



(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)



1-0044568

(51)^{2020.01} C12N 5/10; A61P 31/14; C12N 15/85; (13) B
A61K 39/187; C07K 14/18

(21) 1-2020-07185

(22) 16/04/2020

(86) PCT/CN2020/085026 16/04/2020

(87) WO2020/238458 A1 03/12/2020

(30) 201910443709.1 25/05/2019 CN

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/11/2021 404A

(71) YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD. OF QINGDAO (CN)

No. 21, Aodongnan Road, Hongdao Economic Development District, Qingdao,
Shandong, 266114, China

(72) GUO, Weiwei (CN); LIU, Dawei (CN); XIANG, Yinhui (CN); WANG, Yuhong
(CN); DOU, Xiaolong (CN); LIU, Lei (CN); FAN, Gencheng (CN); DU, Yuanzhao
(CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Trần & Trần (TRAN & TRAN CO., LTD.)

(54) DÒNG TẾ BÀO BIỂU HIỆN PROTEIN E2, PROTEIN E2 VÀ VACCIN DƯỚI
ĐƠN VỊ CỦA VIRUT GÂY SỐT Ở LỢN

(21) 1-2020-07185

(57) Sáng chế đề cập đến dòng tế bào dùng để biểu hiện protein E2, protein E2 và vaccin dưới đơn vị protein E2 của virus gây sốt ở lợn được sản xuất từ protein này. Kháng nguyên protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 trong vaccin được sản xuất bằng cách sử dụng việc biểu hiện dòng tế bào E2-CHO của virus gây sốt ở lợn tái tổ hợp. Vaccin được sản xuất từ sáng chế có các đặc điểm như độ ổn định kháng nguyên cao, độ tinh khiết cao, tính đặc hiệu cao, không tạo ra các kháng thể khác không liên quan, có phương pháp phát hiện thuận tiện và chính xác, mà có thể đặt nền móng vững chắc cho việc sản xuất vaccin dưới đơn vị của virus gây sốt ở lợn và các chất thử chẩn đoán.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực kỹ thuật về sản phẩm sinh học dùng cho thú y, và cụ thể là đề cập đến dòng tế bào dùng để biểu hiện protein E2 và việc sử dụng dòng tế bào này, protein E2 và vaccin dưới đơn vị protein E2 của virus gây sốt ở lợn được sản xuất từ protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sốt ở lợn là bệnh lây nhiễm cấp tính, nghiêm trọng, và có khả năng lây lan cao do virus gây sốt ở lợn cổ điển (CSFV: Classical Swine Fever Virus) gây ra, gây tổn thất đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn trên thế giới. Mặc dù vaccin giảm độc lực của CSFV đã được sử dụng trong các giải pháp kỹ thuật đã biết cho hiệu quả miễn dịch tốt và có tính an toàn cao nhưng khó phân biệt được kháng thể do cơ thể sản sinh ra khi được kích thích bằng vaccin sống giảm độc lực với kháng thể được tạo ra bởi lợn nhiễm virus kiểu dại, điều này không có lợi cho việc kiểm soát dịch bệnh và tình chế virus gây sốt ở lợn. Việc nghiên cứu và phát triển vaccin dưới đơn vị của virus gây sốt ở lợn có thể giúp phân biệt được động vật được gây miễn dịch bằng vaccin này và động vật bị nhiễm, và có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc tình chế CSFV.

Chủng gây ra dịch bệnh là virus gây sốt ở lợn Trung Quốc có thể được chia thành 2 nhóm gen và 4 phân nhóm gen, cụ thể là các phân nhóm gen 2.1, 2.2, 2.3 và 1.1. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sự khác biệt rất lớn về các gen sinh kháng nguyên giữa các chủng virus gây sốt ở lợn phổ biến ở Trung Quốc và các chủng có độc lực cao Shimen truyền thống và các chủng giảm độc lực trên thỏ được sử dụng cho vaccin. Chủng dùng cho vaccin giảm độc lực trên thỏ Trung Quốc truyền thống thuộc phân nhóm gen 1.1, nhưng những virus kiểu dại thuộc phân nhóm này chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ, và chúng được phát hiện chủ yếu ở các vùng chăn nuôi gia súc kiểu chăn thả khá xa. Với sự phát triển nhanh của ngành chăn nuôi lợn tập trung, chủng CSFV gây ra dịch bệnh chính ở Trung Quốc thuộc nhóm gen 2. Việc điều tra dịch tễ đối với CSFV đã phát hiện ra rằng vaccin

giảm độc lực truyền thống của CSFV thuộc phân nhóm gen 1.1 hiện đang được sử dụng rộng rãi không thể tạo ra khả năng bảo vệ miễn dịch tốt chống lại virus gây sốt ở lợn thuộc nhóm gen 2 hiện đang lây lan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dòng tế bào dùng để biểu hiện protein E2 và việc sử dụng dòng tế bào này, cũng như protein E2 và việc sử dụng protein này. Vaccin dưới đơn vị protein E2 của virus gây sốt ở lợn được sản xuất trong sáng chế có thể tạo ra khả năng bảo vệ miễn dịch tốt cho lợn.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất dòng tế bào dùng để biểu hiện protein E2, mà là dòng tế bào E2-CHO chứa mảnh nucleotit mã hóa protein E2; trong đó, protein E2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3.

Mảnh nucleotit này có trình tự SEQ ID NO:4.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất việc sử dụng dòng tế bào E2-CHO để biểu hiện tái tổ hợp protein E2 của virus gây sốt ở lợn.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất protein E2 có trình tự axit amin là SEQ ID NO:3. Trình tự của mảnh nucleotit mã hóa protein E2 là SEQ ID NO:4.

Theo phương án thứ tư, sáng chế đề xuất vaccin dưới đơn vị được sản xuất từ protein E2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3. Trình tự của mảnh nucleotit mã hóa protein E2 là SEQ ID NO:4.

Theo phương án thứ năm, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein E2 để sản xuất vaccin.

Theo phương án thứ sáu, sáng chế đề xuất vaccin dưới đơn vị của virus gây sốt ở lợn, chứa kháng nguyên và tá chất dùng cho vaccin, và kháng nguyên này là protein E2 được tạo ra trong sáng chế.

