



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

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

(11) 
1-0020186

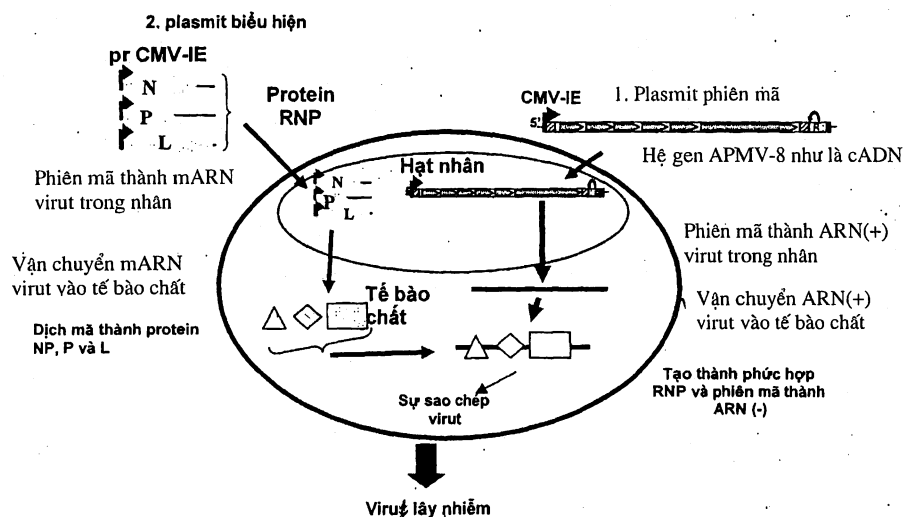
(51)⁷ **A61K 39/00, 39/155, 39/12, C12N 7/00, (13) B**
C07K 14/005, C12N 15/86

- (21) 1-2012-00747 (22) 20.08.2010
(86) PCT/US2010/046179 20.08.2010 (87) WO2011/022656 24.02.2011
(30) 61/235,912 21.08.2009 US
(45) 25.12.2018 369 (43) 25.12.2012 297
(73) 1. Merial Limited (US)
3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096, United States of America
2. UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. (US)
Room 634, Boyd Graduate Studies Research Center, Athens, GA 30602-7411, United States of America
(72) BUBLOT, Michel (BE), MEBATSION, Teshome (ET), PRITCHARD, Joyce (US), MUNDT, Egbert (DE)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) **VACXIN PARAMYXOVIRUT THUỘC LOÀI CHIM TÁI TỔ HỢP**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm hoặc vaccin APMV được xử lý bằng công nghệ di truyền. Vaccin hoặc chế phẩm này có thể là chế phẩm hoặc vaccin APMV tái tổ hợp. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp cải biến hệ gen APMV để tạo ra APMV tái tổ hợp; APMV cải biến được tạo ra bằng các phương pháp này; trình tự ADN và protein; và phương pháp tạo ra các tế bào chuyển nhiễm và động vật chủ bằng APMV tái tổ hợp này.

Hệ di truyền ngược APMV-8



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến paramyxovirut thuộc loài chim (APMV: avian paramyxoviruses) và trình tự APMV. Sáng chế còn đề cập đến vector virut có xen đoạn và biểu hiện các gen ngoại lai để dùng làm vật mang miễn dịch an toàn để bảo vệ chống lại nhiều loại tác nhân gây bệnh. Sáng chế còn đề cập đến vaccin vector trong hệ di truyền ngược dùng để sản xuất vaccin sống đã được làm giảm độc lực. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit có thể dùng để tạo ra cấu trúc tiểu đơn vị trong vector biểu hiện *in vitro* hoặc dùng làm trình tự để hợp nhất vào vector biểu hiện *in vivo* thuộc dạng virut hoặc plasmit.

Sáng chế đề cập đến virut APMV không được cải biến và cải biến, các phương pháp tạo ra và sử dụng nó, và trình tự ADN và protein nhất định. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến virut APMV trong đó hệ gen như trong tự nhiên của virut đã được biến đổi ("các đột biến APMV" hoặc "APMV tái tổ hợp") và các phương pháp tạo ra và sử dụng các đột biến APMV hoặc APMV tái tổ hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong lĩnh vực phát triển vaccin thì vaccin trên cơ sở vector virut là một hướng phát triển nhanh nhất. Nhiều vaccin dựa trên vector virut đang được triển khai lâm sàng để phòng các bệnh chuyển nhiễm toàn cầu quan trọng như HIV, bệnh lao và bệnh sốt rét. Các vaccin vector virut cho động vật, ví dụ như vaccin vector bệnh đậu gà dùng cho động vật nuôi và gia cầm, vaccin vector virut ecpet ở loài chim dùng cho gia cầm, và vaccin vector virut gây bệnh đậu mùa cho động vật hoang dại, đã được đưa vào thị trường. Còn các vaccin vector khác cho gia súc cũng đang được phát triển. Vaccin vector virut có ưu điểm là chúng có thể được sử dụng một cách an toàn do dùng khung vector đã được làm giảm độc lực nhiều và không gây bệnh cho động vật. Nhược điểm của vector virut hiện

được sử dụng là sự có mặt của kháng thể được truyền từ mẹ hoặc kháng thể có được từ lần bị chuyển nhiễm trước. Các kháng thể này sẽ trung hoà vector virus đưa vào và do đó làm giảm tác dụng của vacxin vector. Một động cơ chủ yếu thúc đẩy sự phát triển vacxin vector là sự xuất hiện của virus cúm H5N1 có khả năng gây bệnh cao xuất hiện đầu tiên ở châu Á và sau đó ở châu Âu và châu Phi. Một số vacxin vector dự tuyển đã được phát triển bao gồm vacxin vector trên cơ sở virus gây bệnh đậu gà (Taylor et al, 1988), virus gây bệnh đậu mùa (Chambers et al., 1988), virus sácôm Rous (Hunt et al, 1988), adenovirus (Tang et al., 2002, Gao et al, 2006), virus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (Schultz-Cherry et al, 2000), virus gây bệnh Newcastle (US6,719,979, Veits et al., 2006, Swayne et al, 2002, Park et al, 2006), virus ecpet gây viêm nhiễm thanh-khí quản (Veits và các đồng tác giả 2003), virus ecpet gà tây (Darteil et al., 1995), và adenovirus (Hoelscher et al, 2008, Toro et al, 2007). Các vacxin vector này đã được đánh giá hiệu quả ở các loài chim nguyên thể, nhưng cho đến nay chưa có báo cáo nào công bố hiệu quả của chúng ở chim đã có sẵn khả năng sinh miễn dịch với vector virus và/hoặc protein được mã hoá bởi các đoạn cài xen.

Họ virus *Paramyxoviridae* bao gồm cả các tác nhân gây bệnh cho người (virus bệnh sởi, virus bệnh quai bị, virus gây bệnh khó thở ở trẻ em và virus hợp bào hô hấp) và cho động vật (virus bệnh Newcastle và virus gây dịch tả trâu bò) có tác động lớn đến sức khoẻ cộng đồng cũng như nền kinh tế toàn cầu (Lamb et al., 2007). Các thành viên thuộc họ virus này được xác định là có hệ gen ARN sợi đơn, đối mã, đơn sợi. Họ *Paramyxoviridae* bao gồm hai phân họ, cụ thể là *Paramyxovirinae* và *Pneumovirinae*. Theo hệ thống phân loại lại gần đây, phân họ *Paramyxovirinae* bao gồm năm giống, đó là *Morbillivirus*, *Henipavirus*, *Rubulavirus*, *Respirovirus* và *Avulavirus*, còn họ *Pneumovirinae* bao gồm *Pneumovirus* và *MetaPneumovirus* (Mayo, 2002). Paramyxovirus thuộc loài chim (APMV) được phân loại là thuộc giống *Avulavirus* và được xác định là gồm chín typ huyết thanh phân biệt về mặt kháng nguyên dựa trên xét nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI hemagglutination inhibition) (Alexander, 1988). Trong số 9 typ huyết thanh này, các thể phân lập thuộc kiểu phụ APMV-1 có thể gây bệnh có tính tàn sát cho gia cầm nuôi công nghiệp và được phân loại là virus gây bệnh

Newcastle (NDV Newcastle disease virus) có độc lực cao (velogenic). Các dạng virus NDV yếu hơn được gọi là thể phân lập virus có độc lực vừa (mesogenic) và virus có độc lực yếu (lentogenic), trong đó dạng độc lực yếu hầu như không gây ra triệu chứng trong gia cầm nuôi. Các thể phân lập APMV-2, 3, 6 và 7 cũng gây bệnh cho gia cầm nuôi. Cụ thể là, sự nhiễm các thể phân lập APMV-2 và 3 có thể gây ra bệnh đường hô hấp nhẹ và các vấn đề về chất lượng và số lượng trứng (Bankowski et al., 1981; Redmann et al., 1991; Tumova et al., 1979; Zhang et al., 2007). Các thể phân lập APMV-6 và 7 được biết là chuyển nhiễm gà tây, vịt và chim di cư và có thể gây bệnh đường hô hấp mà sau khi nhiễm khuẩn thứ phát có thể bị biến chứng (Saif et al., 1997; Shortridge et al., 1980). Mặt khác, các thể phân lập APMV-4, 5, 8 và 9 đã được phân lập từ vịt, chim nước và các loài chim rừng khác nhưng các loài chim này hiếm khi thể hiện các triệu chứng lâm sàng sau khi nhiễm virus (Alexander et al., 1983; Capua et al., 2004; Gough et al., 1984; Maldonado et al., 1995; Shortridge et al., 1980).

Người ta đã xác định trình tự hệ gen của một số thể phân lập NDV và sử dụng chúng để làm sáng tỏ yếu tố quyết định khác nhau của độc lực virus NDV (de Leeuw et al., 1999; Krishnamurthy et al., 1998; Zou et al., 2005). Trong hai năm gần đây, một số trình tự APMV khác ngoài APMV1 đã được công bố, chẳng hạn như số truy cập Genbank EU338414 cho APMV-2, EU403085 cho APMV-3, FJ177514 cho APMV-4, EU622637 cho APMV-6, FJ231524 cho APMV-7, FJ215863, FJ215864 và FJ619036 cho APMV-8, EU910942 cho APMV-9. Ngoài thông tin về trình tự, chưa biết nhiều về các yếu tố độc lực của virus. Các thể phân lập APMV 2-9 phần lớn được phân lập từ chim di cư. Đáng lưu ý là, có rất ít báo cáo về sự chuyển nhiễm thử nghiệm các thể phân lập này ở gà (Saif et al., 1997). Vì các APMV này chủ yếu nhiễm ở chim rừng, nhưng trong một số trường hợp cũng đã phân lập được chúng từ đàn vật nuôi công nghiệp (Zhang et al., 2007), mà đôi khi cũng biểu hiện thành bệnh (Saif et al., 1997; Shihmanter et al., 1998; Shihmanter et al., 1998), nên hiểu biết về độc lực của virus ở gia cầm là điều cần thiết.

Phần lớn các thể phân lập APMV gây bệnh tương đối nhẹ nhưng bệnh này có thể bị trầm trọng hơn khi có mặt đồng thời sự nhiễm vi khuẩn hoặc nhiễm virus và có thể ảnh hưởng đến giá trị kinh tế. Đặc biệt là, vào năm 1956 APMV-2 lần đầu tiên được phân

lập như là tác nhân gây bệnh thứ cấp ở gà mắc bệnh viêm thanh khí quản cấp ở Southern California (Bankowski et al., 1960). Kể từ đó đã phân lập được nhiều chủng thuộc typ huyết thanh này từ một số loài chim, điều đó cho thấy là APMV-2 phân bố rộng rãi trên thế giới (Andral et al., 1984; Bradshaw et al., 1979; Fleury et al., 1979; Goodman et al., 1988; Lang et al., 1975; Lipkind et al., 1982; Lipkind et al., 1979; Zhang et al., 2006). Theo báo cáo của Bankowski *et. al.*, sự phơi nhiễm tự nhiên cũng như nhân tạo gà tây mái đang thời kỳ đẻ trứng với APMV-2 làm giảm rõ rệt tỷ lệ nở trứng và hiệu suất thu gia cầm (Bankowski et al., 1981). Những ví dụ ban đầu về dạng phân lập APMV-4 là dạng thu được từ vịt hoang dã săn được trên đường di cư Mississippi ở Mỹ (Webster et al., 1976) và từ gà, vịt và ngỗng ở Hồng Kông trong chương trình theo dõi bệnh cúm gia cầm (Alexander et al., 1979). Ngoài thể phân lập từ màng kết đeo nhãn đánh dấu mắc bệnh viêm ruột sốt xuất huyết (Gough et al., 1984), tất cả các thể phân lập khác dường như không gây bệnh cho gia cầm và được nhận thấy là phân bố rộng rãi ở chim nước trên khắp thế giới (Stanislawek et al., 2002; Tumova et al., 1989; Yamane et al., 1982). Gough và các đồng tác giả đã cho biết rằng không có triệu chứng lâm sàng và thu được hiệu giá HI rất thấp (1:8 hoặc nhỏ hơn) sau khi chuyển nhiễm thể phân lập từ màng kết đeo nhãn đánh dấu cho vịt con một tuần tuổi và gà hai tuần tuổi qua đường mũi (Gough et al., 1984). Tương tự, các thể phân lập APMV-6 đầu tiên từ gia cầm nuôi ở Hồng Kông trong chương trình theo dõi bệnh cúm gia cầm được báo cáo là không gây bệnh cho gà dựa trên kết quả hiệu giá HI thấp ở gà được chuyển nhiễm thử nghiệm (Shortridge et al., 1980). Tuy nhiên, đã có báo cáo về sự nhiễm APMV-6 ở gà tây dẫn tới bệnh hô hấp thể nhẹ và ảnh hưởng tới việc đẻ trứng (Alexander, 2003).

APMV-8 (Goose/Delaware/1053/76) được phân lập lần đầu ở Mỹ từ ngỗng Canada săn được (*Branta canadensis*) (Rosenberger et al., 1974). Khảo sát huyết thanh học (từ năm 1990 đến 1992) chim săn bắn ở miền Nam Tây Ban Nha cho thấy tỷ lệ hiện diện của kháng thể APMV-8 lên đến 43% trong số các huyết thanh được thử nghiệm (Maldonado et al., 1995). Một nghiên cứu huyết thanh khác để xác định tình trạng của vịt trời khỏe mạnh còn sống ở New Zealand đối với sự nhiễm APMV cho thấy sự có mặt của kháng thể APMV-8 trong 56% số huyết thanh được thử nghiệm (Stanislawek et al.,

2002). Warke et al (2008) đã cho thấy là từ 16% đến 31% số huyết thanh gà được kiểm tra có thể đã có kháng thể APMV-8. Nhưng do hiệu giá cao vốn có đối với APMV1, nên có thể xảy ra khả năng cho xét nghiệm HI dương tính sai vì huyết thanh không phản ứng rất đặc hiệu trong thử nghiệm HI. Chỉ với ngoại trừ một số thể phân lập APMV-8 ở chim nước được phân lập khi các quần thể này được theo dõi virus cúm chim (Stallknecht et al., 1991), gần như không có thông tin về tỷ lệ hiện diện và khả năng gây bệnh của virus này.

Nhờ sự phát triển các hệ di truyền ngược cho hệ gen ARN sợi âm tính của NDV, nên đã có thể cài xen các trình tự gen ngoại lai vào hệ gen, do đó có thể tạo ra các vector NDV tái tổ hợp dùng làm vacxin và phép trị liệu gen (Krishnamurthy et al., 2000; Peeters et al., 1999; Roemer-Oberdoerfer et al., 1999). Đã có báo cáo về các vector NDV tái tổ hợp biểu hiện các protein virus lạ chẳng hạn như protein HA của kiểu phụ H1 của virus cúm A (Nakaya et al., 2001), protein VP2 virus gây bệnh Gumboro ở gà (IBDV Infectious Bursal Disease virus) (Huang et al., 2004), ngưng kết tổ hồng cầu virus cúm chim thuộc kiểu phụ H5 (Veits et al., 2006; Ge et al., 2007) và kiểu phụ H7 (Park et al., 2006). Tuy nhiên, hiệu quả của đa phần các vacxin này mới chỉ được chứng tỏ ở chim SPF (specific pathogen free). NDV gây bệnh tàn sát cho gia cầm dẫn đến những tổn thất kinh tế nghiêm trọng trong ngành công nghiệp chăn nuôi gia cầm. Vì vậy, ở phần lớn các nước trên thế giới, gà nuôi công nghiệp thường được chủng ngừa chống NDV. Do đó, gà từ đàn bố mẹ đã được chủng ngừa thường có mức kháng thể cao được truyền từ mẹ. Các vacxin NDV sống thông thường có tác dụng bảo vệ ngay cả khi có mặt các kháng thể này. Tuy nhiên, vacxin NDV tái tổ hợp (tức là có cài xen gen ngoại lai) thường được làm giảm độc lực nhiều hơn so với vacxin NDV sống, do đó hiệu quả của chúng có thể bị giảm đi khi có mặt kháng thể NDV từ mẹ. Do đó, cần thiết tìm kiếm nền tảng vacxin vector có thể là cơ sở tạo ra vacxin có biểu hiện kháng nguyên khác loài an toàn. Lý tưởng là, vacxin tái tổ hợp này có thể gây ra đáp ứng miễn dịch thể dịch mạnh, có thể sử dụng được hàng loạt, và không đắt tiền.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến vaccin hoặc chế phẩm chứa (i) APMV tái tổ hợp và (ii) chất mang được dụng hoặc dùng được trong thú y. Sáng chế bao gồm các phương pháp cải biến hệ gen APMV để tạo ra virus hoặc vectơ virus APMV tái tổ hợp APMV; APMV cải biến được tạo ra bằng các phương pháp này; trình tự ADN và protein; và các phương pháp các tế bào chuyển nhiễm và động vật chủ bằng APMV tái tổ hợp như vậy để thúc đẩy quá trình khuếch đại ADN ngoại sinh và protein được mã hoá bởi ADN ngoại sinh, bao gồm protein có tính kháng nguyên, ở các tế bào và động vật chủ nêu trên.

Một khía cạnh theo sáng chế đề xuất virus APMV, trình tự ADN và protein tham gia vào quá trình tạo ra virus cải biến hoặc tái tổ hợp. Một phương án theo sáng chế đề cập đến trình tự hệ gen và protein của APMV-2, 4, 6, hoặc 8.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất virus APMV cải biến tái tổ hợp, có độ an toàn tăng lên, đáp ứng miễn dịch thể dịch mạnh, và phương pháp tạo ra các virus tái tổ hợp như vậy.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất vaccin hoặc chế phẩm virus APMV tái tổ hợp có mức độ an toàn tăng lên so với đã biết vaccin APMV hoặc các vaccin tái tổ hợp khác.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vectơ virus không được cải biến và APMV cải biến dùng để biểu hiện sản phẩm gen trong cơ thể chủ.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất virus APMV tái tổ hợp được cải biến bằng cách xen đoạn vào nó ADN từ nguồn bất kỳ vào vùng liên gen hoặc vùng không thiết yếu của hệ gen APMV này. Các thể virus tái tổ hợp APMV được cải biến bằng phương pháp tổng hợp mang các gen khác loài mã hoá và biểu hiện kháng nguyên, được sử dụng theo sáng chế để tạo ra chế phẩm hoặc vaccin mới.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất vector virus APMV mà tạo ra hệ di truyền ngược, trong đó vector này có thể được sử dụng làm khung cho các vaccine hoặc chế phẩm tái tổ hợp ở các động vật chủ khác nhau.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm hoặc vaccine dùng để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật chủ được chủng ngừa chế phẩm hoặc vaccine này, chế phẩm hoặc vaccine này bao gồm chất mang được dùng và a virus APMV tái tổ hợp cải biến hoặc vector virus. Theo một khía cạnh khác nữa theo sáng chế, virus hoặc vector virus APMV tái tổ hợp này bao gồm, trong vùng không thiết yếu của hệ gen virus, ADN khác loài mã hoá protein có tính kháng nguyên thu được từ tác nhân gây bệnh, trong đó chế phẩm hoặc vaccine này khi được phân phối cho cơ thể chủ, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với protein được mã hoá bởi tác nhân gây bệnh.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên ở động vật, phương pháp này gồm chủng ngừa cho động vật bằng vaccine hoặc được phẩm chứa virus APMV tái tổ hợp cải biến hoặc vector virus mà chứa và biểu hiện yếu tố quyết định kháng nguyên của tác nhân gây bệnh cho động vật nêu trên. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên ở động vật bằng cách dùng chế độ cơ bản-tăng cường.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện sản phẩm gen trong tế bào nuôi cấy *in vitro* bằng cách đưa vào tế bào này virus APMV tái tổ hợp được cải biến, trong đó gen này có thể là protein có tính kháng nguyên thu được từ tác nhân gây bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phần sau đây mô tả chi tiết, bằng cách ví dụ, và không được dự định nhằm giới hạn sáng chế ở các phương án cụ thể được mô tả, có thể được hiểu khi tham khảo các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig. 1 là bảng thể hiện sự phân lập virus từ một số cơ quan gà sau khi chuyển nhiễm thử nghiệm bằng APMV-2, 4, 6 trong trứng gà có phôi.

Fig. 2 là bảng thể hiện các kết quả phân tích mô của một số cơ quan gà sau khi chuyển nhiễm thử nghiệm bằng APMV-2, 4, 6.

Fig. 3 thể hiện hiệu giá kháng thể HI ở gà SPF được chủng ngừa thử nghiệm bằng APMV-2, 4 hoặc 6. Các mẫu huyết thanh gà được gom vào ngày 2, 4, 7, 14 và 28 sau khi chuyển nhiễm được đem đi xét nghiệm HI để phân tích sự có mặt của kháng thể HI.

Fig. 4 thể hiện hiệu giá kháng thể HI ở gà SPF và vịt được chuyển nhiễm thử nghiệm bằng APMV-8. Gà và vịt được chuyển nhiễm qua đường mũi-miệng liều 10^6 EID₅₀ APMV-8. Các mẫu huyết thanh được gom vào ngày 2, 4, 7, 14, và 28 bằng cách tiêm trong màng bụng (p. i.) và được phân tích bằng xét nghiệm HI bằng kháng nguyên APMV-8. Hiệu giá huyết thanh HI (theo log₂) được thể hiện trên trục bên trái.

Fig. 5 thể hiện sự phát triển của hiệu giá kháng thể HI ở gà SPF trong lịch trình chủng ngừa cơ bản/tăng cường bằng APMV-8. Gà SPF một ngày tuổi được chuyển nhiễm vào ngày 1 (cơ bản) và ngày 14 (tăng cường) với liều 10^6 EID₅₀ APMV-8. Các mẫu huyết thanh được thu nhận vào ngày 7 và 14 p.i. sau lần chuyển nhiễm đầu tiên và ngày 7 và 14 p.i. sau lần chuyển nhiễm thứ hai. Huyết thanh này được đem xét nghiệm HI. Hiệu giá huyết thanh HI (theo log₂) được thể hiện trên trục bên trái.

Fig. 6 thể hiện phân tích các sản phẩm RT-PCR bằng điện di trên gel agarosa. Các mô khí quản được lấy vào ngày 2 p.i. từ những con vịt không được chuyển nhiễm

(C1-C5) và vịt được chuyển nhiễm APMV-8 (I1-I5). Các mô này được làm đồng nhất hoá và điều chế ARN cho RT-PCR. Mẫu đối chứng nước (W) được điều chế song song. Sản phẩm phản ứng được tách ra trên gel agarosa 1,5 %. Kích cỡ của the mảnh được không chế bằng cách sử dụng thang 100 bp (cặp bazơ) (New England Biolabs). Kích cỡ của các mảnh ADN được thể hiện ở bên phải.

Fig. 7 là bảng thể hiện sự phân lập virus từ gà và vịt được chuyển nhiễm thử nghiệm bằng APMV-8. Sự phân lập virus từ mô gà được thực hiện trong trứng gà có phôi và sự phát hiện ARN virus từ mô vịt bằng RT-PCR.

Fig. 8 là bảng thể hiện kết quả của việc xét nghiệm mô một số cơ quan sau khi chuyển nhiễm gà và vịt Bắc kinh bằng APMV-8.

Fig. 9 thể hiện sự phát triển của hiệu giá kháng thể HI ở gà SPF sau khi chuyển nhiễm bằng liều APMV-8 khác nhau. Gà SPF một ngày tuổi được chuyển nhiễm vào ngày 1 bằng liều gây nhiễm khác nhau (ID infectious dose) APMV-8 hoặc được chuyển nhiễm giả bằng môi trường chuyển vận virus (VTM virus transport medium). Máu được lấy vào ngày 7 và 14 p.i. và các mẫu huyết thanh thu được được phân tích bằng xét nghiệm HI. Hiệu giá huyết thanh HI (theo log₂) được thể hiện trên trục bên trái. Hiệu giá trung bình hình học (GMT geometric mean hiệu giá) của các mẫu huyết thanh được thể hiện ở hàng thấp nhất.

Fig. 10 thể hiện sự phát triển của hiệu giá kháng thể HI ở vịt Bắc kinh sau khi chuyển nhiễm bằng các liều APMV-8 khác nhau. Vịt Bắc kinh SPF một ngày tuổi được chuyển nhiễm vào ngày 1 bằng liều gây nhiễm (ID) APMV-8 khác nhau hoặc được chuyển nhiễm giả bằng môi trường chuyển vận virus (VTM). Máu được lấy vào ngày 7 và 14 p.i. và các mẫu huyết thanh thu được được phân tích bằng xét nghiệm HI. Hiệu giá huyết thanh HI (theo log₂) được thể hiện trên trục bên trái. Hiệu giá trung bình hình học (GMT) của các mẫu huyết thanh được thể hiện ở hàng thấp nhất.

Fig. 11 là bảng thể hiện các SEQ ID NO của các trình tự ADN và protein tương ứng.

Fig. 12 thể hiện trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của chủng APMV-8 (APMV-8: SCWDS ID: MA-7, được phân lập từ vịt trời) và bản đồ di truyền của hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ.

Fig. 12 còn thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:2) mã hoá Nucleoprotein (NP) APMV-8 và trình tự protein NP (SEQ ID NO:3).

Fig. 13 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:4) mã hoá Protein Phospho APMV-8 (P) và trình tự protein P (SEQ ID NO:5).

Fig. 14 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:6) mã hoá Protein nền của APMV-8 (M) và trình tự protein M (SEQ ID NO:7).

Fig. 15 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:8) mã hoá Protein dung hợp của APMV-8 (F) và trình tự protein F (SEQ ID NO:9).

Fig. 16 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:10) mã hoá Ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza (HN) của APMV-8 và trình tự protein HN (SEQ ID NO:11).

Fig. 17 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:12) mã hoá APMV-8 Polymeaza (L) và the L trình tự protein (SEQ ID NO:13). This APMV-8 L(1) protein được dịch mã từ codon ATG nằm ở vị trí 8273-8275 của SEQ ID NO:1.

Fig. 18 thể hiện trình tự protein (2) của Polymeaza (L) APMV-8 (SEQ ID NO:14). Protein APMV-8 L(2) này được dịch mã từ codon ATG nằm ở vị trí 8297-8299 của SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:14 không chứa 8 axit amin đầu tiên của SEQ ID NO:13.

Fig. 19A là biểu đồ dòng chảy của hệ di truyền ngược APMV-8. Fig. 19B thể hiện kết quả của sự sao chép của virus APMV-8 trong các tế bào MDCK.

Fig. 20 thể hiện kết quả xét nghiệm HI của gà giò công nghiệp 2 tuần sau khi dùng vacxin APMV-8.

Fig. 21 thể hiện kết quả xét nghiệm HI của gà giò công nghiệp 4 tuần sau khi dùng vaccin APMV-8.

Fig. 22 thể hiện các kết quả của xét nghiệm HI sau khi dùng vaccin *in ovo* vào ngày 18 (nghiên cứu 1).

Fig. 23 thể hiện các kết quả của xét nghiệm HI sau khi dùng vaccin *in ovo* vào ngày 19 (nghiên cứu 2).

Fig. 24 thể hiện các kết quả của xét nghiệm HI sau khi dùng vaccin *in ovo* vào ngày 18 (nghiên cứu 3).

Fig. 25 thể hiện trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ 5' (5'-FLG) và hệ gen có chiều dài đầy đủ 3' (3'-FLG), bao gồm trình tự nằm cạnh sườn.

Fig. 26 thể hiện bản đồ plasmit của pcNDA-NP, pcNDA-P, pcDNA-L, và pcDNA3-T7.

Fig. 27 thể hiện bản đồ plasmit của pUC18-MG-APMV-8 và pCITE4A-EGFP.

Fig. 28 thể hiện bản đồ plasmit của pUC57-FL-APMV-8.

Fig. 29 thể hiện trình tự hệ gen mini APMV-8.

Fig. 30 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein NP và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Fig. 31 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein P và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Fig. 32 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein M và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Fig. 33 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein F và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Fig. 34 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein HN và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Fig. 35 thể hiện sự sắp hàng thẳng hàng trình tự protein L và mức đồng nhất trình tự ở mức ADN và protein.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cần lưu ý là trong phần mô tả này và đặc biệt ở trong yêu cầu bảo hộ, các thuật ngữ chẳng hạn như “có chứa”, “chứa” và các từ tương tự có thể có nghĩa được chấp nhận trong luật patent Mỹ; ví dụ, các từ này có thể có nghĩa là “gồm có”, “gồm”, “gồm cả”, và các từ tương tự; và các thuật ngữ chẳng hạn như “chủ yếu bao gồm” và “chủ yếu là bao gồm” có nghĩa như được nêu trong luật patent Mỹ, ví dụ, các từ này cho phép sự có mặt của các thành phần không được chỉ ra, nhưng loại trừ các thành phần được tìm thấy là đã biết hoặc thành phần ảnh hưởng đến đặc tính cơ bản hoặc mới của sáng chế.

Trừ khi được lưu ý khác đi, các thuật ngữ khoa học được sử dụng theo nghĩa thông thường. Có thể tham khảo định nghĩa của các thuật ngữ chung trong lĩnh vực sinh học phân tử trong Benjamin Lewin, *Genes V*, do Oxford University Press xuất bản, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Các mạo từ số ít “a”, “an”, và “the” bao gồm nghĩa số nhiều trừ khi nội dung rõ ràng chỉ định khác đi. Tương tự, từ “hoặc” được dự định để bao gồm “và” trừ khi nội dung rõ ràng chỉ định khác đi. Cụm từ “hoặc” dùng để chỉ thành viên bất kỳ của một danh sách cụ thể và cũng bao gồm kết hợp bất kỳ của các thành viên thuộc danh sách đó.

Cần lưu ý trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ kèm theo và/hoặc các đoạn trong đó, thuật ngữ “Paramyxovirut thuộc loài chim” hoặc “APMV” được sử dụng thay đổi cho nhau, và dùng để chỉ và bao gồm APMV-1, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-5, APMV-6, APMV-7, APMV-8, và APMV-9.

Thuật ngữ “động vật” được dùng trong bản mô tả này bao hàm tất cả các động vật có vú, chim, và cá. Động vật như được sử dụng ở bản mô tả này có thể được chọn từ nhóm gồm ngựa (ví dụ, ngựa), chó (ví dụ, chó, chồn gulô, cáo, chó sói, chó rừng), mèo (ví dụ, sư tử, hổ, mèo nhà, mèo hoang, mèo to khác, và các giống mèo khác bao gồm báo gêpa và mèo rừng linh), cừu (ví dụ, cừu), bò (ví dụ, gia súc), lợn (ví dụ, lợn), cừu (ví dụ, cừu, dê, lamas, bò rừng bizon), gia cầm (ví dụ, gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cú, gà lôi, vịt, chim sẻ, diều hâu, quạ, đà điểu, đà điểu sa mạc Úc và đà điểu đầu mèo ở Úc), động vật linh trưởng (ví dụ, bộ bán hầu, phủ hầu, khỉ, con vượn, khỉ không đuôi), người, và cá. Thuật ngữ “động vật” cũng bao gồm động vật đơn lẻ ở tất cả các giai đoạn phát triển, bao gồm cả giai đoạn phôi thai và các mang bầu.

Các thuật ngữ “polypeptit” và “protein” được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả này dùng để chỉ polyme của các gốc axit amin liên tiếp.

Các thuật ngữ “axit nucleic”, “nucleotit”, và “polynucleotit” được sử dụng thay đổi cho nhau và dùng để chỉ ARN, ADN, ADN bổ trợ (cDNA ADN bổ trợ), hoặc cRNA (bổ trợ ARN) và các dẫn xuất của chúng, chẳng hạn như các chất chứa khung chính được cải biến. Cần nhận thức rằng sáng chế đề xuất các polynucleotit chứa trình tự bổ trợ với các trình tự được mô tả trong bản mô tả này. “Polynucleotit” được dự tính trong sáng chế bao gồm cả sợi thuận (từ 5' đến 3') và sợi bổ trợ ngược (3' to 5'). Các polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra theo các cách khác nhau (ví dụ bằng cách tổng hợp hóa học, bằng cách nhân dòng gen v.v.) và có thể có các dạng khác nhau (ví dụ mạch thẳng hoặc mạch nhánh, sợi đơn hoặc sợi đôi, hoặc dạng lai của chúng, đoạn môi, mẫu dò v.v.).

Thuật ngữ “ADN của hệ gen” hoặc “hệ gen” được sử dụng thay đổi cho nhau và dùng để chỉ thông tin có đặc tính di truyền của cơ thể chủ. ADN của hệ gen gồm có ADN

của nhân (còn được gọi là ADN nhiễm sắc thể) mà còn bao gồm cả ADN của lap thể (ví dụ, lục lạp) và cơ quan tế bào khác (ví dụ, ty thể). ADN của hệ gen hoặc hệ gen được dự tính theo sáng chế còn dùng để chỉ ARN của virus. ARN có thể là ARN sợi dương tính hoặc sợi âm tính. Thuật ngữ “ADN của hệ gen” được dự tính trong sáng chế bao gồm ADN của hệ gen chứa trình tự bổ trợ với các trình tự được mô tả trong bản mô tả này. Thuật ngữ “ADN của hệ gen” còn dùng để chỉ ARN thông tin (mRNA), ADN bổ trợ (cDNA), và ARN bổ trợ (cRNA). Thuật ngữ “RA (axit nucleic) hệ gen” như được sử dụng ở bản mô tả này bao gồm ARN, ARN thông tin, ARN bổ trợ, ADN và ADN bổ trợ.

Thuật ngữ “gen” được sử dụng dùng để chỉ chung đoạn polynucleotit bất kỳ có chức năng sinh học. Do đó, gen hoặc polynucleotit bao gồm các intron và exon như trong trình tự hệ gen, hoặc chỉ các trình tự mã hoá như trong ADN bổ trợ, chẳng hạn như khung đọc mở (ORF open reading frame), bắt đầu từ codon bắt đầu (codon metionin) và kết thúc bằng tín hiệu kết thúc (codon kết thúc). Gen và polynucleotit cũng có thể bao gồm vùng điều hòa biểu hiện của chúng, chẳng hạn như vùng khởi đầu phiên mã, vùng dịch mã và vùng kết thúc phiên mã. Do đó, cũng bao gồm gen khởi đầu và vùng gắn kết ribosom (nói chung các yếu tố điều hoà này nằm trong khoảng từ 60 và 250 nucleotit ở phía trên codon bắt đầu của trình tự mã hoá hoặc gen; Doree S M và các đồng tác giả; Pandher K và các đồng tác giả; Chung J Y và các đồng tác giả), gen kết thúc phiên mã (nói chung gen kết thúc nằm trong khoảng 50 nucleotit phía sau codon kết thúc của trình tự mã hoá hoặc gen; Ward C K và các đồng tác giả). Gen hoặc polynucleotit còn dùng để chỉ mảnh axit nucleic biểu hiện ARN thông tin hoặc ARN chức năng, hoặc mã hoá protein cụ thể, và bao gồm trình tự điều hoà.

Thuật ngữ “ADN khác loài” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ ADN thu được từ một sinh vật khác, chẳng hạn như dạng tế bào khác hoặc loại khác so với loại từ người nhận. Thuật ngữ này cũng bao gồm ADN hoặc mảnh của chúng trên cùng một hệ gen của ADN cơ thể chủ trong đó ADN khác loài được cài xen vào vùng của hệ gen mà khác với vị trí ban đầu của nó.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “kháng nguyên” hoặc “chất sinh miễn dịch” dùng để chỉ một chất gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trong cơ thể chủ động vật. Kháng nguyên này là toàn bộ cơ thể, bị giết, làm giảm độc lực hoặc còn sống; cấu trúc tiểu đơn vị hoặc phần cơ thể sinh vật; vectơ tái tổ hợp chứa phần cài xen có đặc tính miễn dịch; mẫu hoặc mảnh ADN có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch khi được trình bày đến cơ thể chủ động vật; polypeptit, biểu vị, hapten, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Theo cách khác, chất sinh miễn dịch hoặc kháng nguyên có thể chứa độc tố hoặc chất kháng độc tố.

Thuật ngữ “protein hoặc peptit có khả năng sinh miễn dịch” như được sử dụng ở bản mô tả này bao gồm các polypeptit có hoạt tính miễn dịch với nghĩa là khi được cấp cho cơ thể chủ, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch thuộc dạng thể dịch và/hoặc tế bào chống lại protein mày. Tốt hơn nếu mảnh protein có hoạt tính miễn dịch về cơ bản giống như hoạt tính của phân tử protein toàn phần. Do đó, mảnh protein theo sáng chế chứa hoặc chủ yếu chứa hoặc bao gồm ít nhất một biểu vị hoặc phần quyết định tính kháng nguyên. Thuật ngữ protein hoặc polypeptit “có khả năng sinh miễn dịch”, như được sử dụng ở bản mô tả này, bao gồm trình tự protein với chiều dài đầy đủ, các chất tương tự của chúng, hoặc phần sinh miễn dịch của chúng. Thuật ngữ “mảnh có khả năng sinh miễn dịch” dùng để chỉ mảnh protein bao gồm một hoặc nhiều biểu vị và do đó gây ra đáp ứng miễn dịch đã nêu trên. Các mảnh như vậy có thể được nhận diện bằng cách sử dụng một số kỹ thuật lập bản đồ biểu vị bất kỳ, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, ví dụ trong ấn phẩm, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Ví dụ, biểu vị mạch thẳng có thể được xác định ví dụ, bằng cách tổng hợp vào cùng một lúc một số lượng lớn peptit trên chất mang rắn, các peptit này tương ứng với phần phân tử protein, và cho peptit phản ứng với kháng thể trong khi mà các peptit này vẫn gắn với gắn với chất mang. Các kỹ thuật như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,708,871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. Tương tự, các biểu vị cấu dạng được nhận dạng một cách dễ dàng bằng cách xác định cấu dạng không gian của các axit amin chẳng hạn bằng phân

tích tinh thể học tia X và cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều. Xem ví dụ trong ấn phẩm: Epitope Mapping Protocols, đã nêu ở trên.

Thuật ngữ "protein hoặc peptit có khả năng sinh miễn dịch" còn dự định bao gồm các khuyết đoạn, bổ sung và thay thế vào trình tự, miễn là polypeptit thực hiện chức năng tạo ra đáp ứng miễn dịch như được xác định trong bản mô tả này. Thuật ngữ "biến thể bảo toàn" dùng để chỉ việc thay thế gốc axit amin gốc có hoạt tính sinh học tương tự, hoặc thay thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hoá không thay đổi hoặc là gốc khác tương đương về mặt sinh học. Liên quan đến khía cạnh này, các thay thế được ưu tiên đặc biệt sẽ thường là bảo toàn về bản chất, tức là các thay thế này xảy ra trong một họ axit amin. Ví dụ, các axit amin thường được chia thành bốn họ: (1) họ axit--aspartat và glutamat; (2) họ kiềm-lysin, arginin, histidin; (3) họ không phân cực-alanin, valin, loxin, isoloxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan; và (4) họ phân cực không mang điện tích-glyxin, asparagin, glutamin, xystin, serin, threonin, tycolophan. Phenylalanin, tryptophan, và tycolophan đôi khi được phân loại là axit amin thơm. Ví dụ về biến thể bảo toàn bao gồm việc thay thế một gốc kỵ nước chẳng hạn như isoloxin, valin, loxin hoặc metionin bằng một gốc kỵ nước khác, hoặc thay thế một gốc có cực bằng gốc có cực khác, chẳng hạn như thay thế arginin cho lysin, axit glutamic cho axit aspartic, hoặc glutamin cho asparagin, và các gốc tương tự; hoặc thay thế bảo toàn tương tự một axit amin bằng axit amin có liên quan về mặt cấu trúc sẽ không có tác động lớn đến hoạt tính sinh học. Các proteins có về cơ bản trình tự axit amin giống như phân tử tham khảo nhưng có thay thế axit amin đôi chút khác về cơ bản không làm thay đổi tính sinh miễn dịch của protein, do đó, vẫn nằm trong định nghĩa như là polypeptit tham khảo. Tất cả các polypeptit được tạo ra bằng các cải biến này đều bao hàm trong bản mô tả này. Thuật ngữ "biến thể bảo toàn" cũng bao gồm việc sử dụng axit amin được thế thay cho axit amin gốc không được thế miễn là kháng thể được sinh ra chống lại polypeptit được thế cũng phản ứng miễn dịch với polypeptit không được thế.

"Tế bào vật chủ" dùng để chỉ tế bào chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình đã bị biến đổi di truyền, hoặc có khả năng được biến đổi di truyền bằng cách đưa vào

polynucleotit ngoại sinh, chẳng hạn như plasmid tái tổ hợp hoặc vector. Khi đề cập đến các tế bào được biến đổi di truyền, thuật ngữ này dùng để chỉ cả tế bào được biến đổi ban đầu và thế hệ con của nó. Các polynucleotit có trình tự mong muốn có thể được cài xen vào vào vector nhân dòng hoặc vector biểu hiện thích hợp, và đến lượt mình vector này có thể được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và khuếch đại. Có thể đưa các polynucleotit vào tế bào vật chủ theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vector chứa polynucleotit quan tâm có thể được đưa vào tế bào vật chủ theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp thích hợp, bao gồm phương pháp hấp thu trực tiếp, sự nhập nội bào, chuyển nhiễm, giao phối, đục lỗ điện, chuyển nhiễm sử dụng canxi clorua, rubidi clorua, canxi phosphat, DEAE-dextran, hoặc các chất khác; phương pháp bắn phá gen; kỹ thuật lipofection (là kỹ thuật dùng liposom đưa chất liệu di truyền vào tế bào); và chuyển nhiễm (trong đó vector là có tính chuyển nhiễm, chẳng hạn như, vector virus retro). Việc lựa chọn vector hoặc polynucleotit đưa vào thường tùy thuộc vào đặc điểm của tế bào vật chủ.

Một "đáp ứng miễn dịch" đối với chế phẩm hoặc vắc xin là sự thay đổi trong cơ thể chủ đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể đối với chế phẩm hoặc vắc xin quan tâm. Thông thường, "đáp ứng miễn dịch" bao gồm nhưng không chỉ giới hạn trong số một hoặc nhiều tác dụng sau đây: sản xuất kháng thể, tế bào B, tế bào T trợ giúp, và/hoặc tế bào T gây độc tế bào, hướng đặc hiệu với kháng nguyên hoặc các kháng nguyên trong chế phẩm hoặc vắc xin quan tâm. Tốt hơn nữa, cơ thể chủ sẽ thể hiện đáp ứng miễn dịch trị liệu hoặc bảo vệ sao cho tính đề kháng với sự nhiễm mới sẽ được tăng lên và/hoặc độ nghiêm trọng lâm sàng của bệnh được giảm đi. Tác dụng bảo vệ như vậy sẽ được thể hiện bằng sự giảm đi hoặc không có các triệu chứng thông thường thể hiện ở cơ thể chủ bị nhiễm, thời gian thu nhận nhanh hơn và/hoặc hiệu giá virus thấp hơn ở cơ thể chủ bị nhiễm.

Một phương án của sáng chế đề xuất trình tự hệ gen ADN và trình tự protein được mã hóa của APMV-8. Trình tự ADN hệ gen bổ trợ (cDNA) của chủng APMV-8 theo sáng chế có trình tự polynucleotit như được nêu trong SEQ ID NO:1. Trình tự ADN bổ trợ hệ gen APMV-8 (SEQ ID NO:1) có mức đồng nhất trình tự 48% so với ADN hệ

gen của APMV-1 (SEQ ID NO:15), mức đồng nhất trình tự là 61% so với ADN hệ gen của APMV-2 (SEQ ID NO:16), mức đồng nhất trình tự là 47,2% so với ADN hệ gen của APMV-3 (SEQ ID NO:17), mức đồng nhất trình tự là 47,6 % so với ADN hệ gen của APMV-4 (SEQ ID NO:18), mức đồng nhất trình tự là 52% so với ADN hệ gen của APMV-6 (SEQ ID NO:19), mức đồng nhất trình tự là 53% so với ADN hệ gen của APMV-7 (SEQ ID NO:20), mức đồng nhất trình tự là 99,1% so với ADN hệ gen của APMV-8 (SEQ ID NO:37), mức đồng nhất trình tự là 96,5% so với ADN hệ gen của APMV-8 (SEQ ID NO:38), mức đồng nhất trình tự là 96,4% so với ADN hệ gen của APMV-8 (SEQ ID NO:39), mức đồng nhất trình tự là 48% so với ADN hệ gen của APMV-9 (SEQ ID NO:40). Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1, 2, 4, 6, 8, 10 hoặc 12, và biến thể hoặc mảnh của chúng. Sáng chế còn gồm sợi hỗ trợ với polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này. Còn theo một phương án nữa, sáng chế đề xuất a polypeptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14, và biến thể hoặc mảnh của chúng.

Ngoài ra, cũng dự định rằng các chất tương đồng của polynucleotit hoặc polypeptit từ chủng APMV, chẳng hạn như APMV-8, APMV-2, APMV-4, APMV-6 là nằm trong phạm vi sáng chế. Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “các chất tương đồng” bao gồm các đồng đẳng thích hợp, các chất tương tự và các bản sao. Thuật ngữ “các chất tương tự” dùng để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit có chức năng như nhau hoặc tương tự nhau, nhưng đã tiến hoá một cách riêng rẽ trong các sinh vật không có liên hệ với nhau. Thuật ngữ “các đồng đẳng thích hợp” dùng để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit từ các loài khác nhau, nhưng đã tiến hoá từ một gen tổ tiên chung trong quá trình hình thành loài. Thông thường, các đồng đẳng thích hợp mã hoá polypeptit có chức năng giống nhau hoặc tương tự nhau. Thuật ngữ “các bản sao” dùng để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit có liên hệ thông qua quá trình sao chép trong hệ gen. Các bản sao thường có chức năng khác nhau, nhưng các chức năng này có thể có liên hệ với nhau. Các chất tương tự, các đồng đẳng thích hợp, và các bản sao của polypeptit APMV kiểu đại có thể khác với polypeptit APMV kiểu đại bởi các cải biến sau dịch mã, bởi sự khác biệt trình tự axit amin, hoặc ở cả hai yếu tố này. Cụ thể là, các chất tương đồng theo

sáng chế thường sẽ thể hiện mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80-85%, 85-90%, 90-95%, hoặc 95%, 96%, 97%, 98% , 99% với toàn bộ hoặc một phần trình tự polynucleotit hoặc polypeptit của APMV-8, và sẽ thể hiện chức năng tương tự.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất ADN bổ trợ hệ gen của APMV-8 có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1. Còn theo một phương án nữa, polynucleotit này là sợi bổ trợ ngược của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1. Còn theo một phương án nữa, polynucleotit này hoặc sợi bổ trợ ngược của polynucleotit theo sáng chế có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất là 90%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với polypeptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất mảnh polynucleotit mã hoá polypeptit của AMPV-8, chẳng hạn như polynucleotit mã hoá polypeptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hoá polypeptit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất là 90%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với polypeptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14, hoặc bảo toàn biến thể, biến thể alen, dạng tương đồng hoặc mảnh có khả năng sinh miễn dịch chứa ít nhất tám hoặc ít nhất mười axit amin liên tiếp của một trong số các polypeptit này, hoặc kết hợp của các polypeptit này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit có trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO:1, 2, 4, 6, 8, 10, hoặc 12, hoặc biến thể của chúng. Còn theo một phương án nữa, polynucleotit này là sợi bổ trợ ngược của polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit hoặc sợi bổ trợ ngược của polynucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất là 90%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với một trong số polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1, 2, 4, 6, 8, 10, hoặc 12, hoặc biến thể của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với polypeptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất mảnh và các biến thể của polypeptit APMV được nhận diện nêu trên (SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14) được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này điều chế một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết rõ.

Các biến thể là polypeptit tương đồng có trình tự axit amin ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 14.

Các biến thể bao gồm các biến thể alen. Thuật ngữ "biến thể alen" dùng để chỉ polynucleotit hoặc polypeptit có hiện tượng đa hình dẫn đến thay đổi trình tự axit amin của protein và tồn tại trong quần thể tự nhiên (ví dụ, loài hoặc giống virus). Các biến dị alen tự nhiên như vậy thông thường có thể gây ra 1- 5% biến dị trong polynucleotit hoặc a polypeptit. Có thể nhận diện được các biến thể alen bằng cách tạo trình tự trình tự axit nucleic quan tâm ở một số loài khác nhau, mà có thể được thực hiện một cách dễ dàng bằng cách sử dụng mẫu dò lai để nhận diện cùng locus di truyền ở các loài này. Biến dị bất kỳ và tất cả biến dị axit nucleic như vậy và hiện tượng đa hình hoặc biến dị axit amin tạo ra là kết quả của biến dị alen tự nhiên và không làm biến đổi hoạt tính chức năng của của gen quan tâm, được dự định là nằm trong phạm vi sáng chế.

Thuật ngữ "đồng nhất" khi đề cập đến trình tự có thể dùng để chỉ, chẳng hạn, số vị trí có nucleotit hoặc axit amin đồng nhất chia cho số nucleotit hoặc axit amin trong trình tự ngắn hơn trong hai trình tự khi sự sắp hàng của hai trình tự có thể được xác định theo thuật toán Wilbur and Lipman (Wilbur and Lipman). Có thể xác định mức đồng nhất trình tự hoặc mức độ tương tự trình tự của hai trình tự axit amin, hoặc mức đồng nhất trình tự giữa hai trình tự nucleotit bằng cách sử dụng gói phần mềm Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Khi trình tự ARN được nêu là tương tự, hoặc có mức đồng nhất hoặc tương đồng trình tự với trình tự ADN, thì thymidin (T) trong

trình tự ADN được xem là tương đương với uraxil (U) trong trình tự ARN này. Do đó, các trình tự ARN là nằm trong phạm vi sáng chế và có thể thu được từ trình tự ADN, theo cách là thymidin (T) trong trình tự ADN này được xem là tương đương với uraxil (U) in trình tự ARN.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến được phẩm hoặc vaccin dùng để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật chủ được chủng ngừa vaccin hoặc chế phẩm này, vaccin hoặc chế phẩm này bao gồm chất mang được dụng và virus APMV tái tổ hợp cải biến hoặc vector virus. Theo một khía cạnh khác nữa theo sáng chế, virus hoặc vector virus APMV tái tổ hợp này bao gồm, trong vùng không thiết yếu của hệ gen virus, trình tự ADN khác loài mã hoá protein có tính kháng nguyên thu được từ tác nhân gây bệnh trong đó chế phẩm hoặc vaccin này khi được phân phối cho cơ thể chủ, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với protein được mã hoá bởi tác nhân gây bệnh này.

