi trình tự axit nucleic của TiLV bao gồm, tế bào cá rô phi, tế bào CHSE-214 *Oncorhynchus tshawytscha*, tế bào BF-2 *Lepomis macrochirus*; tế bào BB *Ictalurus nebulosus*, tế bào EPC *Cyprinus carpio*, tế bào KF-1 *Cyprinus carpio*, tế bào RTG-2 *Salmo gairdneri*, tế bào FHM *Pimephales promelas*, và tế bào E-11 *Ophicephalus striatus* cũng như tế bào không phải của cá, nhưng không bị giới hạn ở tế bào thận chó, tế bào BSC-1, tế bào LLC-MK, tế bào CV-1, tế bào CHO, tế bào COS, tế bào chuột, tế bào người, tế bào HeLa, tế bào 293, tế bào VERO, tế bào MDBK, tế bào MDCK, tế bào MDOK, tế bào CRFK, tế bào RAF, tế bào TCMK, tế bào LLC-PK, tế bào PK15, tế bào WI-38, tế bào MRC-5, tế bào T-FLY, tế bào BHK, tế bào SP2/0, NS0, PerC6 (tế bào võng mạc của người), tế bào phôi gà hoặc dẫn xuất, tế bào trứng có phôi, trứng gà có phôi hoặc các dẫn xuất của chúng.

Các dạng chế phẩm môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp cho việc nuôi cấy tế bào được gây nhiễm bằng virus TiLV được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Môi trường MEM của Eagle được Cải biến, môi trường thiết yếu tối thiểu MEM, Môi trường D-MEM của Eagle được Dulbecco Cải biến, môi trường D-MEM-F12, môi trường E của William, môi trường RPMI, môi trường nuôi cấy tế bào HyClone (HyClone, Logan, Utah); và môi trường biểu mô đáy không có huyết thanh (CellnTech), và các chất tương tự và dẫn xuất của chúng. Các môi trường này cũng có thể là môi trường nuôi cấy virus và tế bào chuyên biệt như VP-SFM, OptiPro.TM. SFM, môi trường AIM V.R, HyQ SFM4 MegaVir, EX-CELL Vero SFM, EPISERF, ProVero, môi trường 293 hoặc CHO bất kỳ và các chất tương tự và các dẫn xuất của chúng. Các môi trường nuôi cấy được mô tả trong bản mô tả này có thể được bổ sung bằng chất phụ gia bất kỳ đã biết từ giải pháp kỹ thuật hiện có mà có thể áp dụng được cho việc nuôi cấy tế bào và virus, như, ví dụ, huyết thanh động vật và các phần hoặc chất tương tự của chúng, axit amin, các yếu tố tăng trưởng, các hormon, dung dịch đệm, các yếu tố vi lượng, trypsin, natri pyruvat, các vitamin, L-glutamin và dung dịch đệm sinh học. Một môi trường là OptiPRO SFM được bổ sung L-glutamin và trypsin. Theo các phương án nhất định, các môi trường nuôi cấy tế bào có thể được bổ sung 0,1 đến 10 đơn vị trypsin. Theo cách

khác, các đương lượng được tạo ra từ thực vật của trypsin (ví dụ, Accutase) nằm trong khoảng từ 2-100 đơn vị cũng có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào. Các môi trường nuôi cấy tế bào có thể được sử dụng với sự thiếu vắng hoặc sự có mặt của các hợp phần được tạo ra từ động vật. Một ví dụ về việc bổ sung bằng hợp phần được tạo ra từ động vật là huyết thanh được chiếu xạ gamma nằm trong khoảng từ 0,5-10% nồng độ cuối.

Vector biểu hiện có thể được đưa vào tế bào để tạo ra các protein (ví dụ, SEQ ID NO: 12 và các đoạn và các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này) được mã hóa bởi các trình tự nucleotit theo sáng chế (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và các đoạn và các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này). Các tế bào có thể chứa vector biểu hiện thông qua việc đưa vector biểu hiện vào tế bào chủ thích hợp thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector biểu hiện có thể được đưa vào tế bào để tạo ra các protein được mã hóa bởi các trình tự nucleotit theo sáng chế (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 và các đoạn và các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này). Các tế bào có thể chứa vector biểu hiện thông qua việc đưa vector biểu hiện vào tế bào chủ thích hợp thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector biểu hiện nhân thực có thể được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào để tạo ra các protein (ví dụ, SEQ ID NO: 12 hoặc các protein được mã hóa bởi các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11) và các đoạn và các biến thể được mô tả trong bản mô tả này được mã hóa bởi các trình tự nucleotit của vector này.

Axit nucleic ngoại sinh (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, cADN nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc cADN bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn, hoặc các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này) có thể được đưa vào tế bào thông qua một loạt kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vectơ biểu hiện nhân thực có thể được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào để tạo ra các protein được mã hóa bởi các trình tự nucleotit (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, cADN nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc cADN bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn, hoặc các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này). Các tế bào động vật có vú có thể chứa vectơ biểu hiện thông qua việc đưa vectơ biểu hiện vào tế bào chủ thích hợp thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Axit nucleic ngoại sinh có thể được đưa vào tế bào thông qua một loạt kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như chuyển nhiễm liposom, vi tiêm, quá trình kết tủa canxi clorua hoặc canxi phosphat, quá trình chuyển nhiễm do DEAE-dextrin làm trung gian, hoặc biến nạp bằng xung điện. Các phương pháp khác được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào cũng có thể bao gồm quá trình kết tủa canxi phosphat, quá trình kết tủa canxi phosphat được cải biến, quá trình kết tủa polybren, dung hợp liposom, vi tiêm, và phân phối gen do thụ thể làm trung gian. Các vectơ biểu hiện có thể chứa các trình tự ghi mã, hoặc các phần của chúng, mã hóa các protein để biểu hiện và sản xuất. Các vectơ biểu hiện chứa các trình tự mã hóa các protein và polypeptit đã được tạo ra, cũng như các yếu tố kiểm soát quá trình dịch mã và phiên mã thích hợp, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ và thực hiện. Các phương pháp này bao gồm các kỹ thuật tổng hợp, các kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, và tái tổ hợp gen *in vivo* mà được mô tả trong tài liệu: Sambrook *et al.*, và Ausubel *et al.*

Các tế bào sẽ được gây nhiễm bằng TiLV hoặc các axit nucleic của nó (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, cADN nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc cADN bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn, hoặc các biến thể của chúng) có thể là tế bào sơ cấp và tế bào thứ cấp, tế bào này có thể thu được từ các mô khác nhau và bao gồm các loại tế bào mà có thể được duy trì và nhân lên trong môi trường nuôi cấy.

Các tế bào được duy trì trong môi trường nuôi cấy có thể được cấy chuyển bằng việc chuyển chúng từ môi trường nuôi cấy trước sang môi trường nuôi cấy có môi trường

tươi mới. Theo một phương án, tế bào biểu mô đã được kích thích được duy trì một cách vững chắc trong môi trường nuôi cấy tế bào trong ít nhất 3 lần cấy chuyển, ít nhất 4 lần cấy chuyển, ít nhất 5 lần cấy chuyển, ít nhất 6 lần cấy chuyển, ít nhất 7 lần cấy chuyển, ít nhất 8 lần cấy chuyển, ít nhất 9 lần cấy chuyển, ít nhất 10 lần cấy chuyển, ít nhất 11 lần cấy chuyển, ít nhất 12 lần cấy chuyển, ít nhất 13 lần cấy chuyển, ít nhất 14 lần cấy chuyển, ít nhất 15 lần cấy chuyển, ít nhất 20 lần cấy chuyển, ít nhất 25 lần cấy chuyển, hoặc ít nhất 30 lần cấy chuyển.

Theo một phương án, tế bào mà đã được gây nhiễm bằng TiLV hoặc chứa các axit nucleic của nó (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, cADN nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc cADN bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn, hoặc các biến thể của chúng được mô tả trong bản mô tả này) có thể biểu hiện một loạt gen đánh dấu có tác dụng phân biệt chúng với tế bào không bị lây nhiễm. Quá trình biểu hiện các gen đánh dấu có thể được đánh giá bằng một loạt phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sự có mặt của gen đánh dấu có thể được xác định ở cấp độ ADN, ARN hoặc polypeptit.

Theo một phương án, phương pháp này có thể bao gồm việc phát hiện sự có mặt của quá trình biểu hiện polypeptit gen đánh dấu. Quá trình biểu hiện polypeptit bao gồm sự có mặt của trình tự polypeptit gen đánh dấu, hoặc sự có mặt của số lượng tăng cao của polypeptit gen đánh dấu so với tế bào không phải biểu mô. Các hiện tượng này có thể được phát hiện bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm bằng cách giải trình tự và/hoặc liên kết vào các phối tử cụ thể (như các kháng thể). Ví dụ, quá trình biểu hiện polypeptit có thể được đánh giá bằng các phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhuộm miễn dịch, phép phân tích FACS, hoặc phương pháp thấm tách Western. Các phương pháp này là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể bao gồm việc phát hiện sự có mặt của các axit nucleic (ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, cADN nêu trong SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc cADN bổ sung với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, các đoạn, hoặc các biến thể của chúng). Quá trình biểu hiện ARN bao gồm sự có mặt của trình tự ARN, sự có mặt của hiện tượng xử lý hoặc phân cắt ARN, hoặc sự có

mặt của số lượng của ARN. Các hiện tượng này có thể được phát hiện bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm bằng cách giải trình tự tất cả hoặc một phần của ARN gen đánh dấu, hoặc bằng quá trình lai chọn lọc hoặc quá trình khuếch đại chọn lọc tất cả hoặc một phần của ARN. Theo một phương án, quá trình lai *in situ* có thể được sử dụng để phát hiện các axit nucleic của TiLV.

Các tế bào đã được biến nạp thu được có thể được sử dụng cho nghiên cứu cơ bản cũng như kiểm tra về tác nhân trị liệu và tác nhân phòng bệnh. Cụ thể là, đối với mục đích sau, tế bào chủ có thể được ủ và/hoặc được tiếp xúc với tác nhân trị liệu hoặc tác nhân phòng bệnh tiềm tàng. Mức biểu hiện thu được của cấu trúc gen có thể được phát hiện và được đem so sánh với mức biểu hiện của cấu trúc gen ở tế bào trước khi tiếp xúc với tác nhân này.

Các cấu trúc gen này cũng như tế bào chủ được biến nạp bằng các cấu trúc gen này cũng có thể là cơ sở cho các động vật chuyển gen để kiểm tra cả trong vai trò là dụng cụ nghiên cứu và dùng cho tác nhân trị liệu và tác nhân phòng bệnh. Các động vật như vậy thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cá và chuột trụi lông. Các kiểu hình có thể được đặt mối tương quan với các gen và được xem xét để xác định tác dụng của các gen đối với các động vật cũng như sự thay đổi về kiểu hình sau khi cho dùng hoặc tiếp xúc với tác nhân trị liệu tiềm tàng.

Một phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV bao gồm việc ủ hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với nucleotit bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này, và xác định xem liệu tác nhân thử nghiệm có liên kết vào nucleotit hay không, trong đó nếu tác nhân thử nghiệm liên kết vào nucleotit, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là tác nhân trị liệu và/hoặc tác nhân phòng ngừa đối với TiLV.

Một phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV bao gồm việc ủ hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với nucleotit bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến



thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này, và phát hiện mức biểu hiện của nucleotit trước khi và sau khi tiếp xúc hoặc ủ với tác nhân thử nghiệm, trong đó nếu mức biểu hiện của nucleotit được làm giảm sau khi tiếp xúc hoặc ủ với tác nhân thử nghiệm, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là tác nhân trị liệu và/hoặc tác nhân phòng ngừa đối với TiLV.

Một phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV bao gồm việc ủ hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với cấu trúc gen bao gồm nucleotit bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này, và phát hiện mức biểu hiện của nucleotit ở cấu trúc gen trước khi và sau khi tiếp xúc hoặc ủ tác nhân thử nghiệm với cấu trúc gen, trong đó nếu mức biểu hiện của gen này giảm hoặc được làm giảm sau khi tiếp xúc với hợp chất hoặc tác nhân thử nghiệm, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là tác nhân trị liệu và/hoặc tác nhân phòng ngừa đối với TiLV.

Một phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV bao gồm việc biến nạp tế bào chủ bằng cấu trúc gen bao gồm nucleotit bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng như được mô tả trong bản mô tả này, phát hiện mức biểu hiện của nucleotit ở tế bào chủ, cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với tế bào chủ, và phát hiện mức biểu hiện của nucleotit ở tế bào chủ sau khi tiếp xúc với hợp chất hoặc tác nhân thử nghiệm, trong đó nếu mức biểu hiện của nucleotit giảm hoặc được làm giảm sau khi tiếp xúc với hợp chất hoặc tác nhân thử nghiệm, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là tác nhân trị liệu và/hoặc tác nhân phòng ngừa đối với TiLV.

Mức biểu hiện của nucleotit hoặc gen có thể được xác định bằng cách sử dụng kiểu hình có thể đo được, hoặc loại là nguyên thể đối với gen này hoặc loại mà được liên kết theo cách nhân tạo, như gen chỉ thị.

Một phương án khác nữa là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV, bao gồm việc ủ

hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc một đoạn hoặc biến thể của chúng, và phát hiện sự có mặt của phức hợp giữa tác nhân thử nghiệm và polypeptit, trong đó nếu phức hợp giữa tác nhân thử nghiệm và polypeptit được phát hiện, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là loại phòng ngừa và/hoặc điều trị đối với TiLV.

Một phương án khác nữa là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV, bao gồm việc ủ hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc đoạn hoặc biến thể của chúng và một phối tử đã biết của polypeptit, và phát hiện sự có mặt của phức hợp giữa tác nhân thử nghiệm và phối tử, trong đó nếu phức hợp giữa tác nhân thử nghiệm và phối tử được phát hiện, thì tác nhân thử nghiệm này được nhận diện là loại phòng ngừa và/hoặc điều trị đối với TiLV.

Một phương án khác của sáng chế là phương pháp và/hoặc thử nghiệm để sàng lọc và/hoặc nhận diện tác nhân thử nghiệm để phòng ngừa và/hoặc điều trị TiLV, bao gồm việc ủ hoặc cho tác nhân thử nghiệm tiếp xúc với polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 11, hoặc đoạn hoặc biến thể của chúng và một kháng thể đã biết của polypeptit, và phát hiện sự có mặt và số lượng của kháng thể không được liên kết, trong đó sự có mặt của kháng thể không được liên kết chỉ ra rằng tác nhân thử nghiệm đang liên kết vào polypeptit, và tác nhân thử nghiệm được nhận diện là loại phòng ngừa và/hoặc điều trị đối với TiLV.

Phương pháp sàng lọc thông lượng cao cũng có thể được sử dụng để sàng lọc các tác nhân thử nghiệm. Các phân tử hoặc các peptit nhỏ có thể được tổng hợp và được liên kết vào bề mặt và được tiếp xúc với các polypeptit, và được rửa. Peptit đã được liên kết được hiển thị và phát hiện bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế còn đề xuất các polypeptit sẽ được sử dụng cho việc thiết kế thuốc hợp lý trong đó các chất đồng đẳng cấu trúc của các polypeptit có hoạt tính về mặt sinh học có thể được thiết kế. Các chất đồng đẳng như vậy thường cản trở polypeptit *in vivo*, như bằng sự liên kết không hữu ích vào đích. Trong phương pháp này, cấu trúc không gian ba chiều của protein được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật

này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tinh thể học tia x, và lập mô hình bằng máy vi tính. Cũng có thể thu được thông tin bằng cách sử dụng cấu trúc của các protein tương đồng hoặc các kháng thể đặc hiệu với đích.

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật này, có thể thiết kế các tác nhân mà đóng vai trò là chất ức chế hoặc chất đối kháng của các polypeptit, hoặc đóng vai trò là môi, liên kết vào phân tử đích theo cách không hữu ích và phong bế quá trình liên kết polypeptit có hoạt tính.

Thuật ngữ “tác nhân” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là chất mà tạo ra hoặc có khả năng tạo ra tác dụng và thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hóa chất, dược phẩm, chế phẩm sinh học, phân tử hữu cơ nhỏ, kháng thể, axit nucleic, peptit, và protein.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu bằng việc đề cập đến các ví dụ không giới hạn dưới đây, các ví dụ này được trình bày để minh họa đầy đủ hơn về các phương án được ưu tiên của sáng chế. Hoàn toàn không nên hiểu chúng là làm giới hạn phạm vi rộng của sáng chế.

#### Ví dụ 1- Các chất liệu và phương pháp được sử dụng cho các ví dụ 2-9

Môi trường nuôi cấy tế bào: Tám dòng tế bào cá đã được thiết lập được sử dụng trong nghiên cứu này: (1) CHSE-214 (ATCC CRL 1681) từ cá hồi Chinook *Oncorhynchus tshawytscha*; (2) BF-2 (ATCC CCL 91), được tạo ra từ cá mang xanh *Lepomis micropterus*; (3) BB (ATCC CCL 59), từ cá trê đầu bò nâu Mỹ *Ictalurus nebulosus*; (4) và (5) EPC (ATCC CRL 2872 và KF-1), từ cá chép *C. Carpio*; (6) RTG-2 (ATCC CCL 55), từ cá hồi cầu vồng *Salmo gairdneri*; (7) FHM (ATCC CCL 42), từ cá tuế đầu bẹt *Pimephales promelas*; và (8) E-11, từ cá lóc *Ophicephalus striatus* (được cung ứng dồi dào bởi M. Ucko, Tổ chức Israel Oceanographic and Limnological Research). Ngoài ra, môi trường nuôi cấy của tế bào não cá rô phi sơ cấp được tạo ra, được phát triển như được mô tả trên đây trong tài liệu: Hasegawa *et al.* 1997 và Hedrick *et al.* 2000. Nói một cách vắn gọn, cá rô phi sông Nile thương mại (*O. niloticus*) (50 gam) được làm chết êm dịu bằng cách gây mê quá liều (600mg/lít tricain metansulfonat [MS-222]; Finquel, Mỹ), và não được lấy ra một cách vô trùng. Não đã được thái nhỏ

được làm đồng đều bằng tay và được cho đi qua thiết bị xay mắt lưới 100 $\mu$ . Sau đó, tế bào được rửa và được uơm trong bình phản ứng được bít kín 12,5ml (Becton-Dickinson, San Francisco, CA, Mỹ) ở 25°C. Môi trường nuôi cấy ban đầu đã chứa 80% môi trường Leibovitz (L-15) (Gibco, Mỹ), 10% huyết thanh bê bào thai được làm bất hoạt (FCS) (Gibco), và 10% môi trường huyết thanh cá rô phi được làm bất hoạt, được bổ sung L-glutamin (300mg/lít), HEPES (1%), penixilin (100 $\mu$ g/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml), và amphotericin B (0,25 $\mu$ g/ml).