Vaccin dưới đơn vị được sản xuất từ protein E2 theo ít nhất một phương án của sáng chế có các đặc tính như độ ổn định kháng nguyên cao, độ tinh khiết cao, độ đặc hiệu cao, không tạo ra các kháng thể khác không liên quan, và có phương pháp phát hiện

thuận tiện và chính xác, mà có thể đặt nền móng vững chắc cho việc sản xuất vacxin dưới đơn vị của virus gây sốt ở lợn và các chất thử dùng để chẩn đoán.

Mô tả chi tiết sáng chế

Glycoprotein vỏ E2 là protein cấu trúc chính của CSFV, là yếu tố xác định chính đối với độc lực và các loài vật chủ của CSFV, nằm trên bề mặt ngoài của virion, và là protein sinh kháng nguyên chính mà tạo ra kháng thể trung hòa virus và bảo vệ lợn miễn dịch khỏi sự tấn công của CSFV. Do đó, sáng chế sử dụng protein E2 của virus gây sốt ở lợn làm phân tử protein quan trọng để phát triển vacxin mới cho virus gây sốt ở lợn. Vacxin dưới đơn vị được phát triển bởi các tế bào nhân chuẩn biểu hiện các kháng nguyên protein E2 tái tổ hợp được sử dụng để phân biệt giữa đáp ứng miễn dịch được tạo ra bởi việc nhiễm virus tự nhiên với đáp ứng miễn dịch được tạo ra bởi vacxin dưới đơn vị. Vacxin được đánh dấu này sẽ thúc đẩy việc tinh chế virus gây sốt ở lợn.

Cụ thể, sáng chế tối ưu hóa trình tự gen của protein E2 của chủng gây dịch bệnh thuộc nhóm gen 2 của virus gây sốt ở lợn đã phân lập, vì vậy protein E2 tái tổ hợp có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện tế bào CHO (Chinese Hamster Ovary cell – tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc). Vacxin dưới đơn vị được xử lý kỹ thuật di truyền được tạo ra bằng cách nhũ hóa bằng tá chất dùng cho vacxin có độ an toàn và hiệu lực cao trong việc gây miễn dịch cho lợn, và đóng vai trò bảo vệ chắc chắn đối với các chủng gây dịch bệnh, và có thể được sử dụng làm vacxin được đánh dấu để tinh chế CSFV.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây bằng các ví dụ thực hiện. Tuy nhiên, cần hiểu rằng một phương án có thể được thực hiện theo các cách hoặc phương tiện khác nhau mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không cần nhắc lại, như, không chỉ giới hạn ở, các thay đổi về thông số thử nghiệm, sự thay thế các chất thử dùng trong thử nghiệm, và các yếu tố tương tự. Các phương pháp được sử dụng trong sáng chế có thể là các phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực sản xuất vacxin, và không bị giới hạn ở việc trích dẫn cụ thể các phương án trong sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện sáng chế

bằng các phương pháp thông thường khác.

Ví dụ 1: Sàng lọc protein E2 của virus gây sốt ở lợn

Trong năm 2018, các triệu chứng điển hình của bệnh sốt ở lợn xuất hiện ở các con lợn mà đã tiêm vaccin chứa virus gây sốt ở lợn đã biết (vaccin này là vaccin virus sống toàn phần thuộc kiểu gen 1.1) ở trang trại lợn. Để phân lập nguồn gây bệnh, lá lách của các con lợn bị chết được thu thập trong điều kiện vô trùng, huyền phù được đồng hóa bằng nước muối vô trùng, ly tâm và thu lấy dịch nổi. Sau khi làm vô trùng, dịch nổi được chủng vào trong các tế bào tinh hoàn lợn (ST, Swine Testis-). 96 giờ sau đó, thu gom dịch nổi chứa virus cho lần đầu tiên; và 72 giờ sau đó, thu gom dịch nổi chứa virus cho lần thứ hai. Dung dịch virus sau khi thu gom được tinh chế và chủng virus được thu lấy sau đó. Chủng virus này được phân tích và phát hiện các đặc điểm của virus về nồng độ virus, tính sinh miễn dịch, tính đặc hiệu và độ tinh khiết, v.v., và các kết quả cho thấy rằng có phản ứng đặc hiệu diễn ra giữa chủng virus đã phân lập và huyết thanh chứa virus gây sốt ở lợn, và không có tạp nhiễm vi khuẩn, vi khuẩn mycoplasma và virus ngoại sinh.

Việc phát hiện đặc trưng của chủng virus đã sàng lọc theo phương án này được tiến hành, và các kết quả cho thấy rằng chủng này là virus gây sốt ở lợn. Kết quả của phép thử thử thách này thể hiện rằng virus đã sàng lọc này có thể gây chết cho lợn, và việc giải phẫu cũng cho thấy rằng có hiện tượng chảy máu ở các cơ quan bên trong, hoại tử, và nhồi máu.

Gen của protein E2 (được đề cập là gen E2) được đọc trình tự, protein này là protein cấu trúc của chủng đã sàng lọc và xác định. Gen E2 có chiều dài 1110 cặp bazơ (bp, Base Pair) và mã hóa 370 axit amin. Trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, và trình tự nucleotit của gen mã hóa là SEQ ID NO:2. Cây tiến hóa di truyền và việc phân tích độ tương đồng về trình tự nucleotit được tiến hành trên trình tự gen E2 hiện tại và trên trình tự gen E2 được lưu trữ trong ngân hàng gen (GenBank), và đã phát hiện thấy rằng độ tương đồng về axit amin của gen E2 hiện tại và chủng độc lực Shimen hiện đang được sử dụng là khoảng 87%, và độ tương đồng về axit amin của gen E2 hiện tại với axit amin của kiểu gen 2.1d phổ biến là khoảng 98%. Kết quả này cho thấy rằng virus nêu trên đã đột biến và vaccin 1.1 không còn khả năng bảo vệ khỏi chủng gây dịch bệnh là virus gây

sốt ở lợn.