“Vector” dùng để chỉ plasmit, thể thực khuẩn, hoặc virus ADN hoặc ARN tái tổ hợp chứa polynucleotit khác loài sẽ được phân phối cho tế bào đích, hoặc là *in vitro* hoặc *in vivo*. Polynucleotit khác loài này có thể chứa trình tự quan tâm dùng cho mục đích phòng ngừa hoặc trị liệu, và tùy ý có thể ở dạng caxet biểu hiện. Như được sử dụng ở bản mô tả này, vector không nhất thiết là phải có khả năng sao chép trong tế bào đích hoặc đối tượng cuối. Thuật ngữ này bao gồm vector nhân dòng cũng như vector virus.

Thuật ngữ “được xử lý bằng công nghệ di truyền” hoặc “tái tổ hợp” dùng để chỉ polynucleotit có nguồn gốc bán tổng hợp hoặc tổng hợp hoặc là không xuất hiện trong tự nhiên hoặc được gắn kết với polynucleotit khác theo trật tự không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “vùng không thiết yếu” dùng để chỉ vùng hệ gen virus là không thiết yếu cho sự sao chép và sự nhân lên của virus trong nuôi cấy mô và sự khuyết hoặc bất hoạt nó có thể làm giảm độc tính của virus trong nhiều hệ động vật. Có thể làm khuyết đoạn vùng không thiết yếu bất kỳ hoặc phần của nó ra khỏi hệ gen APMV này hoặc có thể cài xen trình tự lạ vào nó, và khả năng sống và độ ổn định của APMV tái tổ hợp tạo ra từ sự khuyết hoặc cài xen có thể được sử dụng để đánh giá liệu vùng hoặc phần khuyết

đoạn của nó có thật sự là không thiết yếu. Theo một phương án, vùng không thiết yếu của hệ gen APMV này là vùng bất kỳ ở hệ gen APMV-2, 4, 6, hoặc 8 mà không mã hoá Polymeaza (L). Còn theo một phương án nữa, vùng không thiết yếu này chứa khung đọc mở mã hoá protein không thiết yếu. Theo khía cạnh này, khung đọc mở được chọn từ nhóm bao gồm nucleoprotein (NP), phosphoprotein (P), protein nền (M), protein dung hợp (F), và ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza (HN). Theo một phương án, vùng không thiết yếu này nằm trước gen NP. Theo một phương án khác, vùng không thiết yếu này nằm sau gen L. Còn theo một phương án nữa, vùng không thiết yếu này là vùng không mã hoá hoặc vùng liên gen. Theo khía cạnh này, vùng không mã hoá hoặc vùng liên gen có thể là vùng nằm giữa gen NP và P, nằm giữa gen P và M, nằm giữa gen M và F, hoặc nằm giữa gen F và HN trên hệ gen APMV-2, 4, 6, hoặc 8. Còn theo một phương án nữa, vùng không thiết yếu này có thể là vùng với vị trí nucleotit 1 - 140, 1526 - 1692, 2910 - 3085, 4195 - 4498, 6130 - 6382, 8116 - 8272, 8116 - 8289, hoặc 15013 - 15342 của SEQ ID NO:1.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm các thể ghép APMV trong đó một phần hoặc toàn bộ gen hoặc một số phần hoặc toàn bộ gen của vector APMV được thay bằng gen tương tự từ các virus khác, đặc biệt là các virus thuộc họ paramyxoviridae.

Theo một phương án theo sáng chế, vaccin hoặc dược phẩm này chứa kháng nguyên được chọn từ nhóm các tác nhân gây bệnh loài chim bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus gây bệnh viêm phế quản (IBV Infectious Bronchitis virus), virus gây bệnh Newcastle (NDV), virus gây hội chứng giảm đẻ (EDS egg drop syndrome virus), hoặc virus bệnh Gumboro ở gà (IBDV Infectious Bursal Disease virus), virus gây bệnh viêm nhiễm thanh khí quản (ILTV Infectious Laryngosus viêm phế quản virus), adenovirus loài chim, virus bệnh Marek (MDV Marek's disease virus), virus bệnh đậu gà, virus gây bệnh viêm ruột vịt (DEV duck enteritis virus), parvovirus vịt, virus cúm chim, APMV, chẳng hạn như APMV-1, và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án khác, vaccin hoặc dược phẩm này chứa kháng nguyên được chọn từ tác nhân gây bệnh ở mèo chẳng hạn như, nhưng không chỉ giới hạn trong số, virus ecpet mèo (FHV feline herpesvirus), calicivirus mèo (FCV feline calicivirus), virus bệnh bạch cầu mèo (FeLV feline leukemia virus), virus gây suy giảm miễn dịch mèo (FIV feline immunodeficiency virus), parvovirus mèo (FPV feline parvovirus), chứng viêm nhiễm phúc mạc mèo (FIPV feline infectious peritonitis virus), virus dại, và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Còn theo một phương án nữa, vaccin hoặc dược phẩm này theo sáng chế chứa kháng nguyên chọn từ tác nhân gây bệnh ở chó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, virus dại, virus ecpet chó (CHV feline herpesvirus), parvovirus chó (CPV canine parvovirus), virus gây bệnh sốt ho ở chó (CDV canine distemper virus), virus gây bệnh khó thở ở chó 2 (CPI2 canine parainfluenza 2), coronavirus chó, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Còn theo một phương án nữa, vaccin hoặc dược phẩm này chứa kháng nguyên chọn từ tác nhân gây bệnh ở ngựa, chẳng hạn như virus ecpet ngựa (typ 1 hoặc typ 4), virus cúm ngựa, bệnh uốn ván, virus west nile, arterivirus ngựa và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Còn theo một phương án nữa, vaccin hoặc dược phẩm này chứa kháng nguyên được chọn từ tác nhân gây bệnh ở bò, cừu hoặc dê, chẳng hạn như virus dại, rotavirus bò, virus gây bệnh khó thở ở bò typ 3 (bPIV-3 bovine parainfluenza virus type 3), coronavirus bò, virus tiêu chảy bò (BVDV bovine viral diarrhea virus), virus bệnh chân tay miệng (FMDV foot and mouth disease virus), virus gây dịch tả trâu bò (RPV Rinderpest virus), virus Peste des Petits ruminants ở động vật nhai lại (PPRV Peste des Petits Ruminants virus), virus sốt viêm chảy ác tính, virus hợp bào hô hấp bò (BRV bovine respiratory syncytial virus), virus bệnh viêm khí quản truyền nhiễm ở bò (IBR Infectious Bovine Rhinotracheitis virus), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án khác nữa, vaccin hoặc dược phẩm này chứa kháng nguyên được chọn từ tác nhân gây bệnh ở lợn chẳng hạn như, nhưng không chỉ giới hạn trong số, virus cúm lợn (SIV swine influenza virus), circovirus lợn typ 2 (PCV-2 porcine circovirus type 2), virus hội chứng sinh sản và hô hấp hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS porcine reproductive respiratory syndrome virus), virus giả dại (PRV pseudorabies virus), parvovirus lợn (PPV porcine parvovirus), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* và các dạng tương tự, và kết hợp của chúng.

Cấu trúc của virus tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như mô tả, ví dụ, trong các patent Mỹ số 4,769,330, 4,722,848, 4,603, 112, 5,174, 993, và 5,756,103, 6,719,979. Cụ thể là, virus APMV tái tổ hợp này có thể được cấu trúc theo hai bước. Trước hết, gen quan tâm sẽ được cài xen vào virus, chẳng hạn như là khung đọc mở của kháng nguyên từ APMV-1 (NDV) hoặc virus cúm chim hoặc sinh vật khác, được đưa vào cấu trúc plasmid *E.coli* mà ADN bổ trợ tương đồng với phần ADN bổ trợ của APMV này được cài xen vào đó. Một cách độc lập, trình tự gen ADN bổ trợ sẽ được cài xen ở phía sau vùng gen khởi đầu (vùng bắt đầu gen) và tiếp đó là vùng kết thúc gen đặc hiệu cho vector APMV. Mảnh ADN bắt đầu gen/kháng nguyên lạ/kết thúc gen nằm cạnh sườn mảnh ADN bổ trợ tương đồng với ADN bổ trợ chứa APMV-8 có các vị trí phân cắt bằng enzym giới hạn duy nhất. Sau đó, cấu trúc plasmid tạo ra được khuếch đại bằng cách nuôi vi khuẩn *E.coli* và phân lập. Tiếp theo, plasmid tái tổ hợp này được sử dụng trong phân cắt bằng enzym giới hạn để cắt mảnh ADN bắt đầu gen/kháng nguyên lạ/kết thúc gen nằm cạnh sườn ADN bổ trợ tương đồng của ADN bổ trợ APMV-8 và mảnh này được gắn vào cấu trúc có chiều dài đầy đủ APMV-8 được phân cắt một cách thích hợp.

Cấu trúc có chiều dài đầy đủ chứa gen quan tâm được chuyển nhiễm vào tế bào cùng với plasmid chứa polynucleotit để biểu hiện nucleoprotein của APMV (NP), phosphoprotein của APMV (P) và ARN polymeaza APMV (L) cũng như ARN polymeaza T7. Tất cả các cấu trúc cDNA của APMV nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu polymeaza T7. Sự thu nhận virus gây nhiễm được thực hiện như mô tả trong Römer-

Oberdörfer et al., 1999 và như được chỉ ra trên Fig. 19A. Có thể thu được biểu hiện của ARN polymeaza T7 trong các tế bào chuyển nhiễm bằng các phương pháp khác nhau bao gồm chuyển nhiễm ADN plasmit chứa caxet biểu hiện của ARN polymeaza T7, virus tái tổ hợp (chẳng hạn như virus bệnh đậu gà hoặc virus canarypox) biểu hiện ARN polymeaza T7 hoặc trong các tế bào biểu hiện ARN polymeaza T7. Theo một phương án khác, các polynucleotit dùng để biểu hiện nucleoprotein APMV (NP), phosphoprotein APMV (P) và ARN polymeaza APMV (L) và cRNA virus có chiều dài đầy đủ nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu sớm ngay lập tức của virus cự bào người. Sự thu nhận virus được thực hiện như mô tả trong Inoue K, et al., 2003.

Sự biểu hiện thành công của ADN bổ trợ cải xen quan tâm (ADN bổ trợ lạ hoặc ADN bổ trợ khác loài) bằng virus gây nhiễm được cải biến đòi hỏi hai điều kiện. Trước hết, đoạn xen phải được đưa vào vùng hệ gen của virus sao cho virus được cải biến vẫn còn sống. Điều kiện thứ hai cho sự biểu hiện ADN bổ trợ được cải xen là sự có mặt của trình tự điều hoà cho phép biểu hiện gen này trong nền virus (chẳng hạn như: bắt đầu gen, gen dừng, gen khởi đầu, gen tăng cường, các tín hiệu bổ sung chuỗi poly (A), vùng liên gen và vùng không dịch mã).

Nói chung, tốt hơn là sử dụng gen khởi đầu chức năng mạnh trong các tế bào có nhân điển hình. Theo một phương án, gen khởi đầu được dùng để phiên mã ARN thông tin của virus bằng ARN polymeaza của virus là “trình tự bắt đầu gen”. “Trình tự bắt đầu gen” là vị trí gắn kết cho protein L gắn kết và phiên mã ARN virus nằm sau thành ARN thông tin của virus.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc phân phối của vaccin APMV với lượng hữu hiệu trị liệu để chuyển vận và biểu hiện kháng nguyên, biểu vị hoặc chất sinh miễn dịch trong tế bào đích. Việc xác định một lượng điều trị hiệu quả là thử nghiệm thông thường đối với chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, chế phẩm vaccin APMV chứa vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hoá kháng nguyên, biểu vị hoặc chất sinh miễn dịch và chất mang, tá dược lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y. Theo một phương án khác, chất mang, tá dược

lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y tạo thuận lợi cho quá trình chuyển nhiễm và/hoặc cải thiện sự tồn tại của vector hoặc protein.

Các chất mang hoặc tá dược lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, chất mang hoặc tá dược lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y có thể là dung dịch 0,9% NaCl (ví dụ, nước muối) hoặc dung dịch đệm phosphat. Các chất mang hoặc tá dược lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y khác mà có thể được sử dụng cho các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số poly-(L-glutamat) hoặc polyvinylpyrrolidon. Các chất mang hoặc tá dược lỏng hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y có thể là hợp chất bất kỳ hoặc kết hợp của các hợp chất tạo thuận lợi cho việc cấp vector (hoặc protein được biểu hiện từ vector theo sáng chế *in vitro*), hoặc tạo thuận lợi cho quá trình chuyển nhiễm và/hoặc cải thiện sự duy trì vector (hoặc protein). Liều và thể tích liều được bàn luận trong bản mô tả này trong phần mô tả chung và cũng có thể được chuyên gia trong lĩnh vực xác định từ phần mô tả này khi kết hợp với kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật này, mà không cần bất kỳ thử nghiệm quá mức nào.

Theo một phương án khác, chất mang, tá dược lỏng, hoặc tá dược được dụng hoặc dùng được trong thú y có thể là nhũ tương nước trong dầu. Ví dụ về các nhũ tương nước trong dầu thích hợp bao gồm nhũ tương vaccine nước trong dầu trên cơ sở dầu là ổn định và là chất lỏng ở nhiệt độ 4°C chứa: từ 6 đến 50 % thể tích pha nước chứa kháng nguyên, từ 12 đến 25 % thể tích, từ 50 đến 94 % thể tích pha dầu chứa dầu hoàn toàn không chuyển hóa hoặc chuyển hóa chất một phần (ví dụ, dầu khoáng chẳng hạn như dầu parafin) và/hoặc dầu chuyển hóa (ví dụ, dầu thực vật, hoặc các este của axit béo, polyol hoặc rượu), từ 0,2 đến 20 % p/v các chất hoạt động bề mặt, từ 3 đến 8 % p/v, dạng sau này là toàn bộ hoặc một phần, hoặc ở dạng hỗn hợp với các este polyglyxerol, các este polyglyxerol này là polyglyxerol (poly)rixinoleat, hoặc polyoxyetylen dầu rixin hoặc dầu polyoxyetylen rixin được được hydro hoá khác. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt mà có thể được sử dụng trong nhũ tương nước trong dầu bao gồm các este sorbitan được etoxyl

hoá (ví dụ, polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat (TWEEN 80®), có thể mua từ AppliChem, Inc., Cheshire, CT) và các este sorbitan (ví dụ, sorbitan monooleat (SPAN 80®), có thể mua được từ Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Ngoài ra, đối với nhũ tương nước trong dầu, ngoài ra còn tham khảo patent Mỹ số 6,919,084. Theo một số phương án, pha nước chứa kháng nguyên là dung dịch muối chứa một hoặc nhiều chất đệm. Ví dụ về dung dịch đệm thích hợp là nước muối đệm phosphat. Theo một phương án, nhũ tương nước trong dầu có thể nhũ tương hệ ba nước/dầu/nước (W/O/W water/oil/water) (tham khảo ví dụ, patent Mỹ số 6,358,500). Ví dụ về các nhũ tương thích hợp khác được mô tả trong patent Mỹ số 7,371,395.

Dược phẩm và vacxin theo sáng chế có thể chứa hoặc chủ yếu chứa một hoặc nhiều tá chất. Các tá chất thích hợp để sử dụng thực hiện sáng chế là (1) polyme của axit acrylic hoặc metacrylic, các polyme dẫn xuất maleic anhydrit và alkenyl, (2) trình tự kích thích miễn dịch (ISS), chẳng hạn như các trình tự oligodeoxyribonucleotit có một hoặc nhiều đơn vị CpG không được metyl hoá (Klinman et al., 1996; WO98/16247), (3) nhũ tương dầu trong nước, chẳng hạn như nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" được công bố bởi M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 cũng của tài liệu này, (4) lipid cation chứa muối amoni bậc bốn, ví dụ, DDA (5) các xytokin, (6) nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, (7) saponin hoặc (8) các tá chất khác bất kỳ được bàn luận trong tài liệu bất kỳ được viện dẫn và kết hợp theo cách viện dẫn vào đơn này, hoặc (9) kết hợp bất kỳ hoặc các hỗn hợp của chúng.

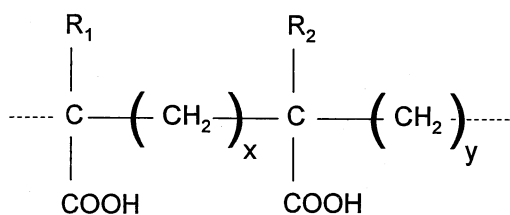
Nhũ tương dầu trong nước (3), là đặc biệt thích hợp cho các vector virus, có thể trên cơ sở: dầu parafin lỏng trong (loại tinh khiết European pharmacopoeia), dầu isoprenoit chẳng hạn như squalan, squalen, dầu tạo ra từ quá trình oligome hoá các alken, ví dụ isobuten hoặc đexen, este của các axit hoặc rượu có nhóm alkyl mạch thẳng, chẳng hạn như dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol, di(caprylat/caprat), glyxerol tri(caprylate/caprat) và propylen glycol dioleat, hoặc este của các rượu hoặc các axit béo mạch nhánh, đặc biệt là este của axit isostearic.

Dầu này được sử dụng kết hợp với chất nhũ hoá để tạo thành nhũ tương. Các chất nhũ hoá này có thể là các chất hoạt động bề mặt phi ion, chẳng hạn như: este của một mặt sorbitan, manit (ví dụ anhyđromanitol oleat), glyxerol, polyglyxerol hoặc propylen glycol và mặt khác các axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, este nêu trên tùy ý được etoxylat hoá, hoặc là khối copolyme polyoxypropylen-polyoxyetylen, chẳng hạn như Pluronic, ví dụ, L121.

Trong số loại (1) polyme là tá chất, ưu tiên là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic được tạo liên kết ngang, đặc biệt là được tạo liên kết ngang bằng các ete polyalkenyl của các đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này đã được biết đến với tên carbomer (Pharmerupa, vol. 8, no. 2, June 1996). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể tham khảo patent Mỹ số 2,909,462, đề xuất polyme acrylic như vậy được tạo liên kết ngang bằng hợp chất polyhydroxyl có ít nhất ba nhóm hydroxyl, tốt hơn nếu không nhiều hơn tám nhóm như vậy, nguyên tử hydro của ít nhất ba nhóm hydroxyl được thay bằng các gốc béo không bão hoà, có ít nhất hai nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là các gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ vinyl, alyl và nhóm không bão hoà etylen khác. Các gốc không bão hoà này cũng có thể chứa các nhóm thế khác, chẳng hạn như metyl. Các sản phẩm được bán với tên Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA) là đặc biệt thích hợp. Các chất này được tạo liên kết ngang bằng alyl sacaroza hoặc alyl pentaerytritol. Trong số các chất này, tham khảo được kể đến Carbopol 974P, 934P và 971P.

Liên quan đến copolyme dẫn xuất maleic anhyđrit-alkenyl, ưu tiên là EMA (Monsanto), là copolyme anhyđrit etylen-maleic mạch thẳng hoặc được tạo liên kết ngang và các chất này, ví dụ như, được tạo liên kết ngang bằng đivinyl ete. Tham khảo còn kể đến J. Fields et al., 1960.

Liên quan đến cấu trúc, tốt hơn nếu polyme axit acrylic hoặc metacrylic và EMA được tạo ra bằng các đơn vị cơ sở có công thức sau đây:



trong đó:

- R₁ và R₂, có thể giống nhau hoặc khác nhau, là H hoặc CH₃
- x = 0 hoặc 1, tốt hơn nếu x = 1
- y = 1 hoặc 2, với x + y = 2.

Đối với EMA, x = 0 và y = 2 và đối với carbome x = y = 1.

Các polyme này tan trong nước hoặc dung dịch muối sinh lý (20 g/l NaCl) và có thể điều chỉnh độ pH đến từ 7,3 đến 7,4, ví dụ, bằng soda (NaOH), để tạo ra dung dịch tá chất trong đó vector biểu hiện có thể kết hợp với. Nồng độ polyme trong chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin cuối có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 1,5% trọng lượng/thể tích, vào khoảng 0,05 đến khoảng 1% trọng lượng/thể tích, và nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4% trọng lượng/thể tích.

Các polyme này là hòa tan trong nước hoặc dung dịch nước muối sinh lý (20 g/l NaCl) và có thể điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 7,3 đến 7,4, ví dụ, bằng xút (NaOH), để tạo ra dung dịch tá chất trong đó các vector biểu hiện có thể kết hợp vào. Nồng độ polyme trong chế phẩm miễn dịch cuối hoặc vaccin có thể thay đổi nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,5% trọng lượng/thể tích, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1% trọng lượng/thể tích, và nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4% trọng lượng/thể tích.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên ở động vật, mà phương pháp này gồm việc chủng ngừa cho động vật bằng vaccin hoặc dược phẩm chứa virus APMV tái tổ hợp cải biến chứa và

mã hoá kháng nguyên của tác nhân gây bệnh cho động vật nêu trên. Một khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề cập đến phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên ở động vật theo chế độ cấp cơ bản-tăng cường, gồm có ít nhất một lần cấp cơ bản và ít nhất một lần cấp tăng cường bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit, kháng nguyên, biểu vị hoặc chất sinh miễn dịch thông thường. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin được sử dụng trong lần cấp cơ bản có thể là giống, có thể khác về bản chất với loại được sử dụng làm chất tăng cường. Theo một khía cạnh của phương pháp cơ bản-tăng cường theo sáng chế, chế phẩm hoặc vaccin chứa virus APMV tái tổ hợp (vector virus) theo sáng chế được cấp tiếp đó là việc cấp vaccin hoặc chế phẩm virus bất hoạt chứa kháng nguyên, hoặc vaccin hoặc chế phẩm chứa cấu trúc tiểu đơn vị (protein, kháng nguyên), hoặc Vaccin hoặc chế phẩm plasmid ADN chứa hoặc biểu hiện kháng nguyên. Tương tự, phương pháp cơ bản-tăng cường có thể gồm việc cấp vaccin hoặc chế phẩm virus bất hoạt chứa kháng nguyên, hoặc vaccin hoặc chế phẩm chứa cấu trúc tiểu đơn vị (protein, kháng nguyên), hoặc vaccin hoặc chế phẩm plasmid ADN chứa hoặc biểu hiện kháng nguyên, tiếp đó là việc cấp chế phẩm hoặc vaccin chứa virus APMV tái tổ hợp (vector virus) theo sáng chế. Ngoài ra, cần lưu ý là cả lần cấp cơ bản và thứ hai có thể gồm có chế phẩm hoặc vaccin chứa virus APMV tái tổ hợp (vector virus) theo sáng chế.

Lần cấp cơ bản có thể gồm có một hoặc nhiều lần cấp cùng một chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin trên cơ sở vector virus. Tương tự, cấp tăng cường có thể gồm có một hoặc nhiều lần cấp cùng một chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin trên cơ sở vector virus. Đường cấp cho lần dùng cơ bản và tăng cường có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Tương tự, nguồn gốc của gen bảo vệ có mặt trong lần cấp cơ bản và tăng cường có thể là giống nhau hoặc khác nhau (ví dụ chủng khác nhau).

Tốt hơn, nếu các lần cấp khác nhau được thực hiện cách nhau từ 1 đến 6 tuần, và đặc biệt hơn là cách nhau khoảng 3 tuần. Theo một phương thức được ưu tiên, cũng dự tính việc dùng chất tăng cường miễn dịch vào hằng năm, tốt hơn nếu là sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch trên cơ sở vector virus của vaccin. Tốt hơn, nếu động vật là ít nhất một ngày tuổi vào thời gian lần cấp đầu tiên.

Có thể sử dụng nhiều đường cấp chẳng hạn như dưới da hoặc qua cơ, trong da, qua chân bì, phun xịt, nước uống, nhỏ mắt, qua đường mũi, qua đường miệng, bả ăn, *in ovo* hoặc kết hợp của các phương pháp này (ví dụ qua mắt mũi, qua mũi miệng).

Sáng chế sẽ được mô tả dựa vào các ví dụ không mang tính giới hạn sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 APMV-2, APMV-4, và APMV-6

A. Virut và Chim

Gà SPF (specific pathogen free - không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu) một ngày tuổi (Merial, Gainesville, GA) được nuôi trong bộ phận cách ly áp suất dương tính Horsfall-Baur. Thức ăn và nước được cấp *ad libitum* và các con gà này được xét nghiệm hai lần mỗi ngày. Các loại virut (APMV-2, 4, và 6) được sử dụng cho các nghiên cứu thử nghiệm được phân lập từ chim rừng và được phân loại bởi National Veterinary Service Laboratory (NVSL, Ames Iowa, USA). Virut được nhân lên trong trứng gà SPF có phôi 9 ngày tuổi (SunRise Farms, Catskill, NY, USA) bằng cách chủng ngừa qua đường túi niệu. Dịch ở túi niệu này được gom vào ngày 3 sau khi chủng ngừa, được chia phần phân ước, và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Xác nhận kiểu phụ APMV bằng xét nghiệm HI sử dụng huyết thanh chuẩn (NVSL, Ames, Iowa, USA). Xác định liều gây nhiễm trứng 50% (EID₅₀ 50% egg infectious dose) cho mỗi thể phân lập bằng cách chủng ngừa pha loãng theo bậc 10 lần của dịch túi niệu trong trứng SPF có phôi. Tính toán hiệu giá theo phương pháp như được mô tả bởi Reed và Muench (Reed, LJ et al., 1938, Am. J. Epidemiol. 27:493-497).

B. Gây nhiễm thử nghiệm

Gây nhiễm hai mươi năm gà SPF một ngày tuổi cho mỗi nhóm 10⁶ EID₅₀ cho mỗi con gà qua đường mắt-mũi. Gà thuộc nhóm đối chứng được chủng ngừa giả bằng PBS (muối đệm phosphat phosphate buffered saline). Vào ngày 2, 4, 7, 14, và 28 p. i. (sau

khi gây nhiễm post infection) năm con chim từ mỗi nhóm được lấy máu qua tĩnh mạch cánh để thu gom mẫu huyết thanh, được làm chết nhẹ nhàng bằng CO₂, và được mổ tử thi. Gom các mẫu mô ở khí quản, phổi, tuyến tụy và đường ruột. Với mỗi cơ quan, dùng một cặp kéo và foocxép mới vô trùng. Một nửa mẫu mô được đưa vào ống Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Solon, OH) chứa môi trường chuyển vận virus (1X môi trường cơ bản tối thiểu, 7,5% natri bicacbonat, 15 mM HEPES, 1% huyết thanh bào thai bò, 4,000 U/ml penixilin, 400 µg/ml gentamycin, 8 µg/ml amphotericin B, 4,000 µg/ml streptomycin, 1000 µg/ml kanamycin sulfat). Một nửa mẫu mô thứ hai được cố định trong 10% formalin được đệm và được gắn vào sáp parafin. Các lát cắt của các mô được gắn vào parafin được nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin của Mayer (H&E hematoxylin and eosin).

Các kết quả cho thấy là phát hiện được tiêu chảy nhẹ vào ngày bốn và bảy p. i. ở chim được gây nhiễm APMV-2 hoặc APMV 4. Trong quá trình mổ tử thi, chim được gây nhiễm bằng APMV-2 cho thấy hơi rộng lên tuyến tụy vào ngày hai và bốn sau khi gây nhiễm. Không phát hiện thấy thương tổn lớn khác ở bất kỳ nhóm nào.

C. Phân tích huyết thanh

Sử dụng các thử nghiệm ngưng kết hồng cầu (HA hemagglutination) và ức chế ngưng kết hồng cầu (HI hemagglutination-inhibition) để phát hiện virus trong dịch túi niệu và phân tích sự có mặt của kháng thể HI lần lượt trong các mẫu huyết thanh được gom. Các xét nghiệm này được thực hiện theo quy trình chuẩn bằng cách sử dụng 0,8% tế bào hồng cầu gà được tái tạo huyền phù trong PBS. Xét nghiệm HI được thực hiện bằng phương pháp pha loãng-huyết thanh ổn định-kháng nguyên. Tám đơn vị HA của kháng nguyên virus được sử dụng cho mỗi pha loãng huyết thanh.

Hiệu giá kháng thể HI được khảo sát vào ngày 2, 4, 7, 14, và 28 p.i. Nhận thấy hiệu giá HI dương tính (= 1:16) trong các mẫu huyết thanh Chim được gây nhiễm APMV-2 vào ngày 7 (1/5), ngày 14 (5/5), và ngày 28 p.i. (5/5). Đáng quan tâm là, chỉ một gà được gây nhiễm APMV-4 phát triển hiệu giá HI được xem là dương tính trong tiến trình

thử nghiệm vào ngày 14 p.i. Tương tự đối với APMV-6, hai trong số năm con gà phát triển hiệu giá HI bằng 1:16, chỉ vào ngày 28 p.i.. các con chim được chủng ngừa giả vẫn là âm tính đối với kháng thể HI đối với tất cả ba APMV được sử dụng trong thử nghiệm này. Ngoài ra, để loại trừ sự nhiễm chéo tất cả các mẫu huyết thanh được thử nghiệm về kháng thể HI chống lại hai kháng nguyên khác và vẫn là âm tính.

D. Phân lập virus

Các mẫu mô được gom trong các ống Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) được làm đồng nhất hoá hai lần bằng cách sử dụng Fastprep®-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) ở mức thiết lập là 4,0 M/S trong thời gian 20 giây. Sau khi ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, các mẫu đã làm đồng nhất này được ly tâm trong thời gian 20 phút ở 2000 g ở nhiệt độ 4°C. Sự vô trùng được xét nghiệm sau khi chủng ngừa 50 µl dịch nổi trên bề mặt thu được này trong 2 ml canh môi trường tryptone phosphat (TPB) (DIFCO, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) đã được bổ sung 10% hydrolyzed albumin bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong máy lắc tròn qua đêm. Các mẫu không vô trùng được lọc bằng các bộ lọc xyranh 0,45 µm (Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA). Các mẫu này được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Sự phân lập virus được thực hiện bằng cách chủng ngừa 0,1 ml vào khoang túi niệu của trứng gà SPF có phôi 9 ngày tuổi. Sau khi ủ trong thời gian ba ngày ở nhiệt độ 37,5°C, dịch ở túi niệu này được gom và được xét nghiệm về sự có mặt của hoạt tính vốn cục tế bào máu theo HA.

Để phân tích các vị trí của sao chép virus, một số cơ quan (khí quản, phổi, đường ruột, tuyến tụy) được phân tích về virus gây nhiễm bằng cách phân lập virus trong trứng có phôi (Fig. 1). Nhìn chung, Chỉ phát hiện được virus sao chép trong một số ít con gà. Nói ngắn gọn là, thu hồi được APMV-4 vào ngày 2 từ khí quản, phổi và tuyến tụy còn phân lập được APMV-6 từ phổi và tuyến tụy. Vào ngày 4, phân lập được APMV-2 từ khí quản và phổi còn phân lập được APMV-6 từ tất cả các cơ quan được thử nghiệm chỉ trừ có đường ruột. Vào ngày 7, phân lập được APMV-2 từ một mẫu đường ruột, phân lập được APMV-4 từ tuyến tụy còn phân lập được APMV-6 từ các mẫu phổi và tuyến tụy. Đáng ngạc nhiên, vào ngày 14 p.i. không phân lập được virus còn vào ngày 28 p.i. có thể

phân lập được APMV-2, 4 và 6 từ tuyến tụy. Không phân lập được virus từ các con chim được chủng ngừa giả. Việc nhận diện virus được phân lập ngược được khẳng định bằng xét nghiệm HI bằng cách sử dụng huyết thanh chuẩn như được NVSL cung cấp.

Để đánh giá khả năng gây bệnh học của các virus được khảo sát, phân tích thương tổn có kích thước hiển vi ở cơ quan thu được (Fig. 2). Vào ngày 2 p.i., Nhận thấy có sự viêm chảy phế quản ngoài sự mất mát lông mao trên biểu mô đường hô hấp và bệnh viêm ruột nhẹ ở tất cả gà được gây nhiễm. Vào ngày 4 p.i., Gà được gây nhiễm APMV-2 cho thấy sự tăng số tuyến nhầy phình lên ở khí quản và sự loét ổ của biểu mô đường hô hấp. Chim được gây nhiễm APMV-4 cho thấy các thay đổi có tính gợi ý cao cho sự viêm nhiễm đường hô hấp chẳng hạn như sự viêm phế quản nhẹ, bệnh viêm tụy bạch huyết bào đa ổ từ nhẹ đến vừa phải và ngoài ra là sự tăng sản BALT (mô bạch huyết gắn liền với phế quản Bronchus-Associated Lymphoid Tissue) ở ổ vào ngày 4 p.i. Sự khảo sát trên các cơ quan gà được gây nhiễm APMV-6 cho thấy các thay đổi ở khí quản như viêm phế quản viêm chảy và loét và viêm tụy ổ phù hợp với sự kích thích virus. Vào ngày 7 p.i., gà được gây nhiễm APMV-2 cho thấy là sự suy giảm khí quản ở ổ hoặc thay thế biểu mô đường hô hấp như là biểu thị của sự lành bệnh. Chim được gây nhiễm APMV-4 cho thấy chứng tăng sản BALT nhẹ còn chim được gây nhiễm APMV-6 cho thấy bệnh đường ruột nang, bệnh viêm ruột ổ và sự thâm bạch huyết bào ở tuyến tụy. Ngoài bệnh viêm ruột bạch huyết bào nhẹ và chứng tăng sản GALT nhẹ, chim được gây nhiễm APMV-2 còn thể hiện các thay đổi lành bệnh chẳng hạn như sự thuyên giảm khí quản vào ngày 14 p.i. Các mẫu cơ quan từ gà được gây nhiễm APMV-4 hoặc 6 cho thấy các thay đổi gợi ý cho sự nhiễm virus chẳng hạn như viêm phổi kẽ nhẹ, sự viêm chảy phế quản và chứng tăng sản BALT hoặc GALT vào ngày 14 p.i. Tất cả các mẫu được khảo sát thu được từ gà được gây nhiễm cho thấy thương tổn chẳng hạn như chứng tăng sản GALT, bệnh viêm tụy bạch huyết bào và bệnh viêm phế quản bạch huyết bào vào ngày 28 p.i. Vào ngày 2, gà thuộc nhóm đối chứng cho thấy sự viêm chảy phế quản nhẹ mà có thể được quy cho là do các yếu tố môi trường.

Fig. 3 thể hiện hiệu giá HI thấp (lên đến 1:32 vào ngày 14) từ gà SPF được gây nhiễm APMV-4 hoặc APMV-6, điều này chứng tỏ rằng chỉ sự gây nhiễm APMV-2 thể

hiện đáp ứng HI mà có thể được đặc tả là dương tính huyết thanh. Tuy nhiên, tất cả ba virus được phục hồi từ khí quản, phổi, đường ruột và tuyến tụy chim được gây nhiễm lên đến ngày 7 p.i. và từ tuyến tụy lên đến ngày 28 p.i.. Sự gây nhiễm bằng APMV-2, 4, hoặc 6 thể hiện thương tổn mô bệnh đặc trưng (được tổng kết trong Fig. 2) ở tất cả chim được gây nhiễm, là biểu thị của sự kích thích của kháng nguyên virus. Sự phân lập virus và profin mô bệnh của các con chim được gây nhiễm thể hiện rõ ràng tính hướng kích thích của virus ở chim được gây nhiễm (khí quản và phổi từ ngày 2 đến ngày 7 và đường ruột, phổi và tuyến tụy từ ngày 7 trở đi). Phát hiện được tất cả các thể phân lập ở tuyến tụy lên đến 28 ngày p.i. nhưng không thể phân lập được virus vào ngày 14 p.i.. Điều này cho thấy rằng APMV khảo sát có lẽ có thể tồn tại dai dẳng và sau đó trở nên có hoạt tính. Do đó, chất mang virus này có thể có mặt trong đàn được gây nhiễm. Chỉ có APMV-2 gây ra kháng thể HI còn không phát hiện được kháng thể HI của gà được gây nhiễm APMV-4 và 6.

Ví dụ 2 APMV-8

A. Virus và Chim

Gà SPF một ngày tuổi (Merial, Gainesville, GA, USA) và vịt Bắc kinh (Metzer Farms, Gonzales, CA, USA) được nuôi trong trong bộ phận cách ly Horsfall Baur áp suất dương tính. Thức ăn và nước được cấp *ad libitum*, và các con chim được xét nghiệm hai lần mỗi ngày. Virus APMV-8 (APMV-8: SCWDS ID: MA-7) được sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm được phân lập từ vịt trời và được phân loại bởi National Veterinary Service Laboratory (NVSL, Ames Iowa, USA). Virus này được nhân lên trong trứng gà SPF có phôi 9 ngày tuổi bằng cách chủng ngừa qua đường túi niệu. Dịch túi niệu được gom vào ngày 3 sau khi chủng ngừa, được tập trung lại, được chia phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ -80 °C. Kiểu phụ APMV-8 được khẳng định bằng xét nghiệm HI sử dụng huyết thanh chuẩn được National Veterinary Service Laboratory cung cấp (Ames, IA, USA). EID_{50} được xác định bằng cách chủng ngừa pha loãng theo bậc 10 lần dịch túi niệu trong trứng SPF có phôi. Tính toán hiệu giá theo phương pháp như mô tả bởi Reed và Muench (Reed & Muench, 1938).

B. Chuyển nhiễm thử nghiệm

Hai mươi năm con gà SPF một ngày tuổi hoặc vịt Bắc kinh cho mỗi nhóm được chuyển nhiễm qua đường mũi mắt 10^6 EID₅₀ cho mỗi chim được pha loãng trong PBS. Chim thuộc nhóm gà hoặc vịt đối chứng được chủng ngừa giả bằng PBS. Năm con chim từ mỗi nhóm được lấy máu qua tĩnh mạch cánh để thu gom các mẫu huyết thanh, được làm chết nhẹ nhàng bằng CO₂, và tiến hành mổ tử thi ở hai, bốn, bảy, mười bốn và hai mươi tám ngày sau khi gây nhiễm (d p.i). Các mẫu mô từ khí quản, phổi, tuyến tụy, và đường ruột (tá tràng) được gom lại. Với mỗi cơ quan, sử dụng một cặp kéo và foocxép mới vô trùng. Một nửa mẫu mô được đưa vào ống Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) chứa môi trường chuyển vận virus (VTM, môi trường cơ bản tối thiểu 1X, 7,5% natri bicacbonat, 15 mM HEPES, 1% huyết thanh bào thai bò, 4,000 U/ml penixilin, 400 µg/ml gentamixin, 8 µg/ml amphoterixin B, 4000 µg/ml streptomycin, 1000 µg/ml kanamixin sulfat). Một nửa mẫu mô thứ hai được cố định trong 10% formalin được đệm và được xử lý thông thường, được gắn vào, được cắt lát và được nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin (H&E).

C. Sự phân lập virus

Các mẫu mô được gom trong các ống Lysing Matrix D được làm đồng nhất hoá hai lần bằng cách sử dụng FastPrep-24 (MP Biomedicals) ở mức thiết lập là 4,0 M/S trong thời gian 20 giây. Các mẫu đã làm đồng nhất này được ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được ly tâm trong thời gian 20 phút ở 2000xg ở nhiệt độ 4°C. 50 µl dịch nổi trên bề mặt thu được này được cấy trong 2 ml TFB vô trùng được bổ sung 10% hydrolactalbumin, tiếp đó là ủ ở nhiệt độ 37°C trong máy lắc tròn qua đêm để thử nghiệm sự vô trùng. Các mẫu không vô trùng được lọc bằng các bộ lọc xyranh 0,45 µm (Whatman Inc.). Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Sự phân lập virus được thực hiện bằng cách chủng ngừa 0,1 ml vào khoang túi niệu của trứng gà SPF có phôi 9 ngày tuổi. Sau khi ủ trong thời gian ba ngày ở nhiệt độ 37,5°C, dịch ở túi niệu này được gom và được xét nghiệm về sự có mặt của hoạt tính đông máu bằng HA.

D. Phân tích huyết thanh

Các thử nghiệm ngưng kết hồng cầu (HA) và ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) được sử dụng lần lượt để phát hiện virus trong dịch túi niệu và để phân tích sự có mặt của kháng thể HI trong các mẫu huyết thanh được gom. Các xét nghiệm này được thực hiện theo quy trình chuẩn bằng cách sử dụng 0,8% tế bào hồng cầu gà được tái tạo huyền phù trong PBS. Xét nghiệm HI được thực hiện bằng cách dùng phương pháp pha loãng-huyết thanh ổn định-kháng nguyên. Tám đơn vị HA của kháng nguyên virus được sử dụng cho mỗi pha loãng huyết thanh. Hiệu giá trung bình hình học được xác định như mô tả trước đây (Brugh, 1978).

Fig. 4 thể hiện hiệu giá kháng thể HI ở gà và vịt SPF được chuyển nhiễm bằng APMV-8. Gà và vịt được chuyển nhiễm qua đường mũi-miệng với liều 10^6 EID₅₀ APMV-8. Các mẫu huyết thanh được gom vào ngày 2, 4, 7, 14, và 28 p.i. và được phân tích bằng xét nghiệm HI bằng kháng nguyên APMV-8. Hiệu giá huyết thanh HI (theo log₂) được thể hiện trên trục bên trái.

E. Chỉ số gây bệnh của APMV-8 ở gà

Để đánh giá độc tính của virus của APMV-8, chỉ số gây bệnh trong não (ICPI intracerebral pathogenicity index) được xác định theo quy trình của World Organization for Animal Health (OIE, 2008) cho virus gây bệnh Newcastle. Thời gian chết trung bình (MDT mean dead time) ở các phôi gà được xác định như mô tả trước đây (Swayne et al., 1998) bằng cách sử dụng pha loãng theo bậc APMV-8 từ 10^{-1} đến 10^{-8} .

Việc xác định thời gian chết trung bình (MDT) trong trứng có phôi cũng như đánh giá chỉ số gây bệnh trong não (ICPI) là đo lường quan trọng cho tác nhân gây bệnh của virus. Đối với MDT trong trứng có phôi, không có phôi nào trong số các phôi của trứng được chủng ngừa bị chết sau thời gian 7 ngày và do đó thể phân lập APMV-8 có thể được phân loại là virus có độc lực yếu (lentogenic). Sự có mặt của virus được khẳng định bằng xét nghiệm HA bằng cách sử dụng dịch ở túi niệu của trứng được chủng ngừa với sự

pha loãng 10^{-6} . Tất cả các con gà được chủng ngừa trong não không cho thấy có triệu chứng lâm sàng trong thời gian quan sát, tức là giá trị ICPI bằng 0, điều này cho kết quả là kiểu hình virus có độc lực yếu (lentogenic).

F. Dùng vaccin tăng cường APMV-8

Mười con gà SPF một ngày tuổi cho mỗi nhóm được chuyển nhiễm qua đường mũi mắt 10^6 EID₅₀ cho mỗi con chim. Chim thuộc nhóm gà đối chứng được chủng ngừa giả bằng PBS. Các con chim này được chuyển nhiễm tiếp bằng cùng một liều 14 ngày sau lần gây nhiễm đầu tiên. Sự có mặt của virus gây nhiễm được theo dõi vào ngày 2, 4, 7 và 14 sau lần gây nhiễm đầu tiên và ngày 2 và 4 sau lần chuyển nhiễm thứ hai bằng cách phân lập virus từ các miếng gạc khí quản bằng cách sử dụng trứng SPF có phôi 9 ngày tuổi. Sự đáp ứng của kháng thể được theo dõi bằng đo hiệu giá HI các mẫu huyết thanh được gom vào ngày 0, 7, và 14 sau mỗi lần dùng vaccin.

Để khảo sát xem liệu lần gây miễn dịch thứ hai sẽ cho sự phát triển hiệu giá HI ổn định hơn không, thực hiện thử nghiệm theo lịch trình cơ bản/tăng cường (Fig. 5). Vào ngày 7 sau lần chuyển nhiễm đầu tiên, tất cả mười con chim cho giá trị HI nằm trong khoảng từ 64 đến 1024 (GMT 207). Hiệu giá này giảm đi vào ngày 14 p.i. sau lần gây nhiễm đầu tiên (GMT 84) nhưng lại tăng lên sau khi gây nhiễm tăng cường vào ngày 14 sau lần gây nhiễm đầu tiên. Vào ngày 7 sau lần dùng vaccin tăng cường, GMT được tăng lên đến 137 và lại giảm xuống GMT bằng 73 vào ngày 14 sau lần chuyển nhiễm thứ hai. Có thể phân lập được virus gây nhiễm từ các miếng gạc khí quản vào ngày 2 (5/10 chim) và ngày 4 (4/10) chim sau lần gây nhiễm đầu tiên. Sau lần gây nhiễm thứ hai, không phân lập được virus từ các miếng gạc được lấy vào ngày 2 và 4 p.i..

G. Phát hiện ARN virus bằng RT-PCR

Việc phát hiện ARN virus từ mẫu mô được thực hiện sau khi đồng nhất hoá mẫu mô, tiếp đó là phân lập ARN bằng cách sử dụng kit phân lập High Pure RNA (Roche, Mannheim, Germany). Cặp đoạn mồi (8NPf1, 8NPr, tham khảo bảng 1) được sử

dụng trong RT-PCR bằng cách sử dụng kit Superscript III One Step RT-PCR với nhãn Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm phản ứng thu được được phân tích trên 1% gel agarosa (Fig. 6). Các mô khí quản được lấy ra vào ngày 2 p.i. từ những con vịt không được chuyển nhiễm (C1-C5) và vịt được chuyển nhiễm APMV-8 (I1-I5). Các mô này được làm đồng nhất hoá và điều chế ARN cho RT-PCR. Mẫu đối chứng nước (W) được chuẩn bị song song. Các sản phẩm phản ứng được tách ra trên 1,5% gel agarosa. Kích cỡ của the mảnh được kiểm chế bằng cách sử dụng thang 100 bp (New England Biolabs, Boston, MA, USA). Kích cỡ của các mảnh ADN được thể hiện ở bên phải.

Bảng 1. Các oligonucleotit được sử dụng cho RT-PCR để phát hiện ARN virus trong các mẫu mô

Tên	Trình tự	Hướng	Vị tríA	SEQ ID NO
APMV-PolyT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTACCAAACARRGAA	có nghĩa	1-14	21
8NPfl	CAGGAGACCTGATGTTGCCTCAAC	có nghĩa	200-223	22
8NPr	GCAGGCGATCTATAGTCTCTGATAG	đối nghĩa	618-642	23

H. Xác định liều gây nhiễm tối thiểu ở gà và vịt

Để xác định xem hiệu giá virus nào ở gà sẽ là đủ để phát hiện sự chuyển hóa huyết thanh, gà SPF một ngày tuổi được chuyển nhiễm bằng các liều APMV-8 khác nhau. Các con chim này được nuôi trong nhà như đã nêu trên. Mười con gà cho mỗi nhóm được chuyển nhiễm mỗi nhóm bằng $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$, hoặc 10^6 EID₅₀. Virus được pha loãng trong VTM. Mỗi nhóm được cấy VTM và có tác dụng như mẫu đối chứng. Các con chim này được lấy máu vào ngày 7 và 14 sau khi chuyển nhiễm qua tĩnh mạch cánh. Dựa trên các kết quả thu được trong thử nghiệm ở gà, vịt Bắc kinh ba ngày tuổi được chuyển nhiễm bằng lượng virus khác nhau. Các liều gây nhiễm liều được lựa chọn là $10^3, 10^4$,

10^5 , hoặc 10^6 EID₅₀ cho mỗi con vịt. Một nhóm được gây nhiễm giả bằng VTM. Các con chim này được lấy máu vào ngày 7 và 14 sau khi chuyển nhiễm qua tĩnh mạch chân. Mẫu huyết thanh mẫu được phân tích về sự có mặt của các kháng thể đặc hiệu virus bằng HI như đã nêu trên.

I. Xác định khả năng gây bệnh ở vịt và gà

Trong quá trình thử nghiệm, không phát hiện thấy triệu chứng lâm sàng ở gà và vịt. Trong quá trình mổ tử thi, nhận thấy ba con gà được gây nhiễm có tuyến tụy hơi rộng lên và tá tràng bị sưng tấy vào ngày hai và bốn p.i.. Không phát hiện thấy thương tổn lớn khác ở bất kỳ nhóm nào.

Đáp ứng huyết thanh học được kiểm tra vào ngày 2, 4, 7, 14, và 28 p.i. bằng cách khảo sát hiệu giá HI ở trong huyết thanh (Fig. 4). Các mẫu huyết thanh ở gà được gây nhiễm APMV-8 cho thấy hiệu giá HI dương tính (= 16) bắt đầu vào ngày 7 p.i. (5/5, GMT: 111), 14 p.i. (5/5, GMT: 48), và 28 p.i. (5/5, GMT: 48). Các mẫu huyết thanh vịt được chuyển nhiễm APMV-8 cũng cho thấy hiệu giá HI dương tính (= 16) vào ngày 7 (5/5, GMT 21), 14 (5/5, GMT 28), và 28 (4/5, GMT 14) p.i. Hiệu giá HI thay đổi từ 32 đến 256 cho gà, còn với vịt khoảng này là từ 16 đến 64. Chim được chủng ngừa thuốc vờ vẫn là âm tính đối với kháng thể HI đối với APMV-8 ở tất cả thời điểm khảo sát trong cả hai loài.

Để xác định các vị trí của sao chép virus ở gà và vịt, một số cơ quan (khí quản, phổi, tá tràng, và tuyến tụy) được phân tích đối với gây nhiễm virus bằng cách phân lập virus trong trứng có phôi (Fig. 7). Ở gà, APMV-8 được thu hồi vào ngày 2 p.i. từ khí quản, phổi, và tá tràng. Vào ngày 4 p.i., APMV-8 được phân lập từ tất cả cơ quan được phân tích; trong khi đó vào ngày 7 p.i., chỉ phân lập được APMV-8 từ tuyến tụy. Vào ngày 14 và 28 p.i. không phân lập được virus từ cơ quan bất kỳ. Không phân lập được virus from chim được chủng ngừa thuốc vờ. Sự nhận diện virus được phân lập ngược được khẳng định bằng xét nghiệm HI bằng cách sử dụng huyết thanh chuẩn như được NVSL cung cấp. Không phân lập được virus từ các mô vịt được gom bất kỳ ở thời điểm bất kỳ

thậm chí sau hai lần cấy truyền phụ ở trứng gà SPF có phôi 9 ngày tuổi. Do đó, các đoạn môi RT-PCR được thiết kế dựa trên thông tin trình tự APMV-8 có được để phát hiện sự có mặt của ARN virus trong các mẫu mô được gom (Fig. 7). Vào ngày 2 p.i phát hiện được ARN virus ở trong khí quản (Fig. 6), đường ruột và tuyến tụy còn vào ngày 4 p.i phát hiện được ARN virus ở tất cả các cơ quan được phân tích. Vào ngày 7, 14, và 28 p.i, phát hiện được ARN virus chỉ ở khí quản và phổi. RT-PCR bằng cách sử dụng ARN thu được từ cơ quan của các con chim được chủng ngừa giả không tạo ra sự khuếch đại mảnh RT-PCR mà cho thấy sự vắng mặt của APMV-8 ở các con chim này.