Trong suốt 21 ngày ủ đầu tiên, 50% môi trường được thay đổi mỗi tuần. Sau đó, các lớp đơn được trypsin hóa và được chuyển vào bình phản ứng 25ml mới (Cellstar; Greiner Bio-One, Đức) với hỗn hợp 1:1 của môi trường có điều kiện nuôi cấy trước (từ các môi trường nuôi cấy cũ) và môi trường tươi mới. Các môi trường nuôi cấy của tế bào sơ cấp được cấy chuyển cách tuần. Sau 35 lần cấy chuyển, huyết thanh cá rô phi và môi trường có điều kiện nuôi cấy trước được lược bỏ, và tế bào được chia tách (ở tỷ lệ là 1:2) cứ mỗi 2 đến 3 tuần trong môi trường thông thường (L-15 có FCS 5% được làm bất hoạt).

Các virus và môi trường nuôi cấy virus: Tổng số gồm 25 quần thể phân lập virus Tilapia Lake (TiLV) được thu gom từ các đợt bùng phát bị nghi mà đã xảy ra từ tháng 5 năm 2011 đến tháng 6 năm 2013. Các lần phân lập thu được từ tất cả các vùng của Israel nơi mà cá được nuôi theo cách thương mại: bờ biển (2 lần phân lập); Thung lũng Jordan (bao gồm Thung lũng Bet-Shean và Thung lũng Yizrael; 9 lần phân lập); và Galilee Thượng và Galilee Hạ (3 lần phân lập). Ngoài ra, 11 lần phân lập thu được từ các loài khác nhau của tông cá rô phi hoang dã từ biển hồ Galilee. Sự bùng phát của cá nuôi được định nghĩa là sự tăng lên bất thành linh và không giải thích được về mức tử vong (từ 2% trở lên hàng ngày) trong ít nhất ba ngày liên tiếp. Nếu hai khu vực bị ảnh hưởng một cách đồng thời ở cùng một trang trại, thì những khu vực này được phân loại là một sự bùng phát đơn lẻ. Do đó, mỗi quần thể phân lập thể hiện một sự bùng phát lâm sàng khác biệt. Các virus từ cá hoang dã thể hiện các tổn thương mắt được phân lập từ cá được đánh bắt theo cách thương mại ở biển hồ Galilee; mỗi quần thể phân lập thể hiện một lần đánh bắt khác. Cá cân nặng 20 đến 200 gam hoặc 40 đến 350 gam (lần lượt là cá hoang dã và cá nuôi) được thu gom trong suốt các mùa nóng (tháng năm đến tháng mười; nhiệt độ nước, từ 22 đến 32°C). Để giảm thiểu nguy cơ gây bẩn, não và nội tạng (thận, gan, lá lách, và

tim) của cá bị nghi được lấy ra một cách vô trùng, được tập hợp lại, và được làm đồng đều bằng tay bằng chín thể tích của dung dịch muối được làm cân bằng của Hanks (Hanks' balanced salt solution-HBSS), được ly tâm ở 3.000 x g trong 10 phút, và các dịch nổi ở trên được lọc qua bộ lọc 0,22 $\mu$  (Sarstedt, Đức). Các chất lọc được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng. Đối với việc gây nhiễm, các lớp đơn (mức độ nhập dòng khoảng 90%) được rửa hai lần bằng HBSS và được ủ với 500 $\mu$ l chất lọc virus này ở 25°C trong 1 giờ, sau đó, tế bào được rửa bằng HBSS, được bổ sung môi trường L-15 (2% FCS), và được ủ ở 25°C. Các môi trường nuôi cấy được quan sát hằng ngày trong 21 ngày về tác dụng gây bệnh tế bào (CPE). Trong các thử nghiệm trong đó bệnh tông cá rô phi được tái lập bằng phương pháp tiêm virus, virus có tên là TiLVx2 cũng được sử dụng, virus này được tinh chế bằng hai vòng thử nghiệm pha loãng tới hạn liên tiếp. Điều này được thực hiện bằng các môi trường nuôi cấy E-11, được gây nhiễm bằng các dung dịch pha loãng theo dãy của TiLV (quần thể phân lập 4/2011; thu được từ não của cá thánh Phê rô mắc bệnh mà được thu gom từ hồ Kinneret vào tháng 6 năm 2011).

Chuẩn độ virus: Dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy chứa virus ban đầu (quần thể phân lập 4/2011) được nuôi cấy ở tế bào E-11 và được pha loãng theo dãy theo các lượng gia 10 lần bằng HBSS và 50 $\mu$ l từ mỗi dung dịch pha loãng được chủng ngừa lên trên các lớp đơn E-11 trong đĩa 96 lỗ. Bốn lỗ được sử dụng cho mỗi mẫu được pha loãng. Các đĩa được ủ ở 25°C và được quan sát hằng ngày về CPE. Sau 7 ngày, liều gây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô (TCID<sub>50</sub>) (ml<sup>-1</sup>) được tính toán bằng phương pháp của Reed và Muench 1938.

Phân tích soi hiển vi điện tử: Đối với các lần kiểm tra TiLV bằng phương pháp soi hiển vi điện tử truyền qua, các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm E-11 được nạo từ bình phản ứng, được ly tâm (2.000 vòng/phút trong 7 phút), được cố định bằng 1,5% glutaraldehyt trong natri cacodylat 0,1M (độ pH 7,2) trong 2 giờ, và sau đó, được súc rửa năm lần trong dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,2). Các viên kết, gồm tế bào E-11 bị lây nhiễm, được cố định sau trong OsO<sub>4</sub> 1% trong dung dịch đệm phosphat và được khử nước bằng các nồng độ etanol tăng. Sau đó, các viên kết được rửa hai lần bằng propylen oxit 100% và được xử lý bằng propylen oxit-Epon (3:1) trong 30 phút, sau đó là propylen oxit-Epon (1:1) trong 15 phút. Cuối cùng, các viên kết được bao lấy trong Epon 100% và để qua đêm. Các lát mỏng (70 đến 90nm) được đặt trên vi đồng được phủ Formvar và

được nhuộm bằng uranyl axetat, sau đó là chì xitrat, theo phương pháp Reynolds (Reynolds 1963). Tất cả các ảnh hiển vi được chụp bằng kính hiển vi điện tử JEOL 1200-EX hoạt động ở 60 hoặc 80 kV (Bộ phận Soi Kính Hiển vi Điện tử [Electron Microscopy-EM], Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Bar-Ilan, Israel). Phép phân tích EM về các viên kết virion được nhuộm âm tính được thực hiện ở Bộ phận EM, Đại học Tel Aviv, một cách chính xác như được mô tả trước trong tài liệu: Oberpichler *et al.* 2008, bằng kính hiển vi điện tử truyền qua A JEM 1200-EX (JEOL-USA, Peabody, MA, Mỹ). Các virion dùng cho phép phân tích này được tạo viên kết bằng phương pháp ly tâm siêu tốc thông qua các đệm sucroza 25%.

Quá trình tinh chế virus từ các dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp cắt phân đoạn gradien sucroza: Các tế bào E-11 đã được nuôi cấy được gây nhiễm bằng TiLV (quần thể phân lập 4/2011), và dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy được dọn sạch từ mảnh vỡ tế bào bằng phương pháp ly tâm (10 phút ở mức 3.000 vòng/phút). Dịch nổi ở trên được tạo lớp lên trên 2ml miếng đệm sucroza-Tris-EDTA (TE) 30% (trọng lượng/thể tích) và được ly tâm trong 2 giờ trong khối quay T865 ở mức 65.000 vòng/phút (Sorvall Discovery 90SE). Viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm TE và được tạo lớp lên trên gradien bước sucroza (Bacharach *et al.* 2000; Laham và Bacharach 2007; Melamed *et al.* 2004). Gradien gồm các lớp 3ml có nồng độ sucroza là 70, 60, 50, 40, 30, 20, và 10% (trọng lượng/thể tích) trong TE, từ đáy đến đỉnh. Ly tâm siêu tốc được thực hiện trong khối quay TST41.14 trong 2 giờ ở mức 40.000 vòng/phút (Sorvall Discovery 90SE). Các phần một mililit được lấy từ đỉnh của gradien, và các virion được tạo viên kết từ mỗi phần bằng phương pháp ly tâm siêu tốc (trong 2 giờ ở mức 65.000 vòng/phút; khối quay T865; Sorvall Discovery 90SE) và được tái tạo huyền phù trong 1ml của dung dịch đệm TE. Các phần phân ước 100µl từ mỗi mẫu được ủ với tế bào E-11 nguyên sơ để theo dõi về CPE. Việc ủ các môi trường nuôi cấy bằng các đối chứng âm tính, gồm các phần phân ước từ các phần của gradien sucroza đồng nhất, nhưng không bổ sung các dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy, đã không đem lại CPE nào.

Phân lập các axit nucleic từ các virion được tinh chế và tổng hợp cADN: Các axit nucleic được chiết từ các viên kết virion được tinh chế bằng cách sử dụng peqGOLD Trifast dùng cho ARN (Peqlab, Đức) hoặc kit điều chế mẫu PCR có Độ Tinh Khiết Cao

dùng cho ADN (Roche, Đức). Quá trình phiên mã ngược được thực hiện bằng kit Verso cDNA (Thermo, Lithuania), theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Để nhận diện các trình tự đặc hiệu với TiLV, các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm bằng TiLV (quần thể phân lập 4/2011) được dọn sạch từ mảnh vỡ tế bào bằng phương pháp ly tâm (trong 10 phút ở mức 3.000 x g), và các dịch nổi ở trên đã được tinh chế được đưa vào quá trình tinh chế bằng phương pháp ly tâm siêu tốc (trong 2 giờ trong khối quay T865 ở mức 65.000 vòng/phút [Sorvall Discovery 90SE]) thông qua đệm sucroza 30%. Viên kết được tái tạo huyền phù trong TE, và các virion được tinh chế thêm bằng các đệm sucroza là từ 40 đến 70% (trọng lượng/thể tích). Sau khi ly tâm siêu tốc (khối quay TST41.14 trong 2 giờ ở mức 40.000 vòng/phút; Sorvall Discovery 90SE), phần sucroza 40% được thu gom, và các virion được tạo viên kết bằng quá trình ly tâm siêu tốc bổ sung (khối quay TST41.1 trong 2 giờ ở mức 40.000 vòng/phút; Sorvall Discovery 90SE). ARN được chiết từ các viên kết bằng guanidin thioxyanat (peqGOLD Trifast; Peqlab). cADN được tạo ra bằng quá trình phiên mã ngược và tạo môi ngẫu nhiên, bằng cách sử dụng ARN đã được tinh chế làm khuôn mẫu. Các đoạn của cADN này được phân lập bằng phương pháp tạo dòng vô tính shotgun (Nehls và Boehm 1995).

Phương pháp tạo dòng vô tính shotgun bằng quá trình tạo môi ngẫu nhiên: Phương pháp tạo dòng vô tính shotgun được thực hiện như được mô tả bởi Nehls và Boehm. cADN đã được tinh chế (xấp xỉ 10ng) được tạo môi kép bằng đoạn môi MluI(N)6 (GGAAGTCAATGCACGCGTNNNNNN) (SEQ ID NO: 13) bằng cách sử dụng hỗn hợp chính ReddyMix PCR (Thermo, Lithuania). Các sản phẩm đã được tạo môi được khuếch đại bằng PCR có đoạn môi MluI (GGAAGTCAATGCACGCGT) (SEQ ID NO: 14) và được tạo dòng vô tính vào vector pJET1.2/blunt (CloneJET; Fermentas/Thermo, Lithuania), phần này được biến nạp vào tế bào HIT-DH5 $\alpha$  chủng *Escherichia coli* (Real Biotech, Đài Loan). Các thể biến nạp kháng ampicilin, được nuôi cấy ở 37°C trên các đĩa agar LB chứa 100 $\mu$ g/ml ampicilin, được lấy và nuôi cấy qua đêm trong 5ml LB được bổ sung 100 $\mu$ g/ml ampicilin. ADN plasmit được phân lập bằng cách sử dụng minikit plasmit HiYield (RBC, Đài Loan). Các đoạn chèn được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi được tạo ra từ pJET1.2, được tách bằng quá trình điện di trong gel 1,0%, được đặt trong dung dịch đệm 1X Tris-axetat-EDTA (TAE) ở mức 80 V trong 1,5 giờ, được nhuộm bằng ethidi bromua, được cắt bỏ, và gel được tinh chế bằng cách sử dụng

phương pháp chiết gel GeneJET và kit micro dọn sạch ADN (Thermo, Lithuania). Các đoạn đơn lẻ được giải trình tự bằng Hy Laboratories (Israel) bằng cách sử dụng ABI 3730. Các trình tự được phân tích về tính tương đồng với các trình tự nucleotit trong cơ sở dữ liệu GenBank bằng cách sử dụng Basic Local Alignment Search Tool dùng cho nucleotit (BLASTn) và phần mềm Vector NTI 6 (InforMax, Inc.). Các lần tìm kiếm thêm về các cơ sở dữ liệu protein được thực hiện bằng BLASTx. Các đoạn môi bên trong từ mỗi dòng vô tính đã được giải trình tự được kiểm tra về quá trình khuếch đại PCR đối với hệ gen TiLV. Cụ thể là, các đoạn môi được tạo ra từ dòng vô tính 7450 đã khuếch đại trình tự cùng gốc từ các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm TiLV, trong quá trình phiên mã ngược-PCR (RT-PCR).

Khuếch đại nhanh các đầu mút cADN (Rapid amplification of cDNA ends-RACE): Để kéo dài trình tự của dòng vô tính 7450 thu được bằng phương pháp tạo dòng vô tính shotgun, các phản ứng khuếch đại nhanh các đầu mút cADN (RACE) 3' và 5' được thực hiện như được mô tả trên đây (Scotto-Lavino et al. 2006a; Scott-Lavino et al. 2006b), bằng cách sử dụng tổng số ARN mà được chiết từ tế bào E11 được gây nhiễm TiLV bằng chất phản ứng EZ-RNA (Biological Industries). Nói một cách vắn gọn, đối với RACE 3', cADN được tạo ra bằng cách sử dụng đoạn môi Q<sub>T</sub>

(CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT TTTVN) (SEQ ID NO: 15) và hệ thống tổng hợp sợi thứ nhất SuperScript III dùng cho RT-PCR (số theo danh mục 18080-051; Invitrogen), theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. cADN được khuếch đại bằng đoạn môi dòng vô tính 7450/150R (TATCACGTGCGTACTCGTTTCAGT) (SEQ ID NO: 16) mà được tạo ra từ trình tự bên trong của đoạn shotgun, và bằng đoạn môi Q<sub>0</sub> (CCAGTGAGCAGAGTGACG, (SEQ ID NO: 17) được tạo ra từ đoạn môi Q<sub>T</sub>), bằng cách sử dụng enzym Ex-Taq (số theo danh mục RR001A; TaKaRa). Các sản phẩm PCR thu được được pha loãng 1:20 và được đưa vào quá trình PCR thứ hai có các đoạn môi được lồng Q<sub>I</sub> (GAGGACTCGAGCTCAAGC (SEQ ID NO: 18), được tạo ra từ đoạn môi Q<sub>T</sub>) và E11-inf-R (AAGTTCTCTTGCCTCTTGG (SEQ ID NO: 19), được tạo ra từ trình tự của đoạn shotgun). Đối với RACE 5', cADN được tạo ra như trên đây nhưng với đoạn môi dòng vô tính 7450/150F (CACCCAGACTTGCGGACATA) (SEQ ID NO: 20). Các đuôi poly(A) được bổ sung vào cADN bằng cách sử dụng transferaza đầu tận cùng (số theo



danh mục 3333566; Roche), theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. cADN được tạo đuôi được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn môi E-11-inf-F (TCCAAGGAAACAGCTGAGC (SEQ ID NO: 21), được tạo ra từ trình tự của đoạn shotgun), cùng với hỗn hợp của đoạn môi Q0 và đoạn môi QT. Các sản phẩm PCR thu được được pha loãng 1:20 và được đưa vào quá trình PCR lồng thứ hai bằng cách sử dụng đoạn môi E11-inf-F-in (GAGGCAATATGGATTCTTCG) (SEQ ID NO: 22) và đoạn môi QI.

RT-PCR: Các mẫu từ não, tim, tiền thận, lá lách, và gan được lấy từ các ca lâm sàng của các đợt bùng phát TiLV bị nghi, được tập hợp lại, và được làm đông lạnh một cách trực tiếp ở -80°C. Tổng số ARN được tinh chế bằng cách sử dụng peqGOLD Trifast (PepLab, Đức), theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó là quá trình phiên mã ngược và khuếch đại (Kit Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix; Thermo, Lithuania). Các đoạn môi ngẫu nhiên của kit này được thể bằng đoạn môi đặc hiệu bên ngoài ME1 (GTTGGGCACAAGGCATCCTA) (SEQ ID NO: 23) và dòng vô tính 7450/150R (TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT) (SEQ ID NO: 16). Quá trình tạo vòng được thực hiện ở 50°C trong 15 phút (quá trình phiên mã ngược), 95°C trong 2 phút (quá trình làm bất hoạt enzym), và 35 chu kỳ ở 95°C trong 30 giây, 56°C trong 60 giây, và 72°C trong 60 giây; phản ứng được chấm dứt bằng 72°C trong 7 phút. Các sản phẩm PCR được phân giải trong gel agarosa 1% trong dung dịch đệm 0,5X TAE (Tris-axetat 40mM và EDTA 1mM).