Ví dụ 2: Xây dựng cấu trúc plasmit tái tổ hợp để biểu hiện gen E2

1. Ghép nối và tối ưu hóa gen E2

Miền Pestivirus_E2 của gen E2 được cắt cụt, và 23aa ở đầu tận cùng N và 32aa ở đầu tận cùng C được cắt bỏ để giúp protein này gấp nếp tốt hơn thành cấu trúc bậc ba và để lộ ra nhiều vị trí kháng nguyên của protein E2 hơn. Đồng thời, codon của gen E2 được tối ưu hóa, và trình tự axit amin sau khi tối ưu và cải biến là SEQ ID NO:3, mà có thể biểu hiện rõ vị trí kháng nguyên. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO:3 được tối ưu hóa trên codon, và trình tự nucleotit của gen đã tối ưu hóa là SEQ ID NO:4.

Trình tự SEQ ID NO:4 được tổng hợp bởi công ty Shanghai Bioengineering Co., Ltd. và được cài xen vào trong vector puc57 để thu được puc57-seq4.

2. Xây dựng cấu trúc plasmit tái tổ hợp 14.4-E2

2.1 Phản ứng tiêu hóa nhờ enzym

(1) Dán nhãn vào ống EP dung tích 1,5ml được sử dụng, bổ sung các mẫu và trộn trong ống EP dung tích 1,5ml nêu trên theo bảng dưới đây; thể tích của hệ phản ứng là 50 μ L, như được thể hiện dưới đây:

Thành phần được bổ sung	Thể tích (μ L)
Vector	2 μ g
Endonucleaza giới hạn BstI	2,5
Endonucleaza giới hạn HindIII	2,5
10X đệm	5
dd H ₂ O (double-distilled H ₂ O – H ₂ O chưng cất hai lần)	Bổ sung đến 50

Đối với mỗi phản ứng tiêu hóa nhờ enzym, vector trong bảng nêu trên được chọn từ một trong số các vector pEE14.4 (plasmit), puc57-seq4 và puc57-seq1 tương ứng, trong đó puc57-seq1 có thể được sử dụng làm nhóm đối chứng. Ba vector nêu trên lần lượt được cho trải qua phản ứng tiêu hóa nhờ enzym.

(2) Ống EP dung tích 1,5ml ở bước (1) được đặt trong chậu nước có nhiệt độ không đổi 37°C trong 2-3 giờ. Ba hệ thống tiêu hóa bằng hai enzym lần lượt được tạo ra.

2.2 Thu hồi sản phẩm tiêu hóa bằng hai enzym trên gel

Các hệ thống tiêu hóa bằng hai enzym lần lượt được lấy ra, và các mảnh ADN trong các hệ thống này lần lượt được thu hồi bằng phương pháp điện di trên gel agarosa. Các mảnh plasmid, và các mảnh ADN (chứa gen đích) của gen E2 đã tối ưu, lần lượt được thu lấy.

(1) Dán nhãn vào ống EP thu mẫu, cột hấp thụ và ống thu gom.

(2) Cân ống EP rỗng đã dán nhãn và ghi lại giá trị cân được.

(3) Cắt cẩn thận dải ADN đích duy nhất trên dụng cụ cắt gel bằng dao khỏi gel agarosa, và đặt nó vào trong ống nghiệm sạch dùng để ly tâm dung tích 1,5ml.

(4) Bổ sung 600µl đệm chiết vào trong ống dùng để ly tâm dung tích 1,5ml ở bước (3) và đặt trong bể nước 50°C trong khoảng 5 phút. Trong thời gian này, quay liên tục ống nghiệm dùng để ly tâm lên và xuống từ từ để đảm bảo hòa tan hoàn toàn khối gel để thu được dung dịch thứ nhất.

(5) Bổ sung dung dịch thứ nhất thu được ở bước (4) vào trong cột hấp thụ, sau đó ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 giây; thải bỏ chất thải lỏng khỏi ống thu gom và đặt cột hấp thụ trong ống thu gom.

(6) Bổ sung 600µl đệm chiết vào trong cột hấp thụ, sau đó ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 giây; thải bỏ chất thải lỏng khỏi ống thu gom và đặt cột hấp thụ trong ống thu gom.

(7) Bổ sung 600µl đệm rửa vào trong cột hấp thụ, để nguyên trong 3 phút; sau đó ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 giây; thải bỏ chất thải lỏng khỏi ống thu gom và đặt cột hấp thụ trong ống thu gom.

(8) Lặp lại bước (7).

(9) Ly tâm cột hấp thụ rỗng ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ đệm rửa nhiều nhất có thể; đặt cột hấp thụ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và sấy khô kỹ.

(10) Đặt cột hấp thụ trong ống thu gom, nhỏ từng giọt đệm rửa giải với thể tích 50 μ L (gia nhiệt sơ bộ đến 65°C) vào vị trí trung tâm của màng hấp thụ, để nguyên trong 3 phút, và sau đó ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút.

(11) Lấy ống ly tâm ở bước (10) ra khỏi máy ly tâm, lấy cột hấp thụ ở giữa ra, đẩy nắp ống ly tâm, và giữ mẫu ADN trong ống ly tâm này.

(12) Đặt mẫu ADN ở bước (11) ở 4°C để bảo quản, và chuẩn bị điện di trên gel agarosa để xác định và thu hồi các mảnh ADN trên gel. Theo đó, vectơ pEE14.4 đã làm thẳng và gen đích có thể thu được tương ứng cho phản ứng nối sau đó.

Trong ví dụ này, kit chiết gel được mua của công ty Hangzhou Bioer Technology Co., LTD.

2.3 Phản ứng nối

(1) Dán nhãn vào ống ly tâm dung tích 0,2ml được sử dụng.

(2) Bổ sung các mẫu vào ống ly tâm dung tích 0,2ml đã dán nhãn theo hệ phản ứng 20 μ l như được thể hiện trong bảng như dưới đây:

Thành phần được bổ sung	Thể tích (μ l)
Vectơ pEE14.4 đã làm thẳng	50~200ng
Mảnh ADN cài xen	20~200ng
Ligaza	1
10X đệm	2
dd H ₂ O	Được bổ sung đến 20

Mảnh ADN cài xen trong bảng nêu trên là gen đích thu được ở bước 2.2 (12).

(3) Sau khi bổ sung các mẫu, trộn các thành phần bằng cách khuấy từ từ bằng pipet vài lần.