Để đánh giá tiềm tàng gây bệnh của virus được khảo sát, các cơ quan được phân tích về sự có mặt của thương tổn có kích thước hiển vi (Fig. 8). Vào ngày 2 p.i., phát hiện được sự viêm phế quản tăng sinh đa ổ nhẹ ở tất cả các con gà được gây nhiễm. Các cơ quan còn lại không cho thấy sự khác biệt so với nhóm đối chứng. Gà được gây nhiễm APMV-8 cho thấy sự giảm độc lực ở ổ hoặc sự phục hồi biểu mô đường hô hấp ở khí quản vào ngày 4 p.i. như là biểu thị cho sự lành bệnh. Ngoài ra, các con chim này cũng cho thấy bệnh viêm tụy bạch huyết bào đa ổ nhẹ biểu thị sự nhiễm virus. Gà được gây nhiễm cho thấy các thay đổi ở phổi vào ngày 7 p.i. chẳng hạn như BALT từ vừa phải đến nặng, các thay đổi ở khí quản chẳng hạn như sự viêm chảy phế quản và bệnh viêm tụy bạch huyết bào đa ổ. Các phát hiện này là phù hợp với kích thích tính chất kháng nguyên. Vào ngày 14 p.i, nhận thấy các thay đổi ở khí quản phù hợp quá trình lành vết thương và các thay đổi ở tuyến tụy chẳng hạn như bệnh viêm tụy bạch huyết bào là dấu hiệu của sự nhiễm virus là ở gà được gây nhiễm. Vào ngày 28 p.i., chỉ phát hiện được sự viêm chảy phế quản nhẹ và bệnh viêm ruột nhẹ ở một số gà được gây nhiễm. ở vịt được gây nhiễm, nhận thấy bệnh viêm phế quản bạch huyết bào nhẹ đa ổ, các thay đổi ở phổi (viêm phổi kẽ) và các thay đổi ở đường ruột (bệnh viêm ruột bạch huyết bào) vào ngày 2 p.i trong khi đó nhận thấy các thay đổi ở khí quản phù hợp với sự nhiễm đường hô hấp vào ngày 4 p.i.. Vào ngày 7 p.i., vịt được gây nhiễm thể hiện bệnh viêm phế quản bạch huyết bào và viêm tụy phù hợp với sự nhiễm virus còn sự viêm chảy phế quản được nhận thấy là một dấu hiệu của sự lành vết thương vào ngày 14 p.i.. Ngoài ra, vịt được gây nhiễm thể hiện bệnh viêm tụy bạch huyết bào vào ngày 14 p.i.. Sau đó, vào ngày 28 p.i., phổi của vịt được gây

nhễm nhận thấy chứng tăng sản BALT và cũng như bệnh viêm phế quản dị ái đa ổ nhẹ. Cả hai thương tổn có kích thước hiển vi bệnh học này là biểu thị của sự nhiễm virus. Ở các con đối chứng không được chuyển nhiễm không phát hiện được thay đổi ở các cơ quan được xác định.

J. Xác định nồng độ tối thiểu cần thiết để gây ra đáp ứng miễn dịch

Để kiểm tra liều gây nhiễm tối thiểu là cần thiết để gây ra sự chuyển hóa huyết thanh ở gà, dùng các pha loãng APMV-8 mười lần để gây nhiễm mười con gà SPF một ngày tuổi (Fig. 9). Đối với xét nghiệm HI, sử dụng 4 bộ HA mà cho ngưỡng bằng 16 được xem là mẫu dương tính. Các mẫu huyết thanh được lấy vào ngày 14 p.i. cho thấy là EID₅₀ bằng 10³ là đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch trong 4/10 con gà thì được xem là dương tính (GMT 11). Vào ngày 14 sau khi gây nhiễm với EID₅₀ là 10⁴ chín trong số mười con chim cho hiệu giá ≥ 16 (GMT 34). Sự nhiễm EID₅₀ bằng 10⁵ và 10⁶ gây ra hiệu giá HI ≥ 16 vào ngày 14 p.i. ở tất cả các con chim với GMT lần lượt bằng 73 và 137.

Dựa trên kết quả này, mỗi trong số 8 con vịt được gây nhiễm bằng APMV-8 bắt đầu với liều EID₅₀ 10³ cho mỗi con chim lên đến liều EID₅₀ bằng 10⁶ cho mỗi con chim (Fig. 10). Sáu trong số tám con vịt phát triển hiệu giá có ý nghĩa (≥ 16) 14 ngày sau khi gây nhiễm bằng GMT bằng 14 sau khi chuyển nhiễm bằng EID₅₀ 10⁴/chim. Vào ngày 14 p.i. 6/8 vịt được chuyển nhiễm có EID₅₀ bằng 10⁵/chim và 7/8 con vịt được chuyển nhiễm bằng EID₅₀ 10⁶/chim phát triển hiệu giá có ý nghĩa (≥ 16) với GMT lần lượt bằng 17 và 23.

Ví dụ 3 Xác định trình tự APMV-8 có chiều dài đầy đủ

Để xác định trình tự APMV-8 có chiều dài đầy đủ, thông tin trình tự ARN virus là điều đầu tiên cần đến. Để đạt được mục đích này, đầu 3' của hệ gen virus được tách dòng bằng cách sử dụng đoạn mồi (APMV-polyT, tham khảo bảng 1) mà chứa trình tự suy biến dựa trên trình tự 3' hiện có của APMV1 (Số truy cập Genbank AF077761),

APMV-2 (Số truy cập Genbank EU338414), và APMV-6 (Số truy cập Genbank EF569970). ARN virus được tinh chế từ dịch túi niệu bằng cách sử dụng kit phân lập High Pure RNA (Roche, Mannheim, Germany). Trình tự này được khuếch đại bằng cách sử dụng hệ 5' RACE System cho khuếch đại nhanh (Rapid Amplification) phiên bản đầu cuối ADN bổ trợ (cDNA Ends Version 2.0) (Invitrogen) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Một số mảnh được thu nhận, được rửa giải bằng gel và được tách dòng vào vector tách dòng Topo TA (Invitrogen) và các dòng được lựa chọn dương tính được xác định trình tự. Các trình tự nucleotit thu được được phân tích bằng tra cứu nblast so với nguồn dữ liệu NCBI không cho ra trình tự tương tự nào. Tra cứu tblastx tiếp nguồn dữ liệu NCBI cho thấy thể hiện mức độ tương tự nucleoprotein là mức độ tương tự 83% với Paramyxovirus thuộc loài chim 2 (APMV-2/Chicken/California/Yucaipa/56 Số truy cập Genbank EU338414) và mức độ tương tự 56% của chủng 6 Paramyxovirus thuộc loài chim (APMV-6/Goose/FarEast/4440/2003, Số truy cập Genbank EF569970). Bằng cách sử dụng đoạn môi này, phương pháp chạy đoạn môi được sử dụng bằng cách sử dụng hệ thống 5' RACE System cho khuếch đại nhanh (Rapid Amplification) phiên bản đầu cuối ADN bổ trợ (cDNA Ends Version 2.0) (Invitrogen). 5'-RACE tạo ra mảnh khoảng 800 bp (cặp bazơ). Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, thu được thông tin trình tự mới trên cơ sở thông tin trình tự từ trình tự trước đã được sử dụng để phác thảo các oligonucleotit mới. Đầu 5' của hệ gen virus này cũng được xác định bằng phương pháp 5'-RACE. Thu được đầu 3' của hệ gen virus sau khi nối ARN với ligaza T4 RNA ligase1 (New England Biolabs). Phản ứng nối này được tinh chế tiếp bằng kit phân lập High Pure RNA (Roche) và thực hiện RT-PCR bằng cách sử dụng kit Superscript III One Step RT-PCR với nhãn Platinum Taq (Invitrogen). Mảnh ADN bổ trợ thu được được tách dòng vào vector pCR2.1 (Invitrogen) và được tạo trình tự. Ba plasmid từ mỗi mảnh được nhân dòng được xác định trình tự theo cả hai hướng, do đó tạo ra trình tự phủ 6x cho mỗi nucleotit.

Trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của chủng APMV-8 được phân tích là 15342 nucleotit, điều này phù hợp với quy tắc sáu (Calain, P. & Roux, L., 1993) cho *Paramyxovirinae*. Sáu khung đọc mở (ORF) được phát hiện và mã hoá các protein. Trật tự của protein này được xác định là 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (trình tự hệ gen SEQ ID NO:1

là theo hướng 5' đến 3' đối hệ gen) bằng cách sử dụng sự tương tự trình tự protein đối với protein của paramyxovirut thuộc loài chim khác. Codon khởi đầu và codon kết thúc giả định của các ORF và khối lượng phân tử (MW) theo lý thuyết (mạng của Swiss Institute of Bioinformatics ExPASy ExPASy) của các protein được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2 Thông số của các protein được mã hoá bởi trình tự APMV-8

Protein	Codon bắt đầu	Codon kết thúc	MW theo ý thuyết (kD)
Nucleoprotein (NP)	141-143	1524-1526	51,2
Protein phospho (P)	1693-1695	2908-2910	43,5
Protein nền (M)	3076-3078	4193-4195	40,6
Protein liên hợp (F)	4499-4501	6128-6130	58,5
Ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza (HN)	6383-6385	8114-8116	63,5
Polymeaza (L)	8273-8275 hoặc	15011-15013	254,6
	8297-8299		253,6

Xác định trình tự dẫn đầu và trình tự dẫn hệ gen giả định bằng cách xác định trình tự bắt đầu gen giả định của gen NP (gen dẫn đầu) và trình tự kết thúc gen giả định của protein L (đoạn dẫn). Đoạn dẫn đầu là nằm ở nucleotit từ 1 đến nucleotit 55. Trình tự bắt đầu gen giả định (nt 56-63) của gen NP kết thúc đoạn dẫn đầu. Trình tự dẫn nằm ở phía sau trình tự kết thúc gen cuối trong hệ gen virut. Do sự có mặt của hai trình tự kết thúc gen giả định cho gen ARN polymeaza (nt 15161-15171 hoặc 15288 -15297) đã nhận diện được hai trình tự dẫn giả định (nt 15172-15342 hoặc nt 15289-15342). Vị trí của trình tự bắt đầu gen giả định (trình tự chứa poly G) và trình tự kết thúc gen (trình tự tín hiệu cho sự bổ sung chuỗi poly (A)) và trình tự vùng liên gen được tổng kết trong Bảng 3.

Bảng 3 Xác định trình tự và vị trí của giả định trình tự bắt đầu gen, vùng liên gen, và kết thúc gen của APMV-8

Gen	Bắt đầu gen	Kết thúc gen	Vùng liên gen
Nucleoprotein	56-63	1615-1625	1626-1627
Phosphoprotein	1628-1635	2991-3001	3002-3031
Protein nền	3032-3039	4404-4416	4417-4441
Protein dung hợp	4442-4449	6260-6271	6272-6278
Ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza	6279-6287	8261-8273	8274-8275
ARN polymeaza	8275-8283	15161-15171 hoặc 15288-15297	

Bảng 4 SEQ ID NO so với trình tự ADN và protein.

SEQ ID NO	Tên gen	Loại
1	trình tự hệ gen APMV-8	ADN hoặc ARN
2	Nucleoprotien APMV-8 (NP)	ADN hoặc ARN
3	Nucleoprotien APMV-8 (NP)	Protein
4	protein phospho APMV-8 (P)	ADN hoặc ARN
5	protein phospho APMV-8 (P)	Protein
6	Protein nền APMV-8 (M)	ADN hoặc ARN
7	Protein nền APMV-8 (M)	Protein
8	Protein liên hợp APMV-8 (F)	ADN hoặc ARN
9	Protein liên hợp APMV-8 (F)	Protein
10	Ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza APMV-8 (HN)	ADN hoặc ARN
11	Ngưng kết tổ hồng cầu/neuraminidaza APMV-8 (HN)	Protein
12	ADN polymeaza (L) APMV-8	ADN hoặc ARN
13	protein 1 polymeaza (L) APMV-8	Protein
14	protein 2 Polymeaza (L) APMV-8	Protein

Trình tự bắt đầu gen giả định cho APMV-8 được bảo toàn chứa trình tự poly (C)₅ tiếp đó là trình tự 3'-GCU-5'. Ngoại trừ duy nhất là trình tự bắt đầu gen giả định cho polymeaza ARN virus (3'-CUCCCGCU-5'). Trình tự kết thúc gen giả định cũng là bảo toàn và chứa trình tự poly (U)₆ ở trình tự 5' của hệ gen virus (Bảng 5).

Bảng 5 Trình tự bắt đầu gen và kết thúc gen của APMV-8

	Tên gen	Trình tự (5-3' hướng kháng hệ gen)	SEQ ID NO
Bắt đầu gen	gen NP	CCCCCGCUUCUGUCA	24
	gen P	CCCCCGCUGGAGUUA	25
	gen M	CCCCCGCUUCUGUGC	26
	gen F	CCCCCGCUUUAGAAC	27
	gen HN	CCCCCGCUGGGUAAA	28
	L	CUCCCGCUGGAGAUG	29
Kết thúc gen	gen NP	AACUAAAUUCUUUUUU	30
	gen P	UAACUAAUUCUUUUUU	31
	gen M	AGGAUUAUAUUUUUU	32
	gen F	CUAUAAAUAUUUUUU	33
	gen HN	UACUUAUAUUCUUUUUU	34
	gen L (1)	ACUAAAUAUUCUUUUUU	35
	gen L (2)	UUAUUGAUUUUUUUUU	36

Các trình tự này được dự đoán dựa trên các trình tự được mô tả cho các paramyxovirus khác thuộc giống *Avulavirus* (Chang et al., 2001, Nayak et al, 2008, Jeon et al., 2008). Có thể có hai codon bắt đầu cho ORF của ARN polymeaza. Codon bắt đầu đầu tiên (nt 8273-8275) nằm ở in the vùng kết thúc gen –vùng liên gen- bắt đầu gen nằm giữa ORF HN và ORF polymeaza ARN virus. Quá trình này làm cho codon bắt đầu ít có thể xảy ra nhưng không phải là không thể. Codon bắt đầu thứ hai (8297 -8299) nằm ở

phía sau vùng kết thúc gen –vùng liên gen- bắt đầu gen và có thể hoạt động như codon khởi đầu cho sự bắt đầu dịch mã ARN polymeaza của APMV-8.

Hệ gen APMV-8 có chiều dài 15342 nt (nucleotit). Gen này là dài hơn APMV-1 (SQ ID NO:15, 15186 nt, de Leeuw & Peeters, 1999), APMV-2 (SEQ ID NO:16, 14,904 nt, Subbiah et al., 2008), và APMV-4 (SEQ ID NO:18, 15054 nt, Nayak et al., 2008), và ngắn hơn APMV-3 (SEQ ID NO:17, 16,272 nt, Kumar et al., 2008) và APMV-9 (SEQ ID NO:20, 15,438 nt, Samuel et al., 2009). Chiều dài gồm 55 nt của đoạn dẫn đầu dường như là bảo toàn trong tất cả APMV (Krishnamurthy & Samal, 1998, de Leeuw & Peeters, 1999, Subbiah et al., 2008, Nayak et al., 2008, Kumar et al., 2008, Samuel et al., 2009) trong khi đó trình tự dẫn đường như có chiều dài thay đổi. Các trình tự bắt đầu gen và trình tự kết thúc gen của gen virus có tính bảo toàn cao đối với APMV-8 (như được chỉ ra trên Bảng 5). Điều này cũng đã được mô tả cho các trình tự APMV-2 (Subbiah et al., 2008), APMV-3 (Kumar et al., 2008), APMV-4 (Jeon et al., 2008, Nayak et al., 2008), APMV-6 (Chang et al., 2001), và gần đây là cho APMV-9 (Samuel et al., 2009). Số nucleotit của trình tự có chiều dài đầy đủ là bội số của sáu, điều này là phù hợp với vai trò của bộ sáu cho hệ gen paramyxovirus (Kolakofsky et al., 1998).

Mức đồng nhất trình tự giữa trình tự hệ gen APMV-1, 2, 3, 4, 6, 8, và 9 được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Phần trăm mức đồng nhất trình tự giữa các hệ gen của APMV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, và 9

APMV		1	2	3	4	6	7	8	8	8	8	9
	SEQ ID NO	15	16	17	18	19	20	1	37	38	39	40
8	1	48	61	47,2	47,6	52	53	100	99,1	96,5	96,4	48

Phần trăm mức đồng nhất trình tự giữa hai axit nucleic hoặc trình tự polypeptit được xác định bằng cách sử dụng gói phần mềm Vector NTI 11.0 (PC) (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Dùng điểm phạt mở khe bằng 15 và điểm phạt kéo dài khe 6,66 để xác định phần trăm đồng nhất giữa hai axit nucleic. Dùng điểm phạt mở khe bằng 10 và điểm phạt kéo dài khe bằng 0,1 cho việc xác định phần trăm đồng nhất giữa hai polypeptit. Phần trăm đồng nhất được tính toán dựa trên trình tự ngắn hơn.

Ví dụ 4 Dùng vacxin cho gà giò một ngày tuổi bằng chủng APMV-8

Hai mươi con gà giò một ngày tuổi được chia thành hai nhóm theo bảng 7 được thể hiện sau đây.

Vào ngày 1, lấy máu gà một ngày tuổi để xác định tình trạng kháng thể đối với virut gây bệnh Newcastle (NDV) và APMV-8 bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (xét nghiệm HI). Xét nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng dịch túi niệu từ trứng SPF được chuyển nhiễm chủng NDV Lasota hoặc APMV-8. Bốn đơn vị HA của chủng NDV Lasota hoặc APMV-8 và 1% tế bào hồng cầu gà được sử dụng cho xét nghiệm HI. Hiệu giá HI thu được cho thấy là huyết thanh gà chứa kháng thể HI chống lại NDV nhưng không phát hiện được kháng thể chống lại virut APMV-8.

Bảng 7. Chuyển nhiễm/dùng vaccin cho gà giò một ngày tuổi

Điều trị	Nhóm 1 (mười con gà một ngày tuổi)	Nhóm 2 (phòng trừ) (mười con gà một ngày tuổi)
Ngày 1: dùng vaccin với chủng APMV-8	Có	Không
Ngày 14: xét nghiệm HI	Có	Có
Ngày 14: dùng vaccin thứ hai bằng chủng APMV-8 (tăng cường)	5 gà (nhóm 1-1): dùng vaccin lần 2/ dùng vaccin lần 1. 5 gà (nhóm 1-2): không dùng vaccin lần 2/ dùng vaccin lần 1	5 gà (nhóm 2-1): dùng vaccin lần 2 5 gà (nhóm 2-2): không cho dùng vaccin
Ngày 28: xét nghiệm HI	Có	Có

Vào ngày 1, nhóm gồm từ 1 đến 10 gà được chuyển nhiễm qua đường mũi bằng 10^6 EID₅₀ chủng APMV-8, nhóm 2 gồm 10 gà không được chuyển nhiễm được dùng làm mẫu đối chứng.

Mười bốn ngày sau khi gây nhiễm (ngày 14), các con này gà được lấy máu và các mẫu huyết thanh thu được được phân tích về sự có mặt của kháng thể HI chống lại NDV và APMV-8 (Fig. 20). Kết quả cho thấy là gà được cho dùng vaccin APMV-8 cho hiệu giá HI khi sử dụng APMV-8 làm kháng nguyên. Hiệu giá HI đặc hiệu APMV-8 nằm trong khoảng từ 128 đến 2048. Hiệu giá HI đối với NDV giảm xuống hiệu giá HI thấp hơn 16, do đó chúng không được xem là NDV dương tính. Kết quả này cho thấy là kháng thể có nguồn gốc tự mẹ ở gà chống lại NDV không loại trừ gây nhiễm bằng APMV-8, do đó sự gây nhiễm của các kháng thể này với việc dùng vaccin APMV-8 là không thể xảy ra.

Mười bốn ngày sau khi chuyển nhiễm (ngày 14), các con gà ở nhóm 1 và nhóm 2 được chia ra. Năm con gà ở mỗi trong số nhóm 1 (nhóm 1-1) và nhóm 2 (nhóm 2-1) được chuyển nhiễm tiếp bằng 10^6 EID₅₀ của chủng APMV-8 (bảng 7), năm gà còn lại

trong mỗi nhóm (nhóm 1-2 và nhóm 2-2) không được gây nhiễm. Thử nghiệm này được thiết kế để khảo sát xem liệu lần nhiễm gà sau đó có tác động đến sự gây nhiễm và liệu gây nhiễm thứ hai (dùng vaccin tăng cường) có làm tăng hiệu giá kháng thể. Mười bốn ngày sau (ngày 28), tất cả gà được lấy máu tiếp và khảo sát huyết thanh xem liệu có sự có mặt của kháng thể APMV-8 và NDV. Hiệu giá huyết thanh (Fig. 21) cho thấy là việc dùng vaccin lần đầu vào ngày 14 (nhóm 2-1) gây ra các hiệu giá kháng thể đặc hiệu APMV-8 nằm trong khoảng từ 32 đến 512. Ở gà được cho dùng vaccin chỉ vào ngày 1 (nhóm 1-2), hiệu giá kháng thể giảm xuống đến hiệu giá nằm trong khoảng từ 128 đến 512. Ở gà mà đã được cho dùng vaccin vào ngày 1 và ngày 14 (nhóm 1-1), các hiệu giá kháng thể đặc hiệu APMV-8 không gia tăng, điều này gợi ý là virus được sử dụng cho lần gây nhiễm thứ hai bị trung hoà bởi các kháng thể đặc hiệu APMV-8 được gây ra bởi lần gây nhiễm thứ nhất. Huyết thanh của nhóm đối chứng không được cho dùng vaccin (nhóm 2-2) không chứa Kháng thể HI đặc hiệu APMV-8. Vào ngày 28, kháng thể NDV giảm xuống tiếp, chỉ 11 trong số 20 con gà cho thấy là hiệu giá HI bất kỳ đối với kháng nguyên NDV trong khi đó vào ngày 14 mười bốn con gà thể hiện hiệu giá kháng thể thấp đối với NDV.

Ví dụ 5 Dùng vaccin *in ovo* cho trứng SPF có phôi

Nghiên cứu này được thực hiện để thử nghiệm xem liệu việc dùng vaccin bằng APMV-8 *in ovo* có gây ra đáp ứng kháng thể ở gà hay không và liệu việc dùng vaccin *in ovo* có gây ảnh hưởng đến tỷ lệ nở trứng và khả năng sống.

Trong nghiên cứu 1, 108 trứng SPF được cho dùng vaccin bằng chủng virus APMV-8 *in ovo* bằng cách sử dụng INOVOJECT (Pfizer Animal Health, NY, USA) vào ngày 18 của quá trình ủ. Virus này được pha loãng trong nước muối NaCl vô trùng 0,9%. Sự chuẩn độ ngược virus được pha loãng cho hiệu giá $10^{5.5}$ EID₅₀/100µl. 108 trứng được chũng ngừa bằng nước muối NaCl vô trùng 0,9% làm mẫu đối chứng. Thể tích cho mỗi lần tiêm chủng là 100µl cho mỗi trứng. Tám mươi gà nở ra từ nhóm đối chứng và bốn mươi năm con gà nở ra từ nhóm được cho dùng vaccin APMV-8. Mười con gà từ mỗi nhóm đưa vào bộ phận Horsefall-Bauer. Ngoài ra, gà của nhóm được cho dùng vaccin

APMV-8 và năm con gà thuộc nhóm đối chứng được cho cùng vào bộ phận Horsefall-Bauer để thí nghiệm sự truyền APMV-8 sau khi dùng vaccin. Nước và thức ăn được cấp *ad libitum*. Mười bốn và hai mươi tám ngày sau khi nở, các mẫu máu được lấy ra và được xét nghiệm về sự có mặt của kháng thể HI chống lại APMV-8 bằng cách sử dụng 4 đơn vị HA và 1% tế bào hồng cầu gà. Các kết quả (Fig. 22) cho thấy là việc dùng vaccin *in ovo* vào ngày 18 trong quá trình ủ gây ra đáp ứng miễn dịch như được thể hiện bằng sự có mặt của hiệu giá HI trong các mẫu huyết thanh được thử nghiệm. Mười bốn ngày sau khi nở, thu được hiệu giá HI từ 256 đến 4048 ở nhóm được cho dùng vaccin *in ovo*. Trong huyết thanh của các con gà tiếp xúc với nhau, thu được hiệu giá HI từ 256 đến 2048 14 ngày sau tiếp xúc với gà từ nhóm được cho dùng vaccin, điều này chứng tỏ có sự rơi của virus được sử dụng dùng vaccin. Nhóm đối chứng không thể hiện bất kỳ hiệu giá HI nào đặc hiệu nào cho APMV-8. Mười bốn ngày sau, gà được lấy máu tiếp và cho thấy hiệu giá từ 256 đến 4096 ở nhóm được cho dùng vaccin APMV-8 và từ 256 đến 1024 ở nhóm tiếp xúc APMV-8. Nhóm đối chứng không thể hiện sự có mặt của kháng thể HI APMV-8.

Trong nghiên cứu 2, 88 trứng SPF (không bị bệnh) được cho dùng vaccin *in ovo* bằng cách sử dụng INOVOJECT vào ngày 19 của quá trình ủ. Chủng virus APMV-8 được pha loãng trong 0,9% nước muối NaCl vô trùng. Hiệu giá của virus là $10^{5,75}$ EID₅₀/100μl như thu được sau khi chuẩn độ ngược virus được pha loãng. 88 trứng SPF được chủng ngừa 0,9% nước muối NaCl vô trùng được dùng làm mẫu đối chứng. Thể tích dùng cho tiêm chủng là 100μl cho mỗi trứng. Có bảy mươi tư gà nở ra từ nhóm đối chứng (NaCl) và bảy mươi sáu gà nở ra từ nhóm được cho dùng vaccin APMV-8. Mười con gà từ mỗi nhóm được đưa vào buồng nuôi Horsefall-Bauer. Nước và thức ăn được cấp *ad libitum*. Mười bốn ngày sau khi nở, các mẫu máu được lấy ra và được xét nghiệm về sự có mặt của kháng thể HI chống lại APMV-8 bằng cách sử dụng 4 đơn vị HA và 1% tế bào hồng cầu gà. Các kết quả (Fig. 23) cho thấy là việc dùng vaccin *in ovo* vào ngày 19 của quá trình ủ gây ra đáp ứng miễn dịch với hiệu giá HI đặc hiệu cho APMV-8. Mười bốn ngày sau khi nở, thu được hiệu giá HI từ 256 đến 4048 ở nhóm được cho dùng vaccin APMV-8 *in ovo*. Nhóm đối chứng không thể hiện bất kỳ hiệu giá HI nào đặc hiệu cho APMV-8. Các con gà được lấy máu tiếp vào ngày 28 sau khi nở. Hiệu giá HI cho nhóm

được cho dùng vaccin APMV-8 thay đổi từ 512 đến 4096 (Fig. 23) trong khi đó huyết thanh này cho gà đối chứng vẫn là âm tính với APMV-8.

Trong nghiên cứu thứ ba, 108 trứng SPF ở nhóm 1 và nhóm 2 được cho dùng vaccin *in ovo* bằng cách sử dụng INOVOJECT vào ngày 18 ủ lần lượt bằng $10^{3,5}$ EID₅₀ và $10^{4,5}$ EID₅₀. Chủng virus APMV-8 được pha loãng trong 0,9% nước muối NaCl vô trùng. Trong nhóm thứ ba, 108 trứng SPF được chủng ngừa 0,9% nước muối NaCl vô trùng làm đối chứng. Tám mươi ba gà nở ra từ nhóm 1, bảy mươi chín gà nở ra từ nhóm 2, và tám mươi tám gà nở ra từ nhóm 3 (Tham khảo bảng 8). Sau khi nở, mười con gà từ mỗi nhóm đưa vào phòng nuôi Horsfall-Bauer. Nước và thức ăn được cấp *ad libitum*. Sau khi nở, mười con gà từ nhóm 3 được cho dùng vaccin dưới da trong vùng cổ với thể tích 100 μ l 10^6 EID₅₀ virus APMV-8. Mười bốn ngày sau khi nở, các mẫu máu được lấy ra và được xét nghiệm về sự có mặt của kháng thể HI chống lại APMV-8 bằng cách sử dụng 4 đơn vị HA và 1% tế bào hồng cầu gà (CRBS). Các kết quả (Fig. 24) cho thấy là việc dùng vaccin *in ovo* vào ngày 18 của quá trình ủ gây ra đáp ứng miễn dịch với hiệu giá HI đặc hiệu cho APMV-8. Mười bốn ngày sau khi nở, phát hiện được hiệu giá HI từ 4096 đến 16384 ở các nhóm được cho dùng vaccin APMV-8 *in ovo*. Nhóm đối chứng không thể hiện bất kỳ hiệu giá HI nào đặc hiệu cho APMV-8. Nhóm được cho dùng vaccin bằng APMV-8 dưới da cho thấy sự chuyển hóa huyết thanh với hiệu giá nằm trong khoảng từ 64 đến 4096. Các con gà được lấy máu tiếp vào ngày 28 sau khi nở và được xét nghiệm về sự có mặt của kháng thể HI đặc hiệu APMV-8. Hiệu giá HI vào thời điểm bốn tuần sau khi nở giảm đi và thay đổi trong khoảng từ 512 đến 4096. Nhóm đối chứng không thể hiện bất kỳ hiệu giá HI nào đặc hiệu cho APMV-8. Hiệu giá HI trong nhóm được cho dùng vaccin dưới da cho hiệu giá HI nằm trong khoảng từ 32 đến 256.

Bảng 8

	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3 (đối trứng)
Trứng SPF	108	108	108
Gà đã nở	83	79	88
Dùng vacxin bằng APMV-8 vào ngày 18 của quá trình ủ	$10^{3,5}$ EID ₅₀ 100µl cho mỗi trứng	$10^{4,5}$ EID ₅₀ 100µl cho mỗi trứng	0,9% nước muối NaCl vô trùng

Ví dụ 6 Sự phát triển của di truyền ngược dòng chủng APMV-8 và tạo các đột biến APMV-8 biểu hiện các gen khác loài

Cấu trúc các plasmit biểu hiện chứa gen NP, P, và L của APMV-8

Để thiết lập hệ di truyền ngược cho paramyxovirut, việc thiết lập plasmit biểu hiện protein tham gia vào quá trình sao chép virut ARN là thiết yếu. Các khung đọc mở (ORF) của ba protein APMV-8 (nucleoprotein NP, phosphoprotein P, protein polymeaza ARN phụ thuộc ARN hoặc protein L) được tách dòng vào vector biểu hiện của sinh vật có nhân điển hình pcDNA3 (Invitrogen, California, USA). Để đạt được mục đích này, ARN của dịch tủy niệu chứa APMV-8 được tinh chế bằng cách sử dụng kit phân lập High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland). ARN tinh chế được sử dụng cho phản ứng dây chuyền polymeaza phiên mã ngược (RT-PCR) bằng cách sử dụng kit Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche). Các ORF của protein được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi thích hợp: [NP (NP-FP, NP-RP), P (P-FP, P-RP), L (L-FP, L-RP), tham khảo bảng 9]. Các sản phẩm của phản ứng được tách ra trên gel agarosa 0,7% và được rửa giải khỏi gel bằng cách sử dụng kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các mảnh RT-PCR được ủ với enzym giới hạn thích hợp (NP và P với Eco RI/NotI; L với Kpn I/NotI), được rửa giải bằng gel tiếp và được gắn vào vector biểu hiện của sinh vật có nhân điển hình pcDNA3 đã được phân cắt bằng enzym giới hạn thích hợp. Các sản phẩm phản ứng nối được biến nạp vào các tế bào Top10F (Invitrogen) và ADN plasmit được gom từ các tế bào Top10F đã được phân cắt bằng các

enzym giới hạn thích hợp (Tham khảo nêu trên). Các plasmit chứa mảnh ADN (pDNA-NP, pcDNA-P, pcDNA-L) với kích cỡ thích hợp được xác định trình tự.

Bảng 9. Đoạn mồi cho khuếch đại gen protein của phức hợp RNP

Tên đoạn mồi	Trình tự đoạn mồi ^a	Hướng ^b	Vị trí	SEQ ID NO:
NP-FP-pc3	Eco RI ccGAATTCATGTCATCTGTGTTCAATGAGTATCAGG	có nghĩa	141-168	41
NP-RP-pc3	Not I ccGCGGCCGCTTACCATTCTAGCCCGTTCTCGTATG	đổi nghĩa	1501- 1526	42
P-FP-pc3	Eco RI ccGAATTCATGGATTTCGCCAATGATGAAG	có nghĩa	1693- 1714	43
P-RP-pc3	Not I ccGCGGCCGCTTACGCATTATATATTGCCTGCTTGACTCG	đổi nghĩa	2881- 2910	44
L-FP-pc3	Kpn I ccGGTACCATGGATATAAAACAAGTTGACCTG	có nghĩa	8292- 8320	45
L-RP-pc3	Not I ccGCGGCCGCTTATTTCAACTTGATGATTGCACCG	đổi nghĩa	14989- 15013	46

^a Trình tự đoạn mồi chứa vị trí phân cắt enzym giới hạn được sử dụng cho nhân dòng vô tính. Các vị trí hạn chế là chữ in đậm và được chỉ ra. Codon kết thúc và codon dừng được thể hiện bằng chữ in nghiêng. Các trình tự đặc hiệu cho virus được gạch chân.

^b Hướng của trình tự đoạn mồi là theo ARN thông tin của virus.

^c Vị trí là trình tự đặc hiệu cho virus trong hệ gen có chiều dài đầy đủ như đã được chỉ ra.

Cấu trúc của plasmit chứa hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ

Để tái tạo plasmit chứa hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ, hệ gen ADN bổ trợ của virus được tổng hợp (Genscript, New York, USA) dựa trên trình tự liên ứng được tạo ra ở hai phần khác nhau (5'-FLG, 3'-FLG, tham khảo Fig. 25). Phần 5' (5'-FLG, SEQ ID NO:47) của trình tự virus được tổng hợp từ nucleotit 1-5564. Phía trước trình tự APMV-8 là caxét trình tự bao gồm gen khởi đầu CMV-IE, tiếp đó là trình tự phân cắt của enzym giới hạn cho XmaI (cho quy trình nhân dòng sau đó nếu có thể) và trình tự ribozym hình đầu búa. Ở đầu 5' và 3' của trình tự, vị trí phân cắt enzym giới hạn cho Not I và SacII được lần lượt cho vào. Phần 3' được tổng hợp (3'-FLG, SEQ ID NO:48) của trình tự (nucleotit 5503-15342) tiếp đó là trình tự delta ribozym của virus bệnh viêm gan và trình tự tín hiệu poly-A của hormon sinh trưởng bò. Cho mục đích nhân dòng vô tính, trình tự cho enzym giới hạn Not I được cho vào ở đầu 5' của 3'-FLG và trình tự cho enzym giới hạn Sac II được cho vào ở đầu 3' của trình tự này. Trong phần trùng lên nhau của 5'-FLG và 3'-FLG (nucleotit 5503-5564) có trình tự cho enzym giới hạn duy nhất (Bmt I) phần này phân cắt ở nucleotit 5541 của trình tự có chiều dài đầy đủ. Cả hai phần của ADN (5'-FLG, 3'-FLG) được nối riêng rẽ vào plasmit pUC57 (Genscript) tạo ra các plasmit pUC57/5'-FLG và pUC57/3'-FLG. Để nhân dòng cả hai mảnh với, pUC57/5'-FLG được phân cắt bằng BmtI và Sac II và plasmit chứa 5'-FLG được rửa giải bằng gel. Đồng thời, pUC57/3'-FLG được phân cắt bằng cùng một enzym và mảnh 3'-FLG được rửa giải. 3'-FLG sau đó được gắn vào plasmit chứa 5'-FLG để thu được plasmit chứa trình tự có chiều dài đầy đủ ADN bổ trợ của hệ gen APMV-8 nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu CMV-IE (pUC57-FL-APMV-8).

Cấu trúc của plasmit chứa hệ gen mini của APMV-8

Plasmit chứa tất cả các yếu tố chức năng của hệ gen mini cho APMV-8 (pMG-APMV-8) được cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Conzelmann, và các đồng tác giả (J Virol. 68:713-719, 1994). Plasmit pMG-APMV-8 chứa vùng đoạn dẫn và gen dẫn đầu của hệ gen APMV-8 mà nằm cạnh sườn gen khởi đầu T7 và trình tự ribozym của virus delta kháng hệ gen của virus bệnh viêm gan (Collins, et al., PNAS USA 88:9663-9667, 1991). Trình tự ribozym của virus delta của virus bệnh viêm gan được tiếp

theo là trình tự kết thúc phiên mã T7. Nằm giữa vùng đoạn dẫn và gen dẫn đầu có trình tự mã hoá protein phát huỳnh quang xanh tăng cường theo chiều đối nghĩa. Phía trước trình tự dẫn và ngay lập tức sau gen khởi đầu T7 có ba gốc G bổ sung. Đoạn cài xen này nằm cạnh sườn các vị trí phân cắt enzym giới hạn Eco RI và Not I và được tách dòng đầu cùn vào plasmit pUC57. Cờu trúc này được tách dòng phụ vào plasmit pUC18. Để đạt được mục đích này, khi đó plasmit pMG-APMV-8 được phân cắt bằng Eco RI và Hind III và mảnh thích hợp được rửa giải bằng gel và được gắn vào plasmit pUC18 được phân cắt một cách thích hợp để thu được pUC18-MG-APMV-8. Sự có mặt của của đoạn cài xen này được khẳng định bằng cách tạo trình tự.

Tạo plasmit biểu hiện cho phép biểu hiện của polymeaza T7

Để tái tạo plasmit mã hoá polymeaza ARN phụ thuộc ADN T7 (polymeaza T7) trình tự mã hoá này (Số truy cập Genbank AY264778) được tổng hợp bằng Genscript. Trình tự polymeaza T7 (SEQ ID NO:49) được cải biến để tối ưu hóa sử dụng codon cho việc biểu hiện trong hệ thống có nhân điển hình và để tách loại các vị trí thể cho cắt ghép/thể nhận trong trình tự. Trình tự mã hoá polymeaza T7 nằm cạnh sườn vị trí EcoRI (5') và NotI (3'). Mảnh được tổng hợp này được tách dòng đầu cùn vào vector pUC57 (pCU57-T7). Plasmit này được phân cắt bằng EcoRI/NotI và mảnh mã hoá polymeaza T7 được rửa giải bằng gel. Sau đó, mảnh này được tách dòng vào vector biểu hiện của sinh vật có nhân điển hình pcDNA3 (Invitrogen) để thu được pcDNA3-T7. Sự có mặt của mảnh này trong vector pcDNA3-T7 được xác nhận bằng cách tạo trình tự.

Tạo plasmit cho biểu hiện của protein phát huỳnh quang xanh tăng cường với việc sử dụng vị trí đầu vào ribosom nội tại nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu T7.

Để thí nghiệm chức năng của polymeaza T7, khung đọc mở của protein phát huỳnh quang xanh tăng cường (EGFP) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng plasmit pEGFP-N1 (Clontech, California, USA) và cặp đoạn mồi:

EGFP-FP (CCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG) SEQ ID NO:50 và

EGFP-RP (CCGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG) SEQ ID NO:51

Mảnh PCR thu được được rửa giải bằng gel và được ủ bằng các enzym giới hạn BamHI và NotI. Sản phẩm phản ứng này được rửa giải bằng gel và được gắn vào vector được phân cắt một cách thích hợp pCITE 4A (Novagen). Plasmid thu được (pCITE4A-EGFP) được sử dụng cho thử nghiệm sau đó. Các plasmid pCITE4A-EGFP và pcDNA3-T7 được chuyển nhiễm đơn lẻ hoặc kết hợp với dòng tế bào gà DF1 được nuôi trong các đĩa 24 giếng bằng cách sử dụng Lipofectin 2000 (Invitrogen). Hai mươi bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường này được loại ra và cho muối đệm phosphat vô trùng (PBS) vào. Các tế bào này được đánh giá bằng cách sử dụng kính hiển vi phát huỳnh quang đảo ngược Axiovert 40 CFL (Zeiss, Jena, Germany). Chỉ phát hiện được huỳnh quang màu xanh ở các lỗ của đĩa nuôi cấy mô được đồng chuyển nhiễm bằng cả hai plasmid. Kết quả này cho thấy là cả hai plasmid, pCITE4A-EGFP và pcDNA3-T7, đều có chức năng.

Tính hợp lệ của chức năng của protein virus được biểu hiện NP, P, và L bằng cách sử dụng hệ gen mini plasmid

Các tế bào DF1 được đồng chuyển nhiễm bằng pcDNA3-T7, pUC18-MG-APMV-8, pDNA-NP, pcDNA-P, và pcDNA-L để xác định chức năng của các protein NP, P và L được biểu hiện. Hai mươi bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường được loại ra và cho muối đệm phosphat vô trùng (PBS) vào. Các tế bào này được đánh giá bằng cách sử dụng kính hiển vi phát huỳnh quang đảo ngược Axiovert 40 CFL (Zeiss, Jena, Germany). Chỉ phát hiện thấy huỳnh quang màu xanh ở các lỗ của đĩa nuôi cấy mô mà đồng chuyển nhiễm bằng 5 plasmid. Kết quả này cho thấy là các protein virus được biểu hiện NP, P và L là có chức năng phiên mã hệ gen APMV-8 mini thành ARN thông tin và biểu hiện protein EGFP được mã hoá bởi pUC18-MG-APMV-8.

Sự thu nhận virus APMV8 từ plasmid chứa trình tự APMV-8 có chiều dài đầy đủ

Các tế bào DF1 được đồng chuyển nhiễm bằng pUC57-FL-APMV-8, pDNA-NP, pcDNA-P, và pcDNA-L. Sau 48 đến 96 giờ, phần dịch nổi của các tế bào DF1 được ủ trong các trứng có phôi 10 ngày tuổi để nhân virus. Sau từ 3 đến 5 ngày, dịch ở túi niệu

này được gom và được thử nghiệm về hoạt tính ngưng kết hồng cầu (HA) bằng cách sử dụng 1% tế bào hồng cầu gà. Dịch túi niệu được thử nghiệm dương tính về hoạt tính HA được sử dụng cho ba quy trình. 1) các tế bào DF1 được chuyển nhiễm bằng dịch ở túi niệu này và được thử nghiệm 36 giờ sau khi gây nhiễm bằng huyết thanh đặc hiệu APMV-8 về sự có mặt của biểu hiện protein APMV-8 trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp. 2) Dịch ở túi niệu này được thử nghiệm cho tính đặc hiệu APMV-8 bằng cách sử dụng huyết thanh gà đặc hiệu APMV-8 (được National Central Veterinary Laboratory, Ames, Iowa, USA cung cấp) thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu. 3) Sự thu nhận virus được nhận nhiệm bằng RT-PCR bằng cách sử dụng oligonucleotit đặc hiệu APMV-8. Sự vắng mặt của ADN bổ trợ virus được xác nhận bằng sự loại bỏ bước RT trong quá trình phản ứng. Các mẫu được thử nghiệm dương tính trong tất cả ba thử nghiệm này được nhân lên tiếp trong trứng gà SPF có phôi.

Sự nhân lên APMV-8 trong các tế bào ngoài các tế bào có nguồn gốc từ gà

Các tế bào từ các loài khác nhau [chuột đồng (các tế bào thận chuột đồng Baby, các tế bào BHK-21), khỉ (các tế bào Vero, dòng tế bào với nguồn gốc từ thận khỉ xanh châu Phi), và chó (các tế bào Madin-Darby, MDCK thận chó), và chim cú (dòng tế bào cơ chim cú QM7)] được nuôi trong các đĩa nuôi cấy mô 24 lỗ và được chuyển nhiễm bằng nhiều liều gây nhiễm 0,01. Các tế bào này được cố định bằng etanol được làm lạnh bằng nước đá 24 giờ sau khi chuyển nhiễm và được phân tích về sự có mặt của protein đặc hiệu APMV-8 bằng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp bằng cách sử dụng huyết thanh đặc hiệu APMV-8 từ gà SPF được gây nhiễm APMV-8. Sự gắn kết của các kháng thể được hiện hình ảnh bằng cách sử dụng thể liên hợp FITC đặc hiệu IgY của dê kháng gà. Các tế bào không được gây nhiễm được sử dụng làm đối chứng âm tính. Chỉ trong các tế bào được nhiễm APMV-8 là có huỳnh quang màu xanh. Điều này chứng tỏ rằng APMV-8 có thể gây nhiễm các tế bào từ loài không phải là gà.

Sự sao chép của APMV-8 được tăng lên trong sự có mặt của trypsin. Các tế bào MDCK được gây nhiễm bằng APMV-8 như đã nêu trên. Sau khi gây nhiễm, các tế bào được rửa bằng môi trường không chứa huyết thanh và được phủ lên bằng môi trường

không chứa huyết thanh chứa trypsin với nồng độ 1ug/ml hoặc chỉ bằng môi trường không chứa huyết thanh. Hai mươi bốn, bốn mươi tám, và chín mươi sáu giờ sau khi gây nhiễm, phần dịch nổi tế bào được loại ra và xác định TCID₅₀ trên các tế bào DF1 bằng cách sử dụng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp như đã nêu trên. Số liệu thu được cho thấy rằng khi có mặt trypsin APMV-8 sao chép đến hiệu giá cao hơn khi có mặt enzym này (Fig. 19B).

Các kết quả của ví dụ này chứng tỏ rằng giống như AMPV-1, APMV-8 có khả năng xâm nhập vào các tế bào ở các loài khác và khởi đầu chu trình sao chép của mình. Do đó, thích hợp làm vector cho nhiều loài.

Sản xuất virut APMV-8 tái tổ hợp biểu hiện các gen ngoại lai bằng cách sử dụng hệ di truyền ngược

Để tái tạo virut APMV-8 tái tổ hợp (vector virut) biểu hiện gen ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của bệnh cúm chim có khả năng gây bệnh cao (HPAI), trình tự mã hoá cho gen HA của HPAI của kiểu phụ virut H5 hoặc H7 được cài xen vào các vùng không thiết yếu, chẳng hạn, nằm giữa các gen M và F hoặc nằm giữa các gen P và M của hệ gen APMV-8 trong plasmit chứa hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ. Để đạt được mục đích này trình tự mã hoá của khung đọc mở ngưng kết tổ hồng cầu nằm cạnh sườn tất cả trình tự điều hoà cần thiết của gen F mà bao gồm trình tự bắt đầu gen, trình tự không mã hoá 5', trình tự không mã hoá 3' và trình tự gen dừng. Cấu trúc này được tổng hợp theo cách là vị trí phân cắt enzym giới hạn Bsu 36I và Nhe I được sử dụng để nối mảnh thích hợp vào plasmit có sẵn chứa hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ do đặc tính duy nhất của nó trong cấu trúc plasmit. Plasmit thu được được thiết kế thành plasmit phiên mã mà chứa gen ngưng kết tổ hồng cầu trong vùng không thiết yếu của hệ gen APMV-8 có chiều dài đầy đủ. Bằng cách sử dụng phương pháp này, các trình tự mã hoá nhiều loại kháng nguyên virut và vi khuẩn có thể được tách dòng vào khung chính của trình tự APMV-8. Các kháng nguyên có thể khác mà có thể được cài xen vào hệ gen APMV-8 là protein dung hợp của virut gây bệnh Newcastle, protein S virut bệnh viêm phế quản chim, các gen ngưng kết tổ hồng cầu khác từ virut cúm chim không phải là H5 và H7, gen protein

cấu trúc của virus bệnh thiếu máu mạn tính gà VP1, gen glycoprotein từ virus gây viêm nhiễm thanh-khí quản.

Ví dụ 7 Dùng vaccin cho động vật

Các động vật được cho dùng vaccin bằng một, hai lần cấp hoặc chế độ cơ bản-tăng cường của chế phẩm hoặc vaccin chứa Virus APMV-8 tái tổ hợp (vector virus) như mô tả ở Ví dụ 6. Đối với gà/chim, thực hiện các khác nhau, chẳng hạn, cấp *in ovo* vào D18 hoặc D19, dưới da (SC) vào một ngày tuổi, hoặc qua niêm mạc (phun xịt, nước uống, nhỏ mắt) ở các độ tuổi khác nhau. Liều này nằm trong khoảng từ 3 đến 7 log₁₀ (tốt hơn nếu là 4-6 log₁₀ EID₅₀). Đối với động vật có vú, dùng đường qua niêm mạc (trong mũi, trong mắt, qua đường miệng) hoặc ngoài đường tiêu hóa (trong cơ IM, dưới da SC, không dùng kim, trong da hoặc qua da). Các liều thay đổi từ 5 đến 9 log (tốt hơn nếu là 6-8 log). Hai lần cấp thường được thực hiện cách nhau từ 3-4 tuần. Chế độ cấp cơ bản-tăng cường khác loài (chẳng hạn như, chế độ tăng cường bằng protein) cũng được ưu tiên.

Hiệu quả bảo vệ được gây ra bởi chế phẩm hoặc vaccin này được đánh giá thông qua kích thích tác nhân gây bệnh đặc hiệu ở động vật. Tác động bảo vệ được đánh giá thông qua đánh giá theo dõi lâm sàng và/hoặc tải lượng virus của tác nhân gây bệnh cụ thể trong các miếng gạc mô, máu hoặc niêm mạc. Các mẫu máu từ động vật được cho dùng vaccin được lấy ở các giai đoạn khác nhau và được thử nghiệm về phân tích huyết thanh. Các kết quả cho thấy là chế phẩm hoặc vaccin theo sáng chế có khả năng sinh miễn dịch và tạo ra tác dụng bảo vệ cho động vật được cho dùng vaccin.

Sau khi đã mô tả các phương án được ưu tiên theo sáng chế, cần hiểu là sáng chế như được xác định trong đoạn nêu trên không chỉ bị giới hạn ở các chi tiết cụ thể được nêu trong phần mô tả nêu trên mà nhiều thay đổi từ đó có thể thực hiện mà không nằm ngoài nội dung hoặc phạm vi sáng chế.

Tất cả các tài liệu được viện dẫn hoặc trích dẫn trong bản mô tả này ("các tài liệu được viện dẫn trong bản mô tả này"), và tất cả các tài liệu được viện dẫn hoặc trích dẫn các tài liệu được viện dẫn trong bản mô tả này, cùng với các chỉ dẫn bất kỳ của nhà sản xuất, mô tả, đặc tính sản phẩm, và thông tin sản phẩm cho các sản phẩm bất kỳ được đề cập đến trong bản mô tả này hoặc tài liệu bất kỳ được kết hợp với bản mô tả này theo cách viện dẫn, được kết hợp vào bản mô tả này theo cách viện dẫn, và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế.