Các thử nghiệm tính nhạy cảm nucleaza: Dịch nổi ở trên (9ml) của môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm TiLV được thu gom, và các virion được tinh chế và được tạo viên kết thông qua đệm sucroza 25% (trọng lượng/thể tích), bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm siêu tốc (107.000 X g ở 4°C trong 2 giờ). Dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy E-11 không được gây nhiễm được sử dụng làm đối chứng. Để phân hủy các axit nucleic tự do, các viên kết được tái tạo huyền phù trong 300µl của dung dịch đệm 1X DNaza (Tris-HCl 10mM [độ pH 7,5], MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, và CaCl<sub>2</sub> 0,5mM) và được bổ sung 33µg RNazaA (Sigma R4642) và 1U DNaza (Baseline-ZERO DNase). Các mẫu được ủ trong 40 phút ở mức nhiệt độ trong phòng, sau đó mỗi hỗn hợp phản ứng được pha loãng trong 9ml môi trường Leibovitz (L-15), được bổ sung FCS 5%, và các virion được tạo viên kết như được mô tả trên đây. Để giải phóng các axit nucleic được bảo vệ

khỏi nucleaza từ các virion và để phân hủy phần dư thừa có thể có của RNaza A và DNaza I, các viên kết được tái tạo huyền phù trong 150µl dung dịch đệm proteinaza K (Tris-HCl 50mM [độ pH 7,5], NaCl 100mM, EDTA 10mM, SDS 1%), được bổ sung 100µg/ml proteinaza K (Roche), và các protein được phân hủy trong 30 phút ở 37°C. Các axit nucleic được chiết bằng rượu phenol-clorofom-isoamyl (CIP) và được kết tủa bằng etanol, natri axetat 0,3M (độ pH 5,2), và glycogen trong vai trò là chất mang. Các axit nucleic được tái tạo huyền phù trong 20µl dung dịch đệm (Tris-HCl 10mM [độ pH 8,3], MgCl<sub>2</sub> 10mM, dithiothreitol 1mM [DTT], NaCl 60mM), và 3µl được bổ sung vào 100µl dung dịch đệm RNaza I (NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM [độ pH 7,9], MgCl<sub>2</sub> 10mM, DTT 1mM) có hoặc không có 50 đơn vị RNaza I (số theo danh mục M0243S; NEB). Việc phân hủy được thực hiện trong 5 phút ở 37°C, và các axit nucleic được chiết bằng CIP và được kết tủa như được mô tả trên đây. Các axit nucleic được tái tạo huyền phù trong 20µl hỗn hợp phản ứng phiên mã ngược; phản ứng không có transcriptaza ngược cũng được lắp ráp để đảm bảo sự thiếu vắng của ADN được bảo vệ. cADN thu được được khuếch đại bằng các đoạn mồi đặc hiệu với TiLV (Nested ext-1 [TATGCAGTACTTTCCCTGCC] (SEQ ID NO: 24) và Nested ext-2 [TTGCTCTGAGCAAGAGTACC] (SEQ ID NO: 25)) hoặc bằng các đoạn mồi đặc hiệu với retrovirus cá lóc (SnRV) (Snakehead gag-pol fw [CAGATCACTGATCGATGC] (SEQ ID NO: 26) và Snakehead gag-pol rev [GTCTGAAAGGTAAGGTGG] (SEQ ID NO: 27)). Các sản phẩm được khuếch đại (lần lượt 491 và 284 bp đối với TiLV và SnRV) được tách bằng quá trình điện di trong gel agarosa 1%.

Các thử nghiệm tính nhạy cảm clorofom và ete: Các thử nghiệm tính nhạy cảm TiLV đối với ete và clorofom được thực hiện như được mô tả trên đây (Crandell *et al.* 1975; Hutoran *et al.* 2005).

Tái lập thử nghiệm về bệnh và các vấn đề đạo đức: Các loài thuộc tông cá rô phi được sử dụng trong nghiên cứu này, *O. niloticus* (chúng Chitralada), được nuôi cấy ở cơ sở không có mầm bệnh cụ thể (specific-pathogen-free-SPF) (môi trường không có mầm bệnh được xử lý bằng UV) ở nhiệt độ không đổi là 28°C. Cá được cho ăn chế độ hằng ngày là 2% (trọng lượng/trọng lượng); các thông số nước (O<sub>2</sub> > 5 phần triệu, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 1 phần triệu, NaCl < 1 phần ngàn) được giữ không đổi. Tất cả các lây nhiễm được kích thích bằng thử nghiệm được thực hiện bằng quần thể phân lập thực địa của TiLV (quần

thể phân lập 4/2011, lần cấy chuyển 2), phần này được chia phân ước và được giữ đông lạnh ở  $-80^{\circ}\text{C}$ . Trước khi sử dụng, virus này được rã đông và được nuôi cấy một lần nữa (lần cấy chuyển 3). Đối với việc tái lập nhân tạo về bệnh,  $2,6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> được tiêm trong màng bụng (i.p.) (nhóm 1) vào mỗi con cá (30 đến 35 gam). Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ba lần như nhau với các nhóm gồm 30 con cá. Để phòng ngừa sự lây nhiễm từ nước, mỗi nhóm cá được giữ trong bể nuôi 100 lít tách biệt. Trong suốt các thử nghiệm sống chung (nhóm 2), các nhóm gồm 30 con cá được giữ trong các bể nuôi 200 lít mà được chia thành ba ngăn bằng các vỉ có thể thấm nước, vỉ này cho phép có sự lưu thông của nước (nhưng không phải cá) khắp bể nuôi; nhóm đối chứng được giữ ở phần giữa. Cá sống sót lần gây nhiễm i.p. sơ cấp được tập hợp lại và 3 tuần sau được chia thành hai nhóm (mỗi nhóm có 15 con cá) và được gây nhiễm một lần nữa bằng phương pháp tiêm i.p. Các nhóm đối chứng được tiêm bằng các môi trường nuôi cấy E-11 không được gây nhiễm (nguyên sơ).

Khi các thử nghiệm *in vivo/ex vivo* được thực hiện, não của cá được tiêm TiLV riêng biệt được thu gom (5 đến 7 ngày sau khi tiêm) và được thái nhỏ như trên đây. Các dịch đồng chất (500 $\mu$ l) được ủ với các môi trường nuôi cấy E-11 nhập dòng. Sau sự xuất hiện của CPE, các dịch nổi ở trên được thu gom và được tiêm (200 $\mu$ l) i.p. vào cá nguyên sơ.

Tình trạng sức khỏe của cá được theo dõi một cách cẩn thận xuyên suốt khoảng thời gian nuôi và khoảng thời gian thử nghiệm; các dấu hiệu bên ngoài và tỷ lệ tử vong được theo dõi hai lần hằng ngày trong tổng số là 21 ngày. Các quy định về sự an toàn, thao tác thử nghiệm và chăm sóc động vật tuân theo các chỉ dẫn được thiết lập bởi Ủy ban Chăm sóc Động vật Phòng Thí nghiệm tại Cơ quan Dịch vụ Thú y Israel và được thực hiện theo giấy phép 020\_b5471\_6, được phát hành bởi Ủy ban Phúc lợi Động vật Israel.

**Phép phân tích mô học:** Các mẫu mô được thu gom từ cá bị lây nhiễm được làm chết êm dịu một cách tự nhiên bằng phương pháp rạch bụng và được cố định trong formalin được đệm trung tính 10%. Các mẫu được bao lấy trong parafin (Paraplast Plus; Diapath), được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Reichert-Jung 2050) thành các lát 5 $\mu$ m theo dãy, được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E) 277 (Roberts *et al.* 2012), và được kiểm

tra dưới kính hiển vi quang học (Leica DMRB). Các hình ảnh là thu được bằng hệ thống ánh sáng kỹ thuật số Nikon.

Phép phân tích thống kê: Các kết quả của các thử nghiệm *in vivo* được trình bày ở dạng tỷ lệ phần trăm của tỷ lệ tử vong trung bình từ ba thử nghiệm độc lập (hoặc hai, trong trường hợp cá sống sót). Mỗi thử nghiệm bao gồm ba nhóm thử nghiệm gồm 30 con cá (ba lần lặp lại độc lập).

Các thử nghiệm với cá sống sót được thực hiện hai lần như nhau (hai lần lặp lại độc lập), mà trong đó mỗi nhóm được cấu thành bởi 20 con cá. Độ biến đổi giữa các thử nghiệm (gây nhiễm bằng phương pháp tiêm trong màng bụng trực tiếp, gây nhiễm bằng phương pháp sống chung, và cá đối chứng) được xác định bằng kiểm định chi bình phương, mà trong đó trị số P là lớn hơn 0,05 được xem là đáng kể.

Nội lưu môi trường nuôi cấy: TiLV (số truy cập CNCM I-4817) được nội lưu tại Cơ quan Sưu Tập Môi trường Nuôi cấy Vi Sinh vật (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes-CNCM) tại Viện Pasteur, Paris, Pháp.

Số truy cập trình tự nucleotit: Số truy cập GenBank của trình tự được kéo dài của dòng vô tính 7450 là KJ605629 (SEQ ID NO: 1).

Ví dụ 2- Sự phân bố theo địa lý và đặc điểm của tông cá rô phi mắc bệnh từ biển hồ Galilee và các ao thương mại.

Các đợt bùng phát bệnh ở tông cá rô phi hoang dã và tông cá rô phi thương mại được phát hiện ở biển hồ Galilee và ở các ao thương mại ở Israel, nằm ở bờ biển phía Bắc, Bet-Shean, Yizrael, Thung lũng Jordan, và Galilee Thượng và Galilee Hạ. Ở các ao thương mại, bệnh này đã đem lại mức tử vong hàng loạt (Hình 1A). Việc lấy mẫu cá từ các lần đánh bắt thương mại ở biển hồ Galilee đã cho thấy tất cả các loài thuộc tông cá rô phi thì miễn cảm với bệnh này, mặc dù đã không quan sát thấy các mức tử vong hàng loạt. Trong trường hợp này, cá mắc bệnh được trình bày bằng các tổn thương mắt rõ rệt (Hình 1B).

Các phát hiện bệnh lý bao gồm các tổn thương đại thể được xác định đặc điểm chủ yếu bằng các dạng thay đổi ở mắt, bao gồm độ mờ đục của thủy tinh thể (bệnh đục thủy tinh thể). Trong các trường hợp tiến triển nặng, các tổn thương bao gồm các thủy tinh thể bị đứt gãy có chứng viêm màng mạch nhỏ do tổn thương thủy tinh thể kích thích hoặc

viêm nội nhãn đi kèm với hiện tượng hình thành màng sau thủy tinh thể, sau đó là hiện tượng sung của nhãn cầu (bệnh sung phù nhãn cầu), hiện tượng mất tính nguyên vẹn của cầu mắt có giác mạc bị đục thủng rải rác và hiện tượng tạo lỗ lượng chứa được cô đặc hoặc hiện tượng teo, và hiện tượng mất hoạt động chức năng mắt (chứng teo nhãn cầu) (Hình 1B). Các tổn thương khác bao gồm các dạng ăn mòn da (được quan sát ở tông cá rô phi được nuôi ở ao mắc bệnh; Hình 1C), chứng xuất huyết ở màng não mềm, và chứng sung huyết vừa phải của lá lách và thận (Hình 1D).

Các tổn thương mô học của não bao gồm chứng phù, chứng xuất huyết cục bộ ở màng não mềm, và chứng sung huyết mao quản ở cả chất trắng và chất xám (Hình 1E). Các ổ tăng sinh thần kinh đệm và các dải viền quanh mạch rải rác gồm các bạch huyết bào được phát hiện (Hình 1F). Một số tế bào thần kinh trong đoạn não và cụ thể là ở các thùy thị giác thể hiện các mức thoái hóa tế bào thần kinh khác nhau, bao gồm hiện tượng giảm mật độ bào chất và hiện tượng hình thành không bào và hạt nhân bị dịch chuyển theo ngoại vi (hiện tượng phân hủy chất nhiễm sắc trung tâm).

Các tổn thương mắt bao gồm bao thủy tinh thể bị đứt gãy, uốn lượn, mỏng, và thường bị cuộn, được bao quanh bởi hiện tượng tạo mô sợi có hình tròn và chứng xơ hóa có nhiều dạng dính mỏng mắt vào mỏng mắt và thể mi (dính mỏng mắt sau) và con số vừa phải của tế bào bạch cầu hạt ưa eosin và các trung tâm đại thực bào hắc tố hay MMC. Các chất thâm nhiễm được kéo dài vào tiền phòng, mỏng mắt, thủy tinh dịch, và màng mạch (viêm nội nhãn). Đã có các dạng thay đổi của bệnh đục thủy tinh thể trong thủy tinh thể đặc trưng bởi các cấu trúc hình cầu tương đồng ưa eosin (các hình cầu Morgagni), tế bào biểu mô thủy tinh thể được làm to ra rõ rệt có bào tương được tạo không bào siêu nhỏ ưa eosin dồi dào (tế bào bàng quang), hồ lớn chứa chất lưu protein (các sợi thủy tinh thể được hóa lỏng), hiện tượng khoáng hóa, và tế bào thon dài dẹt (hiện tượng dị sản dạng sợi) (Hình 1Ga, so với thủy tinh thể bình thường ở Hình 1Gb). Biểu mô vảy của giác mạc thường xuyên bị ăn mòn và bị loét và bị thâm nhiễm bởi con số vừa phải của các bạch huyết bào, đại thực bào, và tế bào bạch cầu hạt ưa eosin, và phần này được làm nổi bật bằng hiện tượng tân tạo mạch mô đệm và chứng phù (Hình 1H).

Nhu mô gan đã thể hiện các ổ dọn sạch và sung tế bào gan được phân bố ngẫu nhiên rải rác, với hiện tượng tích tụ trong bào chất của sắc tố vàng đến sắc tố nâu dạng hạt. Lá lách có tính tăng sản, mà các bạch huyết bào tăng sinh bao quanh các hình trái

xoan. MMC được làm tăng về kích cỡ và con số ở cả gan và lá lách. MMC là những cụm tế bào mang nhiều sắc tố khác biệt, thường được nhìn thấy trong cơ chất chống đỡ lưới nội mô của các mô tạo huyết. Quá trình tăng sinh MMC là gắn liền với các giai đoạn muộn của tình trạng lây nhiễm mạn tính trong vai trò là đáp ứng đối với tổn thương mô trầm trọng ở một loạt tình trạng lây nhiễm (đặc biệt là các virus) hoặc các điều kiện môi trường kém. Do đó, chúng được xem là những chỉ báo về sức khỏe quần thể cá (Agius and Roberts 2003).

### Ví dụ 3- Phân lập tác nhân bệnh nguyên từ các mẫu bị lây nhiễm

Để nuôi cấy các mầm bệnh tiềm tàng từ tủy cá rô phi mắc bệnh, các cơ quan của cá có đặc điểm được mô tả trên đây được tập hợp lại, được làm đồng đều, và được ủ với tám dòng tế bào khác nhau như được mô tả trong Ví dụ 1. Đã không nhận diện được mầm bệnh đã biết nào, và chỉ có dòng tế bào E-11 đã được thiết lập và tế bào não cá rô phi sơ cấp đã thể hiện một cách nhất quán CPE sau khi ủ với các dịch đồng chất được đề cập trên đây. Ở tế bào E-11, CPE trở nên có thể nhìn thấy được 5 đến 7 ngày sau khi chủng ngừa, với sự xuất hiện của các không bào bào chất và hiện tượng hình thành mảng bám (Hình 2A), hiện tượng này tiến triển một cách nhanh chóng đến hiện tượng phân rã hầu như hoàn toàn của lớp đơn tế bào (ở thời điểm 9 đến 10 ngày sau khi chủng ngừa). CPE ở tế bào não cá rô phi sơ cấp là đặc trưng bởi quá trình chuyển hóa tế bào thon dài thông thường thành tế bào có hạt, sưng và tròn, hiện tượng này đã được quan sát thấy một cách rõ ràng ở thời điểm 10 đến 12 ngày sau khi chủng ngừa (Hình 2B), dẫn đến hiện tượng bong lớp đơn rộng (ngày 14 đến 19) nhưng không có hiện tượng hình thành mảng bám. Môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm đối tượng giả đối chứng và môi trường nuôi cấy não cá rô phi sơ cấp đã không thể hiện CPE bất kỳ (lần lượt là các Hình 2C và 2D). Các kết quả tương tự là thu được khi các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy có CPE được sử dụng để chủng ngừa các môi trường nuôi cấy nguyên sơ (được kiểm tra lên đến 18 lần cấy chuyển) và khi các dịch nổi ở trên, hoặc các dịch đồng chất được đề cập trên đây, được lọc qua các bộ lọc 0,22 $\mu$ m. Ngoài ra, con số các mảng bám được kích thích bởi tác nhân này được tạo mối liên quan trực tiếp với dịch pha loãng của nó, thu được đường cong một tạo một. Do đó, một đơn vị truyền nhiễm đơn lẻ là đủ để tạo ra một mảng bám. Các kết quả này đã chỉ ra rằng CPE đã được mô tả là do sự có mặt của

tác nhân truyền nhiễm, chắc chắn là virus. Tác nhân gây ra CPE được thu hồi từ 25 mẫu, được thu gom từ tất cả các vùng của Israel nơi mà cá được nuôi cấy.