(4) Đặt ống ly tâm dung tích 0,2ml ở 37°C và để phản ứng trong 30 phút; sau khi phản ứng hoàn thành, đặt ống phản ứng ngay vào trong bể nước đá trong 5 phút để làm lạnh. Dung dịch phản ứng nối chứa các sản phẩm phản ứng được tạo ra, và các sản phẩm phản ứng là các plasmit mang gen đích.

(5) Các sản phẩm phản ứng ở bước (4) có thể được sử dụng trực tiếp để biến nạp hoặc được bảo quản ở -20°C để rã đông và biến nạp khi cần.

2.4 Phản ứng biến nạp

(1) Bổ sung nhanh $10\mu\text{l}$ dung dịch phản ứng nối vào $100\mu\text{l}$ tế bào khả biến (tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được chọn trong ví dụ này) trong ống mẫu, trộn bằng cách khuấy sử dụng pipet, và đặt trong bể đá trong 30 phút.

(2) Sau bước (1), lấy ra ống mẫu, đặt nó trong bể nước có nhiệt độ 42°C trong 100 giây, và sau đó đặt ngay sang bể đá trong 2 phút.

(3) Sau bước (2), lấy ra ống mẫu, bổ sung $600\mu\text{l}$ môi trường LB lỏng vào ống mẫu trên kệ làm việc siêu sạch, và đặt ống mẫu trên máy lắc có nhiệt độ không đổi ở 37°C , 220 vòng/phút, và ủ trong 1 giờ.

(4) Chuẩn bị đĩa biến nạp: chuẩn bị các đĩa chịu được LB để biến nạp theo tính kháng của plasmit.

(5) Phủ đĩa: lấy ống mẫu ra, ly tâm ở nhiệt độ phòng ở 8.000 vòng/phút trong 2 phút; lấy ra $600\mu\text{l}$ dịch nối, và tái tạo huyền phù vi khuẩn ở đáy ống bằng lượng dịch nối còn lại; đặt dịch lỏng chứa vi khuẩn đã tái tạo huyền phù ở tâm của đĩa biến nạp tương ứng của nó, và dàn đều dịch lỏng chứa vi khuẩn ở tâm của đĩa biến nạp bằng que.

(6) Đặt các đĩa ở bước (5) trong máy ủ sinh học có nhiệt độ không đổi ở 37°C và ủ trong 1 giờ, sau đó lật ngược các đĩa biến nạp và ủ trong 15 giờ; và thu lấy các dòng đơn (nghĩa là, một khuẩn lạc duy nhất).

(7) Quan sát và ghi lại kết quả biến nạp.

2.5 Chiết plasmit tái tổ hợp và xác định bằng PCR.

2.5.1 Chiết plasmit tái tổ hợp

(1) Sử dụng đầu của pipet dung tích $10\mu\text{l}$ để chọn lựa dòng đơn nêu trên (chứa plasmit tái tổ hợp) từ đĩa biến nạp cho vào 5ml môi trường LB lỏng có tính kháng ampicilin, lắc vi khuẩn này qua đêm ở 37°C , 220 vòng/phút.

(2) Dùng pipet hút dung dịch chứa vi khuẩn đưa vào trong ống EP dung tích 1,5ml, ly

tâm ở nhiệt độ phòng, 12.000 vòng/phút, trong 2 phút, và thải bỏ dịch nổi.

(3) Bổ sung 250µl đệm chứa chất thử chiết plasmit P1 vào ống EP ở bước (2) để tạo huyền phù hoàn toàn vi khuẩn nêu trên.

(4) Bổ sung 250µl đệm P2 vào dung dịch ở bước (3), và trộn bằng cách lật ngược từ từ ống ly tâm 5-10 lần trực tiếp, và để nguyên ở nhiệt độ phòng trong 2-4 phút.

(5) Bổ sung 350µl đệm N3 vào dung dịch ở bước (4), và trộn bằng cách lật ngược từ từ ống ly tâm 5-10 lần trực tiếp, và để nguyên ở nhiệt độ phòng trong 2-4 phút.

(6) Ly tâm dung dịch ở bước (5) ở nhiệt độ phòng, 14.000 vòng/phút, trong 10 phút.

(7) Chuyển dịch nổi ở bước (6) vào tâm của cột hấp thụ, ly tâm ở nhiệt độ phòng, 12.000 vòng/phút, 30 giây, và thải bỏ chất lỏng khỏi ống thu gom.

(8) Bổ sung 500µl đệm PE vào tâm của cột hấp thụ, ly tâm ở nhiệt độ phòng, 12.000 vòng/phút, 30 giây, và thải bỏ chất lỏng khỏi ống thu gom. Lặp lại một lần.

(9) Đối với cột hấp thụ rỗng, thực hiện ly tâm ở nhiệt độ phòng, 12.000 vòng/phút, 2 phút.

(10) Đặt cột hấp thụ trong ống ly tâm sạch dung tích 1,5ml, bổ sung 30µl đệm rửa giải vào trung tâm của màng hấp thụ, để nguyên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, và ly tâm ở nhiệt độ phòng, 12.000 vòng/phút, trong 2 phút; và bảo quản dung dịch ADN trong ống này ở 4°C.

Ở bước này, bằng cách nuôi cấy mở rộng và chiết plasmit tái tổ hợp, plasmit tái tổ hợp tương đối tinh khiết (plasmit tái tổ hợp 14.4-E2), nghĩa là, dung dịch ADN ở bước (10), được thu lấy cho quá trình gây nhiễm sau đó.

Trong phương án này, kit chiết plasmit được mua từ công ty QIAGEN.

2.5.2 Xác định bằng PCR

(1) Dán nhãn vào ống PCR được sử dụng, bổ sung các mẫu và trộn theo bảng sau đây. Hệ phản ứng là 25 µl.

Thành phần được bổ sung	Thể tích (µl)
-------------------------	---------------

Đoạn môi ngược (10 μ M)	0,5
Đoạn môi xuôi (10 μ M)	0,5
Khuôn mẫu plasmit đã chiết	0,5
2X hỗn hợp	12,5
Nước cất hai lần (dd H ₂ O)	Được bổ sung đến 25

Khuôn mẫu plasmit đã chiết trong bảng nêu trên là plasmit tái tổ hợp 14.4-E2 tương đối tinh khiết thu được sau khi chiết plasmit tái tổ hợp trong 2.5.1.