Các tài liệu tham khảo:

1. Alexander, 1988. Newcastle disease, p. x, 378 p. *In* D. J. Alexander (ed.), *Developments in veterinary virology*. Kluwer Academic, Boston.
2. Alexander, Characterization of viruses which represent further distinct serotypes (PMV-8 and PMV-9) of avian paramyxoviruses. *Arch Virol* 78:29-36.
3. Alexander, et al., 1979. Properties of a newly isolated, serologically distinct avian paramyxovirus. *Arch Virol* 60:105-13.
4. Alexander, 2003. Newcastle Disease, other Paramyxoviruses, and Pneumovirus *Avian Paramyxoviruses 2-9*, p. 63-99. *In* Y. M. Saif (ed.), *Diseases of poultry*, 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa.
5. Andral, et al., 1984. Isolation of avian paramyxovirus 2 and 3 from turkeys in Brittany. *Vet Rec* 114:570-1.
6. Bankowski, et al., 1981, Effect of paramyxovirus yucaipa on fertility, hatchability, and poult yield of turkeys. *Avian Dis* 25:517-20.
7. Bankowski, et al., 1960. Isolation of an Unidentified Agent from the Respiratory Tract of Chickens. *Science* 132:292-293.
8. Bradshaw, et al., 1979. The Epidemiology of Yucaipa Virus in Relationship to the Acute Respiratory Disease Syndrome in Turkeys. *Avian Diseases* 23:539-542.
9. Capua, et al., 2004. Isolation of an avian paramyxovirus type 9 from migratory waterfowl in Italy. *Vet Rec* 155:156.
10. Chambers, et al., 1988. Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccine-expressed hemagglutinin. *Virology* 167:414-421.

11. Collins, P. L., et al., 1991. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9663-9667
12. Conzelmann KK, and Schnell M., 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J Virol.* 68:713-719
13. Darteil, R., M. Bublot, E. Laplace, J.F. Bouquet, J.C. Audonnet and M. Riviere (1995). Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* **211**, 481–490.
14. de Leeuw, et al., 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* 80:131-136.
15. Fleury, et al., 1979. Isolation of twenty-three Yucaipa-like viruses from 616 wild birds in Senegal, West Africa. *Avian Dis* 23:742-4.
16. Gao, et al., (2006). Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol* 80:1959–1964.
17. Ge, et al., (2007) Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *Journal of Virology*, 81(1), 150-158.
18. Goodman, et al., 1988. Isolation of avian paramyxovirus-2 from domestic and wild birds in Costa Rica. *Avian Dis* 32:713-7.
19. Gough, et al., 1984. Avian paramyxovirus type 4 isolated from a ringed teal (*Calonetta leucophrys*). *Vet Rec* 115:653.

20. Hoelscher, et al., (2008). A broadly protective vaccine against globally dispersed clade 1 and clade 2 H5N1 influenza viruses. *J Infect Dis.* 197:1185-1188.
21. Huang, et al., (2004) A recombinant Newcastle Disease Virus (NDV) expressing VP2 protein of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *Journal of Virology*, 78, 10054-10063.
22. Hunt, et al., (1988). Retrovirus-expressed hemagglutinin protects against lethal influenza virus infections. *J Virol* 62:3014–3019.
23. Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. (2003). An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods.* 107:229-236.
24. Krishnamurthy, et al., 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J Gen Virol* 79:2419-2424.
25. Krishnamurthy, S., Huang, Z. & Samal, S. K. (2000) Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.
26. Lamb, et al., 2007. *Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication*, p. 1449-1496. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields' virology* 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
27. Lang, G., A. Gagnon, and J. Howell. 1975. The occurrence of Paramyxovirus yucaipa in Canadian poultry. *Can Vet J* 16:233-7.
28. Lipkind, et al., 1982. Isolation of yucaipa-like avian paramyxovirus from a wild mallard duck (*Anas platyrhynchos*) wintering in Israel. *Vet Rec* 110:15-6.
29. Lipkind, et al., 1979. The isolation of yucaipa-like paramyxoviruses from epizootics of a respiratory disease in turkey poultry farms in Israel. *Vet Rec* 105:577-8.

30. Maldonado, et al., (1995) Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(1), 66-69.
31. Mayo, et al., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147:1655-63.
32. Nayak B, et al., (2008). Molecular characterization and complete genome sequence of avian paramyxovirus type 4 prototype strain duck/Hong Kong/D3/75. *Viol J.* 20;5:124.
33. Park, et al., (2006) Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8203-8208.
34. Peeters, et al., (1999) Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology*, 73(6), 5001-5009.
35. Redmann, et al., 1991. [Isolation of a paramyxovirus-3 from turkeys with respiratory tract disease in Germany]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 98:138-41.
36. Reed, et al., 1938. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *Am. J. Epidemiol.* 27:493-497.
37. Römer-Oberdörfer, et al., (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *Journal of General Virology*, 80, 2987-2995.
38. Rosenberger, et al., (1974) Isolation of Newcastle disease and type-A influenza viruses from migratory waterfowl in the Atlantic flyway. *Avian Diseases*, 18(4), 610-613.
39. Saif, et al., 1997. Natural and Experimental Infection of Turkeys with Avian Paramyxovirus-7. *Avian Diseases* 41:326-329.

40. Shihmanter, et al., 1998. Isolation of avian serotype 3 paramyxoviruses from imported caged birds in Israel. *Avian Dis* 42:829-31.
41. Shihmanter, et al., 1998. Avian paramyxoviruses serotype 3 isolated from captive birds in Israel: clinical signs, pathology, and antigenic characterization. *Avian Dis* 42:418-22.
42. Shortridge, et al., 1980. Isolation and properties of viruses from poultry in Hong Kong which represent a new (sixth) distinct group of avian paramyxoviruses. *J Gen Virol* 49:255-262.
43. Schultz-Cherry, et al., (2000). Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses. *Virology* 278:55–59.
44. Stallknecht, et al., (1991) Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana. *Journal of Wildlife Diseases*. 27:123-128.
45. Stanislawek, et al., (2002) Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Archives of Virology*, V147, 1287-1302.
46. Tang M, et al., 2002. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/I/68 (H3N2). *Arch Virol* 147:2125–2141.
47. Taylor, et al., (1998). Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine* 6:504–508.
48. Toro, et al., (2007). Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine* 25:2886-2891.

49. Tumova, et al., 1979. A hitherto unreported paramyxovirus of turkeys. *Res Vet Sci* 27:135-40.
50. Tumova, et al., 1989. Further evidence of the circulation of PMV-4 and influenza viruses with N2-1957 enzyme in the migratory waterfowls. *Acta Virol* 33:573-6.
51. Veits, et al., (2003). Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. *J Gen Virol* 84:3343–3352.
52. Veits, et al., (2006) Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8197-8202.
53. Webster, et al., 1976. Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of influenza A viruses. *J Gen Virol* 32:217-25.
54. Yamane, et al., 1982. Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature. *Microbiol Immunol* 26:557-68.
55. Zhang, et al., 2007. Serological survey on prevalence of antibodies to avian paramyxovirus serotype 2 in China. *Avian Dis* 51:137-9.
56. Zhang, et al., 2006. Isolation, identification, and comparison of four isolates of avian paramyxovirus serotype 2 in China. *Avian Dis* 50:386-90.
57. Zou, et al., 2005. Complete Genome Sequence and Biological Characterizations of A Novel Goose Paramyxovirus-SF02 Isolated in China. *Virus Genes* 30:13-21.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chứa (i) vectơ virus APMV (paramyxovirus thuộc loài chim - avian paramyxoviruses) tái tổ hợp và (ii) chất mang được dụng hoặc dùng được trong thú y, trong đó vectơ virus APMV này là APMV-8, và trong đó vectơ virus APMV này chứa polynucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc polynucleotit bổ trợ với polynucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với polynucleotit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:1; trong đó vectơ virus APMV này còn chứa polynucleotit được phân lập mã hoá kháng nguyên của tác nhân gây bệnh, trong đó tác nhân gây bệnh là tác nhân gây bệnh ở chim, mèo, chó, ngựa, bò, cừu, dê, hoặc lợn, trong đó polynucleotit này được cài xen vào vùng không thiết yếu của hệ gen APMV này; và trong đó vùng không thiết yếu này được chọn từ vùng bao gồm vùng không dịch mã nằm trước khung đọc mở NP, vùng liên gen nằm giữa hai khung đọc mở của hệ gen APMV, và vùng không dịch mã nằm sau khung đọc mở L.

Fig. 1

Ngày mổ để xét nghiệm	Cơ quan	Đối chứng	APMV-2	APMV-4	APMV-6
2	Khí quản	0/5	0/5	2/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	1/5	2/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy	0/5	0/5	1/5	2/5
		0/5	2/5	0/5	1/5
4	Khí quản	0/5	2/5	0/5	1/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	1/5
	Tuyến tụy				
7		0/5			
	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	2/5
	Ruột	0/5	1/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy		0/5	0/5	1/5
14	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy	0/5	0/5	0/5	0/5
	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
28	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy	0/5	2/5	1/5	1/5

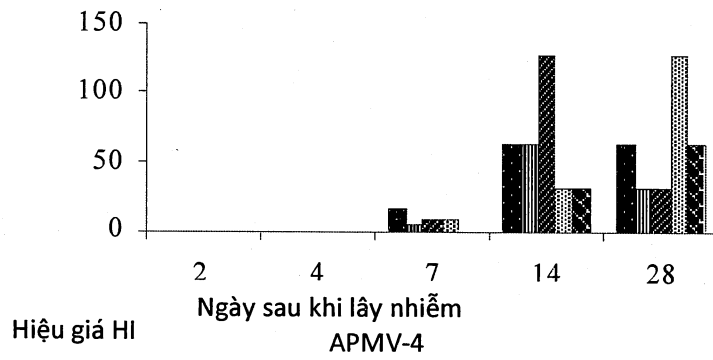
Fig. 2

Ngày mổ để xét nghiệm	Cơ quan	Đối chứng	Kiểu huyết thanh APMV		
			2	4	6
2	Khí quản – viêm khí quản xuất tiết				
	Ruột – viêm ruột non nhẹ	+	+	+	+
		-	+	+	+
4	Khí quản – loét ổ biểu mô đường hô hấp, viêm khí quản nhẹ	-	+	+	+
	Phổi – chứng tăng sản cử trú BALT	-	-	+	-
	Tuyến tụy – viêm tụy bạch huyết bào đa ổ	-	-	+	+
7	Khí quản – suy giảm ổ khí quản	-	+	-	-
	Phổi – chứng tăng sản BALT nhẹ	-	-	+	+
	Ruột – bệnh ruột ở nang, viêm ruột non ổ	-	-	-	+
	Tuyến tụy – xâm nhập bạch huyết bào trong tuyến tụy	-	-	-	+
14	Khí quản – suy giảm khí quản, viêm khí quản xuất tiết	-	+	+	+
	Phổi – bệnh viêm phổi mô kẽ nhẹ, chứng tăng sản BALT	-	-	+	+
	Ruột – chứng tăng sản GALT	-	-	+	+
28	Phổi – bệnh viêm phế quản bạch cầu	-	+	+	+
	Ruột – chứng tăng sản GALT	-	+	+	+
	Tuyến tụy – bệnh viêm tụy bạch cầu	-	+	+	+

Fig. 3

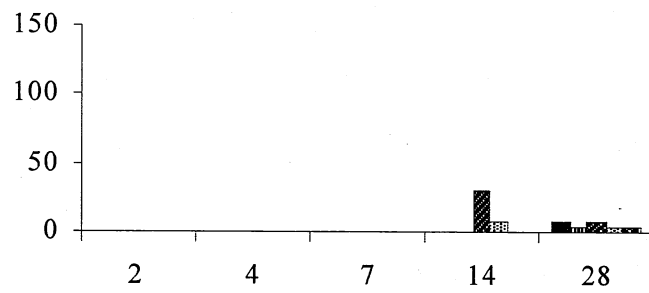
Hiệu giá HI

APMV-2



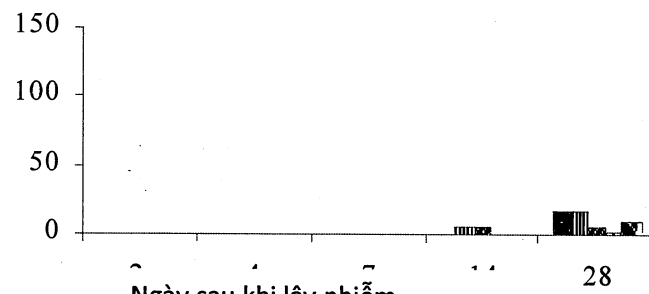
Hiệu giá HI

APMV-4



Hiệu giá HI

APMV-6



Chim 1 Chim 2 Chim 3 Chim 4 Chim 5

Fig. 4

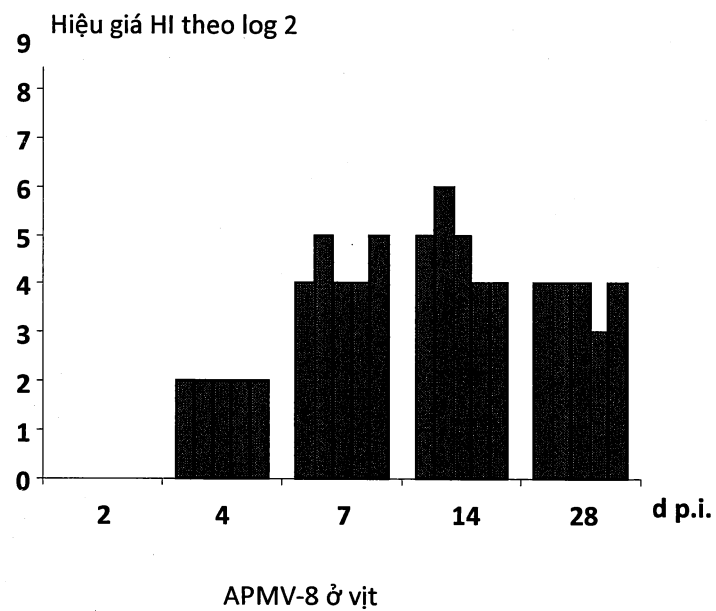
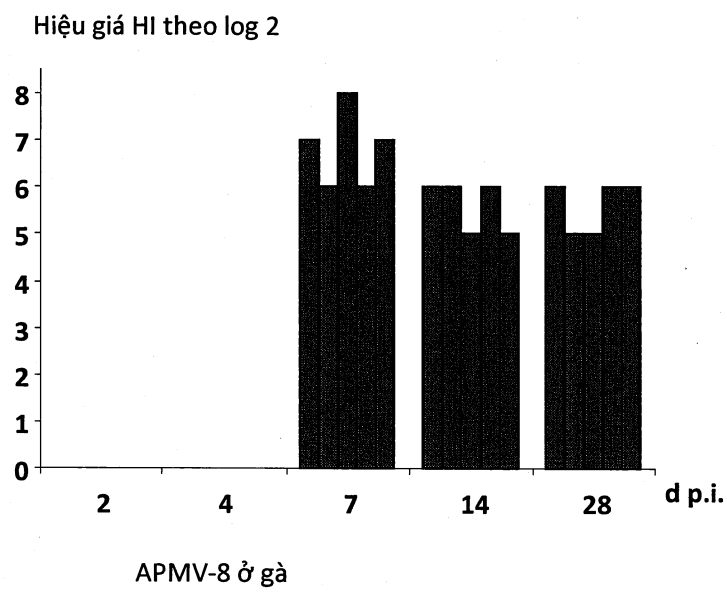


Fig. 5

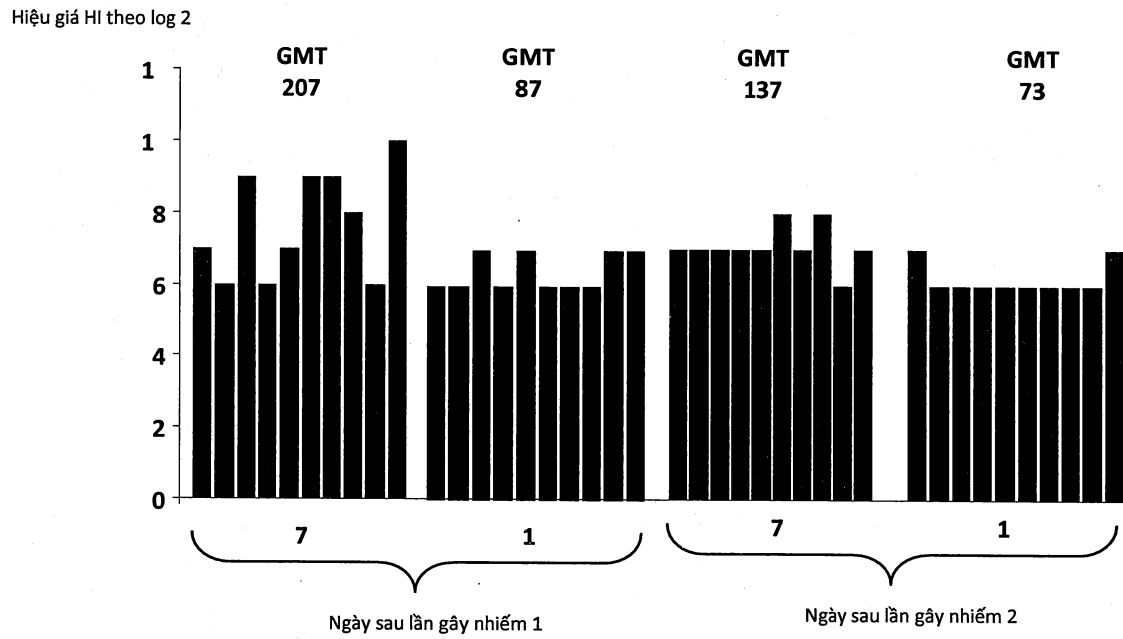


Fig. 6

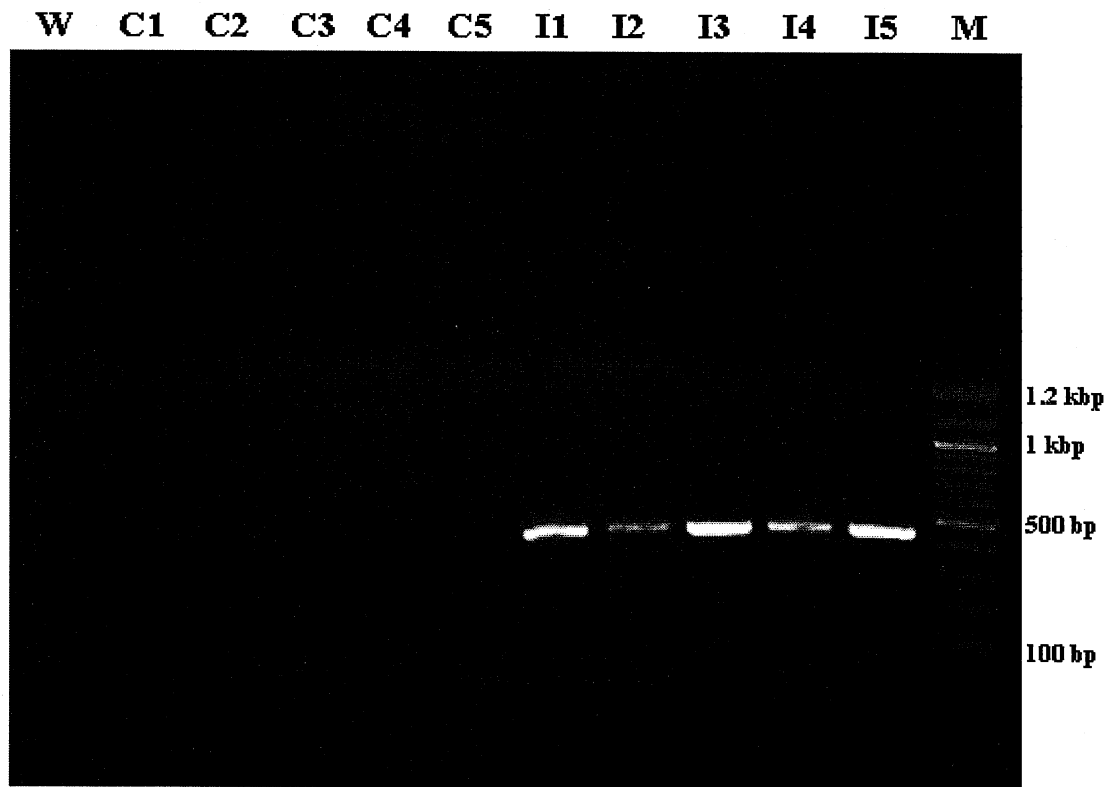


Fig. 7

Ngày p.i.	Cơ quan	Gà		Vịt	
		Đối chứng	APMV-8	Đối chứng	APMV-8
		Phân lập virus ^a		RT-PCR	
2	Khí quản	0/5 ^b	5/5	0/5	5/5
	Phổi	0/5	3/5	0/5	3/5
	Ruột	0/5	2/5	0/5	2/5
	Tuyến tụy	0/5	0/5	0/5	0/5
4	Khí quản	0/5	5/5	0/5	5/5
	Phổi	0/5	1/5	0/5	1/5
	Ruột	0/5	1/5	0/5	1/5
	Tuyến tụy	0/5	1/5	0/5	1/5
7	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy	0/5	2/5	0/5	2/5
14	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy	0/5	0/5	0/5	0/5
28	Khí quản	0/5	0/5	0/5	0/5
	Phổi	0/5	0/5	0/5	0/5
	Ruột	0/5	1/5	0/5	1/5
	Tuyến tụy	0/5	0/5	0/5	0/5

^a Phương pháp được dùng để phát hiện virus

^b Số mẫu mô được thử nghiệm là dương tính/tổng số mẫu thử nghiệm

Fig. 8

Ngày p.i	Cơ quan	Gà		Vịt	
		Đối chứng	APMV-8	Đối chứng	APMV-8
2	Khí quản – viêm khí quản xuất tiết	0/5 ^a			
			5/5	0/5	3/5
	Phổi - bệnh viêm phổi mô kẽ	0/5	0/5	0/5	1/5
	Ruột – viêm ruột non nhẹ	0/5	0/5	0/5	1/5
4	Khí quản - tái tạo biểu mô đường hô hấp, viêm khí quản rất nhẹ	0/5			
			1/5	0/5	5/5
	Tuyến tụy - viêm tụy bạch huyết bào đa ổ nhẹ	0/5	1/5	0/5	0/5
7	Khí quản – viêm khí quản xuất tiết	0/5	5/5	0/5	2/5
	Phổi - BALT từ vừa phải đến nặng	0/5	4/5	0/5	0/5
	Tuyến tụy – viêm tụy bạch huyết bào đa ổ	0/5	3/5	0/5	1/5
14	Khí quản - viêm khí quản xuất tiết	0/5			
			5/5	0/5	4/5
	Tuyến tụy – bệnh viêm tụy bạch cầu	0/5	2/5	0/5	1/5
28	Khí quản – viêm khí quản xuất tiết	0/5			
			5/5	0/5	4/5
	Phổi – chứng tăng sản BALT	0/5	2/5	0/5	2/5
	Ruột – viêm ruột non nhẹ	0/5	3/5	0/5	0/5

^a số mô thể hiện mô bệnh học thay đổi/tổng số được phân tích

Fig. 9

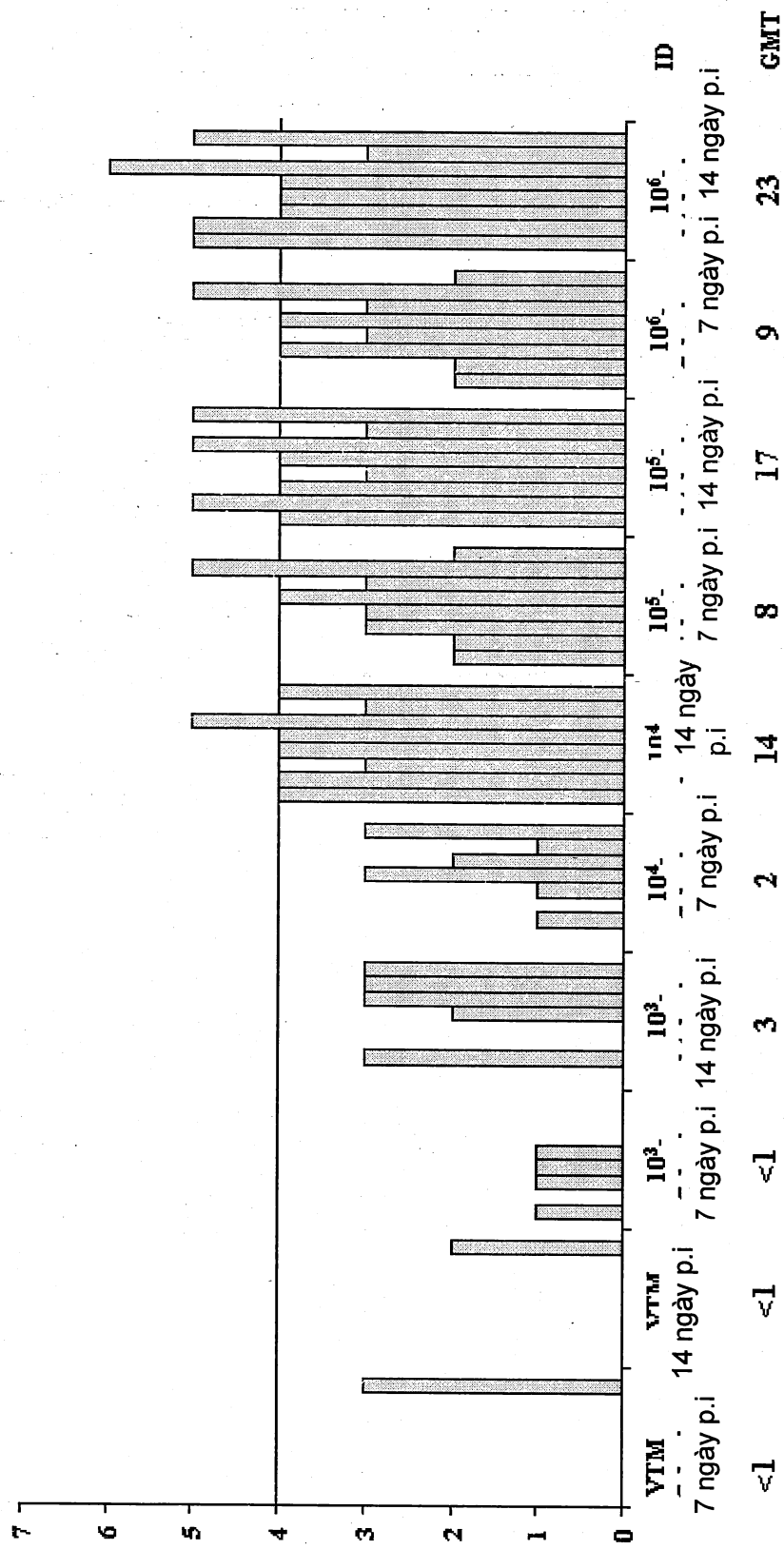


Fig. 10

Hiệu giá HI theo log 2

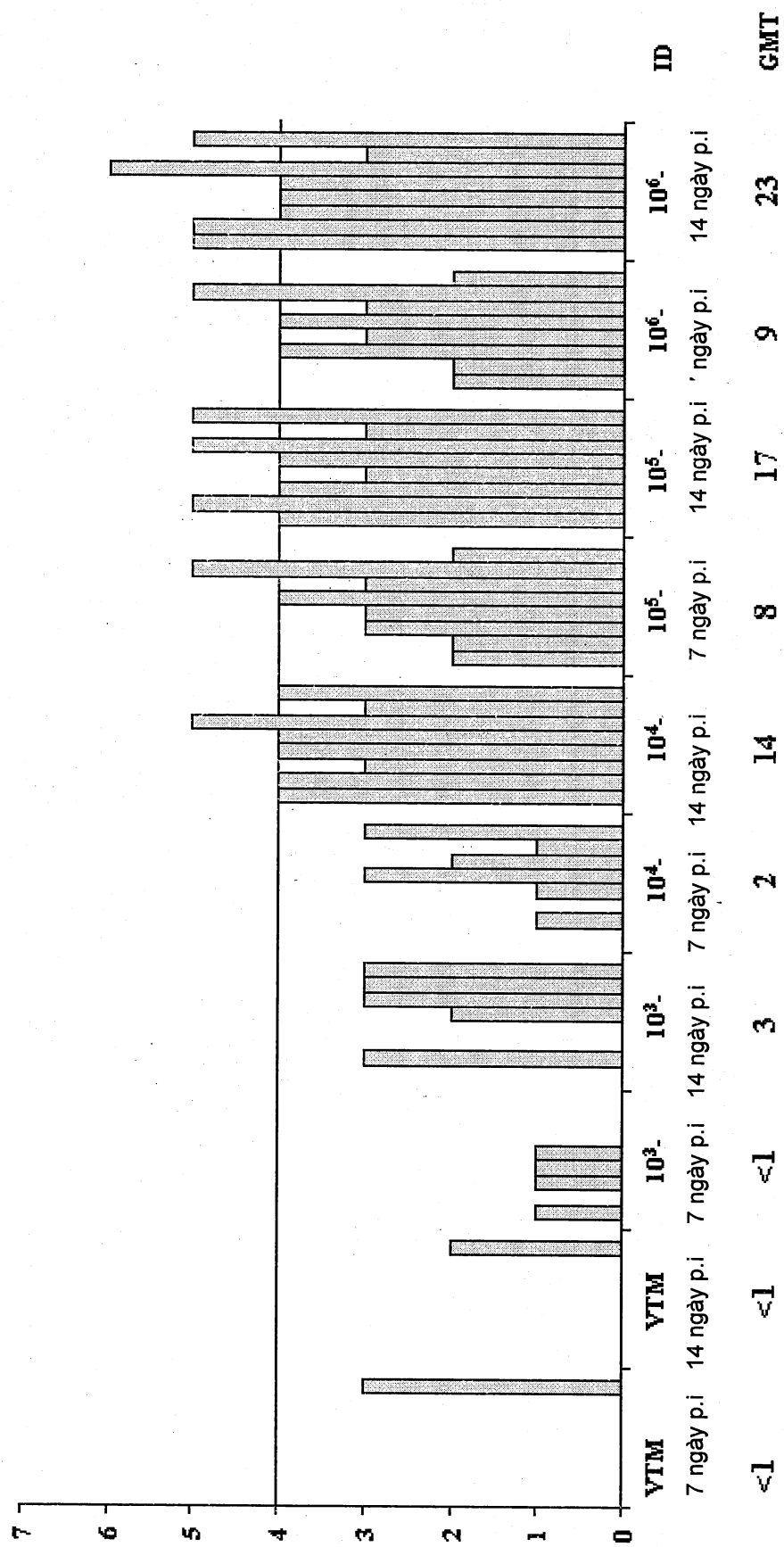


Fig. 11 (1/3)

SEQ ID NO:	Dạng	Tên gen
1	ADN	ADN hệ gen APMV-8
2	ADN	ADN nucleoprotein (NP) APMV-8
3	Protein	Protein nucleoprotein (NP) APMV-8
4	ADN	ADN phosphoprotein (P) APMV-8
5	Protein	Protein phosphoprotein (P) APMV-8
6	ADN	ADN protein nền (M) APMV-8
7	Protein	Protein protein nền (M) APMV-8
8	ADN	ADN Protein dung hợp (F) APMV-8
9	Protein	Protein protein dung hợp (F) APMV-8
10	ADN	ADN Hemagglutinin/neuraminidaza (HN) APMV-8
11	Protein	Protein Hemagglutinin/neuraminidaza (HN) APMV-8
12	ADN	ADN Polymeraza (L) APMV-8
13	Protein	Protein 1 Polymeraza (L) APMV-8
14	Protein	Protein 2 Polymeraza (L) APMV-8
15	ADN	ADN hệ gen APMV-1 (AF077761)
16	ADN	ADN hệ gen APMV-2 (EU338414)
17	ADN	ADN hệ gen APMV-3 (EU403085)
18	ADN	ADN hệ gen APMV-4 (FJ177514)
19	ADN	ADN hệ gen APMV-6 (EU622637)
20	ADN	ADN hệ gen APMV-7 Số truy cập Genbank FJ231524
21	oligo	APMV-PolyT (có nghĩa)
22	Oligo	8NPf1 (có nghĩa)
23	oligo	8NPr (đọc nghĩa)
24	oligo	trình tự khởi đầu của gen NP
25	oligo	trình tự khởi đầu của gen P
26	oligo	trình tự khởi đầu của gen M
27	oligo	trình tự khởi đầu của gen F
28	oligo	trình tự khởi đầu của gen HN
29	oligo	trình tự khởi đầu của gen H
30	oligo	trình tự kết thúc gen NP
31	oligo	trình tự kết thúc gen P
32	oligo	trình tự kết thúc gen M
33	oligo	trình tự kết thúc gen F
34	oligo	trình tự kết thúc gen HN
35	oligo	trình tự kết thúc gen L (1)
36	oligo	trình tự kết thúc gen L (2)
37	ADN	ADN hệ gen APMV-8 Số truy cập Genbank FJ215863.1
38	ADN	ADN hệ gen APMV-8 Số truy cập Genbank FJ215864.1
39	ADN	ADN hệ gen APMV-8 Số truy cập Genbank FJ619036
40	ADN	ADN hệ gen APMV-9 Số truy cập Genbank EU910942
41	Oligo	đoạn mồi NP-FP-pc3
Fig. 11 (2/3)		
42	Oligo	đoạn mồi NP-RP-pc3
43	Oligo	đoạn mồi P-FP-pc3
44	Oligo	đoạn mồi P-RP-pc3

45	Oligo	đoạn mồi L-FP-pc3
46	Oligo	đoạn mồi L-RP-pc3
47	ADN	5'-FLG của hệ gen APMV-8
48	ADN	3'-FLG của hệ gen APMV-8
49	ADN	polymeraza T7 được tối ưu hoá codon (không có EcoRI hoặc vị trí NotI)
50	oligo	đoạn mồi EGFP-FP
51	oligo	đoạn mồi EGFP-RP
52	ADN	hệ gen mini của APMV8
53	ADN	gen NP của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
54	Protein	protein NP của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048297
55	ADN	gen P của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
56	Protein	protein P của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048298
57	ADN	gen M của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
58	Protein	protein M của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048299
59	ADN	gen của F APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
60	Protein	protein F của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048300
61	ADN	gen HN của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
62	Protein	protein HN của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048301
63	ADN	gen L của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank FJ215863
64	Protein	protein L của APMV-8 (FJ215863.1) Genbank AC048302
65	ADN	gen NP của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
66	Protein	protein NP của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048303
67	ADN	gen P của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
68	Protein	protein P của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048304
69	ADN	gen M của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
70	Protein	protein M của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048305
71	ADN	gen F của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
72	Protein	protein F của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048306
73	ADN	gen HN của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
74	Protein	protein HN của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048307
75	ADN	gen L của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank FJ215864
76	Protein	protein L của APMV-8 (FJ215864.1) Genbank AC048308
77	ADN	gen NP của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
78	Protein	protein NP của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88139
79	ADN	gen P của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
80	Protein	protein P của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88140
81	ADN	gen M của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
82	Protein	protein M của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88143
83	ADN	gen F của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
84	Protein	protein F của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88144
Fig. 11 (3/3)		
85	ADN	gen HN của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
86	Protein	protein HN của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88145
87	ADN	gen L của APMV-8 (FJ619036) Genbank FJ619036
88	Protein	protein L của APMV-8 (FJ619036) Genbank ACN88146

Fig. 12 (1/5)

SEQ ID NO:1 trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của APMV-8

15342 BP ADN (hệ gen đối, 5' đến 3')

Số đếm nền 4850 A 3168 C 3159 G 4165 T

Nguồn gốc

1 ACCAAACAAG GAATGCAAGA CCAACGGGAA CTTTAAATAA AACAAATCGAA TTATTGGGGG
 61 CGAAGCAAGT GGATCTCGAG CTCGAGGCCG AAACCCTGAA TTCTACTGGA GGTTTTGAAT
 121 AGGTCGCTAT AGGACTCAAT ATGTCATCTG TGTTCATGA GTATCAGGCG CTTCAAGAAC
 181 AACTTGTGAA GCCGGCTGTC AGGAGACCTG ATGTTGCCTC AACGGGTTTA CTCAGAGCGG
 241 AAATACCTGT CTGTGTTACA TTATCTCAAG ACCCGGTGA GAGATGGAGC CTTGCTTGCT
 301 TGAATATTAG ATGGCTTGGC AGTGATTCAT CAACCACACC AATGAAGCAA GGAGCAATAT
 361 TGTCATGCT GAGTCTACAT TCAGACAATA TGCGAGCTCA CGCAACATTA GCAGCAAGGT
 421 CTGCAGATGC TTCCTCACC ATACTTGAGG TAGATGAAGT AGATATTAGC AACTCACTAA
 481 TCAAATTCAA CGCCAGAAGT GGTGTATCTG ACAAACGCTC AAATCAATTG CTTGCAATTG
 541 CGGATGACAT CCCCAGAAAGT TGCAGTAATG GGCATCCATT TCTTGACACA GACATTGAGA
 601 CCAGAGACCC GCTCGATCTA TCAGAGACTA TAGATCGCCT GCAGGGTATT GCAGCTCAGA
 661 TATGGGTGTC AGCCATAAAG AGCATGACAG CGCCTGACAC CGCATCAGAG TCAGAAAGTA
 721 AGAGGCTGGC CAAATATCAA CAACAAGGCC GACTGGTTAA GCAAGTACTC TTGCATTCTG
 781 TAGTCAGGAC AGAATTTATG AGAGTTATTC GGGGCAGCTT GGTACTGCGC CAGTTTATGG
 841 TTAGCGAGTG CAAGAGGGCT TCAGCCATGG GCGGAGACAC ATCTAGGTAC TATGCTATGG
 901 TGGGTGACAT CAGTCTTTAC ATCAAGAATG CAGGATTGAC TGCATTTTTC CTCACCTGA
 961 AGTTCGGAGT TGGTACCCAG TATCCAACCT TAGCAATGAG TGTTTCTCC AGTGACCTTA
 1021 AAAGGCTTGC TGCACTCATC AGGCTATACA AAACCAAGGG AGACAATGCA CCATACATGG
 1081 CATTCTGGA GGACTCCGAT ATGGGAAATT TTGCTCCAGC AAATTATAGC ACAATGTACT
 1141 CTTATGCCAT GGGCATTGGG ACAATTCTGG AAGCATCTGT ATCTCGATAC CAGTATGCCA
 1201 GAGACTTTAC CAGTGAGAAT TATTTCCGTC TTGGAGTTGA GACAGCCCAA AGCCAGCAGG
 1261 GAGCATTTGA CGAGAGAACA GCCCGAGAAA TGGGCTTGAC TGAGGAATCA AAACAGCAGG
 1321 TTAGATCACT GCTAATGTCA GTAGACATGG GTCCAGTTC AATTCATGAG CCATCTCGCC
 1381 CTGCATTTAT CAGTCAAGAA GAAAATAGGC AGCCTGCCA GAACTTGTC AACTCTCAGG
 1441 GTCAGACCAA GCCAGTCCCG AAGCAGCCCG CACCAAGGGC CGACTCAGAT GACATTGATC
 1501 CATACGAGAA CGGGCTAGAA TGGTAATTCA ACCACCCCGA CACATCCACC TATACACCAA
 1561 TTCCGTGACA TATTAACCCA ATCAAACATT TCATAAATA TAGTAGTCAT TGATTTAAGA
 1621 AAAAAATTGGGGGGCCCTCA ATTGTAAGAAC ATACCAGATC CGTCCACAAC ACCACTCAAC
 1681 AACCCACACA CAATGGGATTT CGCCAATGAT GAAGAAATTG CAGAACTTTT GAATCTCAGC
 1741 ACCAATGTAA TCAAGGAGAT TCAGAAATCC GAACTCAAGC CTCCCCAAAC CACCGGACGA
 1801 CCACCTGTCA GTCAAGGGAA CACAAGAAAT CTAATGATC TATGGGAAAA GGAGACTGCA
 1861 AGTCAGACCA AGACACCGGC CCAATCTACA CAAACCACAC AAGTTCAGTC TGATGAAAAT
 1921 GAGGAGGGAG AAATCAAGTC CGAGTCAACT GATGGCCACA TCAGAGGAAC TGTTAATCAA
 1981 TCAGAGCAAG TCCCAGAACAA AAACCAGAGC AGATCTTAC CAGGTGATGA TCTCGACAGA
 2041 GCTCTCAACA AGCTTGAAGG GAGAATCAAT TTAATCAGCT CAATGGACAA AGAAATTTAA
 2101 AAGGGCCCTC GCATCCAGAA TCTCCCTGGG TCCCAGGGCG CAACTCAACA GCGGACCCAC
 2161 CCATTGGCAG GGGACACCCC GAACATGCAA GCACAGACAA AAGCCCTGGC GAAGCCACAT
 2221 CAAGAGGCAA TCAATCCTGG CAACCAGGAC ACAGGAGAGA GTATTCATTT ACCACCTTCC
 2281 ATGGCACCAC CAGAGTCATT AGTTGGTGCA ATCCGCAATG CACCCCAATT CGTGCCAGAC
 2341 CAATCTATGA CGAATGTAGA TGCGGGGAGT GTCCAACTAC ATGCATCATG TGCAGAGATG
 2401 ATAAGTAGAA TGTTGTAGA AGTTATATCC AAGCTTGATA AACTCGAGTC GAGACTGAAT
 2461 GATATAGCAA AAGTTGTGAA CACTACCCCC CTTATTAGGA ATGATATTAA CCAACTTAAG
 2521 GCCACAACCG CACTGATGTC TAACCAAATT GCCTCCATAC AAATTCTTGA CCCAGGGAAT
 2581 GCAGGGGTGA GGTCCCTCTC TGAATGAAA TCTGTGACGA AGAAAGCTGC TGTTGTAATT
 2641 GCAGGGTTTG GAGACGACCC AACTCAAATT ATTGAAGAAG GCATTATGGC CAAAGATGCT
 2701 CTTGGAAAAAC CTGTGCCTCC AACATCTGTT ATCTCAGCCA AAGCTCAGAC TTCTTCCGGT
 2761 GTGAGTAAGG GTGAAATAGA AGGATTGATT GCATTGGTGG AAACATTAGT TGACAATGAC
 2821 AAGAAGGCAG CAAAATGAT TAAAATGATT GATCAAGTTA AATCCCATGC CGATTACGCC
 2881 CGAGTCAAGC AGGCAATATA TAATGCGTAA TACTGTAAT ACACAAACAA TCAATACTGC
 2941 TGTGGTTGTC ACCCACCTCA GCAAATCAAT AATCTTTTAG AATTTATTGA TTAAGAAAAA
 3001 ATTGACTACT ATAAGAAAAG AACACCAAGT TCGGGGCGAA GACACGATTG ACCACAGTCG

Fig. 12 (2/5)

3061 CTATCTGTAA GGCTCCTCAC CAAAAATGGC ATATACAACA TTGAAACTGT GGGTGGATGA
 3121 GGGTGACATG TCGTCTTCGC TCCTATCATT CCCGTTGGTA CTAAGAGAGA CAGACAGAGG
 3181 CACAAAGGAG CTTCAACCAC AGGTAAGGGT AGATTCAATT GGCGATGTGC AGAACGCCAA
 3241 AGAGTCTCG ATATTCTGTA CTCTATATGG TTTCATCCAA GCAATTAAGG AGAGTTCAGA
 3301 TCGATCGAAA TTCTTCCATC CAAAAGATGA CTTCAAACCT GAGACAGTCA CTGCAGGACT
 3361 GGTAGTGGTA GGTGCGATCC GAATGATGGC TGATGTAAAT ACCATCTCTA ATGACGCACT
 3421 AGCGCTGGAG ATCACTGTGA AGAAATCTGC AACTTCTCAA GAGAAAATGA CGGTGATGTT
 3481 CCACAATAGC CCCCCTTCAT TGAGAACTGC AATAACTATC CGAGCAGGAG GTTTCATCTC
 3541 GAATGCAGAC GAGAATATAA AATGTGCCAG CAAATTGACT GCAGGAGTGC AGTACATATT
 3601 CCGCCCAATG TTTGTTTCAA TCACTAAATT ACACAATGGC AAACATATATA GGGTGCCCAA
 3661 AAGCATCCAC AGCATCTCAT CCACTCTACT GTATAGTGTG ATGTTGGAGG TAGGATTCAA
 3721 AGTGGATATT GGAAGGATC ATCCCCAGGC AAAGATGCTG AAGAAGGTCA CAATCGGCGA
 3781 TGCAGACACA TACTGGGGGT TTGCATGGTT CCACCTGTGC AATTTCAAAA AGACATCCTC
 3841 TAAGGGAAAG CCAAGAAGCG TAGACGAACT AAAGACAAAA GTCAAAAATA TGGGGTTGAA
 3901 ATTGGAGTTA CATGACCTGT GGGGTCCGAC TATTGTGGTC CAAATCACTG GCAAGAGCAG
 3961 CAAATATGCT CAAGGATTTT TTTCTCCAA TGGTACTTGT TGTCTCCAA TCAGCAGATC
 4021 TGCACCAAGG CTTGGGAAGC TTCTGTGGTC TTGTTGAGCA ACTATAGGTG ACGCAACAGT
 4081 TGTATCCAA TCAAGCGAGA AAGGGGAACT CCTAAGGTCT GATGACCTCG AGATACGAGG
 4141 TGCTGTGGCC TCCAAGAAAG GTAGACTGGG CTCATTTTAC CCCTCAAAA AATGATGCAG
 4201 GACATAGTAC AGAGAATTAG AGAGCCATTA GATGTGCGCA AAAACATAA TCTGCGATGA
 4261 ACTGCCCAGA CTCCACTTTA ATCTAGGTTG CAGGGAAATA GTACACGACA TGCGAAATAC
 4321 TATCAGGTC ACCAGCAATC AATAAAGCTG ATCAATCACT ATATTAGGAA TCAAATAGGA
 4381 TAACAATTAT TAATCCAATT TCCTAATTAT **AAAAAATTGC TTTAAAGGTT ATTGACGAGT**
 4441 **CGGGGGCGAA** ATCTTGCCAC TTAGTCTGCA GTCAATCTTA GAATCTACAT ATTGAACAT
 4501 GGGTCAAATA TCAGTATATC TAATTAATAG CGTGTCTATTA TTGCTGGTAT ATCCTGTGAA
 4561 TTCGATTGAC AATACACTCA TTGCCCAAT CGGAGTTGCC AGCGCAAATG AATGGCAGCT
 4621 TGCTGCATAT ACAACATCAC TTTCAAGGAC AATTGCCGTG CGATTCCTAC CTGTGCTCCC
 4681 GGATAATATG ACTACCTGTC TTAAGAAAAC AATCACTACA TACAATAATA CTGTCAACAA
 4741 CATCTTAGGC CCACTCAAA CCAATCTGGA TGCCTGCTC TCATCTGAGA CTTATCCCCA
 4801 TAACAAGATTA ATTGGGGCAG TTATAGGTTT AATTGCTCTC GGTGTTGCAA CATCGGCTCA
 4861 AATCACTGCT GCAGTTGCTC TCAAGCAAGC GCAAGACAAT GCAAGGAACA TACTAGCACT
 4921 CAAAGAAGCA CTGTCCAAAA CCAATGAGGC GGTCAAGGAG CTTAGTAGTG GGTACAACA
 4981 AACAGCTATT GCACTTGGTA AGATACAGAG TTTTGTGAAT GAGGAAATTC TGCCATCTAT
 5041 CAACCAACTG AGCTGCGAGG TGACAGCCAA TAACTTGGG GTGTATTAT CTCTGTATCT
 5101 CACAGAACTG ACCACCATAT TCGGTGCACA GCTGACCAAC CCTGCATTGA CTTCAATTATC
 5161 ATATCAAGCA CTGTACAACC TGTGTGGTGG CAACATGGCA ATGCTTACTC AGAAGATTGG
 5221 AATTAAACAG CAAGAGGTTA ATTCTGCTTA TGAAGCCGGA CTAATCACAG GACAAGTCAT
 5281 TGGTTATGAC TCTCATTACC AGCTGTGGT CATCCAGGTC AATTATCCAA GCATTTCTGA
 5341 GGTCAGTGGT GTACGTGCGA CAGAATTAGT CACTGTAGT GTAACAACAG ACAAGGGTGA
 5401 AGGGAAAGCA ATTGTACCCC AATTGTAGC TGAAGTCGG GTGACTATTG AAGAGCTTGA
 5461 TGTCGCATCT TGTAATTCA GCAGCAGGAC CCTATATTGC AGGCAGGTCA ACACAAGGGC
 5521 ACTTCCCCCG CTAGTAGCTA GCTGTCTTCG AGGTAACAT GATGATTGTC AATATACCAC
 5581 AGAGATTGGA GCATTATCAT CCCGGTATAT AACACTAGAT GGGGGGGTCT TAGTTAATTG
 5641 CAAGTCAATT GTTTGTAGGT GCCTTAATCC AAGTAAGATC ATCTCTCAA ATACAAACGC
 5701 TGCAGTAACA TATGTTGATG CCACAATCTG CAAAACAATT CAATTGGATG ATATACAAC
 5761 CCAGCTGGAA GGGTCACTAT CATCAGTTTA TGCAAGAAAC ATCTCAATTG AGATCAGTCA
 5821 GGTGACCACA TCCGGGTCTT TAGATATCAG CAGTGAGATA GGAAACATCA ATAATACGGT
 5881 GAATCGTGTG GAGGATTTAA TTCACCAATC AGAGGAATGG CTGGCAAAGG TTAACCCACA
 5941 CATTGTAAAT AATACAACAC TAATTGTACT CTGTGTGTTA AGTGCCTTG CTGTGATCTG
 6001 GCTGGCAGTA TTAACGGCTA TTATAATATA CTTGAGAACA AAGTTGAAGA CTATATCGGC
 6061 ATTAGCTGTA ACCAATACAA TACAGTCTAA CCCCTATGTT AACCAAACGA AACATGAATC
 6121 TAAGTTTGA TCATTCAAGC CAAAACAGAG GATCTAGGCT CAGGTAAATA ATAGTTCAAT
 6181 CAATATTTGA TTTATTAGGT TTTTTCCTACT AATTATTAAT ATACTCGTGA TTAGATGATA
 6241 ACGTTAAAAG TCTTAGATA **TTAATAAAAA ATGTAACCTG GGGGCGA**CCC ATTTATAGGT
 6301 GAGTATATAT TAGGAAGTCC TTATATTGCA CTGTGATTTT AAACAATTAT ATTACCTCAT
 6361 ATCTACCTTG TCTAAAGACA TCATGAGTAA CATTGCATCC AGTTTAGAAA ACATTGTAGA
 6421 GCAGGATAGT CGAAAAACAA CTTGGAGGGC CATCTTTAGA TGGTCCGTTT TTCTTATTAC
 6481 AACAGGATGC TTAGCCTTAT CCATTGTTAG CATAGTTCAA ATTGGAAATT TGAAAAATCC