#### Ví dụ 4- Các đặc tính hình thái học của các hạt giống virus

Sự hỗ trợ khác nữa cho quá trình gây nhiễm virus ở các môi trường nuôi cấy E-11 thể hiện CPE đã đến từ quá trình kiểm tra EM các lát mỏng của tế bào này như được mô tả trong Ví dụ 1. Phép phân tích này đã cho thấy sự có mặt của các hạt có mật độ ngăn chặn điện tử xâm nhập thưa thớt (đường kính, 55 đến 75nm), được ôm lấy trong màng trong bào tương (Hình 2E) hoặc trong bào tương (Hình 2F). Đã không tìm thấy hạt như vậy nào ở môi trường nuôi cấy tế bào đối chứng khỏe mạnh. Đáng lưu ý, các hạt này không bắt nguồn từ retrovirus cá lóc (SnRV) mà biểu hiện ở E-11, vì các dạng lắp ráp của retrovirus loại C này thì lớn hơn và được tạo ra chỉ ở màng sinh chất; hơn nữa, các virion mới sinh của SnRV đã không được hiển thị bằng EM ở dòng tế bào đặc hiệu này (mặc dù các trình tự SnRV có thể được khuếch đại bằng PCR).

Các viên kết, được tinh chế từ các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy E-11 đã được gây nhiễm bằng phương pháp ly tâm siêu tốc thông qua các đệm sucroza 25%, được nhuộm âm tính và được kiểm tra bằng EM. Phép phân tích này đã cho thấy các cấu trúc giống virion (xấp xỉ 75 đến 80nm) được bao quanh bởi lớp phủ dày được phát hiện dễ dàng (Hình 2G). Các virion như vậy thì dồi dào và đã không được phát hiện ở các viên kết đối chứng được điều chế từ tế bào E-11 nguyên sơ.

#### Ví dụ 5- Tính nhạy cảm của tác nhân truyền nhiễm đối với ete hoặc clorofom

Các phân tích EM từ Ví dụ 4 đã chỉ ra rằng tác nhân truyền nhiễm, được phân lập từ cá rô phi mắc bệnh, là virus có vỏ bọc. Để kiểm tra điều này, các virion trong các dịch nổi ở trên của tế bào được gây nhiễm E-11 được cho tiếp xúc với ete hoặc clorofom và tác dụng của các lần xử lý này đối với tính lây nhiễm được đo như được mô tả trong Ví dụ 1.

Bảng 1 tổng kết các kết quả của hai và ba lần lặp lại lần lượt của các thử nghiệm tính nhạy cảm clorofom và ete. Đã quan sát thấy sự giảm về tính lây nhiễm là xấp xỉ ba bậc độ lớn (clorofom) đến năm bậc độ lớn (ete), thể hiện tính nhạy cảm của tác nhân này đối với các dung môi này. Điều này đã chỉ ra rằng tác nhân truyền nhiễm thực sự được bọc bằng màng lipid.

Bảng 1 Các thử nghiệm tính nhạy cảm với ete và clorofom

| Điều trị | Thử nghiệm số | TCID <sub>50</sub> /ml không điều trị | TCID <sub>50</sub> /ml cộng với điều trị | Mức giảm gấp số lần | Mức giảm gấp số lần trung bình |
|----------|---------------|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Ete      | 1             | 10 <sup>4,49</sup>                    | 10 <sup>-1</sup>                         | 10 <sup>5,49</sup>  | 1,58 x 10 <sup>5</sup>         |
|          | 2             | 10 <sup>4,83</sup>                    | 10                                       | 10 <sup>3,83</sup>  |                                |
| Clorofom | 1             | 10 <sup>4,63</sup>                    | 10 <sup>1,5</sup>                        | 10 <sup>3,13</sup>  | 0,93 x 10 <sup>3</sup>         |
|          | 2             | 10 <sup>3,5</sup>                     | 10 <sup>1,5</sup>                        | 10 <sup>2</sup>     |                                |
|          | 3             | 10 <sup>4,63</sup>                    | 10 <sup>1,5</sup>                        | 10 <sup>3,13</sup>  |                                |

#### Ví dụ 6- Quá trình xác định đặc điểm phân tử ban đầu của virus tồng cá rô phi

Đã chứng minh được rằng tác nhân truyền nhiễm có thể được phân lập từ cá mắc bệnh và có thể được nhân lên trong môi trường nuôi cấy tế bào cụ thể (Ví dụ 3), tác nhân gây ra bệnh này được đặt tên là virus Tilapia Lake (TiLV), liên quan đến vị trí mà ban đầu nó được phân lập từ đó.

Để tinh chế TiLV, các dịch nổi ở trên môi trường nuôi cấy đã được gây nhiễm TiLV được cắt phân đoạn thông qua các gradien bước sucroza vận tốc nằm trong khoảng từ 10 đến 70% sucroza. Hoạt tính kích thích CPE chủ yếu được khoanh vùng vào các phần từ 30 đến 40% sucroza.

Để nhận diện thêm các trình tự đặc hiệu với TiLV, ARN được chiết từ các virion TiLV (được tinh chế bằng phương pháp ly tâm siêu tốc thông qua các đệm sucroza) và được sử dụng làm khuôn mẫu trong phản ứng phiên mã ngược. Các đoạn của cADN thu được được tạo dòng vô tính bằng cách sử dụng phương pháp shotgun như được mô tả trong Ví dụ 1. Phương pháp này cho phép tạo dòng vô tính các cADN mà có mặt theo các lượng nhỏ, mà không cần kiến thức sẵn có trước về các trình tự của chúng. Một trong các đoạn này (dòng vô tính 7450) được đưa vào các phản ứng RACE 5' và 3', đem lại việc nhận diện 1.326 bazơ của trình tự TiLV (SEQ ID NO: 1) (mã truy cập GENBANK số KJ605629), trình tự này chứa khung đọc hở (open reading frame-ORF) là 420 axit amin (SEQ ID NO: 12). SEQ ID NO: 1 được nhận diện sau là một phần nêu trong SEQ ID NO: 9.

Đã không tìm thấy độ tương đồng đáng kể nào ở cả các axit nucleic và các trình tự protein của dòng vô tính này bằng cách sử dụng các phương pháp tìm kiếm BLAST (Altschul *et al* 1997; Johnson *et al.* 2008) trong cơ sở dữ liệu Genbank.



### Ví dụ 7- PCR dùng để phát hiện TiLV

Như được mô tả trong Ví dụ 1, PCR được thực hiện để phát hiện TiLV. Để thiết lập thử nghiệm PCR dùng để phát hiện TiLV, tổng số ARN được chiết từ não, thận, tim, gan, và lá lách của cá sắp chết. Ngoài ra, ARN được chiết từ não cá rô phi sơ cấp được gây nhiễm TiLV hoặc các môi trường nuôi cấy E-11 và được sử dụng làm khuôn mẫu cho việc tạo cADN. Các mẫu này được đưa vào quá trình RT-PCR có các đoạn mồi mà được tạo ra từ dòng vô tính 7450 (SEQ ID NO: 1). Đoạn 250bp được khuếch đại bằng ME1 (GTTGGGCACAAGGCATCCTA) (SEQ ID NO: 23) và đoạn mồi dòng vô tính 7450/150R (TATCACGTGCGTACTCGTTTCAGT) (SEQ ID NO: 16). Các thử nghiệm PCR đã đem lại sự khuếch đại đoạn 250bp được kỳ vọng từ não của cá được gây nhiễm TiLV (Hình 3A).

Mục đích khuếch đại TiLV là đạt được chỉ sau bước phiên mã ngược, thậm chí trong các điều kiện mà trong đó mẫu này không được điều trị bằng DNaza (Hình 3B). Tổng số ARN được chiết từ dịch nổi ở trên hoặc từ các chất chiết tế bào của môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm TiLV, hoặc từ môi trường nuôi cấy E-11 nguyên sơ. Các mẫu không được điều trị bằng DNaza, và quá trình phiên mã ngược được thực hiện (+) hoặc không được thực hiện (-) trước bước PCR. Đối chứng âm tính “không có ARN” (lần 7) cũng được lấy vào. Đoạn 491bp được khuếch đại bằng các đoạn mồi Nested ext-1 (TATGCAGTACTTTCCCTGCC) (SEQ ID NO: 25) và Nested ext-2 (TTGCTCTGAGCAAGAGTACC) (SEQ ID NO: 26), chỉ khi transcriptaza ngược được thực hiện. Điều này có tính chỉ báo cao về hệ gen ARN của TiLV. Đã quan sát thấy hiện tượng khuếch đại nhất quán ở các mẫu của mô não so với các cơ quan khác. Cũng đã quan sát thấy hiện tượng khuếch đại ở não cá rô phi sơ cấp được gây nhiễm TiLV và các môi trường nuôi cấy E-11 nhưng không phải ở đối chứng âm tính mà bao gồm cADN được điều chế từ não của cá khỏe mạnh (nguyên sơ) (Hình 3B).

Đã không quan sát thấy hiện tượng khuếch đại nào ở các đối chứng âm tính bổ sung, mà bao gồm não cá rô phi sơ cấp được gây nhiễm đối tượng giả và các môi trường nuôi cấy E-11, hoặc các môi trường nuôi cấy E-11 bị lây nhiễm betanodavirus gây bệnh hoại tử thần kinh do virus (viral nervous necrosis-VNN). Đáng lưu ý, sự thiếu vắng của hiện tượng khuếch đại ở mẫu của tế bào được gây nhiễm VNN còn chỉ ra rằng dòng vô tính 7450 thể hiện trình tự được tạo ra từ TiLV hơn là gen cá mà được điều hòa tăng sau

khi gây nhiễm. Trong tất cả các trường hợp, quá trình giải trình tự các đoạn được khuếch đại đã cho thấy độ tương đồng hoàn toàn với trình tự được kỳ vọng.

Thử nghiệm PCR trên đây cũng được khai thác để kiểm tra thêm bản chất ARN của hệ gen TiLV. Đối với điều này, các virion trong các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy E-11 đã được gây nhiễm TiLV được cho tiếp xúc với DNaza I và RNazaA để phân hủy các axit nucleic mà không được bảo vệ bởi các virion. Sau đó, các hạt được tạo viên kết thông qua các đệm sucroza và được phân hủy bằng proteinaza K, và các axit nucleic đã được bảo vệ và khử protein được tinh chế. Các axit nucleic này được cho tiếp xúc với RNaza I, một enzym có sự ưu tiên đối với ARN sợi đơn. Các sản phẩm thu được được phiên mã ngược hoặc không được phiên mã ngược, và được đưa vào quá trình khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với TiLV. (Nested ext-1 [TATGCAGTACTTTCCCTGCC] (SEQ ID NO: 25) và Nested ext-2 [TTGCTCTGAGCAAGAGTACC] (SEQ ID NO: 26); hoặc các đoạn mồi đặc hiệu với SnRV (Snakehead gag-pol fw [CAGATCACTGATCGATGC] (SEQ ID NO: 27) và Snakehead gag-pol rev [GTCTGAAAGGTAAGGTGG] (SEQ ID NO: 28).

Đã quan sát thấy hiện tượng khuếch đại các trình tự TiLV chỉ sau bước phiên mã ngược (Hình 3C, các làn 1 và 3, tương tự với kết quả trong Hình 3B), và chỉ khi nào mà tránh được RNaza I (Hình 3C, các làn 1 và 2). ARN hệ gen sợi đơn của SnRV, phần này được đồng tinh chế dọc theo hệ gen TiLV, được sử dụng làm đối chứng dương bên trong cho thử nghiệm này (Hình 3C, các làn 5 đến 8). Các kết quả này còn cho thấy rằng hệ gen TiLV, có vỏ capsid ở virion, được cấu thành bởi ARN ở dạng sợi đơn.

#### Ví dụ 8- Việc tái lập bệnh tông cá rô phi bằng phương pháp trong màng bụng

Để kiểm tra xem liệu TiLV có thể gây ra bệnh ở tông cá rô phi hay không, các dịch nổi ở trên từ môi trường nuôi cấy E-11 nguyên sơ hoặc môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm TiLV hoặc môi trường nuôi cấy não cá rô phi sơ cấp được lọc (0,22µm), và 200µl được tiêm i.p. vào cá rô phi *nilotica* nguyên sơ (các nhóm gồm 30 con cá như được mô tả trong Ví dụ 1). Tất cả cá nguyên sơ mà được chủng ngừa bằng các dịch nổi ở trên đối chứng (của các môi trường nuôi cấy E-11 nguyên sơ) vẫn còn là không triệu chứng. Tuy nhiên, 74 đến 85% số cá mà được tiêm bằng các dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy E-11 được gây nhiễm TiLV hoặc môi trường nuôi cấy não cá rô phi sơ

cấp được gây nhiễm TiLV đã phát triển bệnh lâm sàng (tính lơ phờ, sự thay đổi màu, các dạng thay đổi ở mắt, đốm da, và gây các vết loét) và chết trong vòng 10 ngày (Hình 4). Cũng đã quan sát thấy cùng một tỷ lệ tử vong đối với cá được tiêm bằng TiLV mà được tinh chế bằng thử nghiệm pha loãng tới hạn (TiLVx2). Ngoài ra, não từ cá được gây nhiễm bằng thử nghiệm được thu hoạch và được ủ đồng thời với tế bào E-11 nguyên sơ. Các môi trường nuôi cấy như vậy đã phát triển CPE đặc trưng. Sau đó, các dịch nổi ở trên của các môi trường nuôi cấy như vậy được thu hoạch và được tiêm vào cá nguyên sơ, đem lại sự xuất hiện bệnh ở cá. Nhìn chung, thử nghiệm cấy chuyển *in vivo/ex vivo* này được lặp lại theo đây ba lần, với tỷ lệ tử vong nhất quán là 75 đến 85% ở mỗi vòng trong vòng 10 ngày sau khi tiêm.

Điều này xác nhận một cách rõ ràng rằng TiLV, được phân lập từ cá được gây nhiễm và được nhân lên ở tế bào E-11, thực sự là tác nhân bệnh nguyên của bệnh này. Quan trọng là, cá mà đã sống sót qua bệnh được kích thích bằng thử nghiệm này (35 con cá) đã miễn dịch hoàn toàn đối với sự phát triển bệnh sau khi thử thách gồm phương pháp tiêm i.p. thứ hai (3 đến 4 tuần sau lần tiêm thứ nhất). Điều này chỉ ra rằng cá có thể nâng cao đáp ứng miễn dịch bảo vệ đối với TiLV.

#### Ví dụ 9- Việc tái lập bệnh tông cá rô phi bằng phương pháp sống chung

Để xác định xem liệu TiLV là có thể truyền được trong hoàn cảnh giống với các điều kiện tự nhiên hay không, thử nghiệm sống chung được thực hiện mà trong đó cá nguyên sơ được cho sống chung với cá được gây nhiễm TiLV bằng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 1.

Các thử nghiệm này đã chứng minh một cách rõ ràng rằng cá nguyên sơ đã phát triển bệnh gây chết, với tỷ lệ tử vong tương tự với tỷ lệ tử vong thu được bằng đường i.p. nhưng với động lực học chậm hơn (trì hoãn 2 đến 3 ngày để đạt đến mức tử vong 50%,  $P < 0,05$  (Hình 4)). Các thử nghiệm này đem lại bằng chứng về khả năng của TiLV trong việc lây lan qua đường từ nước.

#### Ví dụ 10- Phép phân tích dữ liệu tin sinh học

Dữ liệu Ion Torrent được tạo ra bằng cách sử dụng làm ARN não khuôn mẫu của cá rô phi ồm sau khi làm tiêu tan ARN ribosom (hai thư viện). Dữ liệu Illumina được tạo ra đối với các hạt được tinh chế bằng gradien sucroza và được xử lý bằng nucleaza thu

được từ tế bào nuôi cấy E11 được gây nhiễm (hai thư viện). Các thư viện Ion Torrent được xử lý trước bằng cutadapt (Martin 2011) để loại bỏ các đầu mút chất lượng thấp, được cắt tỉa thành chiều dài tối đa 150bp, và bị tước bỏ các trình tự làm thích ứng.

Các trình tự đọc từ tất cả bốn thư viện (2 não và 2 môi trường nuôi cấy tế bào) được phân loại theo nguyên tắc phân loại bằng cách sử dụng taxMaps (<https://github.com/nygenome/taxmaps>) bằng cách lập bản đồ với cơ sở dữ liệu nt của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI), cơ sở dữ liệu RefSeq của NCBI (Pruitt *et al.* 2012), trình tự hệ gen tham chiếu cá rô phi (Oreochromis niloticus) và các trình tự ARN thông tin của tổng cá rô phi được chú thích tương ứng (Brawand *et al.* 2014). Sau đó, các trình tự đọc chưa được phân loại (không lập bản đồ theo trình tự đã biết bất kỳ) được lắp ráp một cách độc lập bằng cách sử dụng công cụ lắp ráp VICUNA (Yang *et al.* 2012). Các contig từ mỗi thư viện được canh thẳng bằng BLAST (Camacho *et al.* 2009) với tất cả các contig từ 3 thư viện khác, giữ lại các điểm so khớp có trị số e là  $1e-10$  trở xuống. Phương pháp tạo cụm liên kết đơn lẻ được sử dụng để chia nhóm tất cả các contig mà đã thể hiện độ tương đồng bất kỳ. Với giả thiết rằng tác nhân truyền nhiễm cần phải có mặt ở tất cả 4 thư viện, đã nhận diện được 10 cụm contig mà chứa ít nhất một contig từ mỗi thư viện trong số 4 thư viện này.

Trong mỗi cụm, các contig được canh thẳng với nhau và được lắp ráp bằng tay để tạo ra trình tự có chiều dài tối đa sau các lần nhân đôi nối tiếp nghịch đảo ở các đầu mút của các contig, chắc chắn là là kết quả của các sản phẩm nhân tạo của quá trình khuếch đại, được loại bỏ. Các ORF được dự đoán chồng lấn ở các contig từ các dạng lắp ráp khác nhau được sử dụng để chỉnh sửa đối với lỗi dịch khung (hầu hết xảy ra do các đoạn thêm-bớt ở các trình tự đọc Ion Torrent) và để suy ra ORF có thể có dài nhất.