(1) Quy trình khuếch đại PCR

98°C	2 phút	}	30 chu trình
98°C	5 giây		
55°C	15 giây		
72°C	80 giây		
72°C	10 phút		
4°C	Vĩnh viễn		

(2) Đọc trình tự: Gửi plasmit tái tổ hợp 14.4-E2 đã xác định được là dương tính bằng PCR đến công ty đọc trình tự để đọc trình tự. Kết quả đọc trình tự cho thấy các nucleotit được cài xen trong plasmit tái tổ hợp phù hợp với danh sách trình tự SEQ ID NO:4, và các axit amin được dịch mã phù hợp với danh sách trình tự SEQ ID NO:3.

3 Xây dựng cấu trúc cho plasmit tái tổ hợp 14.4-E2-G418

Phương pháp xây dựng cấu trúc cho plasmit tái tổ hợp 14.4-E2-G418 là giống với phương pháp ở bước 2 trong ví dụ này.

Cụ thể, gen G418 trong phòng thí nghiệm và plasmit tái tổ hợp 14.4-E2 được xác định là dương tính bằng PCR, là enzym lần lượt được tiêu hóa bởi SmaI và EcoRI. Sau đó, các mảnh ADN thu được được nối, biến nạp và xác định, tương tự với bước 2 trong phương án này, để xây dựng cấu trúc cho plasmit tái tổ hợp 14.4-E2-G418.

Ví dụ 3: Chuyển nhiễm tế bào CHO-K1

(1) Chuẩn bị: Làm vô trùng bằng tia cực tím buồng an toàn sinh học trong 30 phút; môi trường nuôi cấy F-12 trong bể nước có nhiệt độ 37°C để gia nhiệt sơ bộ đến 37°C.

(2) Bổ sung 2,5µg ADN tái tổ hợp (nghĩa là, plasmid tái tổ hợp 14.4-E2-G418), P3000 (chất thử chuyển nhiễm) vào 125µl môi trường nuôi cấy OPTI-MEM và trộn đều. Bổ sung 3,75µl liposom Lipotectamin 3000 vào 125µl môi trường nuôi cấy OPTI-MEM và trộn đều. Trộn liposom nêu trên với ADN tái tổ hợp và để nguyên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

(3) Lấy ra các tế bào trong đĩa 6-lỗ (các tế bào CHO-K1) đã được để nguyên trong 24 giờ trước đó khỏi máy ủ ở 37°C, thải bỏ môi trường dịch nổi, rửa các tế bào này ba lần bằng môi trường nuôi cấy OPTI-MEM được gia nhiệt sơ bộ, và thải bỏ môi trường nuôi cấy OPTI-MEM.

(4) Bổ sung 2ml môi trường nuôi cấy F-12 chứa huyết thanh bào thai bê mang kháng thể kếp 10%, 1% vào mỗi lỗ chứa tế bào.

(5) Bổ sung từ từ hỗn hợp gồm ADN tái tổ hợp và liposom vào tế bào trong mỗi lỗ chứa tế bào, trộn từ từ, và nuôi cấy trong máy ủ tế bào ở 37°C, 5%CO₂.

(6) 72 giờ sau khi chuyển nhiễm các tế bào CHO-K1, thu gom dịch nổi để phát hiện protein, và bổ sung các tế bào này vào G418 để sàng lọc theo áp lực.

(7) Sau 144 giờ sau đó, thu lấy các tế bào đơn dòng; kiểm tra các tế bào đơn dòng này và khuếch đại các tế bào dương tính (nghĩa là, các tế bào CHO tái tổ hợp), mà có thể được sử dụng để sản xuất protein trên quy mô lớn.

Theo phương án này, chất thử gây nhiễm được mua từ Thermo Fisher Scientific Co., LTD.

Ví dụ 4: Tinh chế và phát hiện protein

1. Biểu hiện và xác định protein E2 tái tổ hợp trong các tế bào CHO

Nuôi cấy các tế bào đã chọn từ Ví dụ 3 (nghĩa là, các tế bào dương tính) ở 37°C đến 240 giờ, và thu gom dung dịch protein cứ 48 giờ một lần với tổng số là 5 lần, và tiến hành phân tích protein của dung dịch protein đã thu gom 5 lần bằng SDS-PAGE. Kết quả cho thấy rằng gen E2 trước khi tối ưu hóa không được biểu hiện trong các tế bào CHO, trong khi đó gen E2 đã tối ưu hóa được biểu hiện trong các tế bào CHO.

2. Tinh chế protein E2 tái tổ hợp bằng sắc ký

Dịch nổi với thể tích dung dịch protein E2 được thu gom ở bước 1 được cho chạy sắc ký ái lực sử dụng môi trường GE's Ni Sepharose Excel. Dịch nổi sau khi thu gom được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút, dưới dạng dung dịch nạp.

2.1 Rửa môi trường bằng nước cất với thể tích gấp 5 lần thể tích cột.

2.2 Rửa môi trường bằng đệm cân bằng với thể tích gấp 5 lần thể tích cột.

2.3 Nạp mẫu, và cột có thể được nạp bằng 4mg protein/ μ l.

2.4 Rửa môi trường bằng đệm rửa với thể tích gấp 20 lần thể tích cột.

2.5 Rửa giải protein bằng đệm rửa giải thể tích gấp 5 lần thể tích cột.

3 Thử nghiệm thẩm tách Tây (Westernblot)

Tiến hành SDS-PAGE trên virus toàn phần gây sốt ở lợn và protein được tạo ra ở bước 2 của ví dụ này một cách đồng thời, chuyển các dải protein đích lên màng polyvinyliden florua (PVDF, Polyvinylidene Fluoride) bằng phương pháp bán sấy khô ở 20 vôn và chuyển và thấm hút trong 30 phút, phong bế màng chuyển bằng đệm phong bế trong đêm đó, rửa ba lần bằng dung dịch đệm phosphat-tween (PBST, phosphate buffer solution-tween), được xử lý bằng dịch pha loãng 1:500 của huyết thanh dương tính virus gây sốt ở lợn ở 37°C trong 1,5 giờ, rửa ba lần bằng PBST, xử lý bằng dịch pha loãng 1:2000 của peroxidaza cải ngựa (HRP, horseradish peroxidase) được đánh dấu kháng thể đánh dấu bằng enzym dê kháng lợn ở 37°C trong 1,5 giờ, rửa ba lần bằng PBST, xử lý bằng dung dịch cơ chất trong 5 phút, và tiến hành hiện màu trong hệ thống chụp hình gel chemiDOC. Kết quả cho thấy rằng dải virus toàn phần rất mờ, trong khi đó dải protein E2 được biểu hiện bởi gen này có trình tự nucleotit đã tối ưu hóa SEQ ID NO:4 trong tế bào CHO lại rất sáng, điều đó thể hiện rằng protein E2 được biểu hiện có tính sinh miễn dịch tốt.