Fig. 12 (3/5)

6541 TTCTGTAGGG GATCTGGCTG ATGAAGTGGT GACACCCTTG AAAACCACTC TGTCAGATAC
 6601 ACTCAGGAAT CCAATTAACC AGATAAATGA TATATTTAGG ATTGTTGCCC TTGATATTCC
 6661 ATTGCAAGTG ACCAGTATCC AAAAAGACCT TGCAAGTCAA TTTAACATGT TGATAGATAG
 6721 TTTAAATGCT ATCAAATTAG GCAACGGGAC CAACCTTATC ATACCTACAT CAGACAAGGA
 6781 GTATGCAGGA GGAATTGGAA ACCCTGTATT TACTGTGAT GCTGGAGGTT CTATAGGATT
 6841 CAAACAGTTT AGCTTAATAG AACATCCGAG CTTTATTGCT GGACCTACAA CGACCCGAGG
 6901 CTGTACAAGA ATACCCACTT TTCACATGTC AGAAAGTCAT TGGTGTCTACT CACACAACAT
 6961 CATCGCTGCT GGCTGTCAAG ATGCCAGTGC ATCCAGTATG TATATCTCAA TGGGAGTTCT
 7021 CCATGTGTCC TCATCTGGCA CTCCCATTTT TCTTACTACT GCAAGTGAGC TGATAGACGA
 7081 TGGAGTTAAC GCTAAGTCAT GCAGCATTTGT AGCAACCCAA TTTGGCTGTG ACATTTTGTG
 7141 CAGTATTGTC ACAGAGAAGG AGGGAGATGA TTAAGTGTCT GATACTCCGA CTCCAATGCG
 7201 CCACGGCCGT TTTTCATTCA ATGGTAGTTT TGTAAGGCC GAACTACCAG TGTCCAGTAT
 7261 GTTCTCATCA TTCTCTGCCA ACTACCCTGC TGTGGGATCA GCGGAAATTG TAAAAGATAG
 7321 AATATTATTC CCAATTTACG GAGGTATAAA GCAGACTTCA CCAGAGTTTA CCGAATTAGT
 7381 GAAATACGGA CTCTTTGTAT CAACACCTAC AACTGTGTGC CAGAGTAGCT GGACTTATGA
 7441 CCAGGTAAAA GCTGCGTATA GGCCAGATTA CATATCAGGC CGGTTCTGGG CACAAGTGTAT
 7501 ACTCAGCTGC GCTCTTGATG CAGTCGACTT ATCAAGTTGT ATTGTAAAGA TTATGTAATAG
 7561 CAGCACAGTG ATGATGGCAG CGGAAGGAAG GATAATGAAG ATAGGGATTG ATTACTTTTA
 7621 CTATCAGCGG TCATCTTCTT GGTGGCCATT GGCATTTGTC AAAAACTAG ACCCGCAAGA
 7681 GTTGGCAGAC ACAAACCTCAA TATGGCTGAC CAATTCCATA CCAATCCCGC AATCAAAGTT
 7741 CCCTCGGCCT TCATATTCAG AAAATTATTG CACAAAGCCA GCAGTTTGCC CTGCTACTTG
 7801 TGTCACTGGT GTGTACTCTG ATATTTGGCC CCTGACCTCA TCTTCATCAC TCCCGAGCAT
 7861 AATTTGGATC GGCCAGTACC TTGATGCTCC TGTGGAAGG ACTTATCCTA GATTTGGAAT
 7921 TGCAAATCAG TCACACTGGT ACCTCCAAGA AGATATTCTA CCCACTTCCA CCGCAAGTGC
 7981 GTATTCAACC ACTACATGTT TTAAGAATAC TGCCAGGAAT AGAGTGTCTCT GCGTCACCAT
 8041 TGCCGAATTT GCAGATGGGT TGTTTGGAGA GTACAGGATA ACACCTCAGT TGTACGAATT
 8101 AGTGAGAAAT AATTGAATAA CAATAATTTT GGGACTCATT TTGTGCGAAA GTGAAATTGT
 8161 CATCTTTAAA AATAATCAAT TCGATGATTT TTATTGAACA TGATTAAGCA ATCATGTGGG
 8221 AAATTTATTA TCTCATAAAT TCTAATAGTT GTAAATGATG AATTAAGAAA AAATGGAGGG
 8281 GACCTCTAC ACAAACATGG ATATAAAACA AGTTGACCTG ATAATACAAC CCGAGGTTCA
 8341 TCTCGATTCA CCCATCATAT TGAATAAACT GGCATATTA TGGCGCTTGA GTGGTTTACC
 8401 CATGCCTGCA GACCTACGAC AAAAATCCGT AGTGATGCAC ATCCCGGACC ACATCTTAGA
 8461 AAAATCAGAA TATCGGATCA AGCACCCTCT AGGGAAAATC AAGAGTGACA TAACACATTA
 8521 CTGTCAAGTAT TTTAATATTA ATTTGGCAA TATTGATCCG ATAACCCACC CAAAAGTTT
 8581 GTATTGGTTA TCCAGACTAA CAATAGCTAG TGCTGGAAC TTTAGGCATA TGAAAGATAG
 8641 AATCTTGTGT ACAGTTGGCT CTGAATTTGG ACACAAAATT CAAGATTTAT TTTCACTGCT
 8701 GAGCCATAAA CATAGAGTA ACGGGGATTT ATTTAATCAA AGTCTCTCAG GTACACGTTT
 8761 GACTGCAAGT CCGTTATCCC CTTTATGCAA TCAATTTGTC TCTGACATCA AGTCTGCACT
 8821 CACGACACCC TGGTCAGAAG CTCGTTGGTC TTGGCTTCAT ATCAAAACAA CAATGAGATA
 8881 TCTGATAAAA CAATCAGCA CTACAAATTC GGCTCATTTA ACAGAAATCA TAAAAGAAGA
 8941 ATGGGGTTTA GTAGGTATTA CTCCAGATCT TGTCAATCTT TTTGACAGAG TCAATAATAG
 9001 TCTGACTGCA TTAACATTTG AGATGGTTCT AATGTATTCA GATGTATTAG AATCCCGTGA
 9061 CAATATTGTG TTAGTGGGGC GACTATCTAC CTTTCTACAG CCAGTAGTTA GTAGACTGGA
 9121 GGTGTTGTTT GATCTAGTAG ATTCATTGGC AAAAACTTTA GGTGACACAA TATATGAGAT
 9181 TATTGCAGTG TTAGAGAGCT TGTCTTATGG GTCAGTTCAA CTACATGATG CAAGTCACTC
 9241 TCATGCAGGG TCTTTTTTTT CATTTAACAT GAATGAACTT GATAACACAC TATCAAAGAG
 9301 GGTAGATCCG AAACACAAGA AACTATAAT GAGCATTATA AGACAATGCT TTTCTAATCT
 9361 AGATGTTGAT CAAGCTGCAG AGATGCTATG CCTGATGAGA TTATTCGGAC ACCCAATGTT
 9421 AACTGCACCG GATGCAGCAG CCAAAGTGAG GAAAGCAATG TGTGCTCCAA AACTTGTTGA
 9481 ACACGACACC ATCTTGACAG CATTATCTTT CTTCAGGGG ATAATTATAA ATGGGTACAG
 9541 AAGATCACAC TCTGGCCTGT GGCCCAATGT AGAGCCGTCT TCAATTTATG ATGATGATCT
 9601 CAGACAGCTG TACTTAGAGT CAGCAGAGAT TTCCCATCAT TTTATGCTTA AAAACTACAA
 9661 GAGTTTAAGC ATGATAGAAT TCAAGAAGAG CATAGACTAC GATCTTCATG ATGACCTAAG
 9721 TACTTTCTTA AAGGATAGAG CAATTTGCCG GCCGAAATCC CAGTGGGATG TCATATTTCTG
 9781 TAAGTCTTTA CGCAGATCTC ATACGCAGTC CAGTATCTG GACGAAATTA AGAGCAACCG
 9841 ATTGCTAATT GATTTTCTTG ATTCTGCTGA ATTTGACCCT GGAAAAGAAAT TTGCATATGT
 9901 AACCACAATG GATTATTTGC ACGATAATGA ATTTTGTGCT TCATATTCTC TAAAGGAAAA
 9961 GGAGATCAAA ACTACTGGGA GGATATTTGC AAAAAAGACA CGCAATATGA GAAGTTGCCA

Fig. 12 (4/5)

10021 AGTAATACTT GAATCTTTGT TATCAAAGCA TATATGCAAG TTCTTCAAAG AGAATGGCGT
 10081 TTCGATGGAG CAATTGTCAT TGACCAAGAG TCTACTTGCA ATGTCTCAAC TCTCACCAAA
 10141 AGTCTCGACT TTGCAGGACA CTGCATCAG TCATGTAGGT AACTCAAAAT CTCAGATTGC
 10201 AACCAGCAAC CCATCTCGGC ATCACTCGAC ACCCAATCAG ATGTCACTCT CAAATCGAAA
 10261 AACGGTTGTA GCAACTTTCT TAACAACCTGA CTTGGAAAAA TACTGCCTGC AGTGGCGATA
 10321 TTCAACTATT AAATTGTTTG CACAAGCTCT AAATCAACTC TTTGGGATTG ATCAGGGATT
 10381 TGAATGGATA CATTAAAGAC TTATGAACAG CACCTTATTT GTTGGCGATC CTTACTCGCC
 10441 TCCTGAAGAT CCAACACTAG AAGATATAGA TAAAGCACCA AATGATGATA TCTTCATAGT
 10501 TTCTCCAAGG GGAGGCATAG AGGGTTTATG TCAGAAAATG TGGACCATGA TATCAATTAG
 10561 TGCTATACAT TGTGTAGCAG AGAAAATTGG TGCACGAGTG GCAGCAATGG TGCAGGGTGA
 10621 TAATCAAGTA ATAGCTATCA CCAAAGAATT ATTCAGAGGA GAGAAAGCTT GTGATGTCAG
 10681 AGATGAGTTA GACGAGCTTG GTCAAGTGTT TTTTGATGAG TTCAAGAGAC ACAATTATGC
 10741 AATTGGACAC AATCTTAAGC TAAATGAGAC AATACAAAGC CAATCCTTTT TTGTATATTC
 10801 CAAACGAATA TTCTTTGAAG GCGGATTGCT TAGTCAAGTC CTCAAAAATG CTGCCAAGTT
 10861 ATGTATGGTT GCTGACCATC TAGGTGAAAA CACTGTATCT TCCTGTAGCA ACCTGAGCTC
 10901 GACAATTGCC CGCTTAGTGG AAAATGGGTT TGAGAAGGAC ACTGCTTTTG TGTTGAACCT
 10981 AGTCTACATC ATGACTCAGA TTCTTTTTGA TGAGCATTAC TCGATTGTAT GCGATCACC
 11041 TAGTGTCAAA AGCTTGATTG GATCAAAAAA CCATCGGAAT TTATTGTATT CATCTCTAAT
 11101 ACCAGGTCAG CTCGGCGGTT TCAACTTCCT CAATATAAGT CGGTTGTTCA CTAGGAATAT
 11161 AGGTGACCCA GTAACATGTA GTCTGTCTGA TCTCAAATGC TTCATAGCCG CAGGTCTCCT
 11221 TCCACCCTAT GTCCTAAAAA ATGTGGTTCT GCGTGAGCCT GGTCTGGGA CATGGTTGAC
 11281 GTTGTGCTCT GATCCTTACA CCCTTAACAT ACCATACACA CAGCTTCCAA CCACATATCT
 11341 CAAAAGCAC ACCCAGCGAT CATTGCTTTC ACGTGCAGTA AATCCTTTAT TAGCCGGTGT
 11401 ACAAGTGCCA AATCAGCATG AGGAAGAAGA GATGTTGGCT CGCTTCTCC TTGATCGTGA
 11461 ATATGTGATG CCCCAGGTTG CTCATGTAAT ACTAGAATCA TCAGTCCTTG GCAAACGGAA
 11521 ACAAAATCAA GGCTTAATTG ATACAACCTC AACCATCATT AGAACATCTC TAGTTAATCT
 11581 GCCAGTGTCT AGAAAGAAAT GCGAAAAAT AATCAATTAC TCTCTCAATT ATATTGCTGA
 11641 GTGTCATGAC TCCTTACTTA GCCAGGTCTG CTTCAGTGAT AATAAGGAAT ACTTGTGGTC
 11701 AACCTCCTTA ATATCAGTTG AGACCTGTAG TGTGACAATT GCGGACTATC TGAGAGCTGT
 11761 CAGCTGGTCT AATATATTAG GGGGAAGAAA CATATCCGGG GTGACTACAC CTGATACTAT
 11821 TGAATTAATT CAAGGTTGTT TAATAGGTGA AAATTCTAGT TGTACTCTTT GTGAATCGCA
 11881 TGATGACGCA TTCACGTGGA TGCACCTGCC TGGCCCACTT TACATCCCTG AACCATCAGT
 11941 TACTAACTCT AAAATGCGTG TGCCATATCT GGGTTCAAAA ACAGAGGAGC GGAAAACAGC
 12001 CTCAATGGCA GCAATAAAG GAATGTCACA TCACCTGCGT GCAGTCTTAA GAGGCACATC
 12061 CGTATTTATT TGGGCATTTG GGGATACAGA TATCAATTGG GATAATGCAT TGCAGATTGC
 12121 CCAATCACGG TGTAACATCA CATTGGATCA AATGAGATTA CTTACACCAA TTCCTAGCAG
 12181 TTCAAATATT CAACATAGAC TCGATGACGG AATCAGCAGC CAGAAATTTA CTCCTGCAAG
 12241 CCTTGCTCGA ATCACATCCT TCGTTCACAT CTGTAATGAC AGCCAGAGGT TAGAGAAGGA
 12301 TGGCTCATCT GTCGACTCAA ACTTGATTTA CCAGCAAATT ATGTTACTTG GACTCAGCAT
 12361 CTTTGAAACA ATGTACTCAA TGGACCAAAA GTGGGTATTC AATAACCATA CTTGCAATTT
 12421 GCACACTGGA CACTCCTGTT GTCCAAGGGA ACTAGACATA AGTTTGGTGA ACCCGCCGAG
 12481 ACATCAGACC CCGGAGCTGA CTAGCACAAC AACCAACCCG TTCCTATATG ATCAGCTCCC
 12541 ATTAATCAA GAAAACTTGA CAACACTTGA GATTAAGACA TTTAAATTCA ATGAGCTCAA
 12601 CATTGATGGT TTAGATTTTG GTGAAGGAAT ACAATTATTG AGTCGTTGTA CTGCAAGATT
 12661 AATGGCAGAA TGTATTCTAG AGGAGGGAAT AGGCTCGTCA GTTAAAAATG AAGCAATTGT
 12721 CAATTTTGAT AATTCAGTCA ATTGGATTTC AGAGTGCCTA ATGTGTGATA TTCGCTCACT
 12781 TTGTGTTAAT TTAGGTCAAG AGATACTATG TAGCCTGGCA TACCAAATGT ATTACTTGCG
 12841 AATCAGGGGT AGACGGGCCA TTCTTAATTA CTTGGACACA ACTTTGCAAA GGATCCCTGT
 12901 GATACAATTA GCCAACATTG CACTCACCAT TTCGCACCCT GAGATATTTT GCAGAATTGT
 12961 CAACACGGGG ATCCATAACC AGATTAAGGG CCCATATGTG GCAACAACGG ATTTTCATAGC
 13021 TGCAAGTAGA GATATCATAT TATCAGGTGC AAGGGAGTAT CTATCTTATT TAAGCAGTGG
 13081 GCAGGAAGAC TGTTACACAT TCTTCAACTG TCAAGATGGG GATCTTACTC CAAAAATGGA
 13141 ACAGTATCTT GCAAGGAGGG CATGCCTTTT AACATTATTG TATAATACTG GGCACCAGAT
 13201 CCCCCTTATC CGATCACTGA CGCCAATAGA GAAGTGCAAG GTGCTCACAG AATACAATCA
 13261 ACAAATTGAG TACGCAGATC AAGAGTTTAG CTCTGTACTA AAAGTGGTCA ATGCACTACT
 13321 ACAAATCCTT AAGATAGATG CATTAGTTTC AAATCTCTAC TTCACCACCA GACGTGTTCT
 13381 ATCAAACCTC AGATCATGTG ATAAGGCTAG ATCATATATT GAATATTTGT AACTGAGGA
 13441 CTTGCGGAGAG AAAGAGGATA CAGTACAATA TGACATCATG ACAACAAACG ATATCATACT

Fig. 12 (5/5)

13501 TACTCATGGT CTATTCACAC AGATCGAAAT ATCTTATCAA GGGAATAGTC TCCATAAGTT
 13561 CCTTACTCCG GATAACGCGC CTGGATCTTT GATCCCATTC TCTATTTAC CAAATTCAT
 13621 TGCATGTGAC CCTCTTCATC ACTTGCTCAA GTCGGTCGGT ACATCAAGCA CAAGTTGGTA
 13681 CAAGTATGCA ATCGCCTATG CAGTGTCTGA AAAGAGGTCA GCTCGATTAG GAGGGAGCTT
 13741 GTACATTGGT GAAGGGAGCG GAAGTGTGAT GACTTTACTC GAGTATCTTG AGCCATCTGT
 13801 TGACATATTT TACAATTCAC TCTTCTCAAA TGGTATGAAC CCACCACAAC GAAATTATGG
 13861 GCTTATGCCA CTACAATTG TGAATTCGGT GGTTTATAAG AACTTAACGG CTAAATCAGA
 13921 ATGTAAGCTA GGGTTTGTCC AGCAATTTAA ACCGTTGTGG AGAGACATAG ACATTGAGAC
 13981 TAATGTTACA GATCCATCAT TTATCAATTT TGCATTGAAT GAAATCCCA TGCAATCATT
 14041 AAAACGAGTA AATTGTGATG TGGAAATTTGA CCGTGGTATG CCGATTGAAC GGGTTATTCA
 14101 GGGTTACACC CATATCTTAC TTGTTGCCAC TTACGGATTA CAGCAAGATT CAATACTGTG
 14161 GGTGAAGGTA TATAGGACAT CTGAAAAAGT ATTTCAATTC TTAGTGAGTG CCATGATCAT
 14221 GATCTTTGGT TATGTAAAAA TCCACAGGAA TGGTTATATG TCGACAAAGG ATGAAGAGTA
 14281 CATATTGATG TCTGACTGCA AGGAACCTGT AAATATACA GCTGTCCCTA ACATTCTTAC
 14341 ACGTGTAAAG GATTTAGTGT CGAAGAATCT GAGTCTTATC CATCCAGAAG ACCTCAGAAA
 14401 AGTAAGGTGT GAAACAGATT CCCTGAATTT GAAGTGCAAT CATATTTATG AGAAAAATAAT
 14461 TGCCAGAAAA ATTCATTAC AGGTATCATC AACTGACTCT TTGCTCCTCC AATTAGGCGG
 14521 TGTATCAAC TCGGTGGGCT CAACTGATCC TAGAGAGGTT GCAACATTAT CTTCTATTGA
 14581 GTGTATGGAC TATGTTGTCT CATCAATTGA TTTGGCTATA TTGGAGGCAA ATATTGTAAT
 14641 CTCAGAGAGT GCTGGTCTTG ACCTCGCTTT AATGTTAGGC CCATTCAACT TAAATAAGCT
 14701 TAAGAAAATT GACACAATCC TTAAGTCAAG CACCTATCAG CTAATCCCGT ACTGGTTGCG
 14761 CTATGAGTAC TCTATTAATC CGAGATCTTT GTCATTTCTA ATCACTAAAT TACAACAATG
 14821 CCGAATTTCA TGGTCAGATA TGATCAGAT TTCTGAATTT CGTAAGAAAT CCAAGCGGCC
 14881 TATATTTATC AAACGAGTAA TAGGGAATCA ACAGCTAAAA TCATTCTTTA ATGAAAAGCTC
 14941 AAGTATTGTT TTGACTCGGG CTGAAGTTAA AGTCTGTATA AAGTTCCTCG GTGCAATCAT
 15001 CAAGTTGAAA TAATTTCTGC GATTTTAAAG GGGTGTAATG TTCTAATTTG CACTTGAAGT
 15061 AATATAGCTT GTAATCATTG GCTAGGGGAT AGGATAATTT CTCTAACCTC TGAATCTATA
 15121 TTCCTAGAGT ATAACAAATA TATACATAAT AAAAATGATT TTAAGAAAAA ATCCGACACT
 15181 CAAAGAAAAA TGGTGCCTGT AATATTCTTC TTGCCAAATG ATTGTGAAGT GTCTAGCCTA
 15241 ACTTAAAACA ATCGTATTCT ATAGGGAAGA ATGATATATA AAATAACTAA TAAAAAATTG
 15301 TATTAGTAAA AATTACCGTA TTTCTGTAT TCCATTTCTG GT



Fig. 12

SEQ ID NO:2 trình tự ADN mã hoá Nucleoprotein (NP)

APMV-8

1 ATG TCA TCT GTG TTC AAT GAG TAT CAG GCG CTT CAA GAA CAA CTT GTG 48
 49 AAG CCG GCT GTC AGG AGA CCT GAT GTT GCC TCA ACG GGT TTA CTC AGA 96
 97 GCG GAA ATA CCT GTC TGT GTT ACA TTA TCT CAA GAC CCC GGT GAG AGA 144
 145 TGG AGC CTT GCT TGC TTG AAT ATT AGA TGG CTT GCG AGT GAT TCA TCA 192
 193 ACC ACA CCA ATG AAG CAA GGA GCA ATA TTG TCA CTG CTG AGT CTA CAT 240
 241 TCA GAC AAT ATG CGA GCT CAC GCA ACA TTA GCA GCA AGG TCT GCA GAT 288
 289 GCT TCA CTC ACC ATA CTT GAG GTA GAT GAA GTA GAT ATT AGC AAC TCA 336
 337 CTA ATC AAA TTC AAC GCC AGA AGT GGT GTA TCT GAC AAA CGC TCA AAT 384
 385 CAA TTG CTT GCA ATT GCG GAT GAC ATC CCC AAA AGT TGC AGT AAT GGG 432
 433 CAT CCA TTT CTT GAC ACA GAC ATT GAG ACC AGA GAC CCG CTC GAT CTA 480
 481 TCA GAG ACT ATA GTT GGT ACC CAG TAT CCA ACC TTA GCA ATG AGT GTT 528
 529 TCA GCC ATA AAG AGC ATG ACA GCG CCT GAC ACC GCA TCA GAG TCA GAA 576
 577 AGT AAG AGG CTG GCC AAA TAT CAA CAA CAA GGC CGA CTG GTT AAG CAA 624
 625 GTA CTC TTG CAT TCT GTA GTC AGG ACA GAA TTT ATG AGA GTT ATT CGG 672
 673 GGC AGC TTG GTA CTG CGC CAG TTT ATG GTT AGC GAG TGC AAG AGG GCT 720
 721 TCA GCC ATG GGC GGA GAC ACA TCT AGG TAC TAT GCT ATG GTG GGT GAC 768
 769 ATC AGT CTT TAC ATC AAG AAT GCA GGA TTG ACT GCA TTT TTC CTC ACC 816
 817 CTG AAG TTT GAT GGT ACC CAG TAT CCA ACC TTA GCA ATG AGT GTT 864
 865 TTC TCC AGT GAC CTT AAA AGG CTT GCT GCA CTC ATC AGG CTA TAC AAA 912
 913 ACC AAG GGA GAC AAT GCA CCA TAC ATG GCA TTC CTG GAG GAC TCC GAT 960
 961 ATG GGA AAT TTT GCT CCA GCA AAT TAT AGC ACA ATG TAC TCT TAT GCC 1008
 1009 ATG GGC ATT GGG ACA ATT CTG GAA GCA TCT GTA TCT CGA TAC CAG TAT 1056
 1057 GCC AGA GAC TTT ACC AGT GAG AAT TAT TTC CGT CTT GGA GTT GAG ACA 1104
 1105 GCC CAA AGC CAG CAG GGA GCA TTT GAC GAG AGA ACA GCC CGA GAA ATG 1152
 1153 GGC TTG ACT GAG GAA TCA AAA CAG CAG GTT AGA TCA CTG CTA ATG TCA 1200
 1201 GTA GAC ATG GGT CCC AGT TCA ATT CAT GAG CCA TCT CGC CCT GCA TTT 1248
 1249 ATC AGT CAA GAA GAA AAT AGG CAG CCT GCC CAG AAC TTG TCA GAT ACT 1296
 1297 CAG GGT CAG ACC AAG CCA GTC CCG AAG CAG CCC GCA CCA AGG GCC GAC 1344
 1345 TCA GAT GAC ATT GAT CCA TAC GAG AAC GGG CTA GAA TGG TAA 1386

SEQ ID NO:3 Trình tự protein của Nucleoprotein (NP) APMV-8

1 MSSVFNEYQALQEQLVKPAVRRPDVASTGLLR AEIPVCVTLSQDPGER 48
 49 WSLACLNIRWLASDSTTPMKQGAILSLSLHSDNMRAHATLAARSAD 96
 97 ASLTILEVDEVDISNLIKFNARSGVSDKRSNQLLAIADDIPKSCSNG 144
 145 HPFLDTDIETRDPLDLSETIDRLQGIAAQIWVSAIKSMTAPDTASESE 192
 193 SKRLAKYQQGRLVKQVLLHSVVRTEFMRVIRGSLVLRQFMVSECKRA 240
 241 SAMGGDTSRYAMVGDISLYIKNAGLTAFFLT LKFGVGTQYPTLAMSV 288
 289 FSSDLKRLAALIRLYKTKGDNAPYMAFLESDMGNFAPANYSTMYSYA 336
 337 MGIGTILEASVSRYQYARDFTSENYFRLGVETAQSQQGAFDERTAREM 384
 385 GLTEESKQQVRSLLMSVDMGPSSIHEPSRPAFISQEENRQPAQNLSDT 432
 433 QGQTKPVPKQPAPRADSDIDPYENGLEW* 462

Fig. 13

SEQ ID NO:4 trình tự ADN mã hoá Phosphoprotein (P) APMV-8

1 ATG GAT TTC GCC AAT GAT GAA GAA ATT GCA GAA CTT TTG AAT CTC AGC 48
 49 ACC AAT GTA ATC AAG GAG ATT CAG AAA TCC GAA CTC AAG CCT CCC CAA 96
 97 ACC ACC GGA CGA CCA CCT GTC AGT CAA GGG AAC ACA AGA AAT CTA ACT 144
 145 GAT CTA TGG GAA AAG GAG ACT GCA AGT CAG ACC AAG ACA CCG GCC CAA 192
 193 TCT ACA CAA ACC ACA CAA GTT CAG TCT GAT GAA AAT GAG GAG GGA GAA 240
 241 ATC AAG TCC GAG TCA ACT GAT GGC CAC ATC AGA GGA ACT GTT AAT CAA 288
 289 TCA GAG CAA GTC CCA GAA CAA AAC CAG AGC AGA TCT TCA CCA GGT GAT 336
 337 GAT CTC GAC AGA GCT CTC AAC AAG CTT GAA GGG AGA ATC AAT TTA ATC 384
 385 AGC TCA ATG GAC AAA GAA ATT AAA AAG GGC CCT CGC ATC CAG AAT CTC 432
 433 CCT GGG TCC CAG GCG GCA ACT CAA CAG GCG ACC CAC CCA TTG GCA GGG 480
 481 GAC ACC CCG AAC ATG CAA GCA CAG ACA AAA GCC CTG GCG AAG CCA CAT 528
 529 CAA GAG GCA ATC AAT CCT GGC AAC CAG GAC ACA GGA GAG AGT ATT CAT 576
 577 TTA CCA CCT TCC ATG GCA CCA CCA GAG TCA TTA GTT GGT GCA ATC CGC 624
 625 AAT GCA CCC CAA TTC GTG CCA GAC CAA TCT ATG ACG AAT GTA GAT GCG 672
 673 GGG AGT GTC CAA CTA CAT GCA TCA TGT GCA GAG ATG ATA AGT AGA ATG 720
 721 TTT GTA GAA GTT ATA TCC AAG CTT GAT AAA CTC GAG TCG AGA CTG AAT 768
 769 GAT ATA GCA AAA GTT GTG AAC ACT ACC CCC CTT ATT AGG AAT GAT ATT 816
 817 AAC CAA CTT AAG GCC ACA ACC GCA CTG ATG TCT AAC CAA ATT GCC TCC 864
 865 ATA CAA ATT CTT GAC CCA GGG AAT GCA GGG GTG AGG TCC CTC TCT GAA 912
 913 ATG AAA TCT GTG ACG AAG AAA GCT GCT GTT GTA ATT GCA GGG TTT GGA 960
 961 GAC GAC CCA ACT CAA ATT ATT GAA GAA GGC ATT ATG GCC AAA GAT GCT 1008
 1009 CTT GGA AAA CCT GTG CCT CCA ACA TCT GTT ATC TCA GCC AAA GCT CAG 1056
 1057 ACT TCT TCC GGT GTG AGT AAG GGT GAA ATA GAA GGA TTG ATT GCA TTG 1104
 1105 GTG GAA ACA TTA GTT GAC AAT GAC AAG AAG GCA GCA AAA CTG ATT AAA 1152
 1153 ATG ATT GAT CAA GTT AAA TCC CAT GCC GAT TAC GCC CGA GTC AAG CAG 1200
 1201 GCA ATA TAT AAT GCG TAA 1218

SEQ ID NO:5 Trình tự protein của PhosphoProtein (P)
APMV-8

1 MDFANDEEIAELLNLSTNVIKEIQKSELKPPQTGRPPVSQGNTRNLT 48
 49 DLWEKETASQTKTPAQSTQTTQVQSDENEEGEIKSESTDGHIRGTVNQ 96
 97 SEQVPEQNQSRSSPGDDLDRALNKLEGRINLISSMDKEIKKGPRIQNL 144
 145 PGSQAATQQATHPLAGDTPNMQAQTKALAKPHQEAINPGNQDTGESIH 192
 193 LPPSMAPPESLVGAIRNAPQFVPDQSMTNVDAGSVQLHASCAEMISRM 240
 241 FVEVISKLDKLESRLNDIAKVNTTPLIRNDINQLKATTALMSNQIAS 288
 289 IQILDPGNAGVRSLSMKSVTKKAAVVIAGFGDDPTQIIEGIMAKDA 336
 337 LGKVPPTSVISAKAQTSKGEIEGLIALVETLVDNDKKAALIK 384
 385 MIDQVKSHADYARVKQAIYNA* 406

Fig. 14

SEQ ID NO:6 trình tự ADN mã hoá ma trận protein (M) APMV-8

1 ATG GCA TAT ACA ACA TTG AAA CTG TGG GTG GAT GAG GGT GAC ATG TCG 48
 49 TCT TCG CTC CTA TCA TTC CCG TTG GTA CTA AAA GAG ACA GAC AGA GGC 96
 97 ACA AAG GAG CTT CAA CCA CAG GTA AGG GTA GAT TCA ATT GGC GAT GTG 144
 145 CAG AAC GCC AAA GAG TCC TCG ATA TTC GTG ACT CTA TAT GGT TTC ATC 192
 193 CAA GCA ATT AAG GAG AGT TCA GAT CGA TCG AAA TTC TTC CAT CCA AAA 240
 241 GAT GAC TTC AAA CCT GAG ACA GTC ACT GCA GGA CTG GTA GTG GTA GGT 288
 289 GCG ATC CGA ATG ATG GCT GAT GTT AAT ACC ATC TCT AAT GAC GCA CTA 336
 337 GCG CTG GAG ATC ACT GTT AAG AAA TCT GCA ACT TCT CAA GAG AAA ATG 384
 385 ACG GTG ATG TTC CAC AAT AGC CCC CCT TCA TTG AGA ACT GCA ATA ACT 432
 433 ATC CGA GCA GGA GGT TTC ATC TCG AAT GCA GAC GAG AAT ATA AAA TGT 480
 481 GCC AGC AAA TTG ACT GCA GGA GTG CAG TAC ATA TTC CGC CCA ATG TTT 528
 529 GTT TCA ATC ACT AAA TTA CAC AAT GGC AAA CTA TAT AGG GTG CCC AAA 576
 577 AGC ATC CAC AGC ATC TCA TCC ACT CTA CTG TAT AGT GTG ATG TTG GAG 624
 625 GTA GGA TTC AAA GTG GAT ATT GGG AAG GAT CAT CCC CAG GCA AAG ATG 672
 673 CTG AAG AAG GTC ACA ATC GGC GAT GCA GAC ACA TAC TGG GGG TTT GCA 720
 721 TGG TTC CAC CTG TGC AAT TTC AAA AAG ACA TCC TCT AAG GGA AAG CCA 768
 769 AGA ACG CTA GAC GAA CTA AAG ACA AAA GTC AAA AAT ATG GGG TTG AAA 816
 817 TTG GAG TTA CAT GAC CTG TGG GGT CCG ACT ATT GTG GTC CAA ATC ACT 864
 865 GGC AAG AGC AGC AAA TAT GCT CAA GGA TTT TTT TCC TCC AAT GGT ACT 912
 913 TGT TGT CTC CCA ATC AGC AGA TCT GCA CCA GAG CTT GGG AAG CTT CTG 960
 961 TGG TCT TGT TCA GCA ACT ATA GGT GAC GCA ACA GTT GTT ATC CAA TCA 1008
 1009 AGC GAG AAA GGG GAA CTC CTA AGG TCT GAT GAC CTC GAG ATA CGA GGT 1056
 1057 GCT GTG GCC TCC AAG AAA GGT AGA CTG GGC TCA TTT CAC CCC TTC AAA 1104
 1105 AAA TGA 1110

SEQ ID NO:7 Trình tự protein của ma trận protein (M) APMV-8

1 MAYTTLKLWVDEGDMSSLLSFPLVLKETDRGTKELQPQVRVDSIGDV 48
 49 QNAKESSIFVTLYGFIQAIKESSDRSKFFHPKDDFKPETVTAGLVVVG 96
 97 AIRMMADVNTISNDALALEITVKKSATSQEKMTVMFHNSPPSLRTAIT 144
 145 IRAGGFISNADENIKCASKLTAGVQYIFRPMFVSITKLHNGKLYRVPK 192
 193 SIHSISSTLLYSVMLEVGFKVDIGKDHPQAKMLKKVTIGDADTYWGFA 240
 241 WFHLNCFKKTSSKGKPRTLDELKTKVKNMGLKLELHDLWGPTIVVQIT 288
 289 GKSSKYAQGFFSSNGTCCLPISRSAPELGKLLWSCSATIGDATVVIQS 336
 337 SEKGELLRSDDLIRGAVASKKGRGSGFHPFKK* 370

Fig. 15

SEQ ID NO:8 trình tự ADN mã hoá Protein dung hợp (F)
APMV-8

1 ATG GGT CAA ATA TCA GTA TAT CTA ATT AAT AGC GTG CTA TTA TTG CTG 48
49 GTA TAT CCT GTG AAT TCG ATT GAC AAT ACA CTC ATT GCC CCA ATC GGA 96
97 GTT GCC AGC GCA AAT GAA TGG CAG CTT GCT GCA TAT ACA ACA TCA CTT 144
145 TCA GGG ACA ATT GCC GTG CGA TTC CTA CCT GTG CTC CCG GAT AAT ATG 192
193 ACT ACC TGT CTT AAA GAA ACA ATC ACT ACA TAC AAT AAT ACT GTC AAC 240
241 AAC ATC TTA GGC CCA CTC AAA TCC AAT CTG GAT GCA CTG CTC TCA TCT 288
289 GAG ACT TAT CCC CAG ACA AGA TTA ATT GGG GCA GTT ATA GGT TCA ATT 336
337 GCT CTC GGT GTT GCA ACA TCG GCT CAA ATC ACT GCT GCA GTT GCT CTC 384
385 AAG CAA GCG CAA GAC AAT GCA AGG AAC ATA CTA GCA CTC AAA GAA GCA 432
433 CTG TCC AAA ACC AAT GAG GCG GTC AAG GAG CTT AGT AGT GGG TTA CAA 480
481 CAA ACA GCA ATT GCA CTT GGT AAG ATA CAG AGT TTT GTG AAT GAG GAA 528
529 ATT CTG CCA TCT ATC AAC CAA CTG AGC TGC GAG GTG ACA GCC AAT AAA 576
577 CTT GGG GTG TAT TTA TCT CTG TAT CTC ACA GAA CTG ACC ACC ATA TTC 624
625 GGT GCA CAG CTG ACC AAC CCT GCA TTG ACT TCA TTA TCA TAT CAA GCA 672
673 CTG TAC AAC CTG TGT GGT GGC AAC ATG GCA ATG CTT ACT CAG AAG ATT 720
721 GGA ATT AAA CAG CAA GAC GTT AAT TCG CTA TAT GAA GCC GGA CTA ATC 768
769 ACA GGA CAA GTC ATT GGT TAT GAC TCT CAT TAC CAG CTG CTG GTC ATC 816
817 CAG GTC AAT TAT CCA AGC ATT TCT GAG GTC ACT GGT GTA CGT GCG ACA 864
865 GAA TTA GTC ACT GTT AGT GTA ACA ACA GAC AAG GGT GAA GGG AAA GCA 912
913 ATT GTA CCC CAA TTT GTA GCT GAA AGT CGG GTG ACT ATT GAA GAG CTT 960
961 GAT GTC GCA TCT TGT AAA TTC AGC AGC ACG ACC CTA TAT TGC AGG CAG 1008
1009 GTC AAC ACA AGG GCA CTT CCC CCG CTA GTA GCT AGC TGT CTT CGA GGT 1056
1057 AAC TAT GAT GAT TGT CAA TAT ACC ACA GAG ATT GGA GCA TTA TCA TCC 1104
1105 CGG TAT ATA ACA CTA GAT GGG GGG GTC TTA GTT AAT TGC AAG TCA ATT 1152
1153 GTT TGT AGG TGC CTT AAT CCA AGT AAG ATC ATC TCT CAA AAT ACA AAC 1200
1201 GCT GCA GTA ACA TAT GTT GAT GCC ACA ATC TGC AAA ACA ATT CAA TTG 1248
1249 GAT GAT ATA CAA CTC CAG CTG GAA GGG TCA CTA TCA TCA GTT TAT GCA 1296
1297 AGA AAC ATC TCA ATT GAG ATC AGT CAG GTG ACC ACA TCC GGG TCT TTA 1344
1345 GAT ATC AGC AGT GAG ATA GGA AAC ATC AAT AAT ACG GTG AAT CGT GTG 1392
1393 GAG GAT TTA ATT CAC CAA TCA GAG GAA TGG CTG GCA AAG GTT AAC CCA 1440
1441 CAC ATT GTT AAT AAT ACA ACA CTA ATT GTA CTC TGT GTG TTA AGT GCG 1488
1489 CTT GCT GTG ATC TGG CTG GCA GTA TTA ACG GCT ATT ATA ATA TAC TTG 1536
1537 AGA ACA AAG TTG AAG ACT ATA TCG GCA TTA GCT GTA ACC AAT ACA ATA 1584
1585 CAG TCT AAC CCC TAT GTT AAC CAA ACG AAA CAT GAA TCT AAG TTT TGA 1632

SEQ ID NO:9 Trình tự protein của APMV-8 Protein dung hợp (F)

1 MGQISVYLINSVLLLVYPVNSIDNTLIAPIGVASANEWQLAAYTTS 48
49 SGTIAVRFLPVLDPNMTTCLKETITTYNNTVNNILGPLKSNLDALLSS 96
97 ETYPQTRLIGAVIGSIALGVATSAQITAVALKQAQDNARNILALKEA 144
145 LSKTNEAVKELSSGLQQTALALGKIQSFVNNEILPSINQLSCEVTANK 192
193 LGVYLSLYLTETTTIFGAQLTNPALTSYQALYNLCGGNMAMLTQKI 240
241 GIKQQDVNSLYEAGLITGQVIGYDSHYQLLVIQVNYPSISEVTGVRAT 288
289 ELVTVSVTTDKGEGKAIVPQFVAESRVTEELDVASCKFSSTTL YCRQ 336
337 VNTRALPPLVASCLRGNYDDCQYTTTEIGALSSRYITLDGGVLVNCKSI 384
385 VCRCLNPSKIISQNTNAAVTYVDATICKTIQLDDIQLQLEGLSSVYA 432
433 RNISIEISQVTTSGSLDISSEIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKVNP 480
481 HIVNNTTLIVLCVLSALAVIWLAVLTAAIHYLRKLTISALAVTNTI 528
529 QSNPYVNQTKHESKF*

544

Fig. 16

SEQ ID NO:10 trình tự ADN mã hoá Hemagglutinin/neuraminidaza (HN) APMV-8

1 ATG AGT AAC ATT GCA TCC AGT TTA GAA AAC ATT GTA GAG CAG GAT AGT 48
 49 CGA AAA ACA ACT TGG AGG GCC ATC TTT AGA TGG TCC GTT CTT CTT ATT 96
 97 ACA ACA GGA TGC TTA GCC TTA TCC ATT GTT AGC ATA GTT CAA ATT GGA 144
 145 AAT TTG AAA ATT CCT TCT GTA GGG GAT CTG GCT GAT GAA GTG GTG ACA 192
 193 CCC TTG AAA ACC ACT CTG TCA GAT ACA CTC AGG AAT CCA ATT AAC CAG 240
 241 ATA AAT GAT ATA TTT AGG ATT GTT GCC CTT GAT ATT CCA TTG CAA GTG 288
 289 ACC AGT ATC CAA AAA GAC CTT GCA AGT CAA TTT AAC ATG TTG ATA GAT 336
 337 AGT TTA AAT GCT ATC AAA TTA GGC AAC GGG ACC AAC CTT ATC ATA CCT 384
 385 ACA TCA GAC AAG GAG TAT GCA GGA GGA ATT GGA AAC CCT GTA TTT ACT 432
 433 GTC GAT GCT GGA GGT TCT ATA GGA TTC AAA CAG TTT AGC TTA ATA GAA 480
 481 CAT CCG AGC TTT ATT GCT GGA CCT ACA ACG ACC CGA GGC TGT ACA AGA 528
 529 ATA CCC ACT TTT CAC ATG TCA GAA AGT CAT TGG TGC TAC TCA CAC AAC 576
 577 ATC ATC GCT GCT GGC TGT CAA GAT GCC AGT GCA TCC AGT ATG TAT ATC 624
 625 TCA ATG GGA GTT CTC CAT GTG TCC TCA TCT GGC ACT CCC ATT TTT CTT 672
 673 ACT ACT GCA AGT GAG CTG ATA GAC GAT GGA GTT AAC CGT AAG TCA TGC 720
 721 AGC ATT GTA GCA ACC CAA TTT GGC TGT GAC ATT TTG TGC AGT ATT GTC 768
 769 ACA GAG AAG GAG GGA GAT GAT TAC TGG TCT GAT ACT CCG ACT CCA ATG 816
 817 CGC CAC GGC CGT TTT TCA TTC AAT GGT AGT TTT GTA GAA GCC GAA CTA 864
 865 CCA GTG TCC AGT ATG TTC TCA TCA TTC TCT GCC AAC TAC CCT GCT GTG 912
 913 GGA TCA GGC GAA ATT GTA AAA GAT AGA ATA TTA TTC CCA ATT TAC GGA 960
 961 GGT ATA AAG CAG ACT TCA CCA GAG TTT ACC GAA TTA GTG AAA TAC GGA 1008
 1009 CTC TTT GTA TCA ACA CCT ACA ACT GTG TGC CAG AGT AGC TGG ACT TAT 1056
 1057 GAC CAG GTA AAA GCT GCG TAT AGG CCA GAT TAC ATA TCA GGC CGG TTC 1104
 1105 TGG GCA CAA GTG ATA CTC AGC TGC GCT CTT GAT GCA GTC GAC TTA TCA 1152
 1153 AGT TGT ATT GTA AAG ATT ATG AAT AGC AGC ACA GTG ATG ATG GCA GCG 1200
 1201 GAA GGA AGG ATA ATG AAG ATA GGG ATT GAT TAC TTT TAC TAT CAG CGG 1248
 1249 TCA TCT TCT TGG TGG CCA TTG GCA TTT GTC ACA AAA CTA GAC CCG CAA 1296
 1297 GAG TTG GCA GAC ACA AAC TCA ATA TGG CTG ACC AAT TCC ATA CCA ATC 1344
 1345 CCG CAA TCA AAG TTC CCT CGG CCT TCA TAT TCA GAA AAT TAT TGC ACA 1392
 1393 AAG CCA GCA GTT TGC CCT GCT ACT TGT GTC ACT GGT GTG TAC TCT GAT 1440
 1441 ATT TGG CCC CTG ACC TCA TCT TCA TCA CTC CCG AGC ATA ATT TGG ATC 1488
 1489 GGC CAG TAC CTT GAT GCT CCT GTT GGA AGG ACT TAT CCT AGA TTT GGA 1536
 1537 ATT GCA AAT CAG TCA CAC TGG TAC CTC CAA GAA GAT ATT CTA CCC ACT 1584
 1585 TCC ACC GCA AGT GCG TAT TCA ACC ACT ACA TGT TTT AAG AAT ACT GCC 1632
 1633 AGG AAT AGA GTG TTC TGC GTC ACC ATT GCC GAA TTT GCA GAT GGG TTG 1680
 1681 TTT GGA GAG TAC AGG ATA ACA CCT CAG TTG TAC GAA TTA GTG AGA AAT 1728
 1729 AAT TGA 1734

SEQ ID NO:11 Trình tự protein của Hemagglutinin/neuraminidaza (HN) APMV-8

1 MSNIASSLENIVEQDSRKTWRAIFRWSVLLITGCLALSIVSIVQIG 48
 49 NLKIPSVGDLADEVVTPLKTTLSDTLRNPINQINDIFRIVALDIPLQV 96
 97 TSIQKDLASQFNMLIDSLNAIKLNGTNIIPSTSDKEYAGGIGNPVFT 144
 145 VDAGGSIGFKQFSLEHPSFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSESHWCYSHN 192
 193 IIAAGCQDASASSMYISMGVLHVSSSGTPIFLTASELIDDGVNRKSC 240
 241 SIVATQFGCDILCSIVTEKEGDDYWSDTPTPMRHGRFSFNGSFVEAEL288
 289 PVSSMFSSFSANYPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQTSPEFTLVKYG 336
 337 LRVSTPTTVQCSSWTYDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSCALDAVDLS 384
 385 SCIVKIMNSSTVMMAAEGRIMKIGIDYFYQRSSSWWPLAFVTKLDPQ 432
 433 ELADTNSIWLTSNIPQSKFPRPSYSENYCTKPAVCPATCVTVGYSD 480
 481 IWPLTSSSSLPISHWIGQYLDAPVGRTPYRFGIANQSHWYLQEDILPT 528
 529 STASAYSTTTTCFKNTARNRVFCVTIAEFADGLFGEYRITPQLYELVRN 576
 577 N* 578

Fig. 17 (1/4)

SEQ ID NO:12 trình tự ADN mã hoá Polymeraza (L) APMV-8

1 **ATG** GAG GGC GAC CTC TAC ACA AAC **ATG** GAT ATA AAA CAA GTT GAC CTG 48
 49 ATA ATA CAA CCC GAG GTT CAT CTC GAT TCA CCC ATC ATA TTG AAT AAA 96
 97 CTG GCA CTA TTA TGG CGC TTG AGT GGT TTA CCC ATG CCT GCA GAC CTA 144
 145 CGA CAA AAA TCC GTA GTG ATG CAC ATC CCG GAC CAC ATC TTA GAA AAA 192
 193 TCA GAA TAT CGG ATC AAG CAC CGT CTA GGG AAA ATC AAG AGT GAC ATA 240
 241 ACA CAT TAC TGT CAG TAT TTT AAT ATT AAT TTG GCA AAT ATT GAT CCG 288
 289 ATA ACC CAC CCC AAA AGT TTG TAT TGG TTA TCC AGA CTA ACA ATA GCT 336
 337 AGT GCT GGA ACT TTT AGG CAT ATG AAA GAT AGA ATC TTG TGT ACA GTT 384
 385 GGC TCT GAA TTT GGA CAC AAA ATT CAA GAT TTA TTT TCA CTG CTG AGC 432
 433 CAT AAA CTA GTA GGT AAC GGG GAT TTA TTT AAT CAA AGT CTC TCA GGT 480
 481 ACA CGT TTG ACT GCA AGT CCG TTA TCC CCT TTA TGC AAT CAA TTT GTC 528
 529 TCT GAC ATC AAG TCT GCA GTC ACG ACA CCC TGG TCA GAA GCT CGT TGG 576
 577 TCT TGG CTT CAT ATC AAA CAA ACA ATG AGA TAT CTG ATA AAA CAA TCA 624
 625 CGC ACT ACA AAT TCG GCT CAT TTA ACA GAA ATC ATA AAA GAA GAA TGG 672
 673 GGT TTA GTA GGT ATT ACT CCA GAT CTT GTC ATT CTT TTT GAC AGA GTC 720
 721 AAT AAT AGT CTG ACT GCA TTA ACA TTT GAG ATG GTT CTA ATG TAT TCA 768
 769 GAT GTA TTA GAA TCC CGT GAC AAT ATT GTG TTA GTG GGG CGA CTA TCT 816
 817 ACC TTT CTA CAG CCA GTA GTT AGT AGA CTG GAG GTG TTG TTT GAT CTA 864
 865 GTA GAT TCA TTG GCA AAA ATC TTA GGT GAC ACA ATA TAT GAG ATT ATT 912
 913 GCA GTG TTA GAG AGC TTG TCT TAT GGG TCA GTT CAA CTA CAT GAT GCA 960
 961 AGT CAC TCT CAT GCA GGG TCT TTT TTT TCA TTT AAC ATG AAT GAA CTT 1008
 1009 GAT AAC ACA CTA TCA AAG AGG GTA GAT CCG AAA CAC AAG AAC ACT ATA 1056
 1057 ATG AGC ATT ATA AGA CAA TGC TTT TCT AAT CTA GAT GTT GAT CAA GCT 1104
 1105 GCA GAG ATG CTA TGC CTG ATG AGA TTA TTC GGA CAC CCA ATG TTA ACT 1152
 1153 GCA CCG GAT GCA GCA GCC AAA GTG AGG AAA GCA ATG TGT GCT CCA AAA 1200
 1201 CTT GTT GAA CAC GAC ACC ATC TTG CAG ACA TTA TCT TTC TTC AAG GGG 1248
 1249 ATA ATT ATA AAT GGG TAC AGA AGA TCA CAC TCT GGC CTG TGG CCC AAT 1296
 1297 GTA GAG CCG TCT TCA ATT TAT GAT GAT GAT CTC AGA CAG CTG TAC TTA 1344
 1345 GAG TCA GCA GAG ATT TCC CAT CAT TTT ATG CTT AAA AAC TAC AAG AGT 1392
 1393 TTA AGC ATG ATA GAA TTC AAG AAG AGC ATA GAC TAC GAT CTT CAT GAT 1440
 1441 GAC CTA AGT ATT TTC TTA AAG GAT AGA GCA ATT TGC CGG CCG AAA TCC 1488
 1489 CAG TGG GAT GTC ATA TTT CGT AAG TCT TTA CGC AGA TCT CAT ACG CAG 1536
 1537 TCC CAG TAT CTG GAC GAA ATT AAG AGC AAC CGA TTG CTA ATT GAT TTT 1584
 1585 CTT GAT TCT GCT GAA TTT GAC CCT GGA AAA GAA TTT GCA TAT GTA ACC 1632
 1633 ACA ATG GAT TAT TTG CAC GAT AAT GAA TTT TGT GCT TCA TAT TCT CTA 1680
 1681 AAG GAA AAG GAG ATC AAA ACT ACT GGG AGG ATA TTT GCA AAA ATG ACA 1728
 1729 CGC AAT ATG AGA AGT TGC CAA GTA ATA CTT GAA TCT TTG TTA TCA AAG 1776
 1777 CAT ATA TGC AAG TTC TTA AAA GAG AAT GGC GTT TCG ATG GAG CAA TTG 1824
 1825 TCA TTG ACC AAG AGT CTA CTT GCA ATG TCT CAA CTC TCA CCA AAA GTC 1872
 1873 TCG ACT TTG CAG GAC ACT GCA TCA CGT CAT GTA GGT AAC TCA AAA TCT 1920
 1921 CAG ATT GCA ACC AGC AAC CCA TCT CGG CAT CAC TCG ACA CCC AAT CAG 1968
 1969 ATG TCA CTC TCA AAT CGA AAA ACG GTT GTA GCA ACT TTC TTA ACA ACT 2016
 2017 GAC TTG GAA AAA TAC TGC CTG CAG TGG CGA TAT TCA ACT ATT AAA TTG 2064
 2065 TTT GCA CAA GCT CTA AAT CAA CTC TTT GGG ATT GAT CAC GGA TTT GAA 2112
 2113 TGG ATA CAT TTA AGA CTT ATG AAC AGC ACC TTA TTT GTT GGC GAT CCT 2160
 2161 TAC TCG CCT CCT GAA GAT CCA ACA CTA GAA GAT ATA GAT AAA GCA CCA 2208
 2209 AAT GAT GAT ATC TTC ATA GTT TCT CCA AGG GGA GGC ATA GAG GGT TTA 2256
 2257 TGT CAG AAA ATG TGG ACC ATG ATA TCA ATT AGT GCT ATA CAC TGT GTA 2304
 2305 GCA GAG AAA ATT GGT GCA CGA GTG GCA GCA ATG GTG CAG GGT GAT AAT 2352
 2353 CAA GTA ATA GCT ATC ACC AAA GAA TTA TTC AGA GGA GAG AAA GCT TGT 2400
 2401 GAT GTC AGA GAT GAG TTA GAC GAG CTT GGT CAA GTG TTT TTT GAT GAG 2448
 2449 TTC AAG AGA CAC AAT TAT GCA ATT GGA CAC AAT CTT AAG CTA AAT GAG 2496
 2497 ACA ATA CAA AGC CAA TCC TTT TTT GTA TAT TCC AAA CGA ATA TTC TTT 2544
 2545 GAA GGG CGA TTG CTT AGT CAA GTC CTC AAA AAT GCT GCC AAG TTA TGT 2592
 2593 ATG GTT GCT GAC CAT CTA GGT GAA AAC ACT GTA TCT TCC TGT AGC AAC 2640