Dựa trên mô hình trong đó các đoạn hệ gen được dự kiến là chứa các đầu tận cùng được bảo toàn, dạng kết hợp của phép phân tích k-mer, phép phân tích độ sâu trình tự đọc, và cập nhật dữ liệu bằng tay được sử dụng để xây dựng các motif trình tự đầu tận cùng 5' và 3' để tinh luyện các trình tự đầu tận cùng. Việc lập bản đồ 10 trình tự liên ứng cuối cùng với dữ liệu đọc thô ban đầu bằng BWA-MEM (Li 2013) đã chứng minh rằng 99% số trình tự đọc chưa được nhận diện từ các thư viện Illumina và 87% số trình tự đọc chưa được nhận diện từ các thư viện Ion Torrent được lập bản đồ theo các trình tự liên ứng.

### Ví dụ 11- Quá trình xác định đặc điểm hoàn chỉnh của hệ gen TiLV

Dựa trên tin sinh học, các đoạn môi PCR trình tự liên ứng được thiết kế và các trình tự liên tiếp của tất cả 10 cụm được khuếch đại từ các mẫu cá rô phi đã được gây nhiễm. Các trình tự đầu tận cùng của mỗi đoạn trong số các đoạn hệ gen được chỉnh sửa bằng phương pháp khuếch đại nhanh các đầu mút cADN (RACE) 5' và 3' (Bảng 2). Các phép phân tích tương tự bằng phương pháp giải trình tự thông lượng cao và phương pháp khuếch đại PCR được thực hiện trên các mẫu từ cá rô phi mắc bệnh từ Israel, và sau đó, được thực hiện trên các mẫu từ cá rô phi có hội chứng bệnh tương tự từ Ecuador. Đã thu được các trình tự của tất cả 10 đoạn mà thể hiện độ tương đồng trình tự nucleotit lớn hơn 94% với các trình tự tương ứng từ cá rô phi Israel.

Các đoạn nhỏ của mỗi đoạn được tạo dòng vô tính vào các vector plasmit để tạo ra các mẫu dò dùng cho phương pháp thẩm tách Northern. Ba hỗn hợp của các mẫu dò được sử dụng thể hiện các đoạn 1, 4, 7, và 10 (Combo 1); 3, 6, và 9 (Combo 2); hoặc 2, 5, và 8 (Combo 3) để phòng ngừa sự chồng lấn tín hiệu từ các đoạn có kích cỡ tương tự. Tổng số ARN được chiết từ gan của cá rô phi Ecuador mắc bệnh và từ tế bào nuôi cấy được gây nhiễm bằng TiLV được tạo ra từ não từ cá rô phi Israel hoặc dịch nổi ở trên của môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp thẩm tách Northern đã chứng minh sự có mặt của tất cả 10 trình tự trong các chất chiết axit nucleic từ cá rô phi Israeli và cá rô phi Ecuador bị lây nhiễm (Hình 5).

Các lần tìm kiếm độ tương đồng trong cơ sở dữ liệu trình tự NCBI đã thu được chỉ một điểm so khớp đơn lẻ đối với đoạn 1 mà chỉ ra độ tương đồng rất xa với các motif polymeraza ARN phụ thuộc vào ARN của orthomyxovirut (Bảng 2).

Bảng 2 đoạn hệ gen TiLV

| Đoạn | Cụm số | Kích cỡ<br>[nt] | Độ tương đồng<br>với các trình tự<br>đã biết | SEQ ID NO |
|------|--------|-----------------|----------------------------------------------|-----------|
| 1    | 5      | 1640            | các miền<br>polymeraza PB1<br>của            | 7         |

|    |   |      | orthomyxovirut |    |
|----|---|------|----------------|----|
| 2  | 0 | 1471 | không có       | 2  |
| 3  | 7 | 1371 | không có       | 9  |
| 4  | 4 | 1249 | không có       | 6  |
| 5  | 1 | 1098 | không có       | 3  |
| 6  | 2 | 1044 | không có       | 4  |
| 7  | 3 | 777  | không có       | 5  |
| 8  | 9 | 657  | không có       | 11 |
| 9  | 8 | 549  | không có       | 10 |
| 10 | 6 | 465  | không có       | 8  |

#### Ví dụ 12- PCR chẩn đoán

PCR thông thường: Các đoạn môi NM-CLU7-SF1, 5'-AGT TGC TTC TCA YAA GCC TGC TA (SEQ ID NO: 28) và NM-CLU7-SR1, 5'-TCG TGT TCA CAR CCA GGT TTA CTT (SEQ ID NO: 29) được thiết kế để khuếch đại vùng xấp xỉ 245nt của đoạn 3 của TiLV (cụm 7, Số truy cập KJ605629). cADN từ ARN được chiết bằng chất phản ứng TRI (Invitrogen) được tổng hợp bằng Superscript III (Life Technologies) và các hexamer ngẫu nhiên theo quy trình của nhà cung cấp. PCR được thực hiện bằng Amplitaq Gold (Life Technologies) và các sản phẩm PCR được hiển thị trên gel agarosa, được tinh chế bằng kit Purelink Gel Extraction (Invitrogen), và được xác nhận về tính đặc hiệu đích bằng phương pháp giải trình tự Sanger trên cả hai sợi (Genewiz, NJ). (Hình 6)

PCR thời gian thực định lượng: Thử nghiệm PCR thời gian thực định lượng dùng cho TiLV được thiết lập, hướng đích đến đoạn 1 của TiLV và beta-actin trong vai trò là đối chứng gen giữ nhà (ARN thông tin beta-actin của *Oreochromis niloticus*, XM\_003443127) (Hình 7). Đối với cả hai thử nghiệm, các vùng đích tương ứng được tạo dòng vô tính vào các vector plasmit bằng cách sử dụng các đoạn môi TiLV-CLU5-cF1,

5'-GGT CAA TTC GAG TCA TGC TCG (SEQ ID NO: 30) / TiLV-CLU5-cR1, 5'-GCT GGA CTG CTT TAT AAA TAG CAT AG (SEQ ID NO: 31), hoặc TIL-Actin-cF1, 5'-ATC CTG CGT CTG GAC CTG GCT (SEQ ID NO: 32) / TIL-Actin-cR1, 5'-TGC CAA TGG TGA TGA CCT GTC (SEQ ID NO: 33) để tạo ra các tiêu chuẩn hiệu chuẩn định lượng (các Hình 7A và 7B).

PCR thời gian thực có hướng đích được thực hiện bằng cách sử dụng các oligonucleotit đặc hiệu dưới đây:

Đoạn 1 của TiLV (cụm 5)

CLU5-mRNA-qF1, 5'-AGC TAT GTT ATC TGG CGC T (SEQ ID NO: 34)

CLU5-mRNA-qR1, 5'-GTT GTT ATA CCT ATA GGC ACA T (SEQ ID NO: 35)

CLU5-mRNA-Probe, FAM-5'-GCC ATT CCA CTC AGC AGA ACG TCT G-TAMRA (SEQ ID NO: 36)

Beta-actin của cá rô phi

TIL-Actin-qF1, 5'-GCG TGA CAT CAA RGA GAA GCT G (SEQ ID NO: 37)

TIL-Actin-qR1, 5'-CCA ATG GTG ATG ACC TGT C (SEQ ID NO: 38)

TIL-Actin-Probe, FAM-5'-CCC TGG AGA AGA GTT ACG AGC TGC-TAMRA (SEQ ID NO: 39)

Như được thể hiện trong Hình 7C, quá trình phát hiện TiLV đích thực được tìm thấy ở các mẫu mô khác nhau của cá rô phi mắc bệnh từ Israel bằng cách sử dụng PCR thời gian thực có các đoạn mồi đặc hiệu đối với TiLV.

Các tài liệu tham khảo

Agius and Roberts 2003. *J. Fish Dis.* 26:499–509.

Altschul *et al.* 1997. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.

Bacharach *et al.* 2000. *J. Virol.* 74:11027–11039.

Bigarré *et al.* 2010. *J. Fish Dis.* 32:667–673.

Brawand *et al.* 2014. *Nature* 513:375-81.

- Camacho *et al.* 2009. *BMC Bioinformatics* 10:421.
- Crandell *et al.* 1975. *J. Clin. Microbiol.* 2:465–468.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Cultured aquatic species information programme, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Fisheries and Aquaculture Department. Species fact sheets: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Hasegawa *et al.* 1997. *Fish Pathol.* 32:127–128.
- Hedrick *et al.* 2000. *J. Aquat. Anim. Health* 12:44–57.
- Hutoran *et al.* 2005. *J. Virol.* 79:1983–1991.
- Johnson *et al.* 2008. *Nucleic Acids Res.* 36(Suppl 2):W5–W9.
- Laham and Bacharach 2007 *J. Virol.* 81:10687–10698.
- Li 2013. arXiv:1303.3997.
- Martin 2011 *EMBnet.journal* 17:10-12.
- Melamed *et al.* 2004. *J. Virol.* 78:9675–9688.
- Nehls and Boehm 1995. *Trends Genet.* 11:39–40.
- Oberpichler *et al.* 2008. *Environ. Microbiol.* 10:2020–2029.
- Pruitt *et al.* 2012 *Nucleic Acids Res.* 40:D130-D135.
- Reed and Muench 1938. *Am. J. Hyg.* 27:493–497.
- Reynolds 1963. *J. Cell. Biol.* 17:208–212.
- Roberts *et al.* 2012 *Laboratory Methods in Fish Pathology*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Scotto-Lavino *et al.* 2006a. *Nat. Protoc.* 1:2742–2745.
- Scotto-Lavino *et al.* 2006b. *Nat. Protoc.* 1:2555–2562.



Shlapobersky *et al.* 2010. *Virology* 399:239–247.

Yang *et al.* 2012. *BMC Genomics* 13:475.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit phân lập của virus Tilapia Lake được mã hóa bởi axit nucleic có trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11, hoặc axit nucleic bổ sung với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11.
2. Polypeptit phân lập của virus Tilapia Lake được mã hóa bởi biến thể có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của axit nucleic bổ sung với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11, trong đó biến thể này có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 80% với các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11 hoặc axit nucleic bổ sung với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11.
3. Polypeptit phân lập của virus Tilapia Lake theo điểm 2, trong đó biến thể này có độ tương đồng trong khoảng từ khoảng 99,5% đến 85% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự bổ sung với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11.
4. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm polypeptit của virus Tilapia Lake theo điểm 1.
5. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm polypeptit của virus Tilapia Lake theo điểm 2.
6. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm polypeptit của virus Tilapia Lake theo điểm 3.
7. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm virus bị tiêu diệt và/hoặc được làm suy yếu chứa polypeptit của virus Tilapia Lake, trong đó polypeptit này được mã hóa bởi axit nucleic có trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11 hoặc axit nucleic bổ sung với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 11.
8. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 7 còn bao gồm ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ.
9. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 4 còn bao gồm ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ mà làm tăng cường và/hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch.

10. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 5 còn bao gồm ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ mà làm tăng cường và/hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch.
11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 6 còn bao gồm ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ mà làm tăng cường và/hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch.
12. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 9 trong đó ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm dầu, thức ăn và gelatin.
13. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 10 trong đó ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm dầu, thức ăn và gelatin.
14. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 11 trong đó ít nhất một tá dược, chất bổ trợ hoặc chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm dầu, thức ăn và gelatin.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Columbia University in the City of New York

<120> Polypeptit phân lập của virus Tilapia Lake và chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit này

<130> 01001/004493-WO0

<140> Được nộp cùng với văn bản này

<141> 15-12-2015

<150> US 62/091,824

<151> 15-12-2014

<160> 39

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1326

<212> ADN

<213> Virus ARN Tilapia Lake

<400> 1

|             |            |            |            |             |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| gaaatggact  | cgcggtttgc | acagctaact | ggggttttct | gtgacgattt  | cacttatagc  | 60   |
| gaagggagcc  | gaaggttcct | aagttcttac | agtacagtag | agagacgtcc  | aggagtcccc  | 120  |
| gtagaggggtg | actgttatga | ctgtttgaag | aataagtgga | ttgcctttga  | gctggaaggc  | 180  |
| cagccgcgga  | aatttccaaa | ggcaacagtt | cgttgcattt | tgaacaatga  | tgctacatac  | 240  |
| gtttgctctg  | agcaagagta | ccagcagatt | tgtaaggtac | aattcaagga  | ttatttggag  | 300  |
| atcgacgggg  | ttgttaaagt | tgggcacaag | gcctcctacg | atgctgagct  | aagggaacgg  | 360  |
| ctattggaac  | taccacatcc | aaagagtggc | ccgaagcctc | gtattgagtg  | ggtggcacca  | 420  |
| cccagacttg  | cggacatatc | caaggaaaca | gctgagctaa | agaggcaata  | tggattcttc  | 480  |
| gagtgtctca  | agttcctcgc | ctgcggtgag | gagtgtggtc | ttgaccaaga  | ggcaagagaa  | 540  |
| cttatactga  | acgagtacgc | acgtgataga | gaatttgagt | tccgcaatgg  | aggggtggata | 600  |
| caaaggtata  | cagttgcttc | tcacaagcct | gctacacaga | agatattacc  | tctaccggct  | 660  |
| agtgtctccac | ttgctcgtga | gcttttgatg | ttgattgcta | gaagcacaac  | tcaggcaggg  | 720  |
| aaagtactgc  | atagcgataa | taccagcata | ctagctgtac | cggtcatgcg  | cgactctgga  | 780  |
| aagcacagta  | aaaggagacc | aaccgcctcc | actcaccact | tagttgtagg  | tctaagtaaa  | 840  |
| cctggctgtg  | aacacgattt | tgagtttgac | gggtacaggg | cagctgtgca  | tgtgatgcac  | 900  |
| ctagatccca  | agcaatcggc | taatataggg | gagcaagact | ttgtgagtac  | ccgagaaatt  | 960  |
| tacaagctgg  | atatgttgga | actacctccc | ataagtagga | aggggtgatct | ggacagagct  | 1020 |
| agtggctctt  | agacaagatg | ggacgtcatc | ttacttcttg | aatgcctcga  | ctctacaagg  | 1080 |

gttagccaag cagtggctca acattttaat aggcaccggc tagcacttag cgtctgtaag 1140  
 gacgagttca ggaaaggcta ccagctggct tctgagataa ggggtacaat acccttaagc 1200  
 tcactttatt attcactttg tgcagtaaga ttgcggatga cagtacaccc atttgcgaga 1260  
 tgatcgcttt cgacgccttc gctaaagggtt acgacgttct aatagaggat tatgggaaaa 1320  
 atttgc 1326

<210> 2  
 <211> 1471  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 2  
 ccaaatttta ctctctatta ccaaatacat ttactttctga aaaatgagtc agtttgggaa 60  
 atcattcaag ggcagaactg aggtcacaat aaccgaatat cgctctcata ctgtcaaaga 120  
 tgtgcacaga agcttactta cggctgacaa gtctctaagg aagtcattct gttttaggaa 180  
 cgccctaaac cagttcttgg ataaagattt gcctcttttg cccattcggc caaaattaga 240  
 gtccagggtt gctgtgaaaa agtctaagct gaggagtcag ctgtcgttca gacccggttt 300  
 gactcaggag gaagcaattg atctttacaa caagggtat gatggtgaca gcgtctcagg 360  
 tgccttgcaa gacagggtag tcaatgagcc tgtagcttac tcgagtgcag ataatgacaa 420  
 atttcacagg ggcttagcgg ctctagggtta cactttggct gatagagcat ttgatacatg 480  
 cgaatccggc ttcgtgagag caattcctac cactccatgc gggttcatat gttgtgggcc 540  
 aggttctttc aaagattcac ttggatttgt gataaaaatc ggcgaattct ggcacatgta 600  
 tgacgggttc caacacttcg tcgctgtcga ggatgctaag ttcctagcaa gtaagtctcc 660  
 ttcgttttgg ttggcaaaac gtcttgcaaa gaggctgaat ctgggtcccaa aagaggatcc 720  
 atctatagca gcagctgagt gcccttgtag gaaagtgtgg gaagctagtt ttgctagggc 780  
 acctactgca ctagatccat ttggaggcag ggccttctgc gaccagggtt ggggtgtacca 840  
 cagggacgta gggatatgcaa cagctaacca catatcacag gaaacacttt ttcaacaagc 900  
 gctttcagtg aggaaccttg gaccgcaagg tagtgcaaat gtctcaggct caatacatac 960  
 cgccctggac aggtcagag cagcgtacag tagggggacg cccgcctcta gatctatact 1020  
 gcaagggtt gcaaattctca tcacacctgt aggtgaaaac tttgaatgcg atctcgacaa 1080  
 gaggaagctc aatataaagg cattacgttc tcccagagag tacattacga tagagggcct 1140  
 ggttgtaaac ctggacgatg tgggttagagg gttctacctt gacaaggcga aggtcactgt 1200  
 tctctcgaga tcaaagtgga tgggttacga ggaccttcct cagaaacctc cgaacggtag 1260

at tt t t t a c t g t a g a a a g a g g a a g g c a a t g c t t c t c a t c t c a t g t a g t c c a g g c a c g t a c g c 1320  
 a a a g a a g c g a a a g t g g c a g t g c a g g a g g a t c g c t t t a a a g a t a t g a g g g t t g a g a a t t t 1380  
 c c g g g a g g t a g c g g a a a t a t g g a t c t a a a t c a g t a g g g t t t c t t g g c a a a a g c c t t c a c 1440  
 t a t a t a t a t g g t a a t a a t g a g a a g a t t t g c 1471