4 Huỳnh quang miễn dịch gián tiếp

Sau khi các tế bào (nghĩa là, các tế bào CHO tái tổ hợp) được cố định, trong suốt và được phong bế, v.v., bổ sung kháng thể đơn dòng thể His vào. Sau khi ủ ở 37°C trong 2

giờ, rửa ba lần bằng PBS và bổ sung kháng thể thứ hai phát ánh sáng huỳnh quang màu xanh lá cây để ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sử dụng kính hiển vi huỳnh quang soi ngược để quan sát và chụp ảnh để lưu lại. Kết quả cho thấy rằng các tế bào CHO mang gen E2 mà không có sự tối ưu hóa gen không có ánh sáng huỳnh quang đặc trưng, trong khi đó các tế bào CHO mang gen E2 có sự tối ưu hóa gen có ánh sáng huỳnh quang đặc trưng mạnh.

Ví dụ 5: Sản xuất và xác định hiệu lực của vaccin

1. Sản xuất vaccin

(1) Làm vô trùng tá chất 201 ở 116°C trong 40 phút trong áp suất cao; và giữ nhiệt độ của tá chất 201 này trong bể nước ở khoảng 37°C trước khi sử dụng.

(2) Pha chế pha nước: trộn dung dịch protein đã tinh chế thu được ở bước 2 của Ví dụ 4 với dung dịch nước muối vô trùng theo tỷ lệ thích hợp sao cho nồng độ protein trong mỗi 0,2 ml pha nước không nhỏ hơn 10 ug/ml.

(3) Nhũ hóa: lấy cùng trọng lượng pha dầu và pha nước, nhũ hóa ở 10000 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi nhũ hóa, lấy 10ml, và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút, với pha nước đã kết tủa ở đáy ống không vượt quá 0,5ml, theo đó thu được vaccin.

2. Xác định hiệu lực của vaccin

1) Thử nghiệm miễn dịch trên các con thỏ

Chia 10 con thỏ trắng Nhật Bản có trọng lượng khoảng 2,5kg mỗi con thành hai nhóm. 5 con thỏ ở nhóm miễn dịch được tiêm dưới da 0,2ml vaccin dưới đơn vị, và 5 con còn lại ở nhóm đối chứng trống không được gây miễn dịch. 21 ngày sau khi gây miễn dịch, thu gom máu ở tĩnh mạch tai, tách riêng lấy huyết thanh, và tiến hành việc phát hiện kháng thể bằng thử nghiệm ELISA. Kết quả cho thấy rằng các kháng thể trong nhóm miễn dịch đều dương tính và tỷ lệ phong bế là trên 60%, trong khi đó các kháng thể ở nhóm đối chứng đều âm tính và tỷ lệ phong bế dưới 30%.(xem bảng 1)

Bảng 1: Phát hiện kháng thể 21 ngày sau khi gây miễn dịch các con thỏ bằng vaccin dưới đơn vị

Nhóm	Số	Liều gây miễn dịch (ml/con	Số ngày sau khi gây miễn dịch lần	Tỷ lệ phong bế	Âm tính/Dương	Tỷ lệ dương
------	----	----------------------------	-----------------------------------	----------------	---------------	-------------

		thỏ)	thứ nhất (ngày)	(%)	tính	tính
Nhóm miễn dịch	1	0,2	21	72,3	Dương tính	5/5
	2	0,2	21	79,4	Dương tính	
	3	0,2	21	77,7	Dương tính	
	4	0,2	21	74,1	Dương tính	
	5	0,2	21	76,2	Dương tính	
Nhóm đối chứng	6	/	21	20,3	Âm tính	0/5
	7	/	21	22,1	Âm tính	
	8	/	21	17,5	Âm tính	
	9	/	21	20,3	Âm tính	
	10	/	21	16,4	Âm tính	

2) Kết quả về tính sinh miễn dịch ở các con lợn

Chia ngẫu nhiên 15 con lợn khỏe mạnh dễ nhiễm bệnh (cả kháng nguyên virus gây sốt ở lợn và kháng thể ELISA đều cho kết quả âm tính) thành 3 nhóm với mỗi nhóm gồm 5 con. Nhóm thứ nhất được gây miễn dịch bằng nhóm virus toàn phần; mỗi con trong nhóm được tiêm trong cơ bằng 1,0ml vaccin; và 21 ngày sau khi gây miễn dịch lần đầu, tiến hành gây miễn dịch lần hai bằng cùng vaccin và cùng liều. Nhóm thứ hai là nhóm dùng vaccin đã biết trên thị trường miễn dịch, mỗi con trong nhóm này được tiêm trong cơ bằng 1,0ml vaccin loại này; và 21 ngày sau khi gây miễn dịch lần đầu, tiến hành gây miễn dịch lần hai bằng cùng vaccin và cùng liều. Nhóm thứ ba là nhóm đối chứng không được gây miễn dịch. Vào ngày thứ 14 sau khi gây miễn dịch lần hai, các mẫu máu được thu gom để phát hiện kháng thể kháng CSFV bằng ELISA, và sau đó mỗi con lợn được tiêm trong cơ bằng 1,0ml (chứa không ít hơn 105,0 liều gây chết tối thiểu (MLD, Minimum Lethal Dose-) của chủng đã phân lập từ Ví dụ 1 ở cổ, và quan sát đến ngày thứ 16. Trong thời gian quan sát, nếu có các con lợn bị chết thì ngay lập tức tiến hành mổ tử thi, và việc mổ tử thi này cũng nên được tiến hành đối với các con lợn còn lại vào thời điểm kết thúc thử nghiệm (16 ngày sau khi thử), và kết quả thử nghiệm cần được ghi lại.