Fig. 17 (2/4)

2641 CTG AGC TCG ACA ATT GCC CGC TTA GTG GAA AAT GGG TTT GAG AAG GAC 2688
 2689 ACT GCT TTT GTG TTG AAC CTA GTC TAC ATC ATG ACT CAG ATT CTT TTT 2736
 2737 GAT GAG CAT TAC TCG ATT GTA TGC GAT CAC CAT AGT GTC AAA AGC TTG 2784
 2785 ATT GGA TCA AAA AAC CAT CGG AAT TTA TTG TAT TCA TCT CTA ATA CCA 2832
 2833 GGT CAG CTC GGC GGT TTC AAC TTC CTC AAT ATA AGT CGG TTG TTC ACT 2880
 2881 AGG AAT ATA GGT GAC CCA GTA ACA TGT AGT CTG TCT GAT CTC AAA TGC 2928
 2929 TTC ATA GCC GCA GGT CTC CTT CCA CCC TAT GTC CTA AAA AAT GTG GTT 2976
 2977 CTG CGT GAG CCT GGT CCT GGG ACA TGG TTG ACG TTG TGC TCT GAT CCT 3024
 3025 TAC ACC CTT AAC ATA CCA TAC ACA CAG CTT CCA ACC ACA TAT CTC AAA 3072
 3073 AAG CAC ACC CAG CGA TCA TTG CTT TCA CGT GCA GTA AAT CCT TTA TTA 3120
 3121 GCC GGT GTA CAA GTG CCA AAT CAG CAT GAG GAA GAA GAG ATG TTG GCT 3168
 3169 CGC TTT CTC CTT GAT CGT GAA TAT GTG ATG CCC CGC GTT GCT CAT GTA 3216
 3217 ATA CTA GAA TCA TCA GTC CTT GGC AAA CGG AAA CAA ATC CAA GGC TTA 3264
 3265 ATT GAT ACA ACT CCA ACC ATC ATT AGA ACA TCT CTA GTT AAT CTG CCA 3312
 3313 GTG TCT AGA AAG AAA TGC GAA AAA ATA ATC AAT TAC TCT CTC AAT TAT 3360
 3361 ATT GCT GAG TGT CAT GAC TCC TTA CTT AGC CAG GTC TGC TTC AGT GAT 3408
 3409 AAT AAG GAA TAC TTG TGG TCA ACC TCC TTA ATA TCA GTT GAG ACC TGT 3456
 3457 AGT GTG ACA ATT GCG GAC TAT CTG AGA GCT GTC AGC TGG TCT AAT ATA 3504
 3505 TTA GGG GGA AGA AAC ATA TCC GGG GTG ACT ACA CCT GAT ACT ATT GAA 3552
 3553 TTA ATT CAA GGT TGT TTA ATA GGT GAA AAT TCT AGT TGT ACT CTT TGT 3600
 3601 GAA TCG CAT GAT GAC GCA TTC ACG TGG ATG CAC TTG CCT GGC CCA CTT 3648
 3649 TAC ATC CTT GAA CCA TCA GTT ACT AAC TCT AAA ATG CGT GTG CCA TAT 3696
 3697 CTG GGT TCA AAA ACA GAG GAG CGG AAA ACA GCC TCA ATG GCA GCA ATA 3744
 3745 AAA GGA ATG TCA CAT CAC CTG CGT GCA GTC TTA AGA GGC ACA TCC GTA 3792
 3793 TTT ATT TGG GCA TTT GGG GAT ACA GAT ATC AAT TGG GAT AAT GCA TTG 3840
 3841 CAG ATT GCC CAA TCA CGG TGT AAC ATC ACA TTG GAT CAA ATG AGA TTA 3888
 3889 CTT ACA CCA ATT CCT AGC AGT TCA AAT ATT CAA CAT AGA CTC GAT GAC 3936
 3937 GGA ATC AGC ACG CAG AAA TTT ACT CCT GCA AGC CTT GCT CGA ATC ACA 3984
 3985 TCC TTC GTT CAC ATC TGT AAT GAC AGC CAG AGG TTA GAG AAG GAT GGC 4032
 4033 TCA TCT GTC GAC TCA AAC TTG ATT TAC CAG CAA ATT ATG TTA CTT GGA 4080
 4081 CTC AGC ATC TTT GAA ACA ATG TAC TCA ATG GAC CAA AAG TGG GTA TTC 4128
 4129 AAT AAC CAT ACC TTG CAT TTG CAC ACT GGA CAC TCC TGT TGT CCA AGG 4176
 4177 GAA CTA GAC ATA AGT TTG GTG AAC CCG CCG AGA CAT CAG ACC CCG GAG 4224
 4225 CTG ACT AGC ACA ACA ACC AAC CCG TTC CTA TAT GAT CAG CTC CCA TTA 4272
 4273 AAT CAA GAA AAC TTG ACA ACA CTT GAG ATT AAG ACA TTT AAA TTC AAT 4320
 4321 GAG CTC AAC ATT GAT GGT TTA GAT TTT GGT GAA GGA ATA CAA TTA TTG 4368
 4369 AGT CGT TGT ACT GCA AGA TTA ATG GCA GAA TGT ATT CTA GAG GAG GGA 4416
 4417 ATA GGC TCG TCA GTT AAA AAT GAA GCA ATT GTC AAT TTT GAT AAT TCA 4464
 4465 GTC AAT TGG ATT TCA GAG TGC CTA ATG TGT GAT ATT CGC TCA CTT TGT 4512
 4513 GTT AAT TTA GGT CAA GAG ATA CTA TGT AGC CTG GCA TAC CAA ATG TAT 4560
 4561 TAC TTG CGA ATC AGG GGT AGA CGG GCC ATT CTT AAT TAC TTG GAC ACA 4608
 4609 ACT TTG CAA AGG ATC CCT GTG ATA CAA TTA GCC AAC ATT GCA CTC ACC 4656
 4657 ATT TCG CAC CCT GAG ATA TTT CGC AGA ATT GTC AAC ACC GGG ATC CAT 4704
 4705 AAC CAG ATT AAG GGC CCA TAT GTG GCA ACA ACG GAT TTC ATA GCT GCA 4752
 4753 AGT AGA GAT ATC ATA TTA TCA GGT GCA AGG GAG TAT CTA TCT TAT TTA 4800
 4801 AGC AGT GGG CAG GAA GAC TGT TAC ACA TTC TTC AAC TGT CAA GAT GGG 4848
 4849 GAT CTT ACT CCA AAA ATG GAA CAG TAT CTT GCA AGG AGG GCA TGC CTT 4896
 4897 TTA ACA TTA TTG TAT AAT ACT GGG CAC CAG ATC CCC GTT ATC CGA TCA 4944
 4945 CTG ACG CCA ATA GAG AAG TGC AAG GTG CTC ACA GAA TAC AAT CAA CAA 4992
 4993 ATT GAG TAC GCA GAT CAA GAG TTT AGC TCT GTA CTA AAA GTG GTC AAT 5040
 5041 GCA CTA CTA CAA AAT CCT AAG ATA GAT GCA TTA GTT TCA AAT CTC TAC 5088
 5089 TTC ACC ACC AGA CGT GTT CTA TCA AAC CTC AGA TCA TGT GAT AAG GCT 5136
 5137 AGA TCA TAT ATT GAA TAT TTG TAC ACT GAG GAC TTC GGA GAG AAA GAG 5184
 5185 GAT ACA GTA CAA TAT GAC ATC ATG ACA ACA AAC GAT ATC ATA CTT ACT 5232
 5233 CAT GGT CTA TTC ACA CAG ATC GAA ATA TCT TAT CAA GGG AAT AGT CTC 5280
 5281 CAT AAG TTC CTT ACT CCG GAT AAC GCG CCT GGA TCT TTG ATC CCA TTC 5328

Fig. 17 (3/4)

5329 TCT ATT TCA CCA AAT TCA CTT GCA TGT GAC CCT CTT CAT CAC TTG CTC 5376
 5377 AAG TCG GTC GGT ACA TCA AGC ACA AGT TGG TAC AAG TAT GCA ATC GCC 5424
 5425 TAT GCA GTG TCT GAA AAG AGG TCA GCT CGA TTA GGA GGG AGC TTG TAC 5472
 5473 ATT GGT GAA GGG AGC GGA AGT GTG ATG ACT TTA CTC GAG TAT CTT GAG 5520
 5521 CCA TCT GTT GAC ATA TTT TAC AAT TCA CTC TTC TCA AAT GGT ATG AAC 5568
 5569 CCA CCA CAA CGA AAT TAT GGG CTT ATG CCA CTA CAA TTT GTG AAT TCG 5616
 5617 GTG GTT TAT AAG AAC TTA ACG GCT AAA TCA GAA TGT AAG CTA GGG TTT 5664
 5665 GTC CAG CAA TTT AAA CCG TTG TGG AGA GAC ATA GAC ATT GAG ACT AAT 5712
 5713 GTT ACA GAT CCA TCA TTT ATC AAT TTT GCA TTG AAT GAA ATC CCA ATG 5760
 5761 CAA TCA TTA AAA CGA GTA AAT TGT GAT GTG GAA TTT GAC CGT GGT ATG 5808
 5809 CCG ATT GAA CGG GTT ATT CAG GGT TAC ACC CAT ATC TTA CTT GTT GCC 5856
 5857 ACT TAC GGA TTA CAG CAA GAT TCA ATA CTG TGG GTG AAG GTA TAT AGG 5904
 5905 ACA TCT GAA AAA GTA TTT CAA TTC TTA CTG AGT GCC ATG ATC ATG ATC 5952
 5953 TTT GGT TAT GTA AAA ATC CAC AGG AAT GGT TAT ATG TCG ACA AAG GAT 6000
 6001 GAA GAG TAC ATA TTG ATG TCT GAC TGC AAG GAA CCT GTA AAC TAT ACA 6048
 6049 GCT GTC CCT AAC ATT CTT ACA CGT GTA AGT GAT TTA GTG TCG AAG AAT 6096
 6097 CTG AGT CTT ATC CAT CCA GAA GAC CTC AGA AAA GTA AGG TGT GAA ACA 6144
 6145 GAT TCC CTG AAT TTG AAG TGC AAT CAT ATT TAT GAG AAA ATA ATT GCC 6192
 6193 AGA AAA ATT CCA TTA CAG GTA TCA TCA ACT GAC TCT TTG CTC CTC CAA 6240
 6241 TTA GGC GGT GTT ATC AAC TCG GTG GGC TCA ACT GAT CCT AGA GAG GTT 6288
 6289 GCA ACA TTA TCT TCT ATT GAG TGT ATG GAC TAT GTT GTC TCA TCA ATT 6336
 6337 GAT TTG GCT ATA TTG GAG GCA AAT ATT GTA ATC TCA GAG AGT GCT GGT 6384
 6385 CTT GAC CTC GCT TTA ATG TTA GGC CCA TTC AAC TTA AAT AAG CTT AAG 6432
 6433 AAA ATT GAC ACA ATC CTT AAG TCA AGC ACC TAT CAG CTA ATC CCG TAC 6480
 6481 TGG TTG CGC TAT GAG TAC TCT ATT AAT CCG AGA TCT TTG TCA TTT CTA 6528
 6529 ATC ACT AAA TTA CAA CAA TGC CGA ATT TCA TGG TCA GAT ATG ATC ACG 6576
 6577 ATT TCT GAA TTT CGT AAG AAA TCC AAG CGG CCT ATA TTT ATC AAA CGA 6624
 6625 GTA ATA GGG AAT CAA CAG CTA AAA TCA TTC TTT AAT GAA AGC TCA AGT 6672
 6673 ATT GTT TTG ACT CGG GCT GAA GTT AAA GTC TGT ATA AAG TTC CTC GGT 6720
 6721 GCA ATC ATC AAG TTG AAA TAA 6741

Có hai codon **ATG** (được in đậm và gạch chân) có thể là codon khởi đầu cho Polymeraza (L) APMV 8.

Fig. 17 (4/4)

SEQ ID NO:13 Trình tự protein (1) của Polymeraza (L) APMV-8

1	M EGDLYTN M DIKQVDLIHQEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADL	48
49	RQKSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDITHYCQYFNINLANIDP	96
97	ITHPKSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLS	144
145	HKLVGNGDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCNQFVSDIKSAVTTTPWSEARW	192
193	SWLHIKQTMRYLIKQSRTTNSAHLTEIHKKEEWGLVGITPDLVILFDRV	240
241	NNSLTALTFEMVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDL	288
289	VDSLAKILGDTIYEIIHAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNEL	336
337	DNTLSKRVDPKHKNTIMSIHQCFNSLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLT	384
385	APDAAAKVRKAMCAPKLVEHDTILQTLSPFKGIINGYRRSHSGLWPN	432
433	VEPSSYDDDLRQLYLESAEISHHFMFLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHD	480
481	DLSTFLKDRAICRPKSQWDVIFRKSLLRSHTQSQYLDEIKSNRLIDF	528
529	LDSAEFDPGKEFAYVTTMDYLHDNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMT	576
577	RNMRSQCQVILESLLSKHICKFFKENGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKV	624
625	STLQDTASRHVGNSKSKIATSNPSRHSTPNQMSLSNRKTVVATFLTT	672
673	DLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGIDHGFWEIHLRLMNSTLFVGD	720
721	YSPPEDPTLEDIDKAPNDIFIVSPRGGIEGLCQKMWTMISISAIHCV	768
769	AEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKACDVRDELDELGQVFFDE	816
817	FKRHNIAIGHNLKLNETHIQSQSFFVYSKRIFFEGRLLSQVLKNAAKLC	864
865	MVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFVLNLVYIMTQILF	912
913	DEHYSIVCDHHSVKSLIGSKNHRNLLYSSLIQGLGGFNFLNISRLFT	960
961	RNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGTWLTLCSDP	1008
1009	YTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHEEEMLA	1056
1057	RFLLDREYVMPRVAHVILESSVLGKRKQIQGLIDTPTIIRTSLVNLP	1104
1105	VSRKKCEKIINYSNLNIAECHDSLSSQVCFSDNKEYLWSTSLISVETC	1152
1153	SVTIADYLRAVSWSNILGGRNISGVTTPTDTIELIQGCLIGENSSCTLC	1200
1201	ESHDDAFTWMHLPGPLYPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAI	1248
1249	KGMSHHLRAVLRGTSVFIWAFGDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRL	1296
1297	LTPIPSSSIQHRLDDGISTQKFTPASLARITSFVHICNDSQRLEKDG	1344
1345	SSVDSNLIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNLHLHTGHSCCPR	1392
1393	ELDISLVNPPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNQENLTLEIKTFKFN	1440
1441	ELNIDGLDFGEGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNS	1488
1489	VNWISECLMCDIRSLCVNLGQEILCSLAYQMYLRIRGRRAILNYLDT	1536
1537	TLQRPVLIQLANIALTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPVYATTDFAIA	1584
1585	SRDIILSGAREYLSYLSSGQEDCYTFFNCQDGLTPKMEQYLARRACL	1632
1633	LTLLYNTGHQIPVIRSLTPIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVN	1680
1681	ALLQNPKIDALVSNLYFTTRRVLSNLRSCDKARSYIEYLYTEDFGEKE	1728
1729	DTVQYDIMITNDIILTHGLFTQIEISYQGNLSLHKFLTPDNAPGSLIPF	1776
1777	SISPNSLACDPLHLLKSVGTSSTSWYKYAIAAYAVSEKRSARLGGSly	1824
1825	IGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLSLFSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNS	1872
1873	VVYKNLTAKSECKLGFVQQFKPLWRDIDIDETNVTDPSEINFALNEIPM	1920
1921	QSLKRVNCDVEFDRGMPRIERVIQGYTHILLVATYGLQQDSILWVKVYR	1968
1969	TSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMSTKDEEYILMSDCKEVPVNYT	2016
2017	AVPNILTRVSDLVSKNLSLHPEDLRKVRCETDSLNLKCNHIYEKIIA	2064
2065	RKIPLQVSSTDSLLQLGGVINSVGSTDPREVAATLSSIECMDYVSSI	2112
2113	DLAILEANIVISESAGLDLALMLGPFNLNKLKKIDTILKSSTYQLIPY	2160
2161	WLRYEYSINPRSLSLITKLQQCRISWSDMITISEFRKSKRPFIKR	2208
2209	VIGNQQLKSFFNESSIVLTRAEVKVCIKFLGAIKILK*	2247

Fig. 18

SEQ ID NO:14 Trình tự protein (2) của Polymeraza (L) APMV-8

```

1   MDIKQVDLII QPEVHLDSPILNKLALLWR LSGLPMPADL RQKSVVMHIP
51  DHILEKSEYR IKHRLGKIKS DITHYCQYFN INLANIDPIT HPKSLYWLSR
101 LTIASAGTFR HMKDRILCTV GSEFGHKIQD LFSLLSHKLV GNGDLFNQSL
151 SGTRLTASPL SPLCNQFVSD IKS AVTTPWS EARWSWLHIK QTMRYLIKQS
201 RTTNSAHLTE IIEEWGLVG ITPDLVILFD RVNNSLTALT FEMVLMYSDV
251 LESRDNIVLV GRLSTFLQPV VSRLEVLFDL VDSLAKILGD TIYEIIAVLE
301 SLSYGSVQLH DASHSHAGSF FSNMNELDN TLSKRVDPKH KNTIMSIIRQ
351 CFSNLDVDQA AEMLCMLRLF GHPMLTAPDA AAKVRKAMCA PKLVEHDTIL
401 QTLFFFKGII INGYRRSHSG LWPNEVPSSI YDDDLRQLYL ESAEISHHFM
451 LKNYKSLSMI EFKKSIDYDL HDDLSTFLKD RAICRPKSQW DVIFRKS LRR
501 SHTQSQYLDE IKS NRLLIDF LDSAEFDPKG EFAYVTMDY LHDNEFCASY
551 SLKEKEIKTT GRIFAKMTRN MRSCQVILES LLSKHICKFF KENGVSMEQL
601 SLTKSLLAMS QLSPKVSTLQ DTASRHVGNS KSQIATSNPS RHHSTPNQMS
651 LSNRKTVVAT FLTTDLEKYC LQWRYSTIKL FAQALNQLFG IDHGFEWIHL
701 RLMNSTLFVG DPYSPPEDPT LEDIDKAPND DIFIVSPRGG IEGLCQKMWT
751 MISISAIHCV AEKIGARVAA MVQGDNQVIA ITKELFRGEK ACDVRDELDE
801 LGQVFFDEFK RHNYAIGHNL KLNETIQSQS FFVYSKRIF EGRLLSQVLK
851 NAAKLCMVAD HLGENTVSSC SNLSSTIARL VENGFEKDTA FVLNLVYIMT
901 QILFDEHYSI VCDHHSVKSL IGSKNHRNLL YSSLIPQGLG GFNFLNISRL
951 FTRNIGDPVT CSLSDLKCFI AAGLLPPYVL KNVVLREPG GTWLTLCSDP
1001 YTLNIPYTQL PTTYLKKHTQ RSLLSRAVNP LLAGVQVPNQ HEEEEMLARF
1051 LLDREYVMPR VAHVILESSV LGKRKQIQGL IDTTPTIIRT SLVNLPSVRK
1101 KCEKIINYSL NYIAECHDSL LSQVCFSDNK EYLWSTSLIS VETCSVTIAD
1151 YLRAVSWNSI LGGRNISGVT TPDTELIQG CLIGENSSCT LCESHDDAFT
1201 WMHLPGLYI PEPSTNSKM RVPYLGSKTE ERKTASMAAI KGMSHHLRAV
1251 LRGTSVFIWA FGDTDINWDN ALQIAQSRCN ITLDQMRLLT PIPSSSNIQH
1301 RLDDGISTQK FTPASLARIT SFVHICNDSQ RLEKDGSSVD SNLIYQQIML
1351 LGLSIFETMY SMDQKWVFN HTLHLHTGHS CCPRELDISL VNPPRHQTPE
1401 LTSTTTNPFL YDQLPLNQEN LTTLEIKTFK FNELNIDGLD FGEGIQLLSR
1451 CTARLMAECI LEEGIGSSVK NEAIVNFDNS VNWISECLMC DIRSLCVNLG
1501 QEILCSLAYQ MYYLRI RRR AILNYLDTTL QRIPVIQLAN IALTISHPEI
1551 FRRIVNTGIH NQIKGPYVAT TDFIAASRDI ILSGAREYLS YLSSGQEDCY
1601 TFFNCQDGD LTPKMEQYLAR RACLLTLLYN TGHQIPVIRS LTPIEKCKVL
1651 TEYNQQIEYA DQEFSSVLKV VNALLQNP KI DALVSNLYFT TRRVLSNLR S
1701 CDKARSYIEY LYTEDFGEKE DTVQYDIMTT NDIILTHGLF TQIEISYQGN
1751 SLHKFLTPDN APGSLIPFSI SPNSLACDPL HHLLKSVGTS STSWYKYAIA
1801 YAVSEKRSAR LGGSLYIGEG SGVMTLLEY LEPSVDIFYN SLFSNGMNP P
1851 QRNYGLMPLQ FVNSVYK NL TAKSECKLGF VQQFKPLWRD IDIETNVTD P
1901 SFINFALNEI PMQSLKRVNC DVEFDRGMPI ERVIQGYTHI LLVATYGLQ Q
1951 DSILWVKVYR TSEKVFQFL SAMIMIFGYV KIHNRNGYMST KDEEYILMS D
2001 CKEPVNYTAV PNILTRVSD L VSKNLSLIHP EDLRKVCET DSLNLKCNHI
2051 YEKIARKIP LQVSSTDSLL LQLGGVINSV GSTDPREVAT LSSIECMDY V
2101 VSSIDLAILE ANIVISESAG LDLALMLGPF NLNKLKKIDT ILKSSTYQL I
2151 PYWLRYEYSI NPRSLSFLIT KLQQCRISWS DMITISEFRK KSKRPIFIK R
2201 VIGNQQLKSF FNESSIVLT RAEVKVCIKF LGAIIKLK

```

Fig 19A (1/2)

Hệ di truyền ngược APMV-8

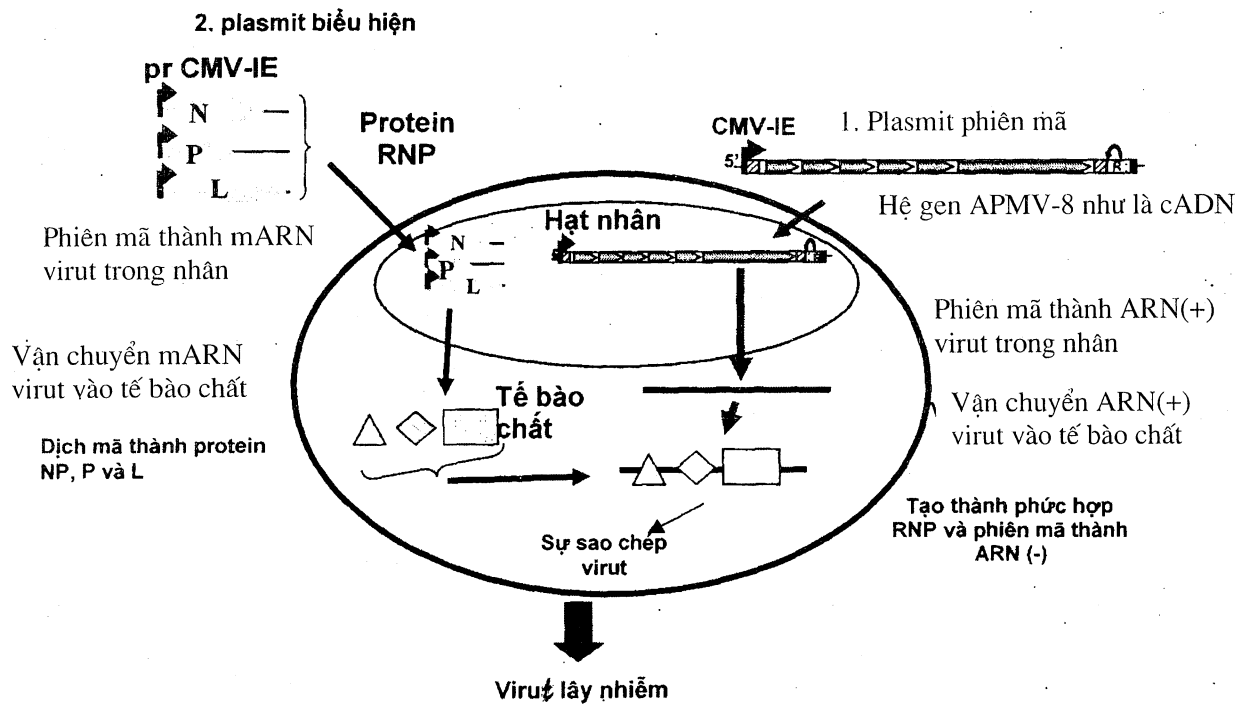


Fig. 19B (2/2)

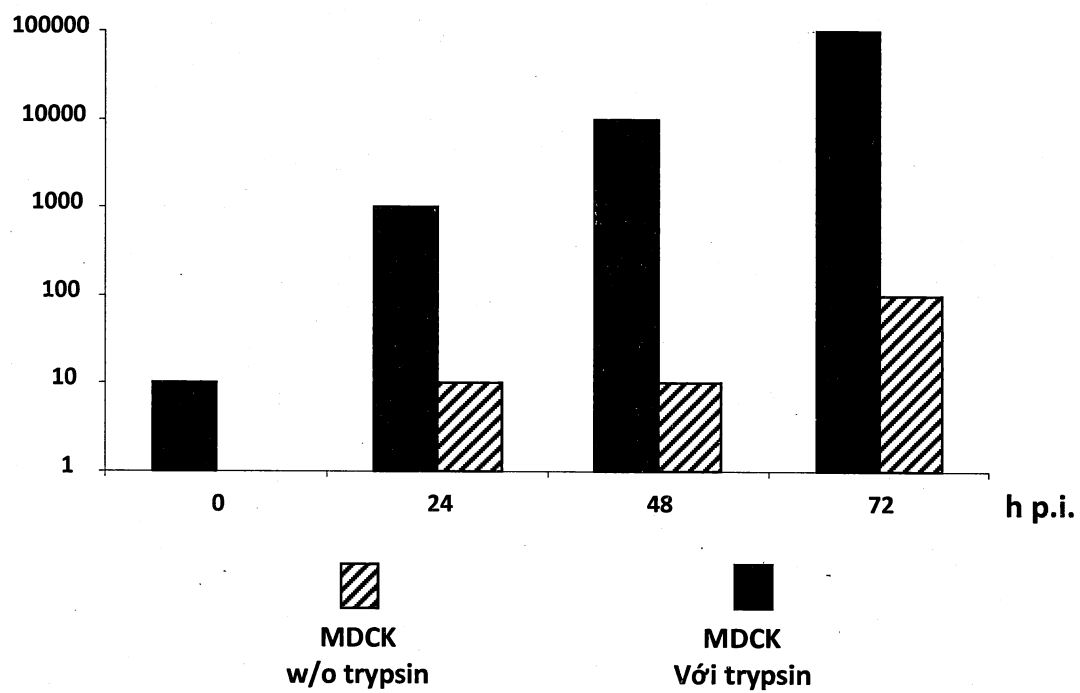
Sự sao chép ở tế bào MDCK**TCID₅₀/100ul**

Fig. 20

Gà giò công nghiệp 2 tuần sau khi chủng ngừa APMV-8

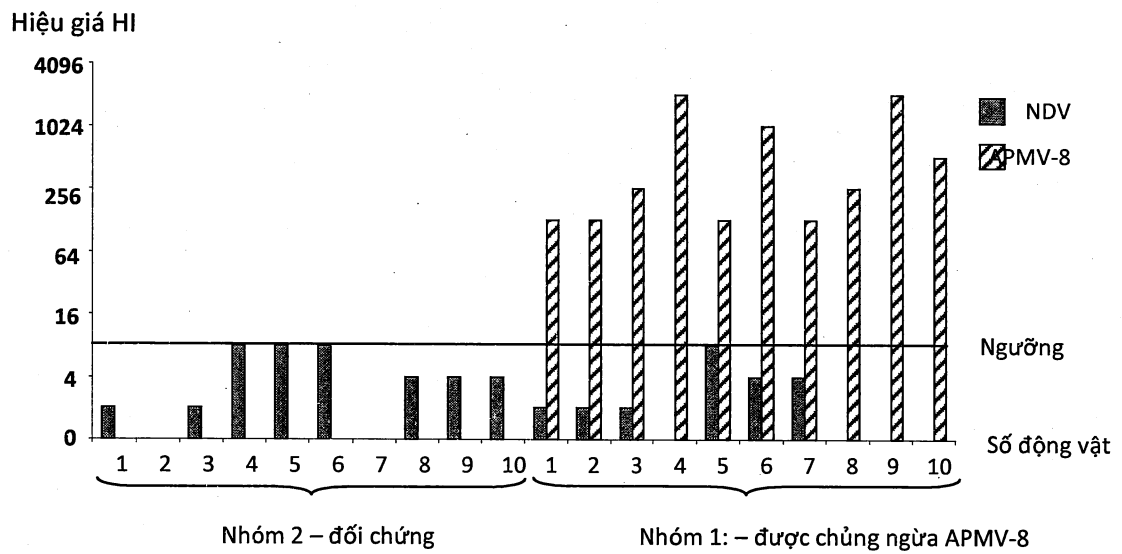


Fig. 21

Gà giò công nghiệp 4 tuần sau khi chủng ngừa APMV-8

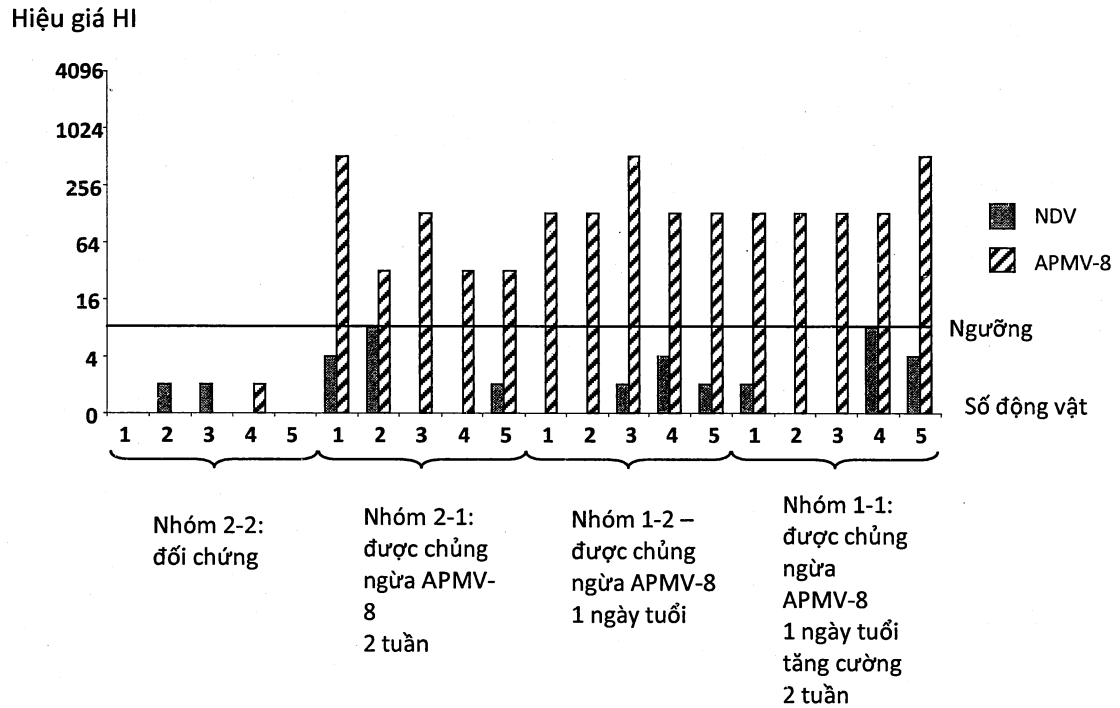


Fig. 22

Nghiên cứu 1, được chủng ngừa in ovo vào ngày 18

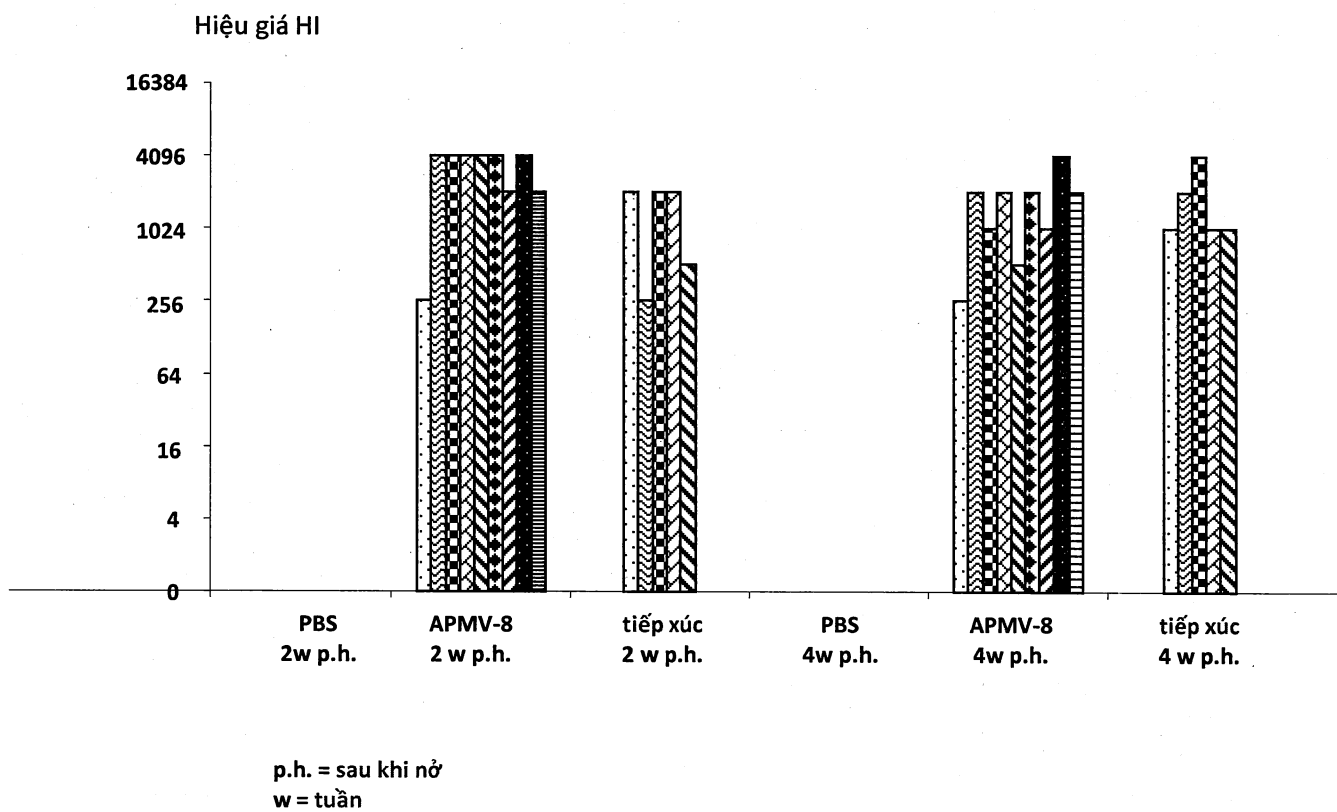


Fig. 23

Nghiên cứu 2: được chủng ngừa in ovo vào ngày 19

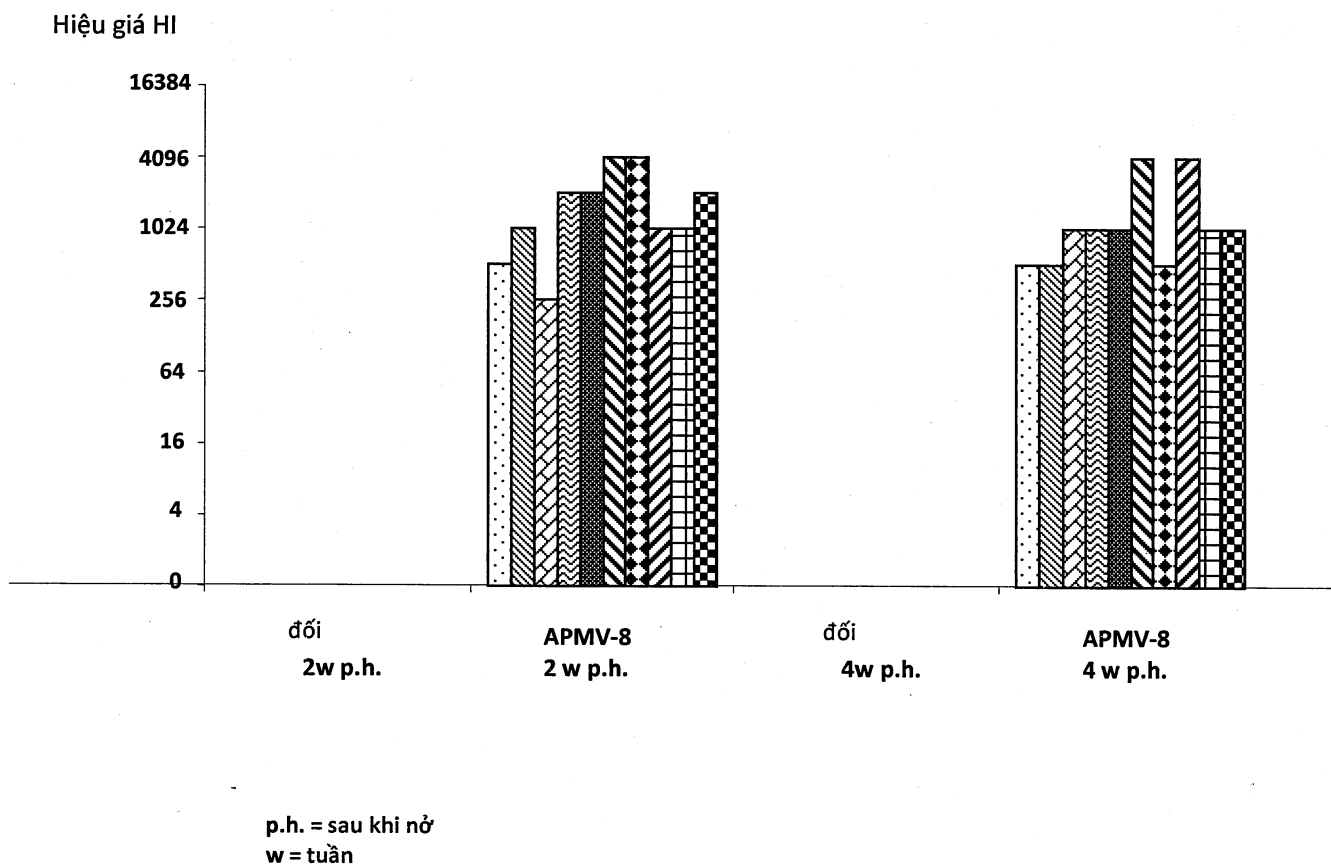


Fig. 24

Nghiên cứu 3: được chủng ngừa in ovo vào ngày 18

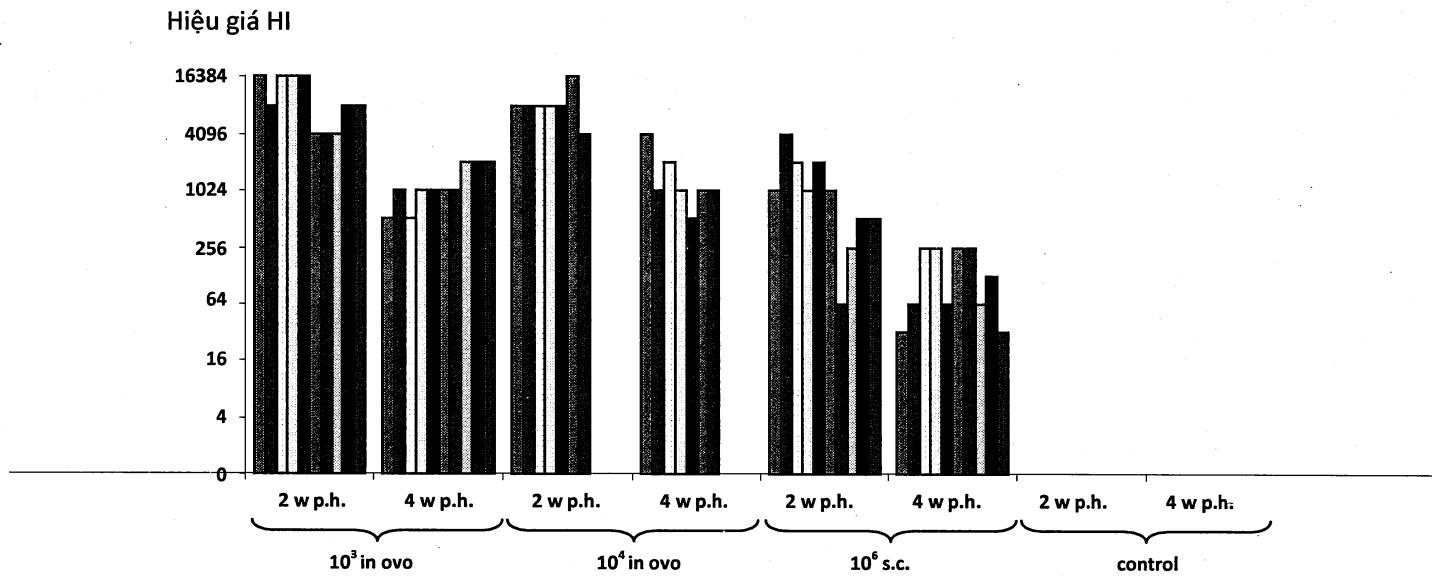


Fig. 25 (1/5)

phần 5', hệ gen (5'-FLG) chiều dài đầy đủ SEQ ID NO:47:

ggGCGGCCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
CCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT
CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATCGGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCCCGGGt
 ctgtagtgagtcggtgaggacgaaactataggaaaggaattcctatagtcACCAAAACAAGGAATGCAAGACCAACGGGAACCTTTAAATAAAACAA
 TCGAATTATTGGGGGCGAAGCAAGTGGATCTCGAGCTCGAGCGCAAAACCTGAATTTCACTGGAGGTTTTGAATAGGTCGCTATAG
 GACTCAATATGTCATCTGTGTTCAATGAGTATCAGGCGCTTCAAGAACAACTTGTGAAGCCGGCTGTGAGGAGACCTGATGTT
 GCCTCAACGGGTTTACTCAGAGCGGAAATACCTGTCTGTGTTACATTATCTCAAGACCCCGGTGAGAGATGGAGCCTTGCTTG
 CTTGAATATTAGATGGCTTGCGAGTGATTCAACACCAATGAAGCAAGGAGCAATATTGCTACTGCTGAGTCTACAT
 TCAGACAATATGCGAGCTCACGCAACATTAGCAGCAAGGTCTGCAGATGCTTCACTCACCATACTGAGGTAGATGAAGTAG
 ATATTAGCAACTCACTAATCAAATTCACGCCAGAAGTGGTGTATCTGACAAAACGCTCAAAATCAATTGCTTGCAATTGCGGA
 TGACATCCCCAAAAGTTGCAGTAATGGGCATCCATTTCTTGACACAGACATTGAGACCAGAGACCCGCTCGATCTATCAGAGA
 CTATAGATCGCTGCAGGTATTGCAGCTCAGATATGGGTGTGACAGCCCAAGCCAGCAGGAGGACTGACACCGCATGACAGCAAG
 TCAGAAAAGTAAGAGGCTGGCCAAATATCAACAACAAGGCCGACTGGTTAAGCAAGTACTCTTGCAATTCTGTAGTCAGGACAG
 AATTTATGAGAGTTATTCGGGGCAGCTTGGTACTGCGCCAGTTTATGGTTAGCGAGTGCAAGAGGGCTTCAGCCATGGGCGG
 AGACACATCTAGTACTATGCTATGGTGGGTGACATCAGTCTTTACATCAAGAATGCAGGATTGACTGCATTTTCTCACC
 TGAAGTTCCGAGTTGGTACCCAGTATCCAACCTTAGCAATGAGTGTCTTCCAGTGACCTTAAAGGCTTGCTGCACTCATC
 AGGCTATACAAAACCAAGGGAGACAATGCACCATACATGGCATTCTGGAGGACTCCGATATGGGAAATTTTGCTCCAGCAA
 ATTATAGCACAATGTACTCTTATGCCATGGGCATTGGGACAATTCTGGAAGCATCTGTATCTCGATACCAGTATGCCAGAGA
 CTTTACCAGTGAGAATTATTTCCGTCTTGAGTTGAGACAGCCCAAGCCAGCAGGAGGACTTGAAGTCAAGTCAAGCAAGA
 GAAATGGGCTTGACTGAGGAATCAAAACAGCAGGTTAGATCACTGCTAATGTGAGTAGACATGGGTCCAGTTCAATTCTATG
 AGCCATCTCGCCCTGCATTTATCAGTCAAGAAGAAAATAGGCAGCCTGCCAGAATTGTGAGATACTCAGGGTCAGACCAAG
 CCAGTCCCGAAGCAGCCCGCACCAAGGGCCGACTCAGATGACATTGATCCATACGAGAACGGGCTAGAATGGTAATTCAACCAC
 CCGACACATCCACCTATACACCAATTCGTGACATATTAACCAATCAAACATTTTCATAAACTATAGTAGTCATTGATTTAAGAAA
 AAATTGGGGGCGACCTCAATTGTGAAACATACCAGATCCGTCCACAACACCACTCAACAACCCACACACAATGGATTTCCGCAATG
 ATGAAGAAATTGCAGAACTTTTGAATCTCAGCACAATGTAATCAAGGAGATTGAGAAATCCGAATCAAGCCTCCCCAAACC
 ACCGGACGACCACTGTCTAGTCAAGGGAACACAAGAAATCTGATGATCTATGGGAAAAGGAGACTGCAAGTCAAGCAAGA
 CACCGGCCCAATCTACACAAAACACACAAGTTTCACTGCTGATGAAAATGAGGAGGGAGAAATCAAGTCCGAGTCAACTGATGGC
 CACATCAGAGGAACTGTTAATCAATCAGAGCAAGTCCCAGAACAAAACAGAGCAGATCTTACCAGGTGATGATCTCGACAG
 AGCTCTCAACAAGCTTGAAGGGAGAATCAATTTAATCAGTCAATGGACAAAAGAAATTAAGGAGGGCCCTCGCATCCAGAAT
 CTCCCTGGGTCCCAGGCGGCAACTCAACAGGCGACCCACCCATTGGCAGGGGACACCCGAAATGCAAGCAGACAAAAGCC
 CTGGCGAAGCCACATCAAGAGGCAATCAATCTGGCAACCAGGACAGGAGAGAGTATTCATTTACCACCTTCCATGGCACC
 ACCAGAGTCATTAGTTGGTGAATCCGCAATGCACCCCAATTCGTGCCAGACCAATCTATGACGAATGTAGATGCGGGGAGTG
 TCCAATACATGCATCATGTGCAGAGATGATAAGTAGAATGTTTGTAGAAGTTATATCCAAGCTTGATAAACTCGAGTCGAG
 ACTGAATGATATAGCAAAAGTTGTGAACACTACCCCTTATTAGGAATGATATTAACCAACTTAAGGCCACAACCGCACTGA
 TGTCTAACCAAAATTGCCTCCATACAAATTTTGACCCAGGGAATGCAGGGGTGAGGTCCCTCTCTGAAATGAAATCTGTGACG
 AAGAAAGCTGCTGTTGTAATTGCAGGGTTTGGAGACGACCAACTCAAATTATTGAAGAAGGCATTATGGCCAAAGATGCTC
 TTGGAAAACCTGTGCCTCCAACATCTGTTATCTCAGCCAAAGCTCAGACTTCTTCCGGTGTGAGTAAGGGTGAAATAGAAGG
 ATTGATTGCATTGGTGGAAACATTAGTTGACAATGACAAGAAGGCAGCAAACTGATTAATAATGATTGATCAAGTTAAATC
 CCATGCCGATTACGCCGAGTCAAGCAGGCAATATATAATGCGTAATACTGTAACACAAACAATCAATACTGCTGTCGGTTG
 CACCCACCTCAGCAAAATCAATAATCTTTTAGAATTTATTGATTAAAGAAAAATTTGACTACTATAAGAAAAAGAACCAAGTTGGGG
 GCGAAGACAGGATTGACCACAGTCGCTATCTGTAAGGCTCTCACCACAAAATGGCATATACAACATTGAACTGTGGGTGGATGA
 GGGTGACATGTCGTCTTCGCTCCTATCATTTCCGTTGGTACTAAAAGAGACAGACAGAGGCACAAAGGAGCTTCAACCACAGG
 TAAGGGTAGATTCAATTGGCGATGTGCAAGCGCAAGAGTCTCGATATTCTGACTCTATATGGTTTCATCCAAGCAAT
 TAAGGAGAGTTGAGATCGATCGAAATTTCTCCATCCAAAAGATGACTTCAAACCTGAGACAGTCACTGCAGGACTGGTAGTG
 GTAGGTGCGATCCGAATGATGGCTGATGTTAATACCATCTTAATGACGCACTAGCGCTGGAGATCACTGTTAAGAAATCTG
 CAACTTCTCAAGAGAAAAATGACGGTGATGTTCCACAATAGCCCCCTTCAATTGAGAACTGCAATAACTATCCGAGCAGGAGGT
 TTTACTCTCGAATGCAGACGAGAATATAAAATGTGCCAGCAAAATGACTGCAGGAGTGCAATGATATTCCGCCCAATGTTTG
 TTTCAATCACTAAATTACACAATGGCAAACTATATAGGGTGCCCAAAAGCATCCACAGCATCTCATCCACTCTACTGTATAGT
 GTGATGTTGGAGGTAGGATTCAAAGTGGATATTGGGAAGGATCATCCCCAGGCAAGATGCTGAAG