<210> 3  
 <211> 1098  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 3  
 c c a a a t g t t t c t c t t a g c t c a g a c t c c a a t a g c t a t g c a g g c g t g g t c c t g a c a a g c t g 60  
 c c t a g t t t g c g c a c t a g c a a g t g a t g a a a g t t t a a g g a t a a a c g a c t a c a a t c a t a c c t 120  
 a a a c a a t a c c t a c c a a a g t a g g g a g a t a g a a g t g a a a t a a g g c g t g g a t t t g c a t c c a a 180  
 g t t c a g g a t g g a g a g t t g c t c c t g c a c t a t g g g g t g c a c t a c a t t g t a a c c c c a t c c t c 240  
 g g g t g g g t c g t t c t g c a c t g g g t t a c a t g c a g t a c c t a a c a g c t t c c c a g c c c t c g g g t a 300  
 c a a a c t t c c c a a a g c a g g g g g a a g a g g t g a t t g g a a a g c t a c t g a a g t t a g g a t t g a c g a 360  
 a g a t a g t g g g g t t g t t c t a t a c a a c g t t t c c a g g t g c a g c c a c a g t a g c g a g t g c a g a g a 420  
 t t t g g a g g t g t a t t c c a c c g t a c t g c c a g g t c a g t g t g a c t g t a c c a g a c c a c t g t g g a 480  
 c g a c t a c a a g a c c a t g c t g g c c t c a a g g c a g c c g a a g t c g t t t g t a g t a g c a g g c c t c a t 540  
 t a t a c t g t g t t t a c t t g c t a g c t c a g t a g c a a t t g g c a t g g g t g t t t a c a a t t a t g c t g g 600  
 g g t c a t c g g c c t a g c g g a c g c a g c t c a a g c a g a t g t t t c t g a g a t t t g g g a g t a c t t a g a 660  
 a g c t t t g a c a c g g a a g t c a c c g g t a t g a c g c t a g g a g a g t t t t g c t c g a t t a a a t c c c t 720  
 c g t c t g t a a a t c t g a t a a c a t a g g c a a a t t c a a g a g c a a t t t g c a g c c t t t g g g g a a g c 780  
 t a t t c t t g c a a t a g t g t t t g g a t g c t a g a g a a t a t a a g t t t g t c t a t t a c c t g g t g c t 840  
 t t c g c t g a t g g t t c t c t c g c t a c t c a g t a a a c t t g t t t c t c t g t t g a a g c a g g t g c c c t t 900  
 c t a t g g g a g t a t c a a a g t t t t a g t a t t c c g g a g g c t a a g a g t t g t g t t t c a a g a c c t t 960  
 t t t c t a t a t t a a g a a g c g g c t t a a g a a g a a a a g c c c g c t t g a g g a t g a c g a a g t c c c t c t 1020  
 g c t t c c a t t a t c t t g a t c c t t a a g c t t c t a t t c c t g g t a g g t c a t a a a g t g g t a a a c t g a 1080  
 g a a a a g a g t a a a t t t g c 1098

<210> 4  
 <211> 1044  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 4

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ccaaatttta cctctcgcat gcatttttat ctacaggatt gtccaatgag ttggcttagg  | 60   |
| gtgataagaa cccttacttt gttttcaaca ctctttaacg gaagcgatca atgcgtggac  | 120  |
| aacatgtggc ggttttacgg gagatcaaac tacacgtcaa gcgtagtcat tgacggggac  | 180  |
| aaatattctg ttgaagggtc atattcgagt agtgattatc tggatccagc agtacagaag  | 240  |
| gtggttctgg gacttgatgg tagcaacgaa gtcatagact cagggtgggtc tccatactac | 300  |
| atgtatgatt tggagggatc aaaaggggaa ctccatcatc tgaactgcaa ctttgtcgag  | 360  |
| aaacgatgta atccgacgct aaactttatg cttggaggat ttgttttgtg cccaggaata  | 420  |
| tcgagaaaag aactggagcc tgtaaccgac aagatattgg agagccgggg aataccgggc  | 480  |
| cgaggtaaaa tacgtactat aaaaataagc tctaaactgt ttgagacatc gctgtgcctt  | 540  |
| tcgaagagga ggcccatctt tagcacctgt atgctaattg cgcggtgtct ttgtacaaac  | 600  |
| tgtaagcgta ctatagatag aacatatatg acgccaaacg gcttcagaac tgaatacaag  | 660  |
| tggagctgca gagacaatag cacaaaacag tgttgggtat tagttgagtc actggaggag  | 720  |
| aatcactccc catacaaatg ccacttttcc gcagtggaag tcctactacc agccgaaata  | 780  |
| aagcgtcacc agctcatcag cgagtgggtc gcgatgcagg atgaagttgc ttataagaag  | 840  |
| tcaaattgctt atcttcttgc tcgtactttt cttagctata caaaaatgcg tagattaaat | 900  |
| cctgtaattg atcttttcgat atcaccacca gtgacagtaa gatcctgctg taaaattaat | 960  |
| aaatacatgt gacactatat gtcctatcat gtgggcgaaa tgcccaggta cagttttaag  | 1020 |
| tgcttgattg agagaaatat ttgc                                         | 1044 |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 777

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut ARN Tilapia Lake

&lt;400&gt; 5

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| ccaaatttta ctctctttgc attgcatacc gtatagtaat agacacaatg tcctacaaga  | 60  |
| ttggtgagct tgagagaatt atcacgcgca aaaacaccct cccaaggac agcggaagtc   | 120 |
| agactgggct gttccatcga ctgctcctag agcattactc tgggtgcctcg aacgtatggt | 180 |
| tcttttgtgc aactgggttt acaccaata caaatggcac aacctggatt gtattgacga   | 240 |
| gtcacccaac cgatgggtga gaaaaggtag ctttgaaatg gaagtatgaa gtgagccccg  | 300 |
| gattgccagt cagaagggtta cttgcccagg agggtagagc agtaaggagg ccgaaaggag | 360 |
| cctatttagt caaaggggac atgcatctct gttcaactac cttctacact agaagggaag  | 420 |
| cgaagtactg gctctgtgcg ccatcccaa agtttccaca ttggaccaag agatcagcgt   | 480 |
| tggtgaccag cactcgacca ctgactgagt tgagcagggt tgccacatac ctagaggcta  | 540 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| taagtaaggg tgcaactgat gtcaatgaat cgtggtgttc ctaccacaga gttggggttag | 600 |
| tgccaatccc taaaggaatc acgtttgaac tctaattacc cagctgtttc gttgtcttat  | 660 |
| tggggaggcc tttctaagtt aactaattac ttttgaaagc agggataatt ggtctgagag  | 720 |
| cttcttatgg tactcagtac cgttcactaa ggatggtagc atgagagaaa gatttgc     | 777 |

<210> 6  
 <211> 1249  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <400> 6                                                            |      |
| ccaaagttta ctctattac ccagaatagc taacttaata aactgaaaat ggtgagaact   | 60   |
| acaaagacta gtatggcagc tgccagcact gttgcaccag aggtagcaat ggatgaaagt  | 120  |
| tcaccagca cttcgcaggt acaagctgaa ctcccaagaa accttgaggt tttcaacgaa   | 180  |
| gcttggtgtc atgtgttttg aagttccttt aacagggagg acaacagtgt gatattctgat | 240  |
| gctgctgcat ttctctttta aatgcacact cactccctcg atggtcagga ggctaagggt  | 300  |
| ctgagagcca gtgaaaagaa gagagagagg gagaacgcta agaaatcaag gaaggcacca  | 360  |
| gaagcaggga tgagggctcg aaggagcctt atattaacca gcagatggac tgaatactgc  | 420  |
| gcaacctgtg tgctgcact gggctcaaag atgaaggtga taaaagcctc aggggacgca   | 480  |
| gctatgattc agatgatgaa ggaccataac tctctattaa gagtgtgtgt tcgcattgag  | 540  |
| gtctggaagg ctaggtacgt cagtttggtt gctctcgacg agaggattca gactttggag  | 600  |
| gacgccaat ggttcccata tctgagtggg gattcctatc gtgcttgccc agggctggtt   | 660  |
| ggtggctact ttgcaaagaa agcagcagca ggagaaagag gaaagaacta caaaaagttg  | 720  |
| aatcagactg ctataatccc gcctccgaga tttctgatca ttggccacag gctgcagata  | 780  |
| ggcgaccagg tcaccctcag ggagctgctt gcctcaattg cttggggcct ttgcgacggt  | 840  |
| gtccttgctg agtggttgag cccctcgacg ggggacggga gtattggtgt tgttggtggt  | 900  |
| ctacctctgc aagctacagg aagctgcttc ctggtggtag ctagccacgg gctctcagca  | 960  |
| attgccgact ctaggattga gggaacaggg aacacgaatc tgctggaaga atgcattgcc  | 1020 |
| attcagaaac aggacggtgt cataaaatgt aagagaagtg ggaagagtct gtatcactgc  | 1080 |
| ctcaaggaga cagcaggggc tgttgggaga taggcaacga agtaggccac ccatgcgcgg  | 1140 |
| aaagctgcac aggctgcaa gggcccctct tagcccaagt tttctatata ttctttaaca   | 1200 |
| agtcactctaa aactggtaaa ttcttagacg gtaattggag aaagatttg             | 1249 |

<210> 7



<211> 1640  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 7  
 ccāaacgtta tctcttaatt acgcactatt actgtactac cataaggtat gtgggcattt 60  
 caagaaggag tttgcaaagg taacctgtta tcaggcccga cctcaatgaa ggcaccggat 120  
 tcagcagcga gggagtcatt agacagagcg tctgaaatca tgacaggaaa atcgtacaat 180  
 gctgtccaca ctggggactt aagcaagctg cctaatacagg gagaaagtcc actgaggata 240  
 gtcgattccg acctttattc agaaaggagt tgctgttggg ttatagagaa ggagggcaga 300  
 gttgtatgca aaagtaccac gtcacccgc ggtatgacgg gcctgttgaa cacaacaagg 360  
 tgtagttctc catctgagct catatgtaag gttttgacag tagaatccct atctgaaaag 420  
 ataggtgaca cgagcgtcga ggagttactt tctcatggca ggtactttta gtgcgcactt 480  
 cgcgaccagg agaggggtaa acccaagagc agagctatct ttctgtcaca tccattcttc 540  
 agattgcttt cctctgtagt agagacgcac gctagatctg tgctgtcaaa ggtctcagca 600  
 gtgtacaccg ctactgctag tgcagaacaa cgggctatga tggccgcaca ggtttagag 660  
 tcaagaaaac atgttcttaa tggcgactgt actaagtata atgaggcaat cgacgcagac 720  
 aactgctaa aagtgtggga tgcaataggc atgggggtcaa tcggagtcac gctcgcttac 780  
 atggtgcgca ggaaatgcgt tctcattaaa gacactctag tagagtgtcc aggaggtatg 840  
 ttgatgggaa tgtttaacgc aactgccacc ttggcattgc aggggacgac tgacagattc 900  
 ctgtctttca gcgacgactt tataacatcg tttaactcgc ctgctgaatt acgcgagata 960  
 gaggacctgc ttttcgcaag ctgtcataac ttgtcgctaa agaagagtta catttcagtt 1020  
 gcctcactgg aaataaactc gtgtaccctc actagggacg gtgacctagc cacagggttg 1080  
 ggttgtactg ctggtgtccc tttcagggga ccacttgtga ctctgaaaca gactgcagct 1140  
 atgttatctg gcgctgttga ctcaggagtt atgccattcc actcagcaga acgtctgttc 1200  
 cagataaagc agcaggaatg tgcctatagg tataacaacc ccacttacac aacgaggaat 1260  
 gaggacttcc tcccacatg cctgggaggg aagactgtaa ttagctttca atctctactg 1320  
 acttgggatt gccaccatt ttggtaccag gtgcaccccg atggcccaga cactatagat 1380  
 cagaaagtcc tgtctgtcct tgcttcaaag actcgcagaa ggagaacccg actggaggct 1440  
 ctctcagact tggacccctt ggtccctcat aggctcctcg tatcagagtc agacgttagc 1500  
 aagatcagag cagctaggca ggctcacttg aagtccttag gcttggaaca acccacaac 1560  
 tttaactatg ctatttataa agcagtccag cccaccgctg ggtgctaagt aactatatag 1620  
 gcgaatgaga gaaatatttg 1640

<210> 8  
 <211> 465  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 8  
 ccaaatttta accctactaa caccaaatat agctataagc caggatgagt gtggcagatt 60  
 atttgtcaag tgacagtgac tcgggggctg agagctcagg atgtttagta ctaagaagtc 120  
 ggaagatcaa gaagggcaag aaagctgctt caaagaagcg aagttggaag aatgaaaggt 180  
 atggtgctga cgagagcggt gaagataata tagagtgggg tgacgaagtc gacctcgaga 240  
 tggacgactg tgattctgca atcccagagt gggctagggt tgatttcaat cccaaaaaca 300  
 gaagggacag agaggatgat gggcagagtg acctatctcg attttccgaa gatttcggaa 360  
 agaagtctct tgacgtgcag tcttagcacc ttaatatcgg ttctgatttc gttcgtatcc 420  
 acaggccaac gctaactata cagggtgtca gagggaaaga tttgc 465

<210> 9  
 <211> 1371  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 9  
 ccaaatttta ccccttaatc cttaatagac cgtaaacttt cttttgaaat ggactcgcgg 60  
 tttgcacagc taactggggt tttctgtgac gatttcactt atagcgaagg gagccgaagg 120  
 ttcctaagtt cttacagtac agtagagaga cgtccaggag tccccgtaga gggtgactgt 180  
 tatgactgtt tgaagaataa gtggattgcc tttgagctgg aaggccagcc gcggaaattt 240  
 ccaaaggcaa cagttcgttg cattttgaac aatgatgcta catacgtttg ctctgagcaa 300  
 gagtaccagc agatttgtaa ggtacaattc aaggattatt tggagatcga cggggttggt 360  
 aaagttgggc acaaggcatc ctacgatgct gagctaaggg aacggctatt ggaactacca 420  
 catccaaaga gtggcccga gacctgtatt gagtgggtgg caccaccag acttgcgagc 480  
 atatccaagg aacagctga gctaaagagg caatatggat tcttcgagtg ctcaaagttc 540  
 ctgcctgctg gtgaggagtg tggctctgac caagaggcaa gagaacttat actgaacgag 600  
 tacgcacgtg atagagaatt tgagttccgc aatggagggt ggatacaaag gtatacagtt 660  
 gcttctcaca agcctgctac acagaagata ttacctctac cggctagtgc tccacttgct 720  
 cgtgagcttt tgatgttgat tgctagaagc acaactcagg cagggaaagt actgcatagc 780  
 gataatacca gcatactagc tgtaccggtc atgcgcgact ctggaaagca cagtaaaagg 840  
 agaccaaccg cctccactca ccacttagtt gtaggtctaa gtaaacctgg ctgtgaacac 900

gattttgagt ttgacgggta cagggcagct gtgcatgtga tgcacctaga tcccaagcaa 960  
 tctggctaata taggggagca agactttgtg agtacccgag aaatttaca gctggatatg 1020  
 ttggaactac ctcccataag taggaagggt gatctggaca gagctagtgg tcttgagaca 1080  
 agatgggacg tcatcttact tctggaatgc ctgactcta caagggttag ccaagcagtg 1140  
 gctcaacatt ttaataggca ccggctagca cttagcgtct gtaaggacga gttcaggaaa 1200  
 ggctaccagc tggcttctga gataaggggt acaataccct taagctcact ttattattca 1260  
 ctttgtgcag taagattgcg gatgacagta caccatttg cgagatgatc gctttcgacg 1320  
 ccttcgctaa aggttacgac gttctaatag aggattatgg gaaaaatttg c 1371

<210> 10  
 <211> 548  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 10  
 ccaaatttta ctcacaagtc cgattacttt ttccgcttgg tgatgtcacg atggatagaa 60  
 aatacagatt ctgtgtcagt aatcttgaca gagatgagtc ggtcgtacgt cactttgtgc 120  
 cattaccccc cttggagctt gtgctgcggc ggcaagacat cacaacctgg tcaagtctgg 180  
 atcctggatc gaaaacattg tctagaatgt tcagagatct cagagttaat gacactgagt 240  
 cagccaactt ggcaggagag tgcaatggtg atagggagct gggccaagt agtaacggag 300  
 cacggaattt tgcacacttc aacatcggaa aggcaggcac caagaagggt catgtggagg 360  
 atatctgaca tggctggcga tagaacttta tgagggcggt ccaggggcaa ttgaagctcc 420  
 gcgaacctac tgattcctca gctagaacat tgtagtgaac catgtgacat taataattta 480  
 gctttagtaa aaatggataa gcttcagctc tggcaaagta tgactttaag gacgtgagaa 540  
 agatttgc 548

<210> 11  
 <211> 657  
 <212> ADN  
 <213> Virut ARN Tilapia Lake

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 11  
 ncaaataatta cctcatctac actaacattt ccaattggac agcatatcca ggaataagta 60  
 tggctcaaat cccaacacta agagagggcc aagggaagct ctacgatttc acgctcaacg 120

gcatgacagt gactagagac acagtcaaca ctgtagttgc tctggagttt cttgtcaatg 180  
caggtccgga tttgctttcc ctaacaattg gcgaaggcct ctcagaagaa acaaagttta 240  
aacacctgct tgtaagcac gccggcatga cccgaaagcg gatagaggaa aggctgggac 300  
gaatctcgag gcgagtcagt gtgacagtcg acgcaattat aataacaaac cgcaagggtc 360  
aaagatttga attcaatcgg aagcagtacc tggatattgc caaacaagct atgaagctta 420  
agctccctgg gattaactgt gtcgacatac cactgcgct cgcttttctc gaggaggtcc 480  
tggcaactgc tttgaaggac actgaagggt cacaagatga caggatggcc ctttaaggcag 540  
acactttctg tgctatcaat catttccgtg aaatgcttaa ataaaaagtg agtcttcagt 600  
gtcattttcc ccagggaggt aagctactcc atttgtgtaa tgatgagaaa aatttgc 657