Kết quả cho thấy rằng các kháng thể của 5 con lợn ở nhóm dùng vaccin dưới đơn vị và 5 con lợn ở nhóm dùng vaccin đã biết đều dương tính và tỷ lệ phong bế lần lượt là 80% và 60%. Tất cả các kháng thể trong nhóm đối chứng đều âm tính, và tỷ lệ phong bế

thấp hơn 30%. Sau khi thử, tất cả các con lợn ở nhóm đối chứng đều bị chết, và tất cả các con lợn ở nhóm dùng vaccin dưới đơn vị đều được bảo vệ, trong khi đó ở nhóm dùng vaccin đã biết có 3 con lợn được bảo vệ và 2 con lợn bị ốm yếu. (xem bảng 2)

Bảng 2: Phát hiện kháng thể ở lợn biểu hiện tính sinh miễn dịch protein E2 35 ngày sau khi gây miễn dịch lần thứ nhất

Nhóm	Số	Liều gây miễn dịch (ml/con lợn)	Số ngày sau khi gây miễn dịch lần thứ nhất (ngày)	Tỷ lệ phong bế (%)	Âm tính/Dương tính	Tác dụng bảo vệ trong vòng 16 ngày sau khi thử	Tỷ lệ bảo vệ
Nhóm dùng vaccin dưới đơn vị	1	1,0+1,0	35	88,6	Dương tính	Khỏe mạnh	5/5
	2	1,0+1,0	35	85,5	Dương tính	Khỏe mạnh	
	3	1,0+1,0	35	92,1	Dương tính	Khỏe mạnh	
	4	1,0+1,0	35	93,7	Dương tính	Khỏe mạnh	
	5	1,0+1,0	35	91,9	Dương tính	Khỏe mạnh	
Nhóm dùng vaccin đã biết	6	1,0+1,0	35	60,2	Dương tính	Ốm yếu	3/5
	7	1,0+1,0	35	69,4	Dương tính	Khỏe mạnh	
	8	1,0+1,0	35	68	Dương tính	Khỏe mạnh	
	9	1,0+1,0	35	60,4	Dương tính	Ốm yếu	
	10	1,0+1,0	35	70,1	Dương tính	Khỏe mạnh	
Nhóm đối chứng	11	/	35	15,7	Âm tính	Chết	0/5
	12	/	35	25,3	Âm tính	Chết	
	13	/	35	17,2	Âm tính	Chết	
	14	/	35	19,6	Âm tính	Chết	
	15	/	35	-3,1	Âm tính	Chết	

Lưu ý: "1,0+1,0" nghĩa là các nhóm được gây miễn dịch đều được gây miễn dịch hai lần, mỗi lần 1,0ml/con lợn, "/" nghĩa là nhóm đối chứng không được gây miễn dịch.

Tóm lại, vaccin dưới đơn vị E2 theo sáng chế cho kết quả thử tốt nhất và cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất trên chủng gây dịch bệnh, điều này cho thấy chủng gây dịch bệnh đã đột biến, và vaccin đã biết trên thị trường có thể không còn cho tác dụng bảo vệ nữa để chống lại sự tấn công của chủng gây dịch bệnh. Vaccin chống lại chủng gây dịch bệnh này thực sự rất cần thiết, vaccin dưới đơn vị protein E2 được đề xuất trong sáng chế là an toàn, ổn định và có tác dụng bảo vệ tốt và có triển vọng thương mại hóa tốt.

Các ví dụ đã mô tả ở trên chỉ là các phần mô tả các ví dụ được ưu tiên của sáng chế, và không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi và cải tiến khác

nhau được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ của sáng chế mà không vượt khỏi tinh thần của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dòng tế bào dùng để biểu hiện protein E2, trong đó dòng tế bào này là dòng tế bào E2-CHO bao gồm mảnh nucleotit mã hóa protein E2; và trình tự axit amin của protein E2 là SEQ ID NO:3.
2. Dòng tế bào theo điểm 1, trong đó trình tự của mảnh nucleotit là SEQ ID NO:4.
3. Protein E2, trong đó trình tự axit amin của protein E2 là SEQ ID NO:3.
4. Protein E2 theo điểm 3, trong đó trình tự của mảnh nucleotit mã hóa protein E2 là SEQ ID NO:4.
5. Vacxin dưới đơn vị của virus gây sốt ở lợn, trong đó vacxin dưới đơn vị này bao gồm kháng nguyên và tá chất dùng cho vacxin, và kháng nguyên này là protein E2 theo điểm 3.
6. Vacxin theo điểm 5, trong đó trình tự của mảnh nucleotit mã hóa protein E2 là SEQ ID NO:4.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD. OF QINGDAO

<120> Dòng tế bào biểu hiện protein E2, protein E2 và vacxin dưới đơn vị của virut gây sốt ở lợn

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 373

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 1

Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn
1				5					10					15	
Glu	Ile	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Trp	Lys	Glu
				20				25					30		
Tyr	Asn	His	Gly	Leu	Gln	Leu	Asp	Asp	Gly	Thr	Val	Arg	Ala	Ile	Cys
				35				40					45		
Thr	Ala	Gly	Ser	Phe	Lys	Val	Thr	Ala	Leu	Asn	Val	Val	Ser	Arg	Arg
				50				55					60		
Tyr	Leu	Ala	Ser	Leu	His	Lys	Arg	Ala	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Phe
65					70				75					80	
Glu	Leu	Leu	Phe	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Gly	Ile	Glu	Glu	Met	Gly	Asp
				85					90					95	
Asp	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Cys	Pro	Phe	Asp	Thr	Ile	Pro	Val	Val	Lys
				100					105					110	
Gly	Lys	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Ala	Phe	Tyr	Leu	Val
				115					120					125	