Fig. 25 (2/5)

AAGGTCACAATCGGCGATGCAGACACATACTGGGGGTTTGCATGGTTCCACCTGTGCAATTTCAAAAAGACATCCTCTAAGG
 GAAAGCCAAGAACGCTAGACGAACTAAAGACAAAAGTCAAAAATATGGGGTTGAAATTGGAGTTACATGACCTGTGGGGTCC
 GACTATTGTGGTCCAAATCACTGGCAAGAGCAGCAAAATATGCTCAAGGATTTTTTCTCCAATGGTACTTGTGTCTCCCAA
 TCAGCAGATCTGCACCAGAGCTTGGGAAGCTTCTGTGGTCTTGTTCAGCAACTATAGGTGACGCAACAGTTGTTATCCAATCA
 AGCGAGAAAGGGGAACCTCTAAGGTCTGATGACCTCGAGATACGAGGTGCTGTGGCCTCCAAGAAAGGTAGACTGGGCTCAT
 TTCACCCCTTCAAAAATGATGCAGGACATAGTACAGAGAATTAGAGAGCCATTAGATGTGCGCAAAAAACATAATCTGCGATGA
 ACTGCCCAGACTCCACTTTAATCTAGGTTGCAGGGAAATAGTACACGACATGCGAAATACTATCACGGTCACCAGCAATCAATAAAG
 CTGATCAATCACTATATTAGGAATCAAATAGGATAACAATTATTAATCCAATTTCTTAATTATAAAAAATTGCTTTAAAGGTTATT
 GACGAGTCGGGGGCGAAATCTTGCCACTTAGTCTGCAGTCAATCTTAGAATCTACATATTGAACTATGGGTCAAATATCAGTATA
 TCTAATTAATAGCGTGCTATTATTGCTGGTATATCCTGTGAATTCGATTGACAATACACTCATTGCCCAATCGGAGTTGCC
 AGCGCAAATGAATGGCAGCTTGTGTCATATACAACATCACTTTAGGGGACAATTGCCGTGCGATTCTACCTGTGCTCCCGGA
 TAATATGACTACCTGTCTTAAAGAAACAATCACTACATACAATAATACTGTCAACAACATCTTAGGCCCACTCAAATCCAATC
 TGGATGCACTGCTCTCATCTGAGACTTATCCCCAGACAAGATTAATTTGGGGCAGTTATAGGTTCAATTGCTCTCGGTGTTGC
 AACATCGGCTCAAATCACTGCTGCAGTTGCTCTCAAGCAAGCGCAAGACAATGCAAGGAACATACTAGCACTCAAAGAAGCAC
 TGTCCAAAACCAATGAGGCGGTCAAGGAGCTTAGTAGTGGGTTACAACAACAGCTATTGCACTTGGTAAGATACAGAGTTT
 TGTGAATGAGGAAATTTCTGCCATCTATCAACCAACTGAGCTGCGAGGTGACAGCCAATAAACTTGGGGTGTATTTATCTCTG
 TATCTCACAGAACTGACCACCATATTCGGTGCACAGCTGACCAACCCTGCATTGACTTCATTATCATATCAAGCACTGTACAA
 CCTGTGTGGTGGCAACATGGCAATGCTTACTCAGAAGATTGGAATTAACAGCAAGACGTTAATTGCTATATGAAGCCGGA
 CTAATCACAGGACAAGTCATTGGTTATGACTCTCATTACCAGCTGCTGGTCATCCAGGTCAATTATCCAAGCATTTCTGAGGT
 CACTGGTGTACGTGCGACAGAATTAGTCACTGTTAGTGTAAACAACAGACAAGGGTGAAGGGGAAAGCAATTGTACCCCAATTT
 GTAGCTGAAAGTCGGGTGACTATTGAAGAGCTTGATGTGCGATCTTGTAATTCAGCAGCAGACCCCTATATTGCAGGCAGG
 TCAACACAAGGGCACTTCCCCGCTAGTAGCTAGCTGTCTTCGAGGTAACATATGATGCCGCGG

Các vị trí phân cắt enzym giới hạn: chữ hoa, được in đậm và gạch chân

Gen khởi đầu sớm ngay lập tức của virus cự bào ở người: chữ hoa, in đậm, chữ nghiêng

Trình tự ribozym dạng đầu búa: chữ thường

Khung đọc mở cho protein virus: chữ hoa, in đậm

Trình tự không mã hóa: chữ hoa

Not I: GCGGCCGC

Bmt I: GCTAGC

Sac II: CCGCGG

phần 3', hệ gen (3'-FLG) chiều dài đầy đủ SEQ ID NO:48:

GCGGCCGCCAGGTCAACACAAGGGCACTTCCCCGCTAGTAGCTAGCTGTCTTCGAGGTAACATATGATGATTGTCAATATACC
 ACAGAGATTGGAGCATTATCATCCCGGTATATAACACTAGATGGGGGGGTCTTAGTTAATTGCAAGTCAATTGTTTGTAGGT
 GCCTTAATCCAAGTAAGATCATCTCTCAAAATACAAACGCTGCAGTAACATATGTTGATGCCACAATCTGCAAAACAATTCAA
 TTGGATGATATACAACTCCAGCTGGAAGGGTCACTATCATCAGTTTATGCAAGAAACATCTCAATTGAGATCAGTCAGGTGA
 CCACATCCGGGTCTTTAGATATCAGCAGTGAGATAGGAAACATCAATAATACGGTGAATCGTGTGGAGGATTTAATTACCA
 ATCAGAGGAATGGCTGGCAAGGTTAACCACACATTGTTAATAATACAACACTAATTGTAATCTGTGTGTTAAGTGGCCTT
 GCTGTGATCTGGCTGGCAGTATTAACGGCTATTATAATATACTTGAGAACAAGTTGAAGACTATATCGGCATTAGCTGTAA
 CCAATACAATACAGTCTAACCCCTATGTTAACCACAAACGAAACATGAATCTAAGTTTTGATCATTCAAGCCAAAACAGAGGATCT
 AGGCTCAGGTTAATAATAGTTCAATCAATATTTGATTTATTAGGTTTTTTTCACTAATTATTAATATACTCGTGATTAGATGATAA
 CGTTAAAGTCTTAGATATTTAATAAAAAATGTAACCTGGGGGCGACCCATTATAGGTGAGTATATATTAGGAAGTCCTTATATT
 GCACTGTGATTTCAACAATTTATATTACCTCATATCTACCTTGCTCTAAAGACATCATGAGTAACATTGCATCCAGTTTAGAAAAC
 ATTGTAGAGCAGGATAGTCGAAAAACAACCTTGGAGGGCCATCTTTAGATGGTCCGTTCTTATTACAACAGGATGCTTAG
 CCTTATCCATTGTTAGCATAGTTCAAATTTGAAATTTGAAAAATTCCTTCTGTAGGGGATCTGGCTGATGAAGTGGTGACACC
 CTTGAAAACCACTCTGTGAGATACACTCAGGAATCCAATTAACCAGATAAATGATATATTTAGGATTGTTGCCCTTGATATT
 CCATTGCAAGTGACCAGTATCCAAAAAGACCTTGCAAGTCAATTTAACATGTTGATAGATAGTTTAAATGCTATCAAATTAG
 GCAACGGGACCAACCTTATCATACCTACATCAGACAAGGAGTATGCAGGAGGAATTGGAAACCTGTATTTACTGTGATGC
 TGGAGGTTCTATAGGATTCAAACAGTTTATGCTTAAATAGAACATCCGAGCTTTATGCTGGACCTACAACGACCCGAGGCTGT
 ACAAGAATACCCACTTTTACATGTCAGAAAGTCAATTGGTGCTACTCACACAACATCATCGCTGCTGGCTGTCAAGATGCCAG
 TGCATCCAGTATGTATATCTCAATGGGAGTTCTCCATGTCTCATCTGGCACTCCCATTTTTCTTACTACTGCAAGTGAGC
 TGATAGACGATGGAGTTAACCCTAAGTCATGCAGCATTGTAGCAACCCAATTTGGCTGTGACATTTTGTGCAGTATTGTAC
 AG

Fig. 25 (3/5)

AGAAGGAGGGAGATGATTACTGGTCTGATACTCCGACTCCAATGCGCCACGGCCGTTTTTCATTCAATGGTAGTTTTGTAGA
 AGCCGAACCTACCAGTGTCCAGTATGTTCTCATCATTCTCTGCCAACTACCCTGCTGTGGGATCAGGCGAAATTGTAAGATA
 GAATATTATTCCCAATTTACGGAGGTATAAAGCAGACTTCACCAGAGTTTACCGAATTAGTGAAATACGGACTCTTTGTATC
 AACACCTACAACCTGTGTGCCAGAGTAGCTGGACTTATGACCAGGTAAAAGCTGCGTATAGGCCAGATTACATATCAGGCCGG
 TTCTGGGCACAAGTGATACTCAGCTGCGCTCTTGATGCACTGACTTATCAAGTTGTATTGTAAGATTATGAATAGCAGCA
 CAGTGATGATGGCAGCGGAAGGAAGGATAATGAAGATAGGGATTGATTACTTTTACTATCAGCGGTCTCTCTTGGTGGCC
 ATTGGCATTGTGCACAAAACCTAGACCCGCAAGAGTTGGCAGACACAACTCAATATGGCTGACCAATCCATACCAATCCCGC
 AATCAAAGTTCCCTCGGCCCTCATATTAGAAAATTATGACAAAAGCCAGCAGTTTGGCCTGTTACTTGGTGTCTAGTGGTGTG
 TACTCTGATATTTGGCCCTGACCTCATCTTCATCACTCCCGAGCATAATTTGGATCGGCCAGTACCTTGATGCTCCTGTTGG
 AAGGACTTATCCTAGATTTGGAATTGCAAACTCAGTCACACTGGTACCTCCAAGAAGATATTCTACCCACTTCCACCGCAAGTG
 CGTATTCAACCACTACATGTTTTAAGAATACTGCCAGGAATAGAGTGTCTGCGTCACCATTGCCGAATTTGCAGATGGGT
 GTTTGGAGAGTACAGGATAACACCTCAGTTGTACGAATTAGTGAGAAAATAATTGAATAACAATAATTTGGGACTCATTTTGT
 CGCAAAGTGAAATTGTCATCTTTAAAAATAATCAATTCGATGATTTTTATTGAACATGATTAAGCAATCATGTGGGAAATTTATTA
 TCTCATAAATCTAATAGTTGTAAATGATGAATTAAGAAAAATGGAGGGCGACCTCTACACAAACATGGATATAAAACAAGTT
 GACCTGATAATACAACCCGAGGTTTCTCGATTCAACCATCATATTTGAATAAACTGGCAGTATTATGGCGCTTGAGTGGTTT
 ACCCATGCTGCAGACCTACGACAAAATCCGTAGTGATGCACATCCCGGACCACATCTTAGAAAAATCAGAATATCGGATCA
 AGCACCGTCTAGGGAAAATCAAGAGTGACATAACACATTACTGTGAGTATTTAATATTAATTTGGCAAATATTGATCCGAT
 AACCCACCCAAAAGTTTGTATTGGTTATCCAGACTAACAAATAGCTAGTGCTGGAACCTTTTAGGCATATGAAAGATAGAATC
 TTGTGTACAGTTGGCTCTGAATTTGGACACAAAATCAAGATTTATTTTCACTGCTGAGCCATAAACTAGTAGGTAACGGGG
 ATTTATTTAATCAAAGTCTCTCAGGTACACGTTTGACTGCAAGTCCGTTATCCCCTTTATGCAATCAATTTGTCTCTGACATC
 AAGTCTGCAGTCACGACACCTGGTCAGAAGCTCGTTGGTCTTGGCTTCATATCAACAAACAATGAGATATCTGATAAAAC
 AATCAGCCTACAAAATTCGGCTCATTTAACGAAAAATCAAAAAGAAGAAATGGGGTTTAGTAGGTATTACTCCAGATCTTGT
 CATTCTTTTGGACAGAGTCAATAATAGTCTGACTGCATTAACATTTGAGATGGTTCTAATGTATTAGATGTATTAGAATCC
 CGTGACAATATTGTGTTAGTGGGGCGACTATCTACCTTTCTACAGCCAGTAGTTAGTAGACTGGAGGTGTTGTTTGTCTAG
 TAGATTCAATTGGCAAAAATCTTAGGTGACACAATATATGAGATTATTGCAAGTGTAGAGAGCTTGTCTTATGGGTGAGTTCA
 ACTACATGATGCAAGTCACTCTCATGCAGGGTCTTTTCTTCAATTAACATGAATGAACCTTGATAACACACTATCAAGAGG
 GTAGATCCGAAACACAAGAACACTATAATGAGCATTATAAGACAATGCTTTTCTAATCTAGATGTTGATCAAGCTGCAGAGA
 TGCTATGCCCTGATGAGATTATTCCGACACCCAATGTTAACTGCACCGGATGCAGCAGCCAAAGTGAGGAAAGCAATGTGTGC
 TCCAAAACCTTGTGAACACGACACCATCTTGCAGACATATCTTTCTTCAAGGGGATAATTATAAATGGGTACAGAAGATCA
 CACTCTGGCCTGTGGCCCAATGTAGAGCCGTCTTCAATTTATGATGATGATCTCAGACAGCTGTACTTAGAGTCAGCAGAGAT
 TTCCCATCATTTTATGCTTAAAACTACAAGAGTTTAAAGCATGATAGAATTCAGAAGAGCATAGACTACGATCTTCATGAT
 GACCTAAGTACTTTCTTAAAGGATAGAGCAATTTGCCGCGCGAAATCCCAAGTGGGATGTCATATTTCGTAAGTCTTTACGCA
 GATCTCATACGCAGTCCAGTATCTGGACGAAATTAAGAGCAACCGATTGCTAATTTGATTTTCTTGATTCTGCTGAATTTGA
 CCCTGGAAAAGAATTTGCATATGTAACCACAATGGATTATTTGCACGATAATGAATTTTGTGCTTCATATTCTTAAAGGAA
 AAGGAGATCAAACTACTGGGAGGATATTGCAAAAATGACACGCAATATGAGAAGTTGCCAAGTAATACTTGAATCTTTGT
 TATCAAAGCATATATGCAAGTTCTTCAAAGAGAAATGGCGTTTCGATGGAGCAATTGTCATTGACCAAGTCTACTTGGCAAT
 GTCTCAACTCTACCAAAAAGTCTCGACTTTGCAGGACACTGCATCACGTGATGAGTAACTCAAAATCTCAGATTGCAACCA
 GCAACCCATCTCGGCATCACTCGACACCCAATCAGATGTCACTCTCAAATCGAAAAACGGTTGTAGCAACTTTCTTAACT
 GACTTGGAAAAATCTGCTGCACTGGCGATATTCAACTATTAAATTTGTTTGCACAAGCTCTAAATCAACTCTTTGGGATTG
 ATCAGGATTTGAATGGATACATTTAAGACTTATGAACAGCACCTTATTTGTTGGCGATCCTTACTCGCCTCCTGAAGATCCA
 AACTAGAGATATAGATAAAGCACCAATGATGATATCTTCATAGTTTCTCCAAGGGGAGGCATAGAGGGTTTATGTCAGA
 AAATGTGGACCATGATATCAATTAGTGCTATACACTGTGTAGCAGAGAAAATTTGGTGCAGAGTGGCAGCAATGGTGCAGGG
 TGATAATCAAGTAATAGCTATCACCAAAAGAATTATTAGAGGAGAGAAAAGCTTGTGATGTGAGAGATGAGTTAGACGAGCT
 TGGTCAAGTGTTTTTTGTGATGAGTTCAAGAGACACAATTATGCAATTGGACACAATCTTAAGCTAAATGAGACAATACAAAGC
 CAATCCTTTTTTGTATATTCCAAACGAATATTCTTTGAAGGGCGATTGCTTAGTCAAGTCTCAAAAATGCTGCCAAGTTAT
 GTATGGTTGCTGACCATCTAGGTGAAAAACACTGTATCTTCTGTAGCAACCTGAGCTCGACAATTGCCCGCTTAGTGGAAAAT
 GGGTTTGAGAAGGACACTGCTTTTGTGTTGAACCTAGTCTACATCATGACTCAGATTCTTTTTGTGAGCATTACTCGATTG
 TATGCGATCACCATAGTGTCAAAAGCTTGATTGGATCAAAAACCATCGGAATTTATTGTATTCTCTAATACCAGGTCA
 GCTCGGCGGTTTTCAACTTCCCTCAATATAAGTCGGTTGTTCACTAGGAATATAGGTGACCCAGTAACATGTAGTCTGTCTGAT
 CTCAAATGCTTCATAGCCGAGGTCTCCTTCCACCCTATGTCCTAAAAAATGTGGTTCTGCGTGAGCCTGGTCTGGGACATG
 GTTGACGTTGTGCTCTGATCCTTACACCCTTAACATACCATACACACAGCTTCCAACCACATATCTCAAAAAGCACACCCAGCG
 ATCATTGCTTTACAGTGCAGTAAATCCTTTATTAGCCGGTGACAAGTGCCAAATCAGCATGAGGAAGAAGAGATGTTGGCT
 CGCTTTCTCCTTGATCGTGAATATGTGATGCCCGCGTTGCTCATGTAATACTAGAAATCATCAGTCTTGGCAAACGGAAACA
 AATCAAAGGCTTAATTGATACAACCTCAACCATCATTAGAACATCTCTAGTTAATCTGCCAGTGTCTAGAAAAGAAATGCGAA
 AAAATAATCAATTACTCTCTCAATTATATTGCTGAGTGTGATGACTCTTACTTAGCCAGGTCTGCTTCACTGATAATAAGG
 AATACTTGTGGTCAACCTCTTAATATCAGTTGAGACTGTAGTGTGACAATTGCGGACTATCTGAGAGCTGTGAGCTGGTCT
 TAATATATTAGGGGGAAGAAAATATCCGGGGTGACTACACTGAT

Fig. 25 (4/5)

ACTATTGAATTAATTCAAGGTTGTTAATAGGTGAAAAATTCTAGTTGTACTCTTTGTGAATCGCATGATGACGCATTACGTT
GGATGCACTTGCCTGGCCCACTTTACATCCCTGAACCATCAGTTACTAACTCTAAAAATGCGTGTGCCATATCTGGGTTCAAAA
ACAGAGGAGCGGAAAAACAGCCTCAATGGCAGCAATAAAAGGAATGTCACATCACCTGCGTGCAGTCTTAAGAGGCACATCCG
TATTTATTTGGGCATTTGGGGATACAGATATCAATTGGGATAATGCATTGCAGATTGCCAATCACGGTGTAAACATCACATT
GGATCAAATGAGATTACTTACACCAATTCTAGCAGTTCAAATATTCAACATAGACTCGATGACGGAATCAGCACGCAGAAA
TTTACTCCTGCAAGCCTTGCTCGAATCACATCCTTCGTTACATCTGTAATGACAGCCAGAGGTTAGAGAAGGATGGCTCATC
TGTGCACTCAAACCTTGATTTACCAGCAAATTATGTTACTTGGACTCAGCATCTTTGAAACAATGTACTCAATGGACCAAAAAG
TGGGTATTCAATAACCATACCTTGCAATTGCAACACTGGAACACCGGTTCTATATGATCAGCTCCCATTAATCAAGAAAAC
GCCGAGACATCAGACCCCGAGCTGACTAGCACAAACCAACCGTTCTATATGATCAGCTCCCATTAATCAAGAAAAC
TGACAACACTTGAGATTAAGACATTTAAATTCAATGAGCTCAACATTGATGGTTTAGATTTTGGTGAAGGAATACAATTAT
TGAGTCGTTGTACTGCAAGATTAATGGCAGAATGTATTCTAGAGGAGGGAATAGGCTCGTCAGTTAAAAATGAAGCAATTG
TCAATTTTGTATAATTGAGTCAATTGGATTTAGAGTGCCTAATGTGTGATATTGCTCACTTTGTGTTAATTTAGGTCAAGA
GATACTATGTAGCCTGGCATACCAATGTATTACTTGCGAATCAGGGGTAGACGGGCCATTCTTAATTACTTGGACACAACT
TTGCAAAGGATCCCTGTGATACAATTAGCCAACATTGCACTCACCATTTCGCACCTGAGATATTTCCGAGAATTGTCAACAC
CGGGATCCATAACAGATTAAAGGGCCATATGTGGCAACGACCGGATTTTATAGCTGCAAGTAGAGATATCATATTATCAGGT
GCAAGGGAGTATCTATCTTATTTAAGCAGTGGGCAGGAAGACTGTTACACATTCTTCAACTGTCAAGATGGGGATCTTACTC
CAAAAATGGAACAGTATCTTGCAAGGAGGGCATGCCTTTTAAACATTATTGTATAATACTGGGCACCAGATCCCCGTTATCCG
ATCACTGACGCCAATAGAGAAGTGCAAGGTGCTCACAGAATACAATCAACAAATTGAGTACGCAGATCAAGAGTTTAGCTCT
GTACTAAAAGTGGTCAATGCACTACTACAAAATCCTAAGATAGATGCATTAGTTTCAAATCTCTACTTCACCACCAGACGTG
TTCTATCAAACCTCAGATCATGTGATAAGGCTAGATCATATATTGAATATTTGTACACTGAGGACTTCGGAGAGAAAAGAGGA
TACAGTACAATATGACATCATGACAACAAACGATATCATACTTACTCATGGTCTATTACACAGATCGAAATATCTTATCAA
GGGAATAGTCTCCATAAGTTCTTACTCCGGATAACCGCGCTGGATCTTTGATCCCATTTCTTATTTACCAAATTCACCTTGC
ATGTGACCTCTTCATCACTTGTCTCAAGTCGGTACATCAAGCACAAGTTGGTACAAGTATGCAATCGCCTATGCAGTGT
CTGAAAAGAGGTGAGTCTGATTAGGAGGGAGCTTGTACATTGGTGAAGGGAGCGGAAGTGTGATGACTTTACTCGAGTATCT
TGAGCCATCTGTTGACATATTTTACAATTCACTCTTCTCAAATGGTATGAACCCACCACAACGAAATTATGGGCTTATGCCAC
TACAATTTGTGAATTTCGGTGGTTTATAAGAACTTAACCGCTAAATCAGAATGTAAGCTAGGGTTTGTCCAGCAATTTAAACC
GTTGTGGAGAGACATAGACATTGAGACTAATGTTACAGATCCATCATTTATCAATTTTGCATTGAATGAAATCCCAATGCAA
TCATTAACACGAGTAAATTTGTGATGTGGAATTTGACCGTGGTATGCCGATTGAACGGGTATTTCAGGGTTACACCCATATCT
TACTTGTGGCACTTACGGATTACAGCAAGATTCAATACCTGTGGGTGAAGGTATATAGGACATCTGAAAAAGTATTTCAATT
CTTACTGAGTGCCATGATCATGATCTTTGGTTATGTAAAAATCCACAGGAATGGTTATATGTCGACAAAGGATGAAGAGTAC
ATATTGATGTCTGACTGCAAGGAACCTGTAACTATACAGCTGTCCCTAACATTCTTACACGTGTAAGTGATTTAGTGTGCA
AGAATCTGAGTCTTATCCATCCAGAAGACCTCAGAAAAAGTAAGGTGTGAAACAGATTCCCTGAATTTGAAGTGCAATCATAT
TTATGAGAAAAATAATTGCCAGAAAAATTCATTACAGGTATCATCAACTGACTCTTTGCTCCTCAATTAGGCGGTGTATC
AACTCGGTGGGCTCAACTGATCCTAGAGAGGTTGCAACATTATCTTCTATTGAGTGTATGGACTATGTTGTCTCATCAATTG
ATTTGGCTATTTGGAGGCAAAATATTGTAATCTCAGAGAGTGTGGTCTTGACCTCGCTTTAATGTTAGGCCCATTTCAACTT
AAATAAGCTTAAAGAAATTGACACAATCCTTAAAGTCAAGCACCTATCAGCTAATCCCGTACTGGTTGCGCTATGAGTACTCT
ATTAATCCGAGATCTTTGTCAATTTCTAATCACTAAATTACAACAATGCCGAATTTTATGGTGCAGATATGATCAGATTCTG
AATTTCTGTAAGAAATCCAAGCGGCCTATATTTATCAAACGAGTAATAGGGAATCAACAGCTAAAATCATTCTTTAATGAAAG
CTCAAGTATTGTTTGTACTCGGGCTGAAGTTAAAGTCTGTATAAAGTTCTCGGTGCAATCATCAAGTTGAAATAATTTCTG
CGATTTTAAAGGGGTGAATGTTCTAATTTGCACTTGAAGTAATATAGCTTGTAATCATTCGCTAGGGGATAGGATAATTTCTCTA
ACCTCTGAATCTATATCTAGAGTATAACAAATATATACATAATAAAAAATGATTTTAAAGAAAAATCCGACACTCAAAGAAAAAT
GGTGCCTGTAATATTTCTTCTGCAAAATGATTGTGAAGTGTCTAGCCTAACTTAAACAATCGTATTCGATAGGGAAGAATGATAT
ATAAAATAACTAATAAAAAATTTGATTAGTAAAAATTACCGTATTTCCTGTATTCCATTCTGGTgggtcgcatggcatctccacctctgc
ggtcgacctgggcatcggaaggagacgcagtcctcgatggctaaggaggggcgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtggcagccatctgtg
tttccccctccccgtgccttcttgaccctggaagggtccactcccactgtccttctctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctg
gggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgCCGCGG

Các vị trí phân cắt enzym giới hạn: chữ hoa, được in đậm và gạch chân

Gen khởi đầu sớm ngay lập tức virus cự bào ở người : chữ hoa, in đậm, chữ nghiêng

Trình tự ribozym delta bệnh viêm gan: chữ thường

Khung đọc mở cho protein virus: chữ hoa, in đậm

Trình tự không mã hóa: chữ hoa

Trình tự poly A hormon sinh trưởng ở bò: chữ thường, gạch chân

Not I: GCGGCCGC

Bmt I: GCTAGC

Sac II: CCGCGG

Fig 26

Plasmid mã hoá các protein là một phần của
phức hợp riboprotein của APMV-8

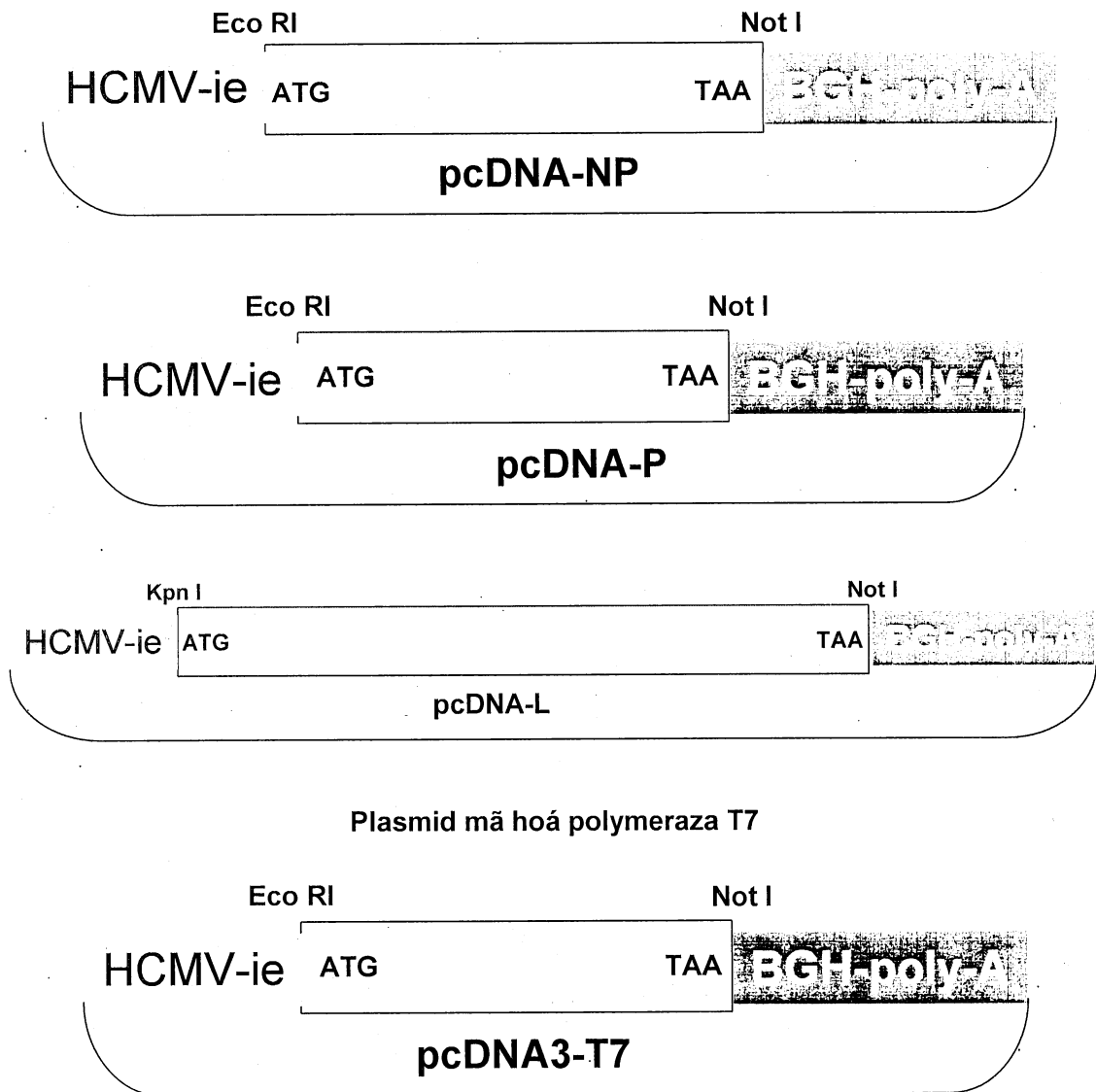
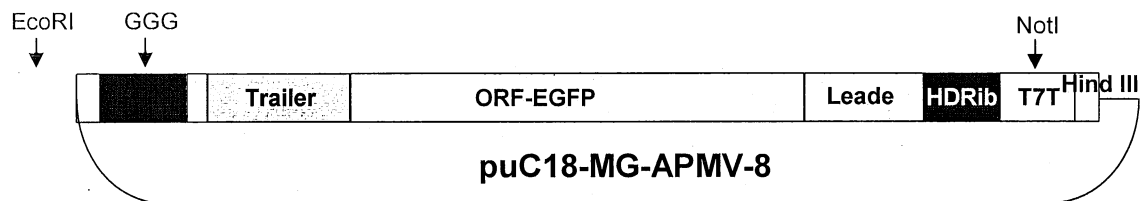


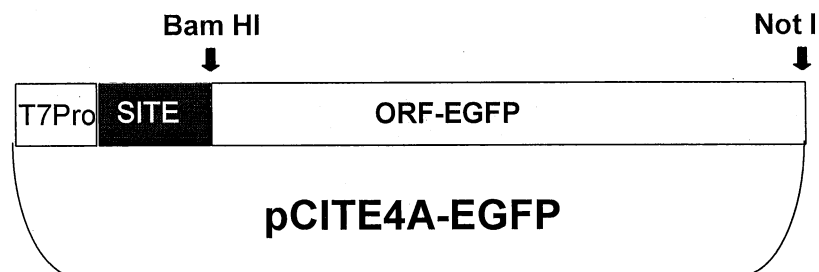
Fig 27

Plasmid chứa hệ gen mini cho APMV-8



T7Pro: Gen khởi đầu T7
 GGG: bộ ba bazơ gồm ba G
 Trailer: trình tự đầy đủ của trình tự dẫn của virus APMV-8
 Leader: trình tự đầy đủ của trình tự dẫn đầu của virus APMV-8
 ORF-EGFP: khung đọc mở của protein phát huỳnh quang xanh tăng cường
 HDRib: trình tự delta ribozym virus bệnh viêm gan
 T7T: trình tự kết thúc T7
 Các vị trí phân cắt enzym giới hạn : EcoRI, NotI, HindIII

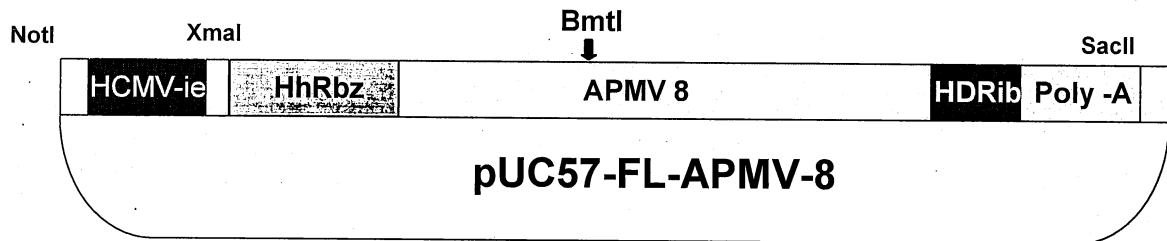
Plasmid mã hoá EGFP dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu SITE



T7Pro: gen khởi đầu T7
 Site: vị trí đầu vào ribosom nội
 ORF-EGFP: khung đọc mở của protein phát huỳnh quang xanh tăng cường
 Các vị trí phân cắt enzym giới hạn: BamHI, NotI

Fig 28

Plasmit chứa trình tự chiều dài đầy đủ của APMV-8



HCMV-ie: gen khởi đầu sớm ngay lập tức virus cự bào ở người
 APMV 8: trình tự chiều dài đầy đủ của APMV 8 trong định hướng kháng hệ gen
 HhRbz: Trình tự ribozym dạng đầu búa
 HDRib: trình tự ribozym delta virus bệnh viêm gan
 Poly A: trình tự tín hiệu polyadenyl hóa hormon sinh trưởng ở bò
 Các vị trí phân cắt enzym giới hạn: Not I, XmaI, BmtI, SacII

Fig. 29

Cấu trúc của hệ gen mini**Eco RI**

GAATTCTAATACGACTCACTATAGGGaccagaaatggaatacaggaaatcggtaatttttactaatacaatttttattagttattttatatatcattcttcctatcga
 atacgattgttttaagttaggctagacacttcacaatcatttggcaagaagaatattacaggcaccaattttcttgagtgctggatttttcttaaatcattttattatgtatatattgt
 tatactctaggaatatagattcagaggttagagaaattatccctatcccctagcgaatgattacaagctatattacttcaagtgc aaattagaacattacacccctttaaatacgagaa
 aTTACAAGCTATATTACTTCAAGTGCAAATTAGAACATTACACCCCTTTAAAATCGCAGAAATTACTTGTACAGCTCGTCCAT
 GCCGAGAGTGATCCCGGGCGGCGGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGG
 ACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCTGGGCAGCAGCACGGGGCCGTGCGCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCGCGAG
 CTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCTGGCCATGATATAGA
 CGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATG
 CGGTTACACAGGGTGTGCCCCCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTGCTCCTTGAAGAAGATGGTGCGCTC
 CTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGC
 CGTAGGTGAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCG
 TAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACCTTGTGGCCGTTTACGTGCGCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACC
 ACCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTattgagtcctatagcgacctattcaaaacctccagtgaattcaggggttcggcctcgagctcgagatcc
 acttgcctcgcccccaataattcgattgtttatttaaagttccggttggtcttgattccttgggtgggtcgcatggcatctccacctctcgcggtccgacctgggcatccga
 aggaggacgcacgtccactcggatggctaaggaggaggcgTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGGCGGCCGC

Not I

Các enzym giới hạn: chữ nghiêng và gạch chân

Gen khởi đầu T7 polymeraza: chữ hoa, được in đậm và gạch chân

Ba nucleotit G bổ sung: chữ hoa và gạch chân

Trình tự dẫn với trình tự hệ gen: chữ thường

Trình tự của khung đọc mở của protein phát huỳnh quang xanh tăng cường theo hướng đối nghĩa: chữ hoa, in đậm

Trình tự dẫn đầu với trình tự hệ gen: chữ thường và gạch chân

Trình tự ribozym delta bệnh viêm gan: chữ thường, gạch chân, và in đậm

Trình tự kết thúc T7: chữ hoa

Fig. 30

sự sắp hàng protein NP

```

1      50
SEQ ID NO:3 (NP) (1) MSSVFNEYQALQEQLVKPAVRRPDVASTGLLRAEIPVCVTLSQDPGERWS
SEQ ID NO:54 (NP) (1) MSSVFNEYQALQEQLVKPAVRRPDVASTGLLRAEIPVCVTLSQDPGERWS
SEQ ID NO:66 (NP) (1) MSSVFNEYQALQEQLVKPAVRRPDVASTGLLRAEIPVCVTLSQDPGERWS
SEQ ID NO:78 (NP) (1) MSSVFNEYQALQEQLVKPAVRRPDVASTGLLRAEIPVCVTLSQDPGERWS
51      100
SEQ ID NO:3 (NP) (51) LACLNIRWLASDSSTTPMKQGAILSLSLHSDNMRAHATLAARSADASLT
SEQ ID NO:54 (NP) (51) LACLNIRWLASDSSTTPMKQGAILSLSLHSDNMRAHATLAARSADASLT
SEQ ID NO:66 (NP) (51) LACLNIRWLASDSSTTPMKQGAILSLSLHSDNMRAHATLAARSADASLT
SEQ ID NO:78 (NP) (51) LACLNIRWLASDSSTTPMKQGAILSLSLHSDNMRAHATLAARSADASLT
101      150
SEQ ID NO:3 (NP) (101) ILEVDEVDISNSLIKFNARSGVSDKRSNQLLAIDDIPKSCSNGHPFLDT
SEQ ID NO:54 (NP) (101) ILEVDEVDISNSLIKFNARSGVSDKRSNQLLAIDDIPKSCSNGHPFLDT
SEQ ID NO:66 (NP) (101) ILEVDEVDISNSLIKFNARSGVSDKRSNQLLAIDDIPKSCSNGHPFLDT
SEQ ID NO:78 (NP) (101) ILEVDEVDISNSLIKFNARSGVSDKRSNQLLAIDDIPKSCSNGHPFLDT
151      200
SEQ ID NO:3 (NP) (151) DIETRDPLDLSETIDRLQGIAAQIWVSAIKSMTAPDTASESESKRLAKYQ
SEQ ID NO:54 (NP) (151) DIETRDPLDLSETIDRLQGIAAQIWVSAIKSMTAPDTASESESKRLAKYQ
SEQ ID NO:66 (NP) (151) DIETRDPLDLSETIDRLQGIAAQIWVSAIKSMTAPDTASESESKRLAKYQ
SEQ ID NO:78 (NP) (151) DIETRDPLDLSETIDRLQGIAAQIWVSAIKSMTAPDTASESESKRLAKYQ
201      250
SEQ ID NO:3 (NP) (201) QQGRLVKQVLLHSVVRTEFMRVIRGSLVLRQFMVSECKRASAMGGDTSRY
SEQ ID NO:54 (NP) (201) QQGRLVKQVLLHSVVRTEFMRVIRGSLVLRQFMVSECKRASAMGGDTSRY
SEQ ID NO:66 (NP) (201) QQGRLVKQVLLHSVVRTEFMRVIRGSLVLRQFMVSECKRASAMGGDTSRY
SEQ ID NO:78 (NP) (201) QQGRLVKQVLLHSVVRTEFMRVIRGSLVLRQFMVSECKRASAMGGDTSRY
251      300
SEQ ID NO:3 (NP) (251) YAMVGDISLYIKNAGLTAFFLTLKFGVGTQYPTLAMSVFSSDLKRLAALI
SEQ ID NO:54 (NP) (251) YAMVGDISLYIKNAGLTAFFLTLKFGVGTQYPTLAMSVFSSDLKRLAALI
SEQ ID NO:66 (NP) (251) YAMVGDISLYIKNAGLTAFFLTLKFGVGTQYPTLAMSVFSSDLKRLAALI
SEQ ID NO:78 (NP) (251) YAMVGDISLYIKNAGLTAFFLTLKFGVGTQYPTLAMSVFSSDLKRLAALI
301      350
SEQ ID NO:3 (NP) (301) RLYKTKGDNAPYMAFLESDMGNFAPANYSTMYSYAMGIGTILEASVSRY
SEQ ID NO:54 (NP) (301) RLYKTKGDNAPYMAFLESDMGNFAPANYSTMYSYAMGIGTILEASVSRY
SEQ ID NO:66 (NP) (301) RLYKTKGDNAPYMAFLESDMGNFAPANYSTMYSYAMGIGTILEASVSRY
SEQ ID NO:78 (NP) (301) RLYKTKGDNAPYMAFLESDMGNFAPANYSTMYSYAMGIGTILEASVSRY
351      400
SEQ ID NO:3 (NP) (351) QYARDFTSENYFRLGVETAQSQQGAFDERTAREMGLTEESKQQVRSLLMS
SEQ ID NO:54 (NP) (351) QYARDFTSENYFRLGVETAQSQQGAFDERTAREMGLTEESKQQVRSLLMS
SEQ ID NO:66 (NP) (351) QYARDFTSENYFRLGVETAQSQQGAFDERTAREMGLTEESKQQVRSLLMS
SEQ ID NO:78 (NP) (351) QYARDFTSENYFRLGVETAQSQQGAFDERTAREMGLTEESKQQVRSLLMS
401      450
SEQ ID NO:3 (NP) (401) VDMGPSSVHEPSRPAFISQEENRQPAQNSSDTQGQTKPVKQPAPRADPD
SEQ ID NO:54 (NP) (401) VDMGPSSVHEPSRPAFISQEENRQPAQNSSDTQGQTKPVKQPAPRADPD
SEQ ID NO:66 (NP) (401) VDMGPSSVHEPSRPAFISQEENRQPAQNSSDTQGQTKPVKQPAPRADPD
SEQ ID NO:78 (NP) (401) VDMGPSSVHEPSRPAFISQEENRQPAQNSSDTQGQTKPVKQPAPRADPD
451      462
SEQ ID NO:3 (NP) (451) DIDPYENGLEW-
SEQ ID NO:54 (NP) (451) DIDPYENGLEW-
SEQ ID NO:66 (NP) (451) DIDPYENGLEW-
SEQ ID NO:78 (NP) (451) DIDPYENGLEW-

```

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:3 so với SEQ ID NO:54: độ đồng nhất trình tự 99%
 SEQ ID NO:3 so với SEQ ID NO:66: độ đồng nhất trình tự 98%
 SEQ ID NO:3 so với SEQ ID NO:78: độ đồng nhất trình tự 98%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:2 so với SEQ ID NO:53: độ đồng nhất trình tự 99%
 SEQ ID NO:2 so với SEQ ID NO:65: độ đồng nhất trình tự 97%
 SEQ ID NO:2 so với SEQ ID NO:77: độ đồng nhất trình tự 97%

Fig. 31

Sự sắp hàng protein P

```

1      50
SEQ ID NO:5 (P) (1) MDFANDEEIAELLNLSTNVIKEIQKSELKPPQTTGRPPVSQGNTRNLTDL
SEQ ID NO:56 (P) (1) MDFANDEEIAELLNLSTNVIKEIQKSELKPPQTTGRPPVSQGNTRNLTDL
SEQ ID NO:68 (P) (1) MDFANDEEIAELLNLSTNVIKEIQKSELKPPQTTGRPPVSQGNTRNLTDL
SEQ ID NO:80 (P) (1) MDFANDEEIAELLNLSTNVIKEIQKSELKPPQTTGRPPVSQGNTRNLTDL
51     100
SEQ ID NO:5 (P) (51) WEKETASQIKTPAQSTQTTQVQSDENEEIKSESTDGHIRGTVNQIEQV
SEQ ID NO:56 (P) (51) WEKETASQIKTPAQSTQTTQVQSDENEEIKSESTDGHIRGTVNQIEQV
SEQ ID NO:68 (P) (51) WEKETASQNKTAQSPQTTQVQSDNEEEIKSESTDGHIRGTVNQIEQV
SEQ ID NO:80 (P) (51) WEKETASQNKTAQSPQTTQVQSDNEEEIKSESTDGHIRGTVNQIEQV
101    150
SEQ ID NO:5 (P) (101) PEQNQSRSSPGDDLDRALNKLEGRINLISSMDKEIKKGPRIQNLPGSQAA
SEQ ID NO:56 (P) (101) PEQNQSRSSPGDDLDRALNKLEGRINLISSMDKEIKKGPRIQNLPGSQAA
SEQ ID NO:68 (P) (101) PEQNQSRSSPGDDLDRALNKLEGRINLISSMDKEIKKGPRIQNLPGSQAA
SEQ ID NO:80 (P) (101) PEQNQSRSSPGDDLDRALNKLEGRINLISSMDKEIKKGPRIQNLPGSQAA
151    200
SEQ ID NO:5 (P) (151) TQQATHPLAGDTPNMQAQTKALAKPHQEAINPGNQDTGSEIHLPPSMAPP
SEQ ID NO:56 (P) (151) TQQATHPLAGDTPNMQAQTKALAKPHQEAINPGNQDTGSEIHLPPSMAPP
SEQ ID NO:68 (P) (151) TQQATHPLAGDTPNMQAQTKALAKPHQEAINPGNQDTGSEIHLPPSMAPP
SEQ ID NO:80 (P) (151) TQQATHPLAGDTPNMQAQTKALAKPHQEAINPGNQDTGSEIHLPPSMAPP
201    250
SEQ ID NO:5 (P) (201) ESLVGAIRNAPQFVPDQSMNTVDAGSVQLHASCAEMISRMFEVVISKLDK
SEQ ID NO:56 (P) (201) ESLVGAIRNAPQFVPDQSMNTVDAGSVQLHASCAEMISRMFEVVISKLDK
SEQ ID NO:68 (P) (201) ESLVGAIRNAPQFVPDQSMNTVDAGSVQLHASCAEMISRMFEVVISKLDK
SEQ ID NO:80 (P) (201) ESLVGAIRNAPQFVPDQSMNTVDAGSVQLHASCAEMISRMFEVVISKLDK
251    300
SEQ ID NO:5 (P) (251) LESRLNDIAKVNTTPLIRNDINQLKATTALMSNQIASIQILDPGNAGVR
SEQ ID NO:56 (P) (251) LESRLNDIAKVNTTPLIRNDINQLKATTALMSNQIASIQILDPGNAGVR
SEQ ID NO:68 (P) (251) LESRLNDIAKVNTTPLIRNDINQLKATTALMSNQIASIQILDPGNAGVR
SEQ ID NO:80 (P) (251) LESRLNDIAKVNTTPLIRNDINQLKATTALMSNQIASIQILDPGNAGVR
301    350
SEQ ID NO:5 (P) (301) SLSEMSVTKKAADVIAFGDDPTQIIEGIMAKDALGKVPPTSVIAK
SEQ ID NO:56 (P) (301) SLSEMSVTKKAADVIAFGDDPTQIIEGIMAKDALGKVPPTSVIAK
SEQ ID NO:68 (P) (301) SLSEMSVTKKAADVIAFGDDPTQIIEGIMAKDALGKVPPTSVIAK
SEQ ID NO:80 (P) (301) SLSEMSVTKKAADVIAFGDDPTQIIEGIMAKDALGKVPPTSVIAK
351    400
SEQ ID NO:5 (P) (351) AQTSSGVSKGEIEGLIALVETLVDNDKKAALKIKMIDQVKSHADYARVKQ
SEQ ID NO:56 (P) (351) AQTSSGVSKGEIEGLIALVETLVDNDKKAALKIKMIDQVKSHADYARVKQ
SEQ ID NO:68 (P) (351) AQTSSGVSKGEIEGLIALVETLVDNDKKAALKIKMIDQVKSHADYARVKQ
SEQ ID NO:80 (P) (351) AQTSSGVSKGEIEGLIALVETLVDNDKKAALKIKMIDQVKSHADYARVKQ
401
SEQ ID NO:5 (P) (401) AIYNA-
SEQ ID NO:56 (P) (401) AIYNA-
SEQ ID NO:68 (P) (401) AIYNA-
SEQ ID NO:80 (P) (401) AIYNA-

```

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:5 so với SEQ ID NO:56: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:5 so với SEQ ID NO:68: độ đồng nhất trình tự 96%

SEQ ID NO:5 so với SEQ ID NO:80: độ đồng nhất trình tự 95%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:4 so với SEQ ID NO:55: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:4 so với SEQ ID NO:67: độ đồng nhất trình tự 96%