<210> 12  
<211> 420  
<212> PRT  
<213> Virut ARN Tilapia Lake

<400> 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Met | Asp | Ser | Arg | Phe | Ala | Gln | Leu | Thr | Gly | Val | Phe | Cys | Asp | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Phe | Thr | Tyr | Ser | Glu | Gly | Ser | Arg | Arg | Phe | Leu | Ser | Ser | Tyr | Ser | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Glu | Arg | Arg | Pro | Gly | Val | Pro | Val | Glu | Gly | Asp | Cys | Tyr | Asp | Cys |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Lys | Asn | Lys | Trp | Ile | Ala | Phe | Glu | Leu | Glu | Gly | Gln | Pro | Arg | Lys |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Phe | Pro | Lys | Ala | Thr | Val | Arg | Cys | Ile | Leu | Asn | Asn | Asp | Ala | Thr | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Val | Cys | Ser | Glu | Gln | Glu | Tyr | Gln | Gln | Ile | Cys | Lys | Val | Gln | Phe | Lys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Asp | Tyr | Leu | Glu | Ile | Asp | Gly | Val | Val | Lys | Val | Gly | His | Lys | Ala | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Asp | Ala | Glu | Leu | Arg | Glu | Arg | Leu | Leu | Glu | Leu | Pro | His | Pro | Lys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Gly | Pro | Lys | Pro | Arg | Ile | Glu | Trp | Val | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asp | Ile | Ser | Lys | Glu | Thr | Ala | Glu | Leu | Lys | Arg | Gln | Tyr | Gly | Phe | Phe |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Glu | Cys | Ser | Lys | Phe | Leu | Ala | Cys | Gly | Glu | Glu | Cys | Gly | Leu | Asp | Gln |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

Glu Ala Arg Glu Leu Ile Leu Asn Glu Tyr Ala Arg Asp Arg Glu Phe  
 180 185 190  
 Glu Phe Arg Asn Gly Gly Trp Ile Gln Arg Tyr Thr Val Ala Ser His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ala Thr Gln Lys Ile Leu Pro Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu  
 210 215 220  
 Ala Arg Glu Leu Leu Met Leu Ile Ala Arg Ser Thr Thr Gln Ala Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Val Leu His Ser Asp Asn Thr Ser Ile Leu Ala Val Pro Val Met  
 245 250 255  
 Arg Asp Ser Gly Lys His Ser Lys Arg Arg Pro Thr Ala Ser Thr His  
 260 265 270  
 His Leu Val Val Gly Leu Ser Lys Pro Gly Cys Glu His Asp Phe Glu  
 275 280 285  
 Phe Asp Gly Tyr Arg Ala Ala Val His Val Met His Leu Asp Pro Lys  
 290 295 300  
 Gln Ser Ala Asn Ile Gly Glu Gln Asp Phe Val Ser Thr Arg Glu Ile  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Leu Asp Met Leu Glu Leu Pro Pro Ile Ser Arg Lys Gly Asp  
 325 330 335  
 Leu Asp Arg Ala Ser Gly Leu Glu Thr Arg Trp Asp Val Ile Leu Leu  
 340 345 350  
 Leu Glu Cys Leu Asp Ser Thr Arg Val Ser Gln Ala Val Ala Gln His  
 355 360 365  
 Phe Asn Arg His Arg Leu Ala Leu Ser Val Cys Lys Asp Glu Phe Arg  
 370 375 380  
 Lys Gly Tyr Gln Leu Ala Ser Glu Ile Arg Gly Thr Ile Pro Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Tyr Tyr Ser Leu Cys Ala Val Arg Leu Arg Met Thr Val His  
 405 410 415  
 Pro Phe Ala Arg  
 420

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (19)..(24)  
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 13  
 ggaaactcaat gcacgcgtnn nnnn

24

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 14  
 ggaactcaat gcacgcgt

18

<210> 15  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)..(54)  
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 15  
 ccagtgagca gagtgacgag gactcgagct caagcttttt tttttttttt ttvn

54

<210> 16  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 16  
 tatcacgtgc gtactcgttc agt

23

<210> 17  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 17  
 ccagtgagca gagtgacg

18

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 18  
 gaggactcga gctcaagc

18

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 19  
 aagttctctt gcctcttgg

19

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

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 20  
 cacccagact tgcggacata

20

<210> 21  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 21  
 tccaaggaaa cagctgagc

19

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 22  
 gaggcaatat ggattcttcg

20

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 23  
 gttgggcaca aggcataccta

20

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 24  
 tatgcagtac ttccctgcc

20

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 25  
 ttgctctgag caagagtacc

20

<210> 26  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 26  
 cagatcactg atcgatgc

18

<210> 27  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 27  
 gtctgaaagg taaggtgg

18



<210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 28  
 agttgcttct cayaagcctg cta

23

<210> 29  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 29  
 tcgtgttcac arccagggtt actt

24

<210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 30  
 ggtcaattcg agtcatgctc g

21

<210> 31  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 31  
 gctggactgc tttataaata gcatag

26

<210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 32  
 atcctgcgtc tggacctggc t

21

<210> 33  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 33  
 tgccaatggt gatgacctgt c

21

<210> 34  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 34  
 agctatgtta tctggcgct

19

<210> 35  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 35  
 gttgttatac ctataggcac at

22

<210> 36  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> mẫu dò tổng hợp

<400> 36  
 gccattccac tcagcagaac gtctg

25

<210> 37  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mỗi tổng hợp

<400> 37  
 gcgtgacatc aargagaagc tg

22

<210> 38  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> đoạn môi tổng hợp

<400> 38  
ccaatgggtga tgacctgtc

19

<210> 39  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

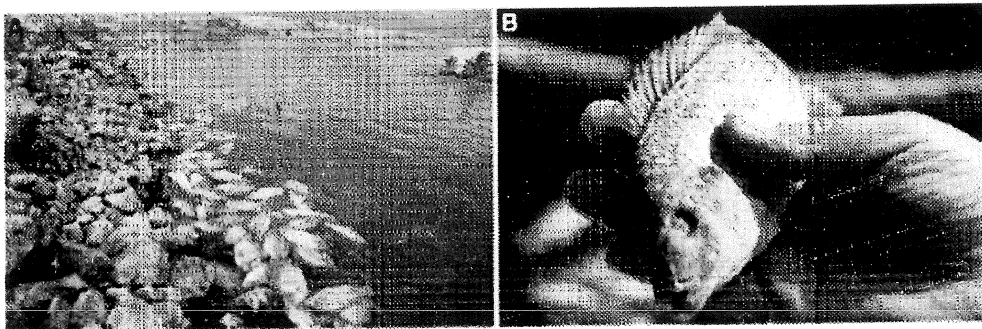
<220>  
<223> mẫu dò tổng hợp

<400> 39  
ccctggagaa gagttacgag ctgc

24

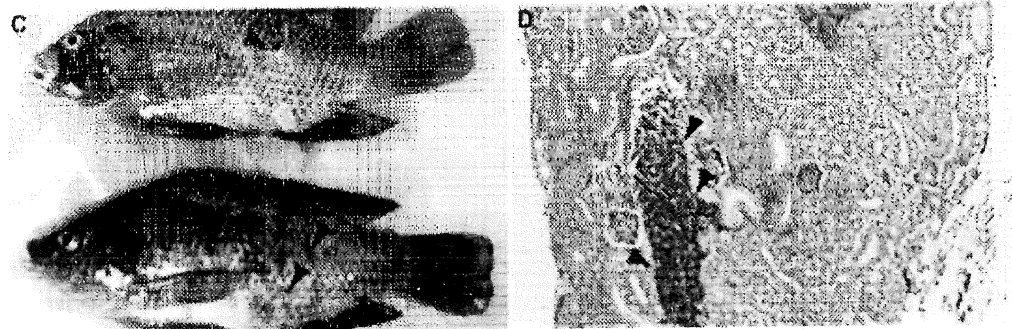
1/11

Hình 1



Hình 1A

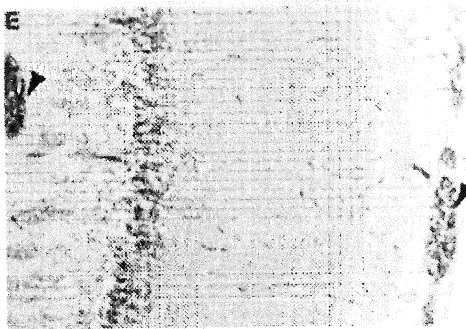
Hình 1B



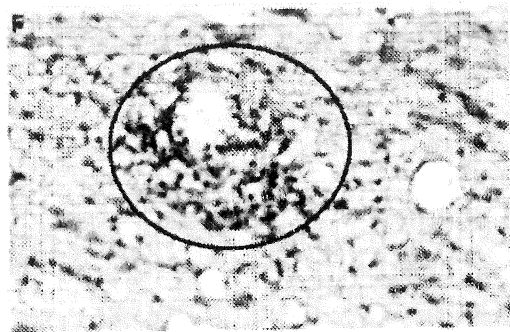
Hình 1C

Hình 1D

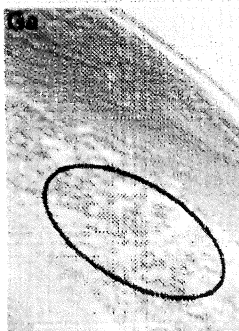
2/11



Hình 1E



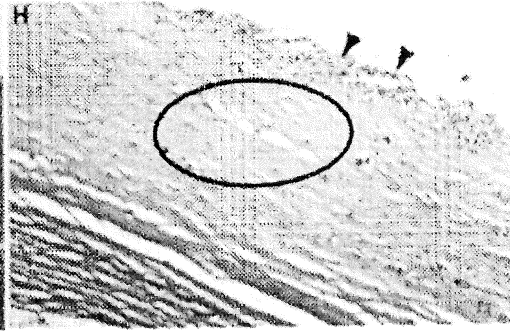
Hình 1F



Hình 1Ga



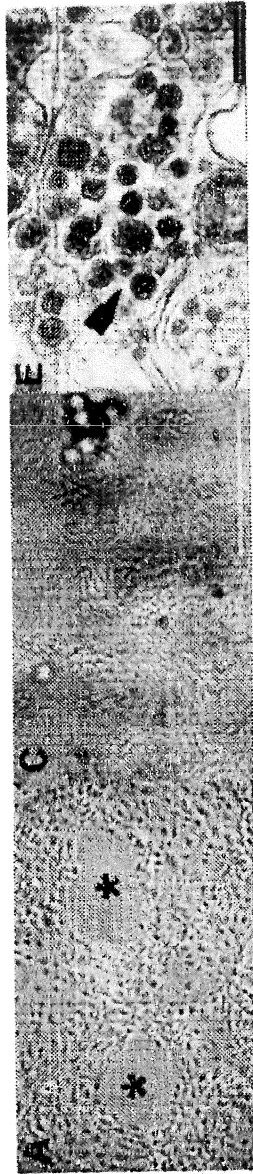
Hình 1Gb



Hình 1H

3/11

Hình 2



Hình 2A

Hình 2C

Hình 2E



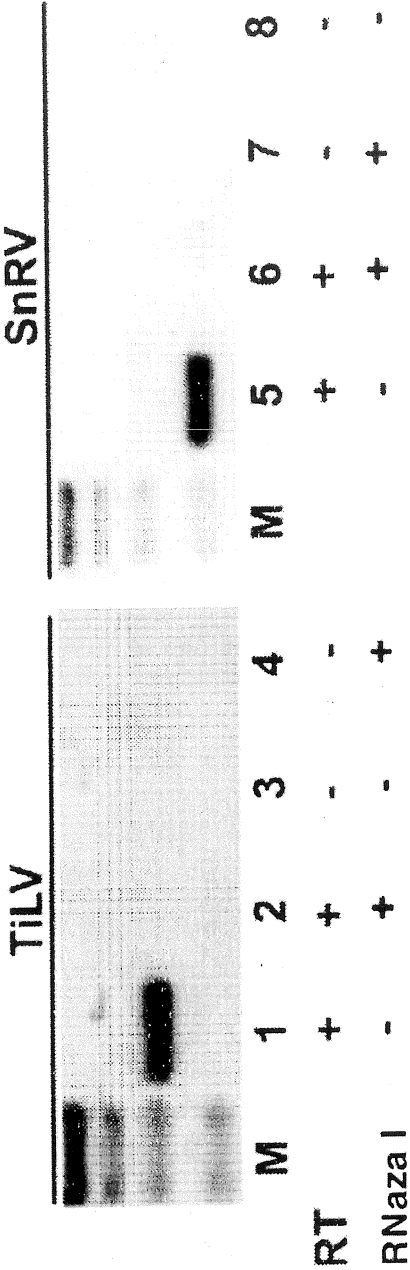
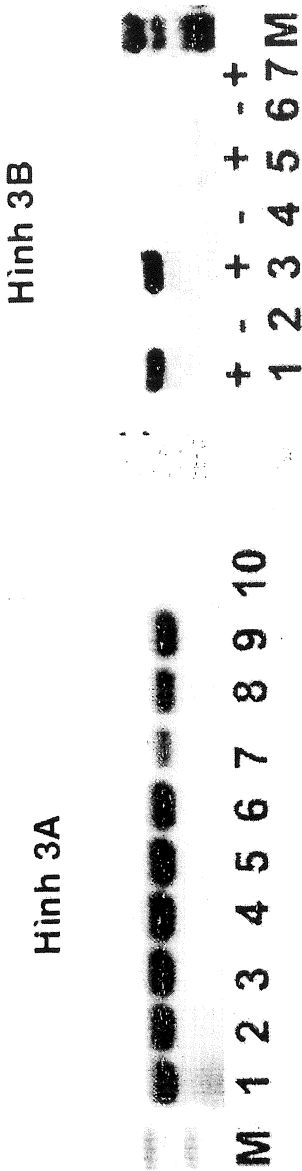
Hình 2B