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

Gln Leu Ala Ala Gly

370

<210> 2

<211> 1119

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 2

cggttgctct gtaaggaaga ctacaggtat gctatatcat caaccaatga gatagggccca	60
ctaggggctg aaggtctcac caccacttgg aaagaataca accacggcctt gcagctggac	120
gacgggactg tcagggccat ttgcactgca gggctcttca aagttacagc acttaatgtg	180
gttagtagga ggtacctagc atcattacat aagagggcctt tgtccacctc agttacattt	240
gaactcctat ttgatgggac caccacaggt attgaggaaa tgggagatga cttcggattt	300
gggctgtgcc cttttgacac aatccctgtg gtcaaaggga agtacaacac cactttatta	360
aacggcagtg ctttctatct agtctgccca atagggtgga cgggcgtcat agagtgcacg	420
gcagtgagcc ccactacctt gagaacagaa gtggtaaaaa cctttaagag agagaagccc	480
ttcccgca ca gagtggattg cgtgaccact atagtagaaa aagaggacct gttctactgc	540
aagatcgggg gcaattggac atgtgtgaaa ggcaaccggg tgacctacat gggggggcaa	600
gtaaagcaat gcaggtggtg cgggtttgac ttcaaagaac ccgatgggct cccgcattac	660
cccataggca agtgcctcct agcaaatgag acgggttaca gggtagtgga ttccacagac	720
tgcaacagag aaggtgttgt tataagtact gaaggagaac atgagtgcct gatcggaac	780
accaccgtaa aagtacacgc gttggatgaa agactggccc ctatgccgtg tagacccaaa	840
gagatcgtct ctagtgcggg acctgtaagg aaaacttctt gcactttcaa ctatacaaag	900
actctaagaa acaagtacta tgagcctagg gacagctact tccagcagta tatgcttaag	960
ggagagtacc aatactggtt tgatctggac gtgactgacc accacacaga ctactttgct	1020
gaattttattg tcttggtggt agtggcacta ttagggggaa ggtacgttct gtggctaata	1080
gtaacctaca tagtactaac agagcaactt gctgccggt	1119

<210> 3

<211> 318

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 3

Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Lys Glu Tyr Asn His Gly Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Asp Asp Gly Thr Val Arg Ala Ile Cys Thr Ala Gly Ser Phe Lys Val
 20 25 30
 Thr Ala Leu Asn Val Val Ser Arg Arg Tyr Leu Ala Ser Leu His Lys
 35 40 45
 Arg Ala Leu Ser Thr Ser Val Thr Phe Glu Leu Leu Phe Asp Gly Thr
 50 55 60
 Thr Pro Gly Ile Glu Glu Met Gly Asp Asp Phe Gly Phe Gly Leu Cys
 65 70 75 80
 Pro Phe Asp Thr Ile Pro Val Val Lys Gly Lys Tyr Asn Thr Thr Leu
 85 90 95
 Leu Asn Gly Ser Ala Phe Tyr Leu Val Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly
 100 105 110
 Val Ile Glu Cys Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg Thr Glu Val
 115 120 125
 Val Lys Thr Phe Lys Arg Glu Lys Pro Phe Pro His Arg Val Asp Cys
 130 135 140
 Val Thr Thr Ile Val Glu Lys Glu Asp Leu Phe Tyr Cys Lys Ile Gly
 145 150 155 160
 Gly Asn Trp Thr Cys Val Lys Gly Asn Pro Val Thr Tyr Met Gly Gly
 165 170 175
 Gln Val Lys Gln Cys Arg Trp Cys Gly Phe Asp Phe Lys Glu Pro Asp
 180 185 190
 Gly Leu Pro His Tyr Pro Ile Gly Lys Cys Ile Leu Ala Asn Glu Thr

195	200	205
Gly Tyr Arg Val Val Asp Ser Thr Asp Cys Asn Arg Glu Gly Val Val		
210	215	220
Ile Ser Thr Glu Gly Glu His Glu Cys Leu Ile Gly Asn Thr Thr Val		
225	230	235
Lys Val His Ala Leu Asp Glu Arg Leu Ala Pro Met Pro Cys Arg Pro		
245	250	255
Lys Glu Ile Val Ser Ser Ala Gly Pro Val Arg Lys Thr Ser Cys Thr		
260	265	270
Phe Asn Tyr Thr Lys Thr Leu Arg Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp		
275	280	285
Ser Tyr Phe Gln Gln Tyr Met Leu Lys Gly Glu Tyr Gln Tyr Trp Phe		
290	295	300
Asp Leu Asp Val Thr Asp His His Thr Asp Tyr Phe Ala Glu		
305	310	315

<210> 4

<211> 960

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 4

atggaagggc tcaccacaac ctggaaagaa tacaaccacg ggttgcagct tgacgacggt	60
acagtgaggg ccatctgtac agcaggatct ttttaaggtga ccgctttgaa tgttgtttca	120
cggcgggtatc tggcaagtct tcacaaaagg gcactctcca caagtgttac tttcgagctc	180
ctttttgacg gcaccacacc cggcatcgaa gagatggggg acgattttgg attcggattg	240
tgtccttttcg acactattcc agttgtcaag ggtaagtaca acactactct gctcaacgga	300
tccgcattct atcttgtctg tcctatcggg tggacaggtg ttattgaatg caccgctgtc	360
agtccaacta ccctgagaac tgaagtcgtt aaaaccttca aaagggaata gcccttcccc	420
caccgcgttg attgcgtcac aactattgtg gaaaaagaag atttgttcta ctgtaagata	480

ggaggcaatt ggacctgtgt caaaggaaat cccgttacct acatgggcgg acaggtgaaa	540
cagtgtagat ggtgtggttt cgacttcaaa gaacctgacg gacttccaca ttaccctatc	600
ggtaaatagt tattggcaaa tgaaacaggg taccgagtag ttgactctac cgattgcaac	660
cgcgagggtg tcgtaatttc tactgaggga gagcacgaat gcctgatagg aacacaacc	720
gtgaaagtac atgctcttga cgaacgactc gcacccatgc catgccgcc aaaggaaatc	780
gtctcatctg ccggacctgt gcgaaaaact tcctgtacct tcaactacac caagactctg	840
agaaataagt attatgaacc cagagattct tatttccagc agtatatgct gaaaggagag	900
tatcagtatt ggttcgatct cgacgttaca gaccatcaca ctgactactt tgcagaataa	960