SEQ ID NO:4 so với SEQ ID NO:79: độ đồng nhất trình tự 96%

Fig. 32

sự sắp hàng protein M

```

1      50
SEQ ID NO:58 (M) (1) MAYTTLKLWVDEGDMSSSLLSFPLVLKETDRGTEKELQPQVRVDSIGDVQN
SEQ ID NO:7 (M) (1) MAYTTLKLWVDEGDMSSSLLSFPLVLKETDRGTEKELQPQVRVDSIGDVQN
SEQ ID NO:70 (M) (1) MAYTTLKLWVDEGDMSSSLLSFPLVLKETDRGTEKELQPQVRVDSIGDVQN
SEQ ID NO:82 (M) (1) MAYTTLKLWVDEGDMSSSLLSFPLVLKETDRGTEKELQPQVRVDSIGDVQN
51      100
SEQ ID NO:58 (M) (51) AKESIFVTLYGFIQAIKEIDRSKFFHPKDDFKPETVTAGLVVVGAIKM
SEQ ID NO:7 (M) (51) AKESIFVTLYGFIQAIKEIDRSKFFHPKDDFKPETVTAGLVVVGAIKM
SEQ ID NO:70 (M) (51) AKESIFVTLYGFIQAIKENIDRSKFFHPKDDFKPETVTAGLVVVGAIKM
SEQ ID NO:82 (M) (51) AKESIFVTLYGFIQAIKENIDRSKFFHPKDDFKPETVTAGLVVVGAIKM
101      150
SEQ ID NO:58 (M) (101) MADVNTISNDALALEITVKKSATSQEKMTVMFHNSPPSLRTAITIRAGGF
SEQ ID NO:7 (M) (101) MADVNTISNDALALEITVKKSATSQEKMTVMFHNSPPSLRTAITIRAGGF
SEQ ID NO:70 (M) (101) MADVNTISNDALALEITVKKSATSQEKMTVMFHNSPPSLRTAITIRAGGF
SEQ ID NO:82 (M) (101) MADVNTISNDALALEITVKKSATSQEKMTVMFHNSPPSLRTAITIRAGGF
151      200
SEQ ID NO:58 (M) (151) ISNADENIKCASKLTAGVQYIFRPMFVSITKLHNGKLYRVPKSIHSISST
SEQ ID NO:7 (M) (151) ISNADENIKCASKLTAGVQYIFRPMFVSITKLHNGKLYRVPKSIHSISST
SEQ ID NO:70 (M) (151) ISNADENIKCASKLTAGVQYIFRPMFVSITKLHNGKLYRVPKSIHSISST
SEQ ID NO:82 (M) (151) ISNADENIKCASKLTAGVQYIFRPMFVSITKLHNGKLYRVPKSIHSISST
201      250
SEQ ID NO:58 (M) (201) LLYSVMLEVGFKVDIGKDHPQAKMLKIVTIGDADTYWGFHLCNFKKT
SEQ ID NO:7 (M) (201) LLYSVMLEVGFKVDIGKDHPQAKMLKIVTIGDADTYWGFHLCNFKKT
SEQ ID NO:70 (M) (201) LLYSVMLEVGFKVDIGKDHPQAKMLKIVTIGDADTYWGFHLCNFKKT
SEQ ID NO:82 (M) (201) LLYSVMLEVGFKVDIGKDHPQAKMLKIVTIGDADTYWGFHLCNFKKT
251      300
SEQ ID NO:58 (M) (251) SSKGKPRTLDELITKVKNMGLKLELHDLWGPTIVVQITGKSSKYAQGFFS
SEQ ID NO:7 (M) (251) SSKGKPRTLDELITKVKNMGLKLELHDLWGPTIVVQITGKSSKYAQGFFS
SEQ ID NO:70 (M) (251) SSKGKPRTLDELITKVKNMGLKLELHDLWGPTIVVQITGKSSKYAQGFFS
SEQ ID NO:82 (M) (251) SSKGKPRTLDELITKVKNMGLKLELHDLWGPTIVVQITGKSSKYAQGFFS
301      350
SEQ ID NO:58 (M) (301) SNGTCCLPISRSAPGLGKLLWSCSATIGDATVVIQSSEKGELLRSDDLEI
SEQ ID NO:7 (M) (301) SNGTCCLPISRSAPGLGKLLWSCSATIGDATVVIQSSEKGELLRSDDLEI
SEQ ID NO:70 (M) (301) SNGTCCLPISRSAPGLGKLLWSCSATIGDATVVIQSSEKGELLRSDDLEI
SEQ ID NO:82 (M) (301) SNGTCCLPISRSAPGLGKLLWSCSATIGDATVVIQSSEKGELLRSDDLEI
351      370
SEQ ID NO:58 (M) (351) RGAVASKKGRLSFSHPFKK-
SEQ ID NO:7 (M) (351) RGAVASKKGRLSFSHPFKK-
SEQ ID NO:70 (M) (351) RGAVASKKGRLSFSHPFKK-
SEQ ID NO:82 (M) (351) RGAVASKKGRLSFSHPFKK-

```

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:7 so với SEQ ID NO:58: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:7 so với SEQ ID NO:70: độ đồng nhất trình tự 98%

SEQ ID NO:7 so với SEQ ID NO:82: độ đồng nhất trình tự 98%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:6 so với SEQ ID NO:57: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:6 so với SEQ ID NO:69: độ đồng nhất trình tự 97%

SEQ ID NO:6 so với SEQ ID NO:81: độ đồng nhất trình tự 97%

Fig. 33

sự sắp hàng protein F

```

1      50
SEQ ID NO:60 (F) (1) MGKISYLINSVLLLLVYPVNSIDNTLAPIGVASANEWQLAAYTTSLSG
SEQ ID NO:72 (F) (1) MGKISYLINSVLLLLVYPVNSIDNTLAPIGVASANEWQLAAYTTSLSG
SEQ ID NO:84 (F) (1) MGKISYLINSVLLLLVYPVNSIDNTLAPIGVASANEWQLAAYTTSLSG
SEQ ID NO:9 (F) (1) MGKISYLINSVLLLLVYPVNSIDNTLAPIGVASANEWQLAAYTTSLSG
51      100
SEQ ID NO:60 (F) (51) TIAVRFLPVLDPNMTTCLRETITTYNNTVNNILGPLKSNLDALLSSETYP
SEQ ID NO:72 (F) (51) TIAVRFLPVLDPNMTTCLRETITTYNNTVNNILGPLKSNLDALLSSETYP
SEQ ID NO:84 (F) (51) TIAVRFLPVLDPNMTTCLRETITTYNNTVNNILGPLKSNLDALLSSETYP
SEQ ID NO:9 (F) (51) TIAVRFLPVLDPNMTTCLRETITTYNNTVNNILGPLKSNLDALLSSETYP
101     150
SEQ ID NO:60 (F) (101) QTRLIGAVIGSIALGVATSAQITAVALKQAQDNARNILALKEALSKTNE
SEQ ID NO:72 (F) (101) QTRLIGAVIGSIALGVATSAQITAVALKQAQDNARNILALKEALSKTNE
SEQ ID NO:84 (F) (101) QTRLIGAVIGSIALGVATSAQITAVALKQAQDNARNILALKEALSKTNE
SEQ ID NO:9 (F) (101) QTRLIGAVIGSIALGVATSAQITAVALKQAQDNARNILALKEALSKTNE
151     200
SEQ ID NO:60 (F) (151) AVKELSSGLQQTALALGKIQSFVNEEILPSINQLSCEVTANKLGVYLSLY
SEQ ID NO:72 (F) (151) AVKELSSGLQQTALALGKIQSFVNEEILPSINQLSCEVTANKLGVYLSLY
SEQ ID NO:84 (F) (151) AVKELSSGLQQTALALGKIQSFVNEEILPSINQLSCEVTANKLGVYLSLY
SEQ ID NO:9 (F) (151) AVKELSSGLQQTALALGKIQSFVNEEILPSINQLSCEVTANKLGVYLSLY
201     250
SEQ ID NO:60 (F) (201) LTELTTIFGAQLTNPALTSLSYQALYNLCGGNMAMLTQKIGIKQQDVNSL
SEQ ID NO:72 (F) (201) LTELTTIFGAQLTNPALTSLSYQALYNLCGGNMAMLTQKIGIKQQDVNSL
SEQ ID NO:84 (F) (201) LTELTTIFGAQLTNPALTSLSYQALYNLCGGNMAMLTQKIGIKQQDVNSL
SEQ ID NO:9 (F) (201) LTELTTIFGAQLTNPALTSLSYQALYNLCGGNMAMLTQKIGIKQQDVNSL
251     300
SEQ ID NO:60 (F) (251) YEAGLITGVIGYDSYQQLLVIQVNYPSISEVTGVRATELVTVSVTTDKG
SEQ ID NO:72 (F) (251) YEAGLITGVIGYDSYQQLLVIQVNYPSISEVTGVRATELVTVSVTTDKG
SEQ ID NO:84 (F) (251) YEAGLITGVIGYDSYQQLLVIQVNYPSISEVTGVRATELVTVSVTTDKG
SEQ ID NO:9 (F) (251) YEAGLITGVIGYDSHYQQLLVIQVNYPSISEVTGVRATELVTVSVTTDKG
301     350
SEQ ID NO:60 (F) (301) EGKAIVPQFVAESRVTHIEELDVASCKFSSTLYCRQVNTRALPPLVASCL
SEQ ID NO:72 (F) (301) EGKAIVPQFVAESRVTHIEELDVASCKFSSTLYCRQVNTRALPPLVASCL
SEQ ID NO:84 (F) (301) EGKAIVPQFVAESRVTHIEELDVASCKFSSTLYCRQVNTRALPPLVASCL
SEQ ID NO:9 (F) (301) EGKAIVPQFVAESRVTHIEELDVASCKFSSTLYCRQVNTRALPPLVASCL
351     400
SEQ ID NO:60 (F) (351) RGNYYDDCQYTTTEIGALSSRYITLDGGVLVNCKSIVCRCLNPSKIIISQNTN
SEQ ID NO:72 (F) (351) RGNYYDDCQYTTTEIGALSSRYITLDGGVLVNCKSIVCRCLNPSKIIISQNTN
SEQ ID NO:84 (F) (351) RGNYYDDCQYTTTEIGALSSRYITLDGGVLVNCKSIVCRCLNPSKIIISQNTN
SEQ ID NO:9 (F) (351) RGNYYDDCQYTTTEIGALSSRYITLDGGVLVNCKSIVCRCLNPSKIIISQNTN
401     450
SEQ ID NO:60 (F) (401) AAVTYVDATICKTIQLDDIQLQLEGLSSVYARNISIEISQVTTSGSLDI
SEQ ID NO:72 (F) (401) AAVTYVDATICKTIQLDDIQLQLEGLSSVYARNISIEISQVTTSGSLDI
SEQ ID NO:84 (F) (401) AAVTYVDATICKTIQLDDIQLQLEGLSSVYARNISIEISQVTTSGSLDI
SEQ ID NO:9 (F) (401) AAVTYVDATICKTIQLDDIQLQLEGLSSVYARNISIEISQVTTSGSLDI
451     500
SEQ ID NO:60 (F) (451) SSEIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKVNPHIVNNTTLIVLCVLSALAVI
SEQ ID NO:72 (F) (451) SSEIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKVNPHIVNNTTLIVLCVLSALAVI
SEQ ID NO:84 (F) (451) SSEIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKVNPHIVNNTTLIVLCVLSALAVI
SEQ ID NO:9 (F) (451) SSEIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKVNPHIVNNTTLIVLCVLSALAVI
501     544
SEQ ID NO:60 (F) (501) WLAVLTAHHYLRKLTISALAVNTTIQSNPYVNQTKRESKF-
SEQ ID NO:72 (F) (501) WLAVLTAHHYLRKLTISALAVNTTIQSNPYVNQTKRESKF-
SEQ ID NO:84 (F) (501) WLAVLTAHHYLRKLTISALAVNTTIQSNPYVNQTKRESKF-
SEQ ID NO:9 (F) (501) WLAVLTAHHYLRKLTISALAVNTTIQSNPYVNQTKRESKF-

```

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:9 so với SEQ ID NO:60: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:9 so với SEQ ID NO:72: độ đồng nhất trình tự 98%

SEQ ID NO:9 so với SEQ ID NO:84: độ đồng nhất trình tự 98%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:8 so với SEQ ID NO:59: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:8 so với SEQ ID NO:71: độ đồng nhất trình tự 97%

SEQ ID NO:8 so với SEQ ID NO:83: độ đồng nhất trình tự 97%

Fig. 34 (1/2)

sự sắp hàng protein HN

1 50
 SEQ ID NO:11 (HN) (1) MSNIASSLENIVEQDSRKTTWRAIFRWSVLLITGCLALSIVIVQIGNL
 SEQ ID NO:62 (HN) (1) MSNIASSLENIVEQDSRKTTWRAIFRWSVLLITGCLALSIVIVQIGNL
 SEQ ID NO:74 (HN) (1) MSNIASSLENIVEQDSRKTTWRAIFRWSVLLITGCLALSIVIVQIGNL
 SEQ ID NO:86 (HN) (1) MSNIASSLENIVEQDSRKTTWRAIFRWSVLLITGCLALSIVIVQIGNL
 51 100
 SEQ ID NO:11 (HN) (51) KIPSVGDLADEVVTPKTTLSDTLRNPINQINDIFRIVALDIPLQVTSIQ
 SEQ ID NO:62 (HN) (51) KIPSVGDLADEVVTPKTTLSDTLRNPINQINDIFRIVALDIPLQVTSIQ
 SEQ ID NO:74 (HN) (51) KIPSVGDLADEVVTPKTTLSDTLRNPINQINDIFRIVALDIPLQVTSIQ
 SEQ ID NO:86 (HN) (51) KIPSVGDLADEVVTPKTTLSDTLRNPINQINDIFRIVALDIPLQVTSIQ
 101 150
 SEQ ID NO:11 (HN) (101) KDLASQFNMLIDSLNAIKLGNGTNIPTSDKEYAGGIGNPVFTVDAGGS
 SEQ ID NO:62 (HN) (101) KDLASQFNMLIDSLNAIKLGNGTNIPTSDKEYAGGIGNPVFTVDAGGS
 SEQ ID NO:74 (HN) (101) KDLASQFNMLIDSLNAIKLGNGTNIPTSDKEYAGGIGNPVFTVDAGGS
 SEQ ID NO:86 (HN) (101) KDLASQFNMLIDSLNAIKLGNGTNIPTSDKEYAGGIGNPVFTVDAGGS
 151 200
 SEQ ID NO:11 (HN) (151) IGFKQFSLEHPSFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSSEHWCYSHNIIAAGCQD
 SEQ ID NO:62 (HN) (151) IGFKQFSLEHPSFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSSEHWCYSHNIIAAGCQD
 SEQ ID NO:74 (HN) (151) IGFKQFSLEHPSFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSSEHWCYSHNIIAAGCQD
 SEQ ID NO:86 (HN) (151) IGFKQFSLEHPSFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSSEHWCYSHNIIAAGCQD
 201 250
 SEQ ID NO:11 (HN) (201) ASASSMYISMVGLHVSSSGTPIFLTASELIDDGVNRKSCSIVATQFGCD
 SEQ ID NO:62 (HN) (201) ASASSMYISMVGLHVSSSGTPIFLTASELIDDGVNRKSCSIVATQFGCD
 SEQ ID NO:74 (HN) (201) ASASSMYISMVGLHVSSSGTPIFLTASELIDDGVNRKSCSIVATQFGCD
 SEQ ID NO:86 (HN) (201) ASASSMYISMVGLHVSSSGTPIFLTASELIDDGVNRKSCSIVATQFGCD
 251 300
 SEQ ID NO:11 (HN) (251) ILCISVIEKEGDDYWSDTPTPMRHGRFSFNGSFVEAELPVSSMFSSFSAN
 SEQ ID NO:62 (HN) (251) ILCISVIEKEGDDYWSDTPTPMRHGRFSFNGSFVEAELPVSSMFSSFSAN
 SEQ ID NO:74 (HN) (251) ILCISVIEKEGDDYWSDTPTPMRHGRFSFNGSFVEAELPVSSMFSSFSAN
 SEQ ID NO:86 (HN) (251) ILCISVIEKEGDDYWSDTPTPMRHGRFSFNGSFVEAELPVSSMFSSFSAN
 301 350
 SEQ ID NO:11 (HN) (301) YPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQTSPEFTELVKYGLFVSTPTTVQSSW
 SEQ ID NO:62 (HN) (301) YPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQTSPEFTELVKYGLFVSTPTTVQSSW
 SEQ ID NO:74 (HN) (301) YPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQTSPEFTELVKYGLFVSTPTTVQSSW
 SEQ ID NO:86 (HN) (301) YPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQTSPEFTELVKYGLFVSTPTTVQSSW
 351 400
 SEQ ID NO:11 (HN) (351) TYDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSCALDAVDLSSCIVKIMNSSTVMMAA
 SEQ ID NO:62 (HN) (351) TYDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSCALDAVDLSSCIVKIMNSSTVMMAA
 SEQ ID NO:74 (HN) (351) TYDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSCALDAVDLSSCIVKIMNSSTVMMAA
 SEQ ID NO:86 (HN) (351) TYDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSCALDAVDLSSCIVKIMNSSTVMMAA
 401 450
 SEQ ID NO:11 (HN) (401) EGRIKIGIDYFYYQRSSSWWPLAFVTKLDPQELADTNSIWLNSIPIQ
 SEQ ID NO:62 (HN) (401) EGRIKIGIDYFYYQRSSSWWPLAFVTKLDPQELADTNSIWLNSIPIQ
 SEQ ID NO:74 (HN) (401) EGRIKIGIDYFYYQRSSSWWPLAFVTKLDPQELADTNSIWLNSIPIQ
 SEQ ID NO:86 (HN) (401) EGRIKIGIDYFYYQRSSSWWPLAFVTKLDPQELADTNSIWLNSIPIQ
 451 500
 SEQ ID NO:11 (HN) (451) SKFPRPSYSENYCTKPAVCPATCVTGVYSDIWPLTSSSSLPSIHWIGQYL
 SEQ ID NO:62 (HN) (451) SKFPRPSYSENYCTKPAVCPATCVTGVYSDIWPLTSSSSLPSIHWIGQYL
 SEQ ID NO:74 (HN) (451) SKFPRPSYSENYCTKPAVCPATCVTGVYSDIWPLTSSSSLPSIHWIGQYL
 SEQ ID NO:86 (HN) (451) SKFPRPSYSENYCTKPAVCPATCVTGVYSDIWPLTSSSSLPSIHWIGQYL
 501 550
 SEQ ID NO:11 (HN) (501) DAPVVERTYPRFGIANQSHWYLQEDILPTSTASAYSTTTCKNTARNRVFC
 SEQ ID NO:62 (HN) (501) DAPVVERTYPRFGIANQSHWYLQEDILPTSTASAYSTTTCKNTARNRVFC
 SEQ ID NO:74 (HN) (501) DAPVVERTYPRFGIANQSHWYLQEDILPTSTASAYSTTTCKNTARNRVFC
 SEQ ID NO:86 (HN) (501) DAPVVERTYPRFGIANQSHWYLQEDILPTSTASAYSTTTCKNTARNRVFC
 551 578
 SEQ ID NO:11 (HN) (551) VTIAEFADGLFGEYRITPQLYELVRNN-
 SEQ ID NO:62 (HN) (551) VTIAEFADGLFGEYRITPQLYELVRNN-
 SEQ ID NO:74 (HN) (551) VTIAEFADGLFGEYRITPQLYELVRNN-
 SEQ ID NO:86 (HN) (551) VTIAEFADGLFGEYRITPQLYELVRNN-

Fig. 34 (2/2)

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:11 so với SEQ ID NO:62: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:11 so với SEQ ID NO:74: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:11 so với SEQ ID NO:86: độ đồng nhất trình tự 99%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:10 so với SEQ ID NO:61: độ đồng nhất trình tự 99%

SEQ ID NO:10 so với SEQ ID NO:73: độ đồng nhất trình tự 97%

SEQ ID NO:10 so với SEQ ID NO:85: độ đồng nhất trình tự 97%

Fig. 35 (1/5)

sự sắp hàng Protein L

```

1      50
SEQ ID NO:13 (L1) (1) MEGDLYTNMDIKQVDLIHQPEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADLRQ
SEQ ID NO:14 (L2) (1) -----MDIKQVDLIHQPEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADLRQ
SEQ ID NO:64 (L) (1) -----MDIKQVDLIHQPEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADLRQ
SEQ ID NO:76 (L) (1) -----MDIKQVDLIHQPEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADLRQ
SEQ ID NO:88 (L) (1) -----MDIKQVDLIHQPEVHLDSPHILNKLALLWRLSGLPMPADLRQ
51      100
SEQ ID NO:13 (L1) (51) KSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDITHYCYFNINLANDPITHP
SEQ ID NO:14 (L2) (43) KSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDITHYCYFNINLANDPITHP
SEQ ID NO:64 (L) (43) KSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDITHYCYFNINLANDPITHP
SEQ ID NO:76 (L) (43) KSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDIAHYCYFNINLANDPITHP
SEQ ID NO:88 (L) (43) KSVVMHIPDHILEKSEYRIKHRLGKIKSDIAHYCYFNINLANDPITHP
101      150
SEQ ID NO:13 (L1) (101) KSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLSHKLVGN
SEQ ID NO:14 (L2) (93) KSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLSHKLVGN
SEQ ID NO:64 (L) (93) KSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLSHKLVGN
SEQ ID NO:76 (L) (93) KSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLSHKLVGN
SEQ ID NO:88 (L) (93) KSLYWLSRLTIASAGTFRHMKDRILCTVGSEFGHKIQDLFSLLSHKLVGN
151      200
SEQ ID NO:13 (L1) (151) GDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCNQFVSDIKSAVTPWSEARWSWLHIKQT
SEQ ID NO:14 (L2) (143) GDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCNQFVSDIKSAVTPWSEARWSWLHIKQT
SEQ ID NO:64 (L) (143) GDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCDQFVSDIKSAVTPWSEARWSWLHIKQT
SEQ ID NO:76 (L) (143) GDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCNQFVSDIKSAVTPWSEARWSWLHIKQT
SEQ ID NO:88 (L) (143) GDLFNQSLSGTRLTASPLSPLCNQFVSDIKSAVTPWSEARWSWLHIKQT
201      250
SEQ ID NO:13 (L1) (201) MRYLIKQSRITNSAHLTEIIEEWGLVGITPDLVILFDRVNNSLTALTFE
SEQ ID NO:14 (L2) (193) MRYLIKQSRITNSAHLTEIIEEWGLVGITPDLVILFDRVNNSLTALTFE
SEQ ID NO:64 (L) (193) MRYLIKQSRITNSAHLTEIIEEWGLVGITPDLVILFDRVNNSLTALTFE
SEQ ID NO:76 (L) (193) MRYLIKQSRITNSAHLTEIIEEWGLVGITPDLVILFDRVNNSLTALTFE
SEQ ID NO:88 (L) (193) MRYLIKQSRITNSAHLTEIIEEWGLVGITPDLVILFDRVNNSLTALTFE
251      300
SEQ ID NO:13 (L1) (251) MVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDLVDSLAKILGDTI
SEQ ID NO:14 (L2) (243) MVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDLVDSLAKILGDTI
SEQ ID NO:64 (L) (243) MVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDLVDSLAKILGDTI
SEQ ID NO:76 (L) (243) MVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDLVDSLAKTLGDTI
SEQ ID NO:88 (L) (243) MVLMYSDVLESRDNIVLVGRLSTFLQPVVSRLEVLFDLVDSLAKTLGDTI
301      350
SEQ ID NO:13 (L1) (301) YEIIAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNELDNTLSKRVPKHKH
SEQ ID NO:14 (L2) (293) YEIIAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNELDNTLSKRVPKHKH
SEQ ID NO:64 (L) (293) YEIIAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNELDNTLSKRVPKHKH
SEQ ID NO:76 (L) (293) YEIIAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNELDNTLSKRVPKHKH
SEQ ID NO:88 (L) (293) YEIIAVLESLSYGSVQLHDASHSHAGSFFSFNMNELDNTLSKRVPKHKH
351      400
SEQ ID NO:13 (L1) (351) TIMSIIRQCFSNLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLTAPDAAAKVRKAMCAPK
SEQ ID NO:14 (L2) (343) TIMSIIRQCFSNLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLTAPDAAAKVRKAMCAPK
SEQ ID NO:64 (L) (343) TIMSIIRQCFSNLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLTAPDAAAKVRKAMCAPK
SEQ ID NO:76 (L) (343) TIMSIIRQCFSNLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLTAPDAAAKVRKAMCAPK
SEQ ID NO:88 (L) (343) TIMSIIRQCFSNLDVDQAAEMLCLMRLFGHPMLTAPDAAAKVRKAMCAPK
401      450
SEQ ID NO:13 (L1) (401) LVEHDTILQTLSTFFKGIIINGYRRSHSGLWPNVEPSSYDDDLRQLYLES
SEQ ID NO:14 (L2) (393) LVEHDTILQTLSTFFKGIIINGYRRSHSGLWPNVEPSSYDDDLRQLYLES
SEQ ID NO:64 (L) (393) LVEHDTILQTLSTFFKGIIINGYRRSHSGLWPNVEPSSYDDDLRQLYLES
SEQ ID NO:76 (L) (393) LVEHDTILQTLSTFFKGIIINGYRRSHSGLWPNVEPSSYDDDLRQLYLES
SEQ ID NO:88 (L) (393) LVEHDTILQTLSTFFKGIIINGYRRSHSGLWPNVEPSSYDDDLRQLYLES
451      500
SEQ ID NO:13 (L1) (451) AEISHHFMLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHDDLSTFLKDRAICRPKSQWDV
SEQ ID NO:14 (L2) (443) AEISHHFMLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHDDLSTFLKDRAICRPKSQWDV
SEQ ID NO:64 (L) (443) AEISHHFMLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHDDLSTFLKDRAICRPKSQWDV
SEQ ID NO:76 (L) (443) AEISHHFMLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHDDLSTFLKDRAICRPKSQWDV
SEQ ID NO:88 (L) (443) AEISHHFMLKKNYKSLSMIEFKKSIDYDLHDDLSTFLKDRAICRPKSQWDV

```

Fig. 35 (2/5)

501 550
 SEQ ID NO:13 (L1) (501) IFRKSLRRSHTQSQYDEIKSNRLLIDFLDSAIFDPGKEFAYVTTMDYLH
 SEQ ID NO:14 (L2) (493) IFRKSLRRSHTQSQYDEIKSNRLLIDFLDSAIFDPGKEFAYVTTMDYLH
 SEQ ID NO:64 (L) (493) IFRKSLRRSHTQSQYDEIKSNRLLIDFLDSAIFDPGKEFAYVTTMDYLH
 SEQ ID NO:76 (L) (493) IFRKSLRRSHTRSQYDEIKSNRLLIDFLDSAIFDPGKEFAYVTTMDYLH
 SEQ ID NO:88 (L) (493) IFRKSLRRSHTRSQYDEIKSNRLLIDFLDSAIFDPGKEFAYVTTMDYLH
 551 600
 SEQ ID NO:13 (L1) (551) DNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMTRNMRSQVILESLLSKHICKFFKE
 SEQ ID NO:14 (L2) (543) DNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMTRNMRSQVILESLLSKHICKFFKE
 SEQ ID NO:64 (L) (543) DNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMTRNMRSQVILESLLSKHICKFFKE
 SEQ ID NO:76 (L) (543) DNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMTRNMRSQVILESLLSKHICKFFKE
 SEQ ID NO:88 (L) (543) DNEFCASYSLKEKEIKTTGRIFAKMTRNMRSQVILESLLSKHICKFFKE
 601 650
 SEQ ID NO:13 (L1) (601) NGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKVSTLQDTASRHVGNSKSQIATSNPSRH
 SEQ ID NO:14 (L2) (593) NGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKVSTLQDTASRHVGNSKSQIATSNPSRH
 SEQ ID NO:64 (L) (593) NGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKVSTLQDTASRHVGNSKSQIATSNPSRH
 SEQ ID NO:76 (L) (593) NGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKVSTLQDTASRHVGNSKSQIATSNPSRH
 SEQ ID NO:88 (L) (593) NGVSMEQLSLTKSLLAMSQSPKVSTLQDTASRHVGNSKSQIATSNPSRH
 651 700
 SEQ ID NO:13 (L1) (651) HSTPNQMSLSNRKTVVATFLTTDLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGID
 SEQ ID NO:14 (L2) (643) HSTPNQMSLSNRKTVVATFLTTDLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGID
 SEQ ID NO:64 (L) (643) HSTANQMSLSNRKTVVATFLTTDLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGID
 SEQ ID NO:76 (L) (643) HSTTNQMSLSNRKTVVATFLTTDLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGID
 SEQ ID NO:88 (L) (643) HSTTNQMSLSNRKTVVATFLTTDLEKYCLQWRYSTIKLFAQALNQLFGID
 701 750
 SEQ ID NO:13 (L1) (701) HGFEWIHLRLMNSTLFVGDYPSPPEDPTLEDIDKAPNDDIFIVSPRGIE
 SEQ ID NO:14 (L2) (693) HGFEWIHLRLMNSTLFVGDYPSPPEDPTLEDIDKAPNDDIFIVSPRGIE
 SEQ ID NO:64 (L) (693) HGFEWIHLRLMNSTLFVGDYPSPPEDPTLEDIDKAPNDDIFIVSPRGIE
 SEQ ID NO:76 (L) (693) HGFEWIHLRLMNSTLFVGDYPSPPEDPTLEDIDKAPNDDIFIVSPRGIE
 SEQ ID NO:88 (L) (693) HGFEWIHLRLMNSTLFVGDYPSPPEDPTLEDIDKAPNDDIFIVSPRGIE
 751 800
 SEQ ID NO:13 (L1) (751) GLCQKMWTMISISAIHCVAEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKAC
 SEQ ID NO:14 (L2) (743) GLCQKMWTMISISAIHCVAEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKAC
 SEQ ID NO:64 (L) (743) GLCQKMWTMISISAIHCVAEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKAC
 SEQ ID NO:76 (L) (743) GLCQKMWTMISISAIHCVAEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKAC
 SEQ ID NO:88 (L) (743) GLCQKMWTMISISAIHCVAEKIGARVAAMVQGDNQVIAITKELFRGEKAC
 801 850
 SEQ ID NO:13 (L1) (801) DVRDELDELQGVFFDEFKRHNYAIGHNLKLNETIQSQSFFVYSKRIFFE
 SEQ ID NO:14 (L2) (793) DVRDELDELQGVFFDEFKRHNYAIGHNLKLNETIQSQSFFVYSKRIFFE
 SEQ ID NO:64 (L) (793) DVRDELDELQGVFFDEFKRHNYAIGHNLKLNETIQSQSFFVYSKRIFFE
 SEQ ID NO:76 (L) (793) DVRDELDELQGVFFDEFKRHNYAIGHNLKLNETIQSQSFFVYSKRIFFE
 SEQ ID NO:88 (L) (793) DVRDELDELQGVFFDEFKRHNYAIGHNLKLNETIQSQSFFVYSKRIFFE
 851 900
 SEQ ID NO:13 (L1) (851) RLLSQVLKNAAKLCMVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFV
 SEQ ID NO:14 (L2) (843) RLLSQVLKNAAKLCMVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFV
 SEQ ID NO:64 (L) (843) RLLSQVLKNAAKLCMVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFV
 SEQ ID NO:76 (L) (843) RLLSQVLKNAAKLCMVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFV
 SEQ ID NO:88 (L) (843) RLLSQVLKNAAKLCMVADHLGENTVSSCSNLSSTIARLVENGFEKDTAFV
 901 950
 SEQ ID NO:13 (L1) (901) LNLVYIMTQILFDEHYSIVCDHISVKSLIGSKNIRNLLYSSLIPGQLGGF
 SEQ ID NO:14 (L2) (893) LNLVYIMTQILFDEHYSIVCDHISVKSLIGSKNIRNLLYSSLIPGQLGGF
 SEQ ID NO:64 (L) (893) LNLVYIMTQILFDEHYSIVCDHISVKSLIGSKNIRNLLYSSLIPGQLGGF
 SEQ ID NO:76 (L) (893) LNLVYIMTQILFDEHYSIVCDHNSVKSLIGSKNIRNLLYSSLIPGQLGGF
 SEQ ID NO:88 (L) (893) LNLVYIMTQILFDEHYSIVCDHNSVKSLIGSKNIRNLLYSSLIPGQLGGF
 951 1000
 SEQ ID NO:13 (L1) (951) NFLNISRLFTRNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGT
 SEQ ID NO:14 (L2) (943) NFLNISRLFTRNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGT
 SEQ ID NO:64 (L) (943) NFLNISRLFTRNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGT
 SEQ ID NO:76 (L) (943) NFLNISRLFTRNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGT
 SEQ ID NO:88 (L) (943) NFLNISRLFTRNIGDPVTCSDLKCFIAAGLLPPYVLKNVVLREPGPGT
 1001 1050
 SEQ ID NO:13 (L1) (1001) WLTLCSDPYTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHE
 SEQ ID NO:14 (L2) (993) WLTLCSDPYTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHE
 SEQ ID NO:64 (L) (993) WLTLCSDPYTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHE
 SEQ ID NO:76 (L) (993) WLTLCSDPYTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHE
 SEQ ID NO:88 (L) (993) WLTLCSDPYTLNIPYTQLPTTYLKKHTQSRLLSRAVNPLLAGVQVPNQHE

Fig. 35 (3/5)

1051 1100
 SEQ ID NO:13 (L1) (1051) EEEMLARFLLDREYVMPRAHVILE SVLGKRKQIQGLIDTTPTHIRTS
 SEQ ID NO:14 (L2) (1043) EEEMLARFLLDREYVMPRAHVILE SVLGKRKQIQGLIDTTPTHIRTS
 SEQ ID NO:64 (L) (1043) EEEMLARFLLDREYVMPRAHVILE SVLGKRKQIQGLIDTTPTHIRTS
 SEQ ID NO:76 (L) (1043) EEEMLARFLLDREYVMPRAHVILE SVLGKRKQIQGLIDTTPTHIRTS
 SEQ ID NO:88 (L) (1043) EEEMLARFLLDREYVMPRAHVILE SVLGKRKQIQGLIDTTPTHIRTS
 1101 1150
 SEQ ID NO:13 (L1) (1101) VNLVPSRKKCKEIIINYSNLNIAECHDSLSSQ CFSDNKEYLWSTSLISVE
 SEQ ID NO:14 (L2) (1093) VNLVPSRKKCKEIIINYSNLNIAECHDSLSSQ CFSDNKEYLWSTSLISVE
 SEQ ID NO:64 (L) (1093) VNLVPSRKKCKEIIINYSNLNIAECHDSLSSQ CFSDNKEYLWSTSLISVE
 SEQ ID NO:76 (L) (1093) VNLVPSRKKCKEIIINYSNLNIAECHDSLSSQ CFSDNKEYLWSTSLISVE
 SEQ ID NO:88 (L) (1093) VNLVPSRKKCKEIIINYSNLNIAECHDSLSSQ CFSDNKEYLWSTSLISVE
 1151 1200
 SEQ ID NO:13 (L1) (1151) TCSVTIADYLRAVSWSNILGGRN ISGVTTTPDTIELIQGCLIGENSSCTLC
 SEQ ID NO:14 (L2) (1143) TCSVTIADYLRAVSWSNILGGRN ISGVTTTPDTIELIQGCLIGENSSCTLC
 SEQ ID NO:64 (L) (1143) TCSVTIADYLRAVSWSNILGGRN ISGVTTTPDTIELIQGCLIGENSSCTLC
 SEQ ID NO:76 (L) (1143) TCSVTIADYLRAVSWSNILGGRN ISGVTTTPDTIELIQGCLIGENSSCTLC
 SEQ ID NO:88 (L) (1143) TCSVTIADYLRAVSWSNILGGRN ISGVTTTPDTIELIQGCLIGENSSCTLC
 1201 1250
 SEQ ID NO:13 (L1) (1201) ESHDDAFTWMHLPGLYIPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAIKG
 SEQ ID NO:14 (L2) (1193) ESHDDAFTWMHLPGLYIPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAIKG
 SEQ ID NO:64 (L) (1193) ESHDDAFTWMHLPGLYIPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAIKG
 SEQ ID NO:76 (L) (1193) ESHDDAFTWMHLPGLYIPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAIKG
 SEQ ID NO:88 (L) (1193) ESHDDAFTWMHLPGLYIPEPSVTNSKMRVPYLGSKTEERKTASMAAIKG
 1251 1300
 SEQ ID NO:13 (L1) (1251) MSHHLRAVLRGTSVFIWAF GDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRLLTPI
 SEQ ID NO:14 (L2) (1243) MSHHLRAVLRGTSVFIWAF GDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRLLTPI
 SEQ ID NO:64 (L) (1243) MSHHLRAVLRGTSVFIWAF GDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRLLTPI
 SEQ ID NO:76 (L) (1243) MSHHLRAVLRGTSVFIWAF GDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRLLTPI
 SEQ ID NO:88 (L) (1243) MSHHLRAVLRGTSVFIWAF GDTDINWDNALQIAQSRCNITLDQMRLLTPI
 1301 1350
 SEQ ID NO:13 (L1) (1301) PSSSNIQRLDDGISTQKFTPASLARITSEVHCNDSQRLEKDGSSVDSN
 SEQ ID NO:14 (L2) (1293) PSSSNIQRLDDGISTQKFTPASLARITSEVHCNDSQRLEKDGSSVDSN
 SEQ ID NO:64 (L) (1293) PSSSNIQRLDDGISTQKFTPASLARITSEVHCNDSQRLEKDGSSVDSN
 SEQ ID NO:76 (L) (1293) PSSSNIQRLDDGISTQKFTPASLARITSEVHCNDSQRLEKDGSSVDSN
 SEQ ID NO:88 (L) (1293) PSSSNIQRLDDGISTQKFTPASLARITSEVHCNDSQRLEKDGSSVDSN
 1351 1400
 SEQ ID NO:13 (L1) (1351) LIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNTLHLHTGHSCCPRELDISLVN
 SEQ ID NO:14 (L2) (1343) LIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNTLHLHTGHSCCPRELDISLVN
 SEQ ID NO:64 (L) (1343) LIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNTLHLHTGHSCCPRELDISLVN
 SEQ ID NO:76 (L) (1343) LIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNTLHLHTGHSCCPRELDISLVN
 SEQ ID NO:88 (L) (1343) LIYQQIMLLGLSIFETMYSMDQKWVFNHNTLHLHTGHSCCPRELDISLVN
 1401 1450
 SEQ ID NO:13 (L1) (1401) PPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNOENLTLEIKTFKFELNIDGLDFG
 SEQ ID NO:14 (L2) (1393) PPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNOENLTLEIKTFKFELNIDGLDFG
 SEQ ID NO:64 (L) (1393) PPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNOENLTLEIKTFKFELNIDGLDFG
 SEQ ID NO:76 (L) (1393) PPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNOENLTLEIKTFKFELNIDGLDFG
 SEQ ID NO:88 (L) (1393) PPRHQTPELTSTTTNPFLYDQLPLNOENLTLEIKTFKFELNIDGLDFG
 1451 1500
 SEQ ID NO:13 (L1) (1451) EGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNSVNWISECLMCDI
 SEQ ID NO:14 (L2) (1443) EGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNSVNWISECLMCDI
 SEQ ID NO:64 (L) (1443) EGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNSVNWISECLMCDI
 SEQ ID NO:76 (L) (1443) EGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNSVNWISECLMCDI
 SEQ ID NO:88 (L) (1443) EGIQLLSRCTARLMAECILEEGIGSSVKNEAIVNFDNSVNWISECLMCDI
 1501 1550
 SEQ ID NO:13 (L1) (1501) RSLCVNLGQEILCSLAYQMYYLIRIGRRRAILNYLDTTLQRIPIQLANIA
 SEQ ID NO:14 (L2) (1493) RSLCVNLGQEILCSLAYQMYYLIRIGRRRAILNYLDTTLQRIPIQLANIA
 SEQ ID NO:64 (L) (1493) RSLCVNLGQEILCSLAYQMYYLIRIGRRRAILNYLDTTLQRIPIQLANIA
 SEQ ID NO:76 (L) (1493) RSLCVNLGQEILCSLAYQMYYLIRIGRRRAILNYLDTTLQRIPIQLANIA
 SEQ ID NO:88 (L) (1493) RSLCVNLGQEILCSLAYQMYYLIRIGRRRAILNYLDTTLQRIPIQLANIA
 1551 1600
 SEQ ID NO:13 (L1) (1551) LTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPYVATTDFIAASRDHILSGAREYLSYL
 SEQ ID NO:14 (L2) (1543) LTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPYVATTDFIAASRDHILSGAREYLSYL
 SEQ ID NO:64 (L) (1543) LTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPYVATTDFIAASRDHILSGAREYLSYL
 SEQ ID NO:76 (L) (1543) LTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPYVATTDFIAASRDHILSGAREYLSYL
 SEQ ID NO:88 (L) (1543) LTISHPEIFRRIVNTGIHNQIKGPYVATTDFIAASRDHILSGAREYLSYL

Fig. 35 (4/5)

1601 1650
 SEQ ID NO:13 (L1) (1601) SSGQEDCYTFFNCQDGD LTPKMEQYLARRACLLTLLYNTGHQIPVIRSLT
 SEQ ID NO:14 (L2) (1593) SSGQEDCYTFFNCQDGD LTPKMEQYLARRACLLTLLYNTGHQIPVIRSLT
 SEQ ID NO:64 (L) (1593) SSGQEDCYTFFNCQDGD LTPKMEQYLARRACLLTLLYNTGHQIPVIRSLT
 SEQ ID NO:76 (L) (1593) SSGQEDCYTFFNCQDGD LTPKMEQYLARRACLLTLLYNTGHQIPVIRSLT
 SEQ ID NO:88 (L) (1593) SSGQEDCYTFFNCQDGD LTPKMEQYLARRACLLTLLYNTGHQIPVIRSLT
 1651 1700
 SEQ ID NO:13 (L1) (1651) PIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVNALLQNP KIDALVSNLYFTTR
 SEQ ID NO:14 (L2) (1643) PIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVNALLQNP KIDALVSNLYFTTR
 SEQ ID NO:64 (L) (1643) PIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVNALLQNP KIDALVSNLYFTTR
 SEQ ID NO:76 (L) (1643) PIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVNALLQNP KIDALVSNLYFTTR
 SEQ ID NO:88 (L) (1643) PIEKCKVLTEYNQQIEYADQEFSSVLKVVNALLQNP KIDALVSNLYFTTR
 1701 1750
 SEQ ID NO:13 (L1) (1701) RVLSNLRSCDKA RSYIEYLYTEDFGEKEDTVQYDIMTTNDIILTHGLFTQ
 SEQ ID NO:14 (L2) (1693) RVLSNLRSCDKA RSYIEYLYTEDFGEKEDTVQYDIMTTNDIILTHGLFTQ
 SEQ ID NO:64 (L) (1693) RVLSNLRSCDKA RSYIEYLYTEDFGEKEDTVQYDIMTTNDIILTHGLFTQ
 SEQ ID NO:76 (L) (1693) RVLSNLRSCDKA RSYIEYLYTEDFGEKEDTVQYDIMTTNDIILTHGLFTQ
 SEQ ID NO:88 (L) (1693) RVLSNLRSCDKA RSYIEYLYTEDFGEKEDTVQYDIMTTNDIILTHGLFTQ
 1751 1800
 SEQ ID NO:13 (L1) (1751) IEISYQGN SLHKFLTPDNAPGSLIPFSISPNSLACDPLHLLKSVGTSST
 SEQ ID NO:14 (L2) (1743) IEISYQGN SLHKFLTPDNAPGSLIPFSISPNSLACDPLHLLKSVGTSST
 SEQ ID NO:64 (L) (1743) IEISYQGN SLHKFLTPDNAPGSLIPFSISPNSLACDPLHLLKSVGTSST
 SEQ ID NO:76 (L) (1743) IEISYQGN SLHKFLTPDNAPGSLIPFSISPNSLACDPLHLLKSVGTSST
 SEQ ID NO:88 (L) (1743) IEISYQGN SLHKFLTPDNAPGSLIPFSISPNSLACDPLHLLKSVGTSST
 1801 1850
 SEQ ID NO:13 (L1) (1801) SWYKYAIAIYAVSEKRSARLGGS LYIGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLS
 SEQ ID NO:14 (L2) (1793) SWYKYAIAIYAVSEKRSARLGGS LYIGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLS
 SEQ ID NO:64 (L) (1793) SWYKYAIAIYAVSEKRSARLGGS LYIGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLS
 SEQ ID NO:76 (L) (1793) SWYKYAIAIYAVSEKRSARLGGS LYIGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLS
 SEQ ID NO:88 (L) (1793) SWYKYAIAIYAVSEKRSARLGGS LYIGEGSGSVMTLLEYLEPSVDIFYNLS
 1851 1900
 SEQ ID NO:13 (L1) (1851) FSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNSV VYKNTAKSECKLGFVQQFKPLWRDID
 SEQ ID NO:14 (L2) (1843) FSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNSV VYKNTAKSECKLGFVQQFKPLWRDID
 SEQ ID NO:64 (L) (1843) FSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNSV VYKNTAKSECKLGFVQQFKPLWRDID
 SEQ ID NO:76 (L) (1843) FSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNSV VYKNTAKSECKLGFVQQFKPLWRDID
 SEQ ID NO:88 (L) (1843) FSNGMNPPQRNYGLMPLQFVNSV VYKNTAKSECKLGFVQQFKPLWRDID
 1901 1950
 SEQ ID NO:13 (L1) (1901) IETNVTDPSE NFALNEIPMQSLKRVNCDVEFDRGMPIERVIQGYTHILL
 SEQ ID NO:14 (L2) (1893) IETNVTDPSE NFALNEIPMQSLKRVNCDVEFDRGMPIERVIQGYTHILL
 SEQ ID NO:64 (L) (1893) IETNVTDPSE NFALNEIPMQSLKRVNCDVEFDRGMPIERVIQGYTHILL
 SEQ ID NO:76 (L) (1893) IETNVTDPSE NFALNEIPMQSLKRVNCDVEFDRGMPIERVIQGYTHILL
 SEQ ID NO:88 (L) (1893) IETNVTDPSE NFALNEIPMQSLKRVNCDVEFDRGMPIERVIQGYTHILL
 1951 2000
 SEQ ID NO:13 (L1) (1951) VATYGLQQDSILWVKVYRTSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMS AKD
 SEQ ID NO:14 (L2) (1943) VATYGLQQDSILWVKVYRTSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMS AKD
 SEQ ID NO:64 (L) (1943) VATYGLQQDSILWVKVYRTSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMS AKD
 SEQ ID NO:76 (L) (1943) VATYGLQQDSILWVKVYRTSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMS AKD
 SEQ ID NO:88 (L) (1943) VATYGLQQDSILWVKVYRTSEKVFQFLLSAMIMIFGYVKIHRNGYMS AKD
 2001 2050
 SEQ ID NO:13 (L1) (2001) EEYILMSDCKEPVNYTAVPNILTRVSDLVSKNLSLIHPEDLRKVCETDS
 SEQ ID NO:14 (L2) (1993) EEYILMSDCKEPVNYTAVPNILTRVSDLVSKNLSLIHPEDLRKVCETDS
 SEQ ID NO:64 (L) (1993) EEYILMSDCKEPVNYTAVPNILTRVSDLVSKNLSLIHPEDLRKVCETDS
 SEQ ID NO:76 (L) (1993) EEYILMSDCKEPVNYTAVPNILTRVSDLVSKNLSLIHPEDLRKVCETDS
 SEQ ID NO:88 (L) (1993) EEYILMSDCKEPVNYTAVPNILTRVSDLVSKNLSLIHPEDLRKVCETDS
 2051 2100
 SEQ ID NO:13 (L1) (2051) LNLKCNHIYEKIIARKIPLQVSSTDSL LQLGGVINSVGSTDPREVATLS
 SEQ ID NO:14 (L2) (2043) LNLKCNHIYEKIIARKIPLQVSSTDSL LQLGGVINSVGSTDPREVATLS
 SEQ ID NO:64 (L) (2043) LNLKCNHIYEKIIARKIPLQVSSTDSL LQLGGVINSVGSTDPREVATLS
 SEQ ID NO:76 (L) (2043) LNLKCNHIYEKIIARKIPLQVSSTDSL LQLGGVINSVGSTDPREVATLS
 SEQ ID NO:88 (L) (2043) LNLKCNHIYEKIIARKIPLQVSSTDSL LQLGGVINSVGSTDPREVATLS
 2101 2150
 SEQ ID NO:13 (L1) (2101) SIECMDYVVSSIDL AILEANIVISESADLDLALMLGPFNLNKLKKIDTIL
 SEQ ID NO:14 (L2) (2093) SIECMDYVVSSIDL AILEANIVISESADLDLALMLGPFNLNKLKKIDTIL
 SEQ ID NO:64 (L) (2093) SIECMDYVVSSIDL AILEANIVISESADLDLALMLGPFNLNKLKKIDTIL
 SEQ ID NO:76 (L) (2093) SIECMDYVVSSIDL AILEANIVISESADLDLALMLGPFNLNKLKKIDTIL
 SEQ ID NO:88 (L) (2093) SIECMDYVVSSIDL AILEANIVISESADLDLALMLGPFNLNKLKKIDTIL

Fig. 35 (5/5)

2151 2200
 SEQ ID NO:13 (L1) (2151) KSSTYQLIPYWLRYEYSINPRSLSFLLITKLQQCRISWSDMITISEFRRKKS
 SEQ ID NO:14 (L2) (2143) KSSTYQLIPYWLRYEYSINPRSLSFLLITKLQQCRISWSDMITISEFRRKKS
 SEQ ID NO:64 (L) (2143) KSSTYQLIPYWLRYEYSINPRSLSFLLITKLQQCRISWSDMITISEFRRKKS
 SEQ ID NO:76 (L) (2143) KSSTYQLIPYWLRYEYSINPRSLSFLLITKLQQCRISWSDMITISEFRRKKS
 SEQ ID NO:88 (L) (2143) KSSTYQLIPYWLRYEYSINPRSLSFLLITKLQQCRISWSDMITISEFRRKKS
 2201 2247
 SEQ ID NO:13 (L1) (2201) KRPIFIKRVIGNQQLKSFFNESSSIVLTRAEVKVCIKFLGAIHKLK-
 SEQ ID NO:14 (L2) (2193) KRPIFIKRVIGNQQLKSFFNESSSIVLTRAEVKVCIKFLGAIHKLK-
 SEQ ID NO:64 (L) (2193) KRPIFIKRVIGNQQLKSFFNESSSIVLTRAEVKVCIKFLGAIHKLK-
 SEQ ID NO:76 (L) (2193) KRPIFIKRVIGNQQLKSFFNESSSIVLTRAEVKVCIKFLGAIHKLK-
 SEQ ID NO:88 (L) (2193) KRPIFIKRVIGNQQLKSFFNESSSIVLTRAEVKVCIKFLGAIHKLK-

Độ đồng nhất trình tự protein:

SEQ ID NO:14 so với SEQ ID NO:64: độ đồng nhất trình tự 99%
 SEQ ID NO:14 so với SEQ ID NO:76: độ đồng nhất trình tự 99%
 SEQ ID NO:14 so với SEQ ID NO:88: độ đồng nhất trình tự 98%

Độ đồng nhất trình tự ADN:

SEQ ID NO:12 so với SEQ ID NO:63: độ đồng nhất trình tự 99%
 SEQ ID NO:12 so với SEQ ID NO:75: độ đồng nhất trình tự 97%
 SEQ ID NO:12 so với SEQ ID NO:87: độ đồng nhất trình tự 97%