Hình 2D

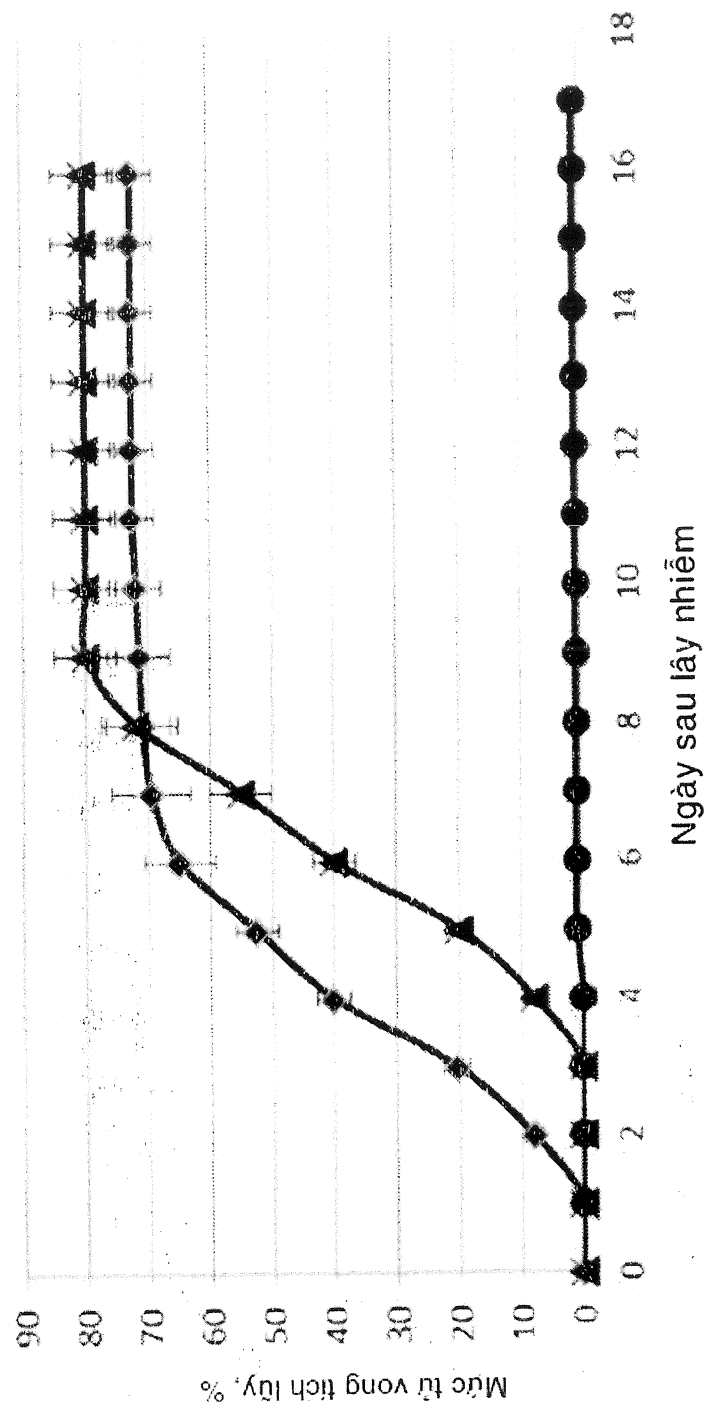
Hình 2F

Hình 2G

Hình 3



Hình 3C



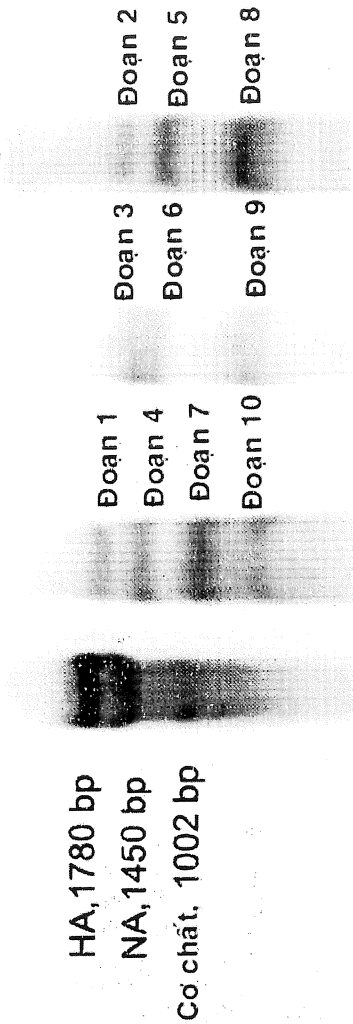
Hình 4



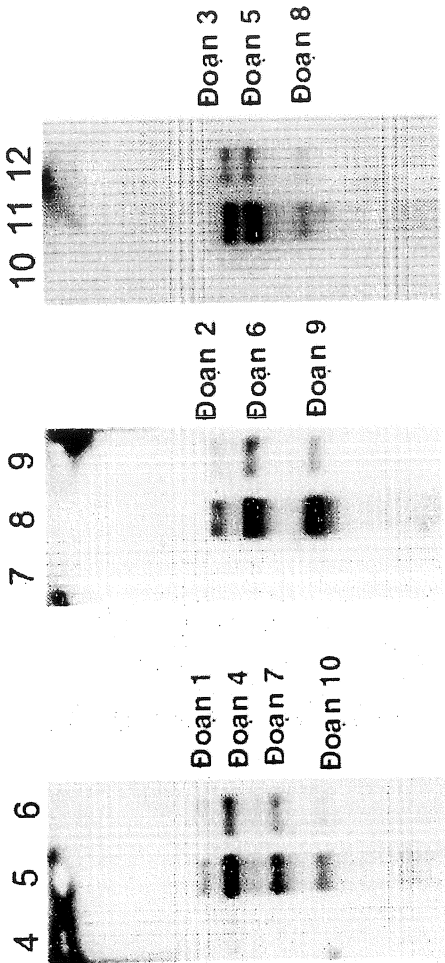
6/11

Hình 5

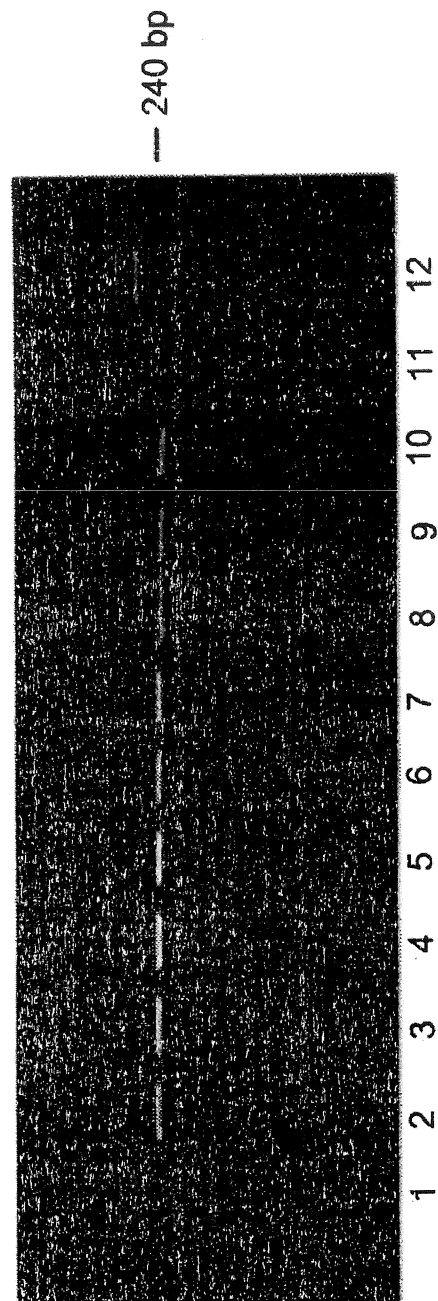
Hình 5A | ARN gan cá rô phi bị lây nhiễm (Ecuador) cúm A (Thang)



Hình 5B | Mẫu dò TILV Combo 1 Mẫu dò TILV Combo 2 Mẫu dò TILV Combo 3

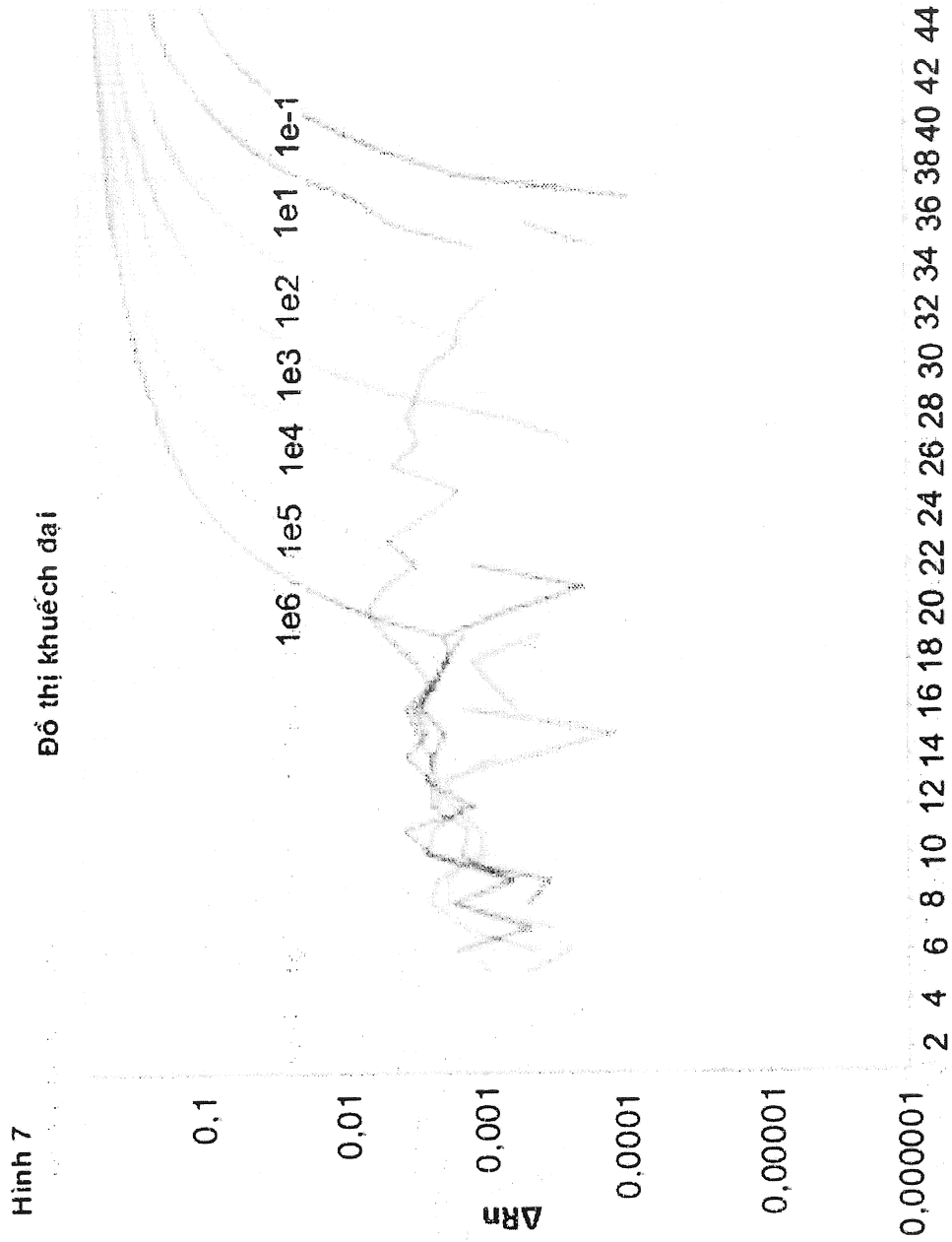


7/11



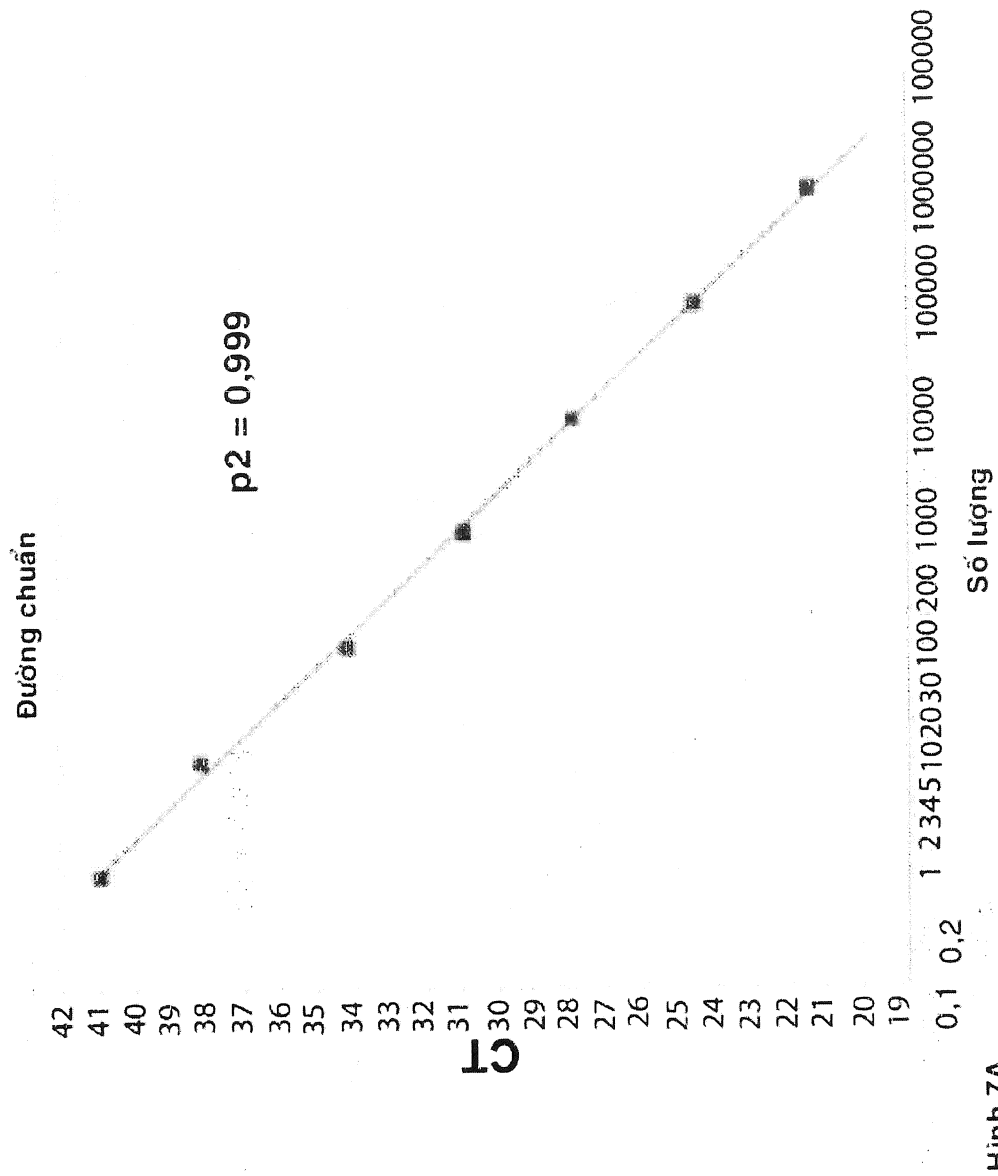
Hinh 6

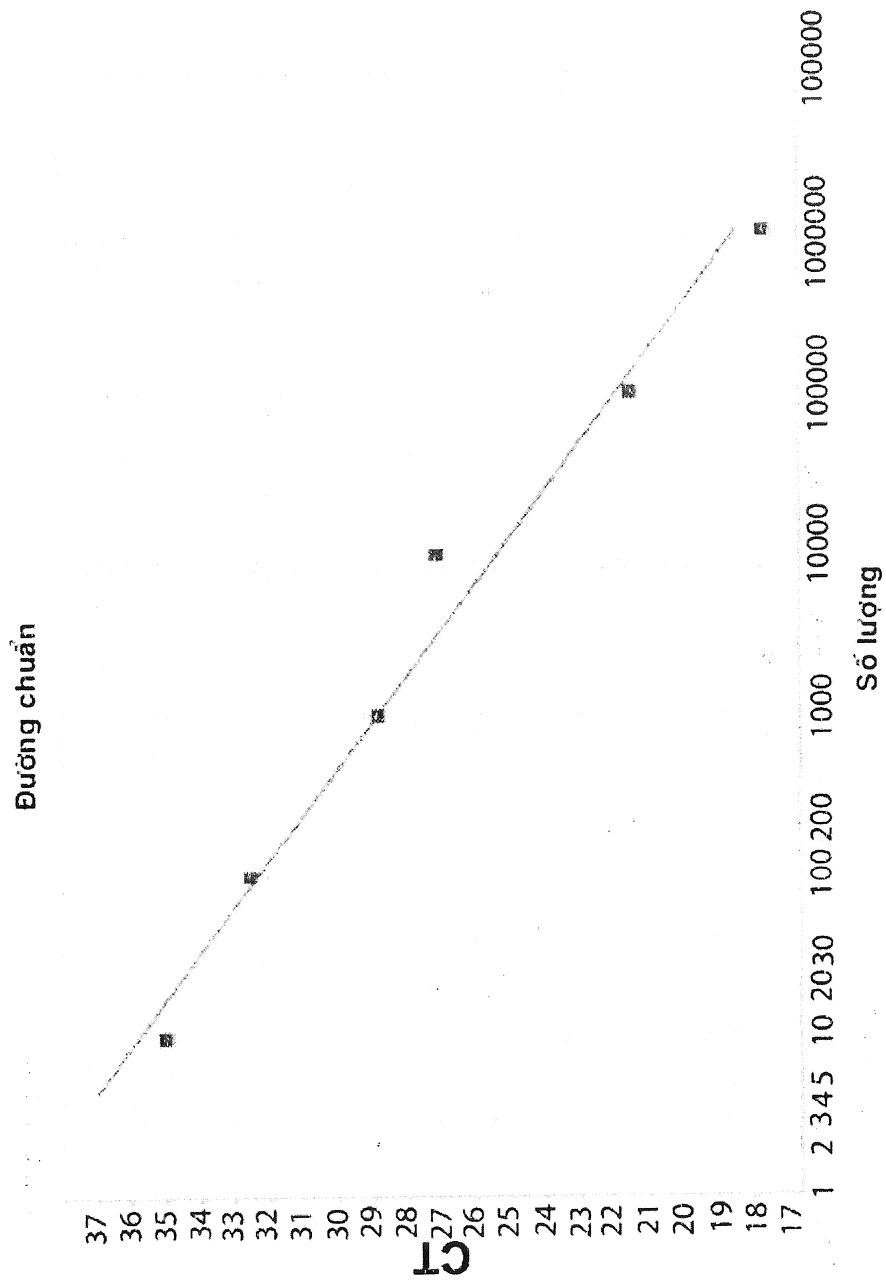
9/11



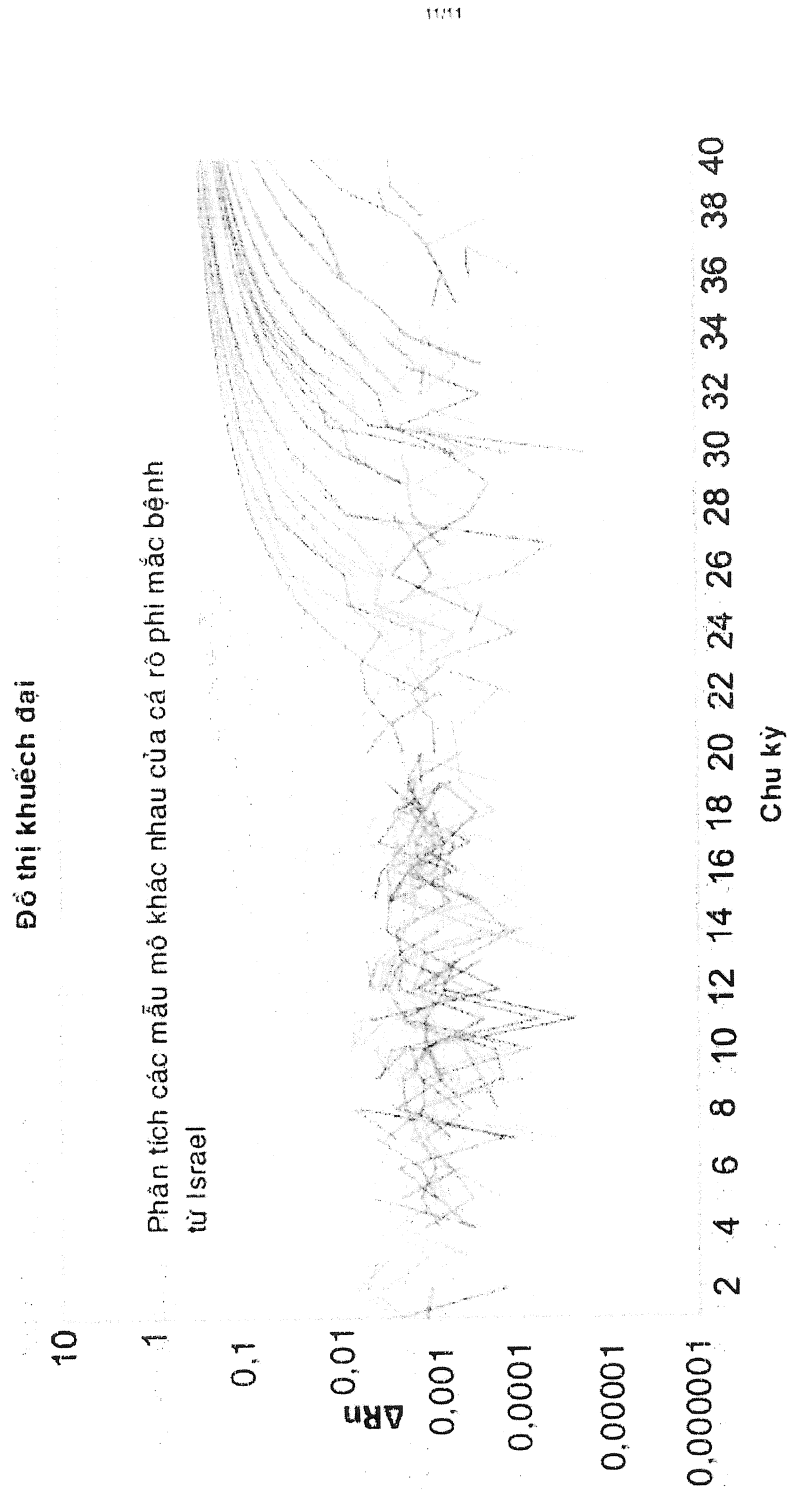
Hình 7A

9/11





13:11



Hình 